

Prognosztikai tényezők elemzése, valamint farmakokinetikai és farmakogenetikai vizsgálatok osteosarcomás gyermekek esetében

Doktori értekezés

Dr. Hegyi Márta

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kovács Gábor, PhD, Med. habil.

Hivatalos bírálók:

Dr. Szánthó András, egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Kajtár Béla, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Kulka Janina, egyetemi tanár, MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Demeter Judit, egyetemi tanár, MTA doktora

Dr. Kriván Gergely osztályvezető főorvos, Ph.D.

Budapest

2013

*Lányomnak, szüleimnek,
testvéreimnek*

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések jegyzéke	5
2	Bevezetés	9
3	Irodalmi összefoglaló	10
3.1	A gyermekkori osteosarcoma	10
3.1.1	Epidemiológia.....	10
3.1.2	Etiológia és genetika.....	12
3.1.3	Patológia	13
3.1.4	Kórlefolyás	14
3.1.5	Diagnózis és rizikó besorolás	16
3.1.6	A gyermekkori osteosarcoma kezelése.....	18
3.1.7	Metasztázis és recidíva	21
3.2	A methotrexate (MTX).....	22
3.2.1	Farmakodinámia	23
3.2.2	Farmakokinetika	26
3.2.3	Metabolizmus és gyógyszer-interakciók	28
3.2.4	Toxicitás	29
3.2.5	Rezisztencia	33
3.2.6	A nagy dózisú methotrexate bevezetésének jelentősége osteosarcomában. 34	
3.2.7	A gyógyszer-szint-monitorozás jelentősége a daganatterápiában	37
3.3	A methotrexate farmakogenetikai vizsgálata	39
3.3.1	ABC transzporterek	39
3.3.2	A methotrexate hatásmechanizmusában fontos további gének	46
4	Célkitűzés	49
5	Módszerek	50
5.1	Betegek	50
5.2	Toxicitás és farmakokinetikai paraméterek.....	51
5.3	Genotipizálási módszerek.....	54
5.3.1	DNS izolálás és a vizsgált polimorfizmusok kiválasztása.....	54

5.3.2	PCR-RFLP módszer	55
5.3.3	Real-Time PCR módszer	55
5.3.4	Egyéb genotipizálási módszerek	56
5.4	Statisztikai analízis	56
6	Eredmények	60
6.1	A gyermekkori osteosarcoma kezelésének eredményei hazánkban	60
6.2	Farmakokinetikai tényezők osteosarcomás gyermekek MTX kezelésében	68
6.3	Polimorfizmusok szerepe a methotrexate farmakokinetikájában és toxicitásában 75	
7	Megbeszélés.....	83
7.1	A gyermekkori osteosarcoma kezelésének eredményei hazánkban	83
7.2	Farmakokinetikai tényezők osteosarcomás gyermekek methotrexate kezelésében 87	
7.3	Polimorfizmusok szerepe a methotrexate farmakokinetikájában és toxicitásában 93	
8	Következtetések.....	105
9	Összefoglalás	107
10	Summary.....	108
11	Irodalomjegyzék	109
12	Saját publikációk jegyzéke	127
12.1	Értekezésben összefoglalt közlemények	127
12.2	Egyéb témában megjelent közlemények	128
	Köszönetnyilvánítás	129

1 Rövidítések jegyzéke

ABC	adenosine triphosphate binding cassette
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B, member 1
ABCC1	ATP-binding cassette, sub-family C, member 1
ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C, member 2
ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C, member 3
ABCC10	ATP-binding cassette, sub-family C, member 10
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G, member 2
AICAR	5-aminoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotid
ALL	akut limfoid leukémia
AUC0-48	koncentráció-idő függvény 48 órás görbe alatti területe
CI 95%	95%-os konfidencia intervallum
COSS	Cooperative Osteosarcoma Study Group
CTC	common toxicity criteria
CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4
DAMPA	2,4-diamino-10-metilpteroilsav
DHF	dihidrofolát
DHFR	dihidrofolát reduktáz
DWI	diffusion-weighted imaging
dUMP	deoxyuridin monofoszfátból
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EFS	event-free survival
EIA	enzim-inhibíciós assay
EORTC	Európai Daganatkutatási és -kezelési Szervezet

ETT TUKEB	Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság
FBJ osteosarcoma	Finkel, Biskis, és Jinkins által felfedezett vírus indukálta Osteosarcoma
FPGS	folilpoliglutamát-szintetáz
FR	folát receptor
G-CSF	granulocita kolónia stimuláló faktor
GGH	gamma-glutamil hidroláz
GGT	gamma-glutamil transzferáz
GOT	glutamát-oxálacetát transzamináz
GPT	glutamát-piruvát transzamináz
HD-MTX	nagy dózisú methotrexate
HPLC	high-pressure liquid chromatography
HWE	Hardy-Weinberg egyenlőség
KIR	központi idegrendszer
L	linker régió
LV	leukovorin
MAP	maximum a posteriori
MDR1	multidrug resistance 1
MDM2	mouse double minute 2
MRP1	multidrug resistance-associated protein 1
MTHFR	metiléntetrahidrofolát-reduktáz
MTX	methotrexate
MTX-PG	poliglutamált methotrexate
NBD	nukleotidkötő domén
NR1I2	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2

OAT	szerves anion transzporter család
OR	odds ratio
OS	overall survival
OSC	osteosarcoma
PCFT	proton-folát transzporter
PCR	polimerase chain reaction
PG	poliglutamált
RFC1	Reduced Folate Carrier 1
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RB	Retinoblastoma
RIA	radioimmunoassay
rs#	polimorfizmusok azonosítója az NCBI honlapon (reference SNP)
RT	real time
SD	szórás
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results (USA)
SLC19A1	solute carrier family 19 member 1
SNP	single nucleotid polymorphism
SXR	Steroid and Xenobiotic Receptor
SV40	Simian virus 40
$T_{\alpha 1/2}$	disztribúciós fázis felezési ideje
$T_{\beta 1/2}$	eliminációs fázis felezési ideje
TDM	therapeutic drug monitoring
THF	tetrahidrofolát
TMD	transzmembrán domén

TMP	timidin-monofoszfátot
TYMS	thymidylate synthetase
UTR	nem átírózó régió

2 Bevezetés

Az osteosarcoma a leggyakoribb primer malignus csonttumor gyermek és fiatal felnőtt korban, bár abszolút gyakorisága a rosszindulatú daganatok között alacsony. Primitív csontképző mesenchymalis szövetből származik, és jellemző rá a tumorsejtek osteoid illetve éretlen csontszövet termelése a proliferáló malignus orsósejtes strómában. Az őssejt kutatásokból nyert ismereteink rohamos bővülésével újabb bizonyítékok azt támasztják alá, hogy az osteosarcoma a differenciáció betegségének tekinthető, melynek során genetikai és epigenetikai változások megszakítják osteoblastok mesenchymalis őssejtekből való differenciálódását ¹. Az Egészségügyi Világszervezet szövettani besorolása a csont tumorokat centrális (medulláris) és felszíni (perifériás) csoportokra osztja, melyeken belül még számos altípus különíthető el. Az osteosarcomát hagyományosan osteoblastos, chondroblastos, fibroblastos és egyéb, ritkán előforduló alcsoportokra osztjuk a domináns extracelluláris mátrix típusától függően ².

Az 1920-as években egy nemzetközileg elismert idős sebész professzor egy csont sarcomáról szóló tudományos összejövetelen így összegezte az elhangzottakat. „Ha nem operáljuk meg őket, meghalnak. Ha megoperáljuk őket, ugyanúgy meghalnak Uraim, ezt a konferenciát az imádkozással kéne lezárunk.” ³. Az 1960-as és az 1970-es évek elején hasonló sajnálatos következtetéseket vonhattak le a kutatók. Az agresszív sebészi kezelés ellenére a gyermekek több mint 80%-ában észlelték a tumor kiújulását. Ezek a gyermekek meg is haltak a betegségükben a diagnózis után 5 éven belül ⁴. Az elmúlt 40 évben észrevehető előrehaladás mutatkozott az osteosarcoma biológiai és etiológiai hátterét és terápiáját illetően. A hatásos adjuváns kemoterápia kifejlesztésének, a sebészet és a diagnosztikus képalkotó eljárások fejlődésének köszönhetően a végtagokra lokalizálódó, áttét nélküli daganatos megbetegedések nagy része gyógyíthatóvá vált. A sebészi technika fejlődése lehetővé tette a túlélő betegek életminőségének javulását a végtagmegtartó műtétek biztonságos alkalmazása által. A genetika és a molekuláris biológia robbanásszerű fejlődése egyre szélesebb körű bepillantást tesz lehetővé a tumor keletkezésének mechanizmusába, és új kutatási irányokat vetít elénk.

3 Irodalmi összefoglaló

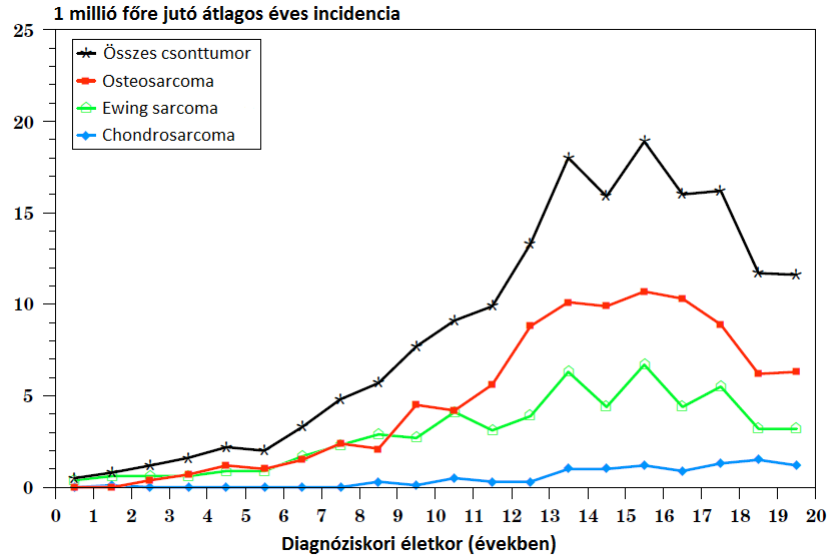
3.1 A gyermekkori osteosarcoma

3.1.1 Epidemiológia

Az daganatok közül a csont tumorok a ritkábbak közé tartoznak. Ennek ellenére az osteosarcoma az ötödik leggyakoribb daganat csoport gyermekekben ⁵. Az osteosarcoma incidenciája 0-14 éves kor között 4,0/egymillió fő/év (95% CI: 3,5-4,6), 0-19 éves kor között 5,0/egymillió fő/év (95% CI: 4,6-5,6) ⁶. A gyermekkori csontdaganatoknak mindössze fele rosszindulatú. Ezek között az osteosarcoma az összes primer csont sarcomák 45%-át, az összes malignus csontdaganat 20%-át teszi ki 20 éves kor alatt ⁷. Serdülő korban és fiatal felnőtt korban a rosszindulatú daganatos megbetegedésekkel összefüggő halálozás okai között a második leggyakoribb az osteosarcoma ⁸.

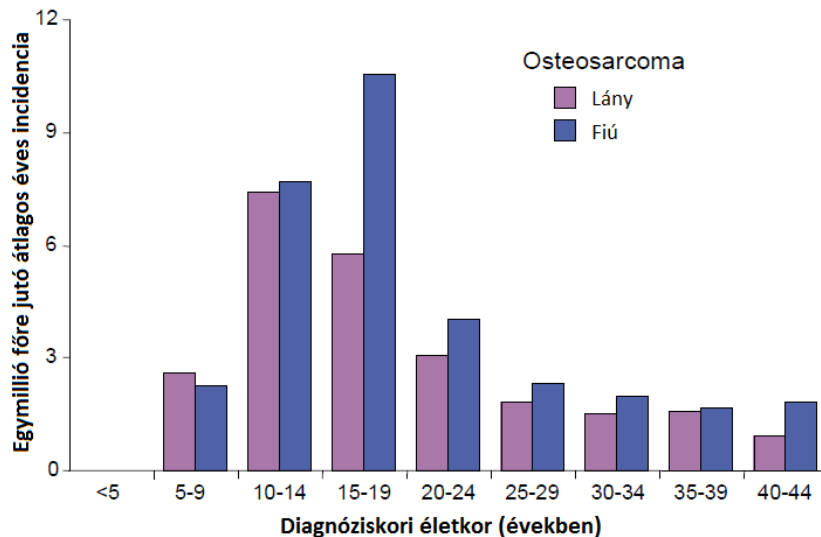
Az osteosarcomás betegek medián életkora 16 év, fiú predomanciával (a fiú : lány arány = 1,6 : 1). Az osteosarcoma gyakoriságának csúcsa a második életévtizedre esik, amikor serdülőkorban hirtelen felgyorsul a növekedés (1.ábra), tehát kapcsolat lehet a gyors csontnövekedés és ezen rosszindulatú betegség kialakulása között. Az osteosarcomás betegek magasabbak, mint a korosztályukhoz tartozó többi gyermek ⁹. Az osteosarcoma fiatalabb életkorban jelenik meg lányokban, mint fiúkban (2.ábra), megfelelően a lányok előrehaladottabb csont korának és a korábban bekövetkező serdülőkori gyors növekedésnek ¹⁰. A fiúk esetében nagyobb csonttér fogat gyarapodás történik egy hosszabb növekedési periódus alatt, ami szintén fokozhatja az osteosarcoma kialakulásának rizikóját. Az osteosarcoma a leggyorsabban növekvő csontok metaphysisében (distális femur, proximális tibia és proximális humerus) hajlamos a kialakulásra. A humerus tumorok fiatalabb korban jelennek meg, mint a tibia és a femur daganatai, ami párhuzamba vonható a humerus korábbi életkorban bekövetkező gyors növekedésével ¹⁰. Tehát a daganat ott jelenik meg a leggyakrabban, ahol a legnagyobb növekedés észlelhető a csont hosszában és méretében. Ez arra a feltételezésre enged következtetni, hogy a csont tumorok a csont hossznövekedésének és remodellingjének normális folyamatában bekövetkező aberráció folyamányaként

jönnek létre ¹⁰. A gyorsan proliferáló sejtek különösen fogékonyak az onkogén hatásokra, mitotikus hibákra, vagy egyéb olyan eseményekre, melyek neoplasztikus transzformációhoz vezetnek ⁹.



1. ábra: A csont tumorok előfordulása életkor szerint. USA, 1975-95. Forrás: SEER, National Cancer Institute

Gurney, J.G., Swensen, A.R. & Bulterys, M. Malignant Bone Tumors. in Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995, Vol. No. 99-4649. (eds. Ries LAG, et al.) (National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub., Bethesda, 1999).



2. ábra: Az osteosarcoma előfordulása életkor és nemek szerint. USA, 1975-2000. Forrás: SEER, National Cancer Institute

Mascarenhas, L., et al. Malignant Bone Tumors. in Cancer Epidemiology in Older Adolescents and Young Adults 15 to 29 Years of Age, Including SEER Incidence and Survival: 1975-2000, Vol. NIH Pub. No. 06-5767. (eds. Bleyer A, O'Leary M, Barr R & LAG, R.) (National Cancer Institute, Bethesda, 2006).

3.1.2 Etiológia és genetika

A fiatalkori osteosarcoma etiológiája tisztázatlan. A legtöbb osteosarcoma tumor sporadikus megjelenésű, nem mutat családi halmozódást⁵. Potenciális kiváltói között szerepel a besugárzás, kémiai tényezők (például beryllium oxid) és vírusok, mint például egérben az FBJ vírus, mely src-onkogént tartalmaz¹¹. Az SV40 vírus DNS-ét a humán osteosarcomás tumorok 50%-ában kimutatták¹². A besugárzott terület körüli alacsony sugárdózis károsíthatja a sejt reparatív mechanizmusait a sejthalál bekövetkezése nélkül, ami jelentősen megnöveli ezeken a területeken a malignus transzformáció veszélyét. A posztirradiációs szarkómák 80-90%-a a csontokban fejlődik ki, és általában 2-3 év látencia idő után jelenik meg¹³. A sugárzás indukálta osteosarcomákat leggyakrabban radioterápiával kezelt Ewing szarkómák (23,9%), rhabdomyosarcomák (17,4%), retinoblastomák (12,8%), Hodgkin lymphomák (9,2%), agytumorok (8,3%) és Wilms' tumorok (6,4%) előzik meg¹⁴. Paget kór, égési sérülés vagy trauma is hozzájárulhat az osteosarcoma patogeneziséhez. Bizonyos örökletes betegségek esetén, úgy mint Rothmund-Thomson szindróma, Bloom szindróma és Li-Fraumeni szindróma, magasabb az osteosarcoma kialakulásának esélye¹¹.

Az osteosarcoma a differenciációs útvonal bármelyik sejtjéből származhat a humán mesenchymalis őssejttől az érett osteoblastig. Sok tanulmány úgy véli, hogy ezek a tumorok osteoblastokból, vagy osteoblastos fejlődési vonal irányba elkötelezett sejtekből indulnak ki, mivel képesek osteoid, alkalikus foszfatáz, osteocalcin, osterix és sialoprotein termelésre¹⁵. A magas malignitású osteosarcomák azonban gyakran multilineáris differenciációt mutatnak. Ezekben a daganatokban elkülöníthetők fibrózus porc- és csontszövetek is, ami arra utal, hogy az a sejt, amiből az osteosarcoma kialakult pluripotensebb, mint egy érett osteoblast¹⁶.

Az osteosarcomát tekinthetjük a differenciáció betegségének, melyet genetikai és epigenetikai változások hoznak létre, megszakítva az osteoblast differenciációt a mesenchymális őssejtből. Osteosarcomára specifikus transzlokációt vagy genetikai abnormalitást eddig nem azonosítottak. Mindazonáltal ezen tumorok közel 70%-ában számos citogenetikai rendellenesség kimutatható. Leggyakoribbak ezek közül az 1. kromoszóma többlete, illetve a 9., 10., 13., és 17. kromoszóma elvesztése¹.

A tumorszuppresszor géneket érintő molekuláris hibák fontos szerepet játszanak a szarkómák kialakulásában. A retinoblastoma (*Rb1*) vagy a *p53* gén örökletes hibáját hordozó betegekben nagyobb az osteosarcoma kialakulásának veszélye, ahogy más malignitások esélye is. Az *MDM2* (mouse double minute 2) onkogén a *p53* transzkripciós fehérje egyik cél génje, mely egy nukleáris foszfo proteint kódol. Az *MDM2* fehérje a *p53* proteinhez kötődik és így negatív feedback mechanizmussal gátolja annak működését. Az *MDM2* amplifikációja és overexpressziója emelkedett *MDM2*-*p53* kötődéshez vezethet, ami inaktiválja a *p53* funkciót¹⁷.

Az *Rb1* lókuszt heterozigótaságának elvesztése (loss of heterozygosity) az osteosarcomák 60-70 %-ában jelen van. Az *Rb* fehérje a sejtciklus G1/S átmenetének fontos szabályozója. A G1/S átmenet alatt az *Rb* fehérje foszforilálódik, ami az addig defoszforilált *Rb* fehérjéhez kötött E2F faktorok aktiválódásához vezet, ezáltal elősegítve a DNS-szintézist és a G1/S átmenetet¹. A molekuláris célpontok közül, melyek az osteosarcoma kialakulásakor módosulhatnak, az *Rb1* gén inaktiválódik a leggyakrabban. A humán osteosarcoma tumorok, valamint az in vivo és in vitro modell rendszerek vizsgálatai alapján publikált adatok alátámasztják a retinoblastoma gén család szerepét a csont fejlődésében és tumorigenezisében¹⁸.

3.1.3 Patológia

Az osteosarcoma a rosszindulatú csonttermelő daganatok közé tartozik. A tumor állományát osteoid tartalma és annak elmeszesedési foka határozza meg, így tapintata az egészen puhától a csontkeményig változhat. A lágyrészbe törő tumor is általában jól elkülönül az izomállománytól, mivel általában periosteum határolja. Az érintett csont metszéspapján, a tumortól néhány centiméterre, esetenként makroszkóposan is különálló tumorszigeteket, úgynevezett „skip” metasztázisokat látni¹.

Az osteosarcoma szövettani mintázata nagyon változatos képet mutat, mivel a tumor sejtek különböző típusú extracelluláris mátrixot termelnek, és különböző differenciáltsági fokot érnek el. A szövettani kép nem csak a betegek között mutat nagy variációt, de egyazon tumoron belül is előfordulhatnak különböző mintázatok. A szövettani képen számos atípusos mitózis látható, gyakoriak a bevérzések és nekrozisok. Az osteosarcomák alcsoportokba való klasszifikációja nem csak a domináns szövettani képtől függ, hanem az anatómiai elhelyezkedéstől és sokszor a szövettani

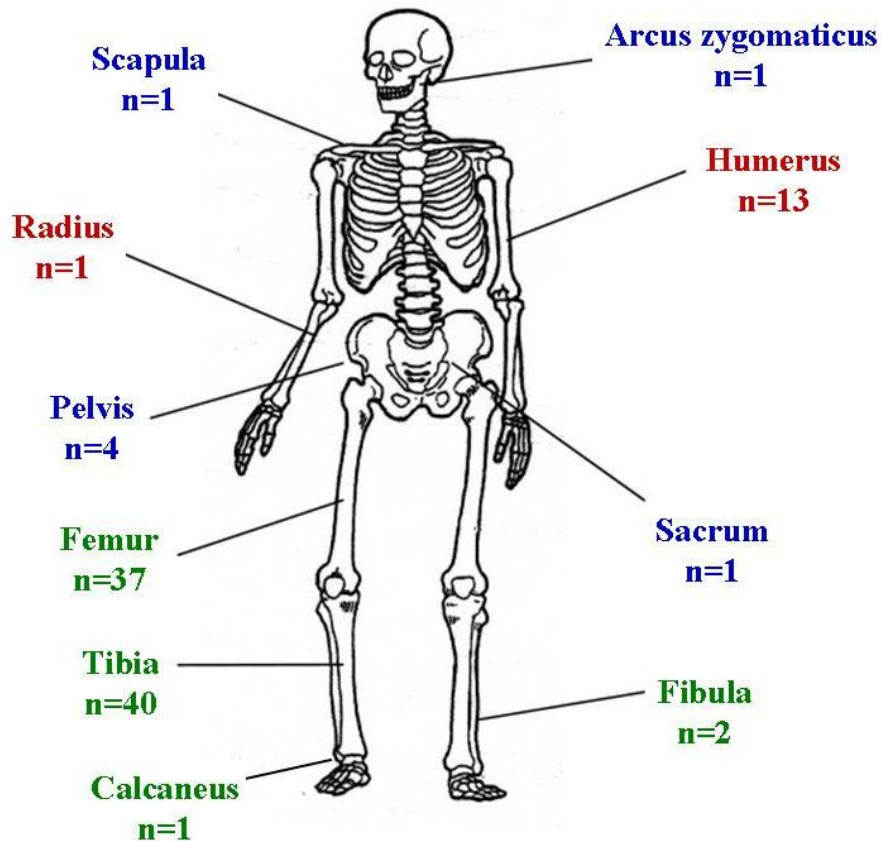
grade-től is. A leggyakoribb a centrális (intramedulláris) osteosarcoma (93%). Ennél jóval ritkábban fordulnak elő a csont felszínén növekvő osteosarcomák (7%). A centrális tumorok közül leggyakoribb a konvencionális high-grade osteosarcoma, mely osteoblastos, chondroblastos és fibroblastos altípusokra osztható az extracelluláris mátrix domináns összetevőjétől függően. A negyedik altípus a pleomorf osteosarcoma, melyben fibrohistiocytás vagy epitheloid sejtek jelenhetnek meg. Nehéz diagnosztizálni, mert az extracelluláris mátrix mennyisége csekély, és az elváltozás röntgenáteresztő ². Az osteosarcoma különböző altípusait az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat Osteosarcoma altípusok (EURAMOS protokoll)

CENTRÁLIS (MEDULLÁRIS)
<ol style="list-style-type: none"> 1. Konvencionális high-grade central osteosarcoma 2. Teleangiectatikus osteosarcoma 3. Intraosseális jól differenciált (low-grade) osteosarcoma 4. Kissejtes osteosarcoma
FELSZÍNI (perifériás)
<ol style="list-style-type: none"> 1. Parosteális (juxtacorticális) jól differenciált (low-grade) osteosarcoma 2. Periosteális osteosarcoma – alacsony és közepes malignitású osteosarcoma 3. High-grade felszíni osteosarcoma

3.1.4 Kórlefolyás

Az osteosarcoma jellegzetes predilekciós helyeken alakul ki a csontrendszerben, illetve az adott csonton belül is. A csöves csontokon belül elsősorban a legaktívabb növekedés helyén, a metaphysisben alakul ki, és csak mintegy 10-15 %-ában az epiphysisben, diaphysisben. A gyerek- és serdülőkorban a leggyakrabban érintett csontok a femur (44%), a tibia (17%) és a humerus (15%) ⁷. (3. ábra)



3. ábra Osteosarcoma előfordulási helyei a Semmelweis Egyetem II. Gyermekklinikájának beteganyaga alapján (1988-2006).

A legtöbb osteosarcomás beteg fájdalmat és duzzanatot panaszol az érintett régióban. Általában trauma vagy testmozgás során történt sérülés után fordulnak orvoshoz. Mindkettő gyakran fordul elő gyermek és adolezscens korban. A fájdalom kezdetben intermittáló, később állandóvá, terheléstől függetlenné válik, sőt éjjel kifejezetten intenzívebb. Ha a fájdalom a környező ízületek felé kisugárzik, ez annak a jele, hogy az intraossealis tumor áttörte a corticalist, és feszíti a periosteumot. A daganat a lágyrészekbe hatolva nyomhatja, vagy infiltrálhatja a környező régiót. Előrehaladott állapotban a fájdalom csillapíthatatlanná válik. Az egyre növekvő duzzanat a tumor terjedését jelenti a környező szövetek felé. Tapintata a daganat tumor-csontképző intenzitásától függ. A duzzanat felett a bőr meleg tapintatú, különösen, ha a tumor nagy kiterjedésű és puha konzisztenciájú. A bőr a tumor fölött feszessé és fénylővé válhat. Ha a daganat a corticalist áttörve, a mélyebb vénák nyomásával pangást okoz, a tumor felett

gyakran látható tágult, subcutan vénás hálózat. A mozgáskorlátozottság a fájdalom és a tumor növekedésének következménye. Ritkán előforduló tünet lehet a fogyás, illetve előrehaladott stádiumban a nagy destrukció miatt az érintett csont patológiás törése ¹⁹.

3.1.5 Diagnózis és rizikó besorolás

A képalkotó vizsgálatok elengedhetetlenek az osteosarcoma diagnózisához. Rosszindulatú csontdaganat gyanúja esetén az első lépés a hagyományos röntgen vizsgálat. A röntgen képen általában a normál trabekuláris szerkezetet átható destrukció látható elmosódott, molyrágásszerű határokkal. Látható továbbá intenzív periosteális csont képződés, mely elemeli a cortexet, ezzel létrehozva az úgynevezett Codman háromszöget. A corticalis és az elemelt periosteum között a corticalisra merőleges, sugaras spiculumok húzódhatnak. Az osteosarcoma radiológiai megjelenése nagyon változatos, de a differenciáldiagnózisban segítségünkre lehet, hogy ez a tumor általában a metaphysealis centrumra lokalizálódik. A daganat kiterjedtségének megállapításához további képalkotó vizsgálatokra van szükség. Mind a lágyrész-, mind az intramedullaris kiterjedés megítélésében elengedhetetlen a szomszédos ízületek MR-vizsgálata. A daganat kiterjedésének megállapításán túl, a megfelelő műtéti beavatkozás megtervezéséhez is feltétlenül szükséges az érintett régió CT- és / vagy MRI-vizsgálata. A távoli metasztázisok kizárása céljából csont szcintigráfiára, mellkas röntgenre, illetve mellkasi CT-vizsgálatok elvégzésére is szükség van ¹⁵. A laboratóriumi vizsgálatok diagnosztikus értéke osteosarcománál korlátozott értékű. Az esetek 50%-ában emelkedik a szérum alkalikus foszfatáz szintje a fokozott osteoblast aktivitás következtében. A végleges diagnózis a daganatból vett minta szövettani vizsgálata alapján mondható ki.

A betegek rizikó besorolása a preoperatív kemoterápia valamint radikális műtét után történik a kezdeti tumor volumen és a tumor sejtek kemoterápiára adott válasza alapján (2. táblázat). Az osteosarcoma szövettani grading-je fontos mind a tumor onkológiai staging meghatározásához, mind a műtét utáni adjuváns kemoterápia megválasztásához ². A kemoterápiára adott szövettani választ a műtéti anyag szövettani vizsgálata során határozzuk meg. A neoadjuváns kemoterápia hatására bekövetkezett nekrozis mértékével jellemezhető. A COSS protokollnak megfelelően jó kemoterápiás válasznak tekintethető, ha a túlélő tumor sejtek aránya kevesebb, mint 10%. Azon

beteg, akiknél már a primer tumor diagnosztizálásakor is jelen volt korai áttét, a rizikó besorolás a metasztázistól függetlenül ugyanilyen módon történik.

2. táblázat Rizikócsoporthatározás a COSS-protokoll szerint

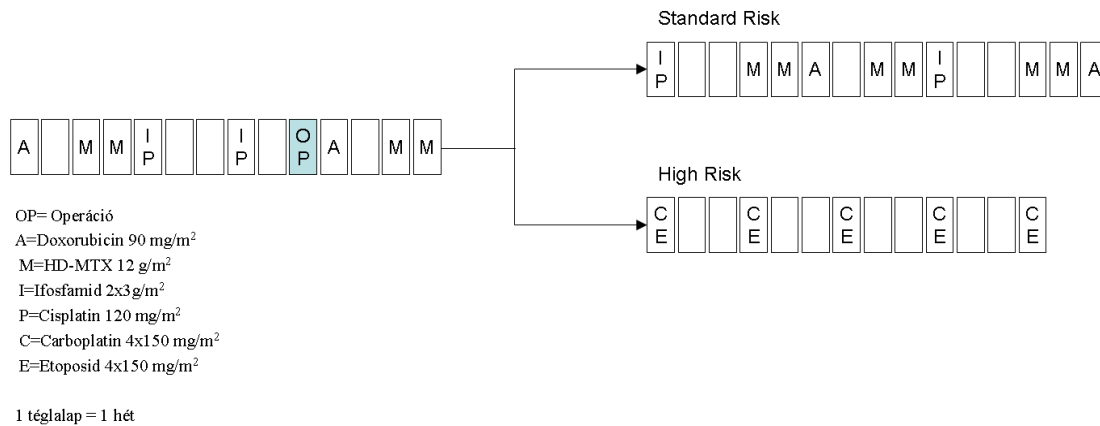
Rizikócsoporthatározás	
Alacsony rizikójú csoport	a tumor térfogata ≤ 70 ml, a szövettani választól függetlenül, vagy
	a tumor térfogata 70-150 ml és I-II.fokú szövettani válasz
Standard rizikójú csoport	a tumor térfogata 70-150 ml és III-IV.fokú szövettani válasz, vagy
	a tumor térfogata ≥ 150 ml és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

A kemoterápiára adott szövettani válasz, a kezdeti tumor méret, az elhelyezkedés (törzsi lokalizáció messze a legrosszabb), az alkalikus foszfatáz szint, a p-glikoprotein expresszió és a metasztázis jelenléte független rizikófaktoroknak tűnnek osteosarcoma esetében²⁰. A Paget kór egy örökletes csont rendellenesség, melyet gyors csont remodelling jellemez, ami abnormális csontképződéshez vezet. A Paget kóros betegek közel 1%-ánál alakul ki osteosarcoma, és ezeknek a betegeknek a prognózisa meglehetősen rossz¹.

3.1.6 A gyermekkori osteosarcoma kezelése

A csont szarkomák kezelésének célja a beteg meggyógyítása mind a primer tumorból, mind az összes (mikro-) metasztázisból, megőrizve közben a lehető legtöbb végtag funkciót, és a lehető legkevesebb késői mellékhatást okozva. Az osteosarcoma kezelése szoros multidiszciplináris együttműködést igényel. Indukciós neoadjuváns kemoterápiával kezdődik, amit a primer tumor (és ha van, akkor a metasztázis) lokális terápiája, majd további adjuváns kemoterápia követ.

Betegeink kezelése a német vezetésű Cooperativ Osteosarcoma Study Group által meghatározott COSS86, majd később a COSS96 protokollon alapult, mely neoadjuváns és adjuváns kemoterápiát, valamint radikális műtétet foglalt magába (4.ábra). A különbség a két protokoll között az volt, hogy a COSS96 protokollban az alacsony rizikójú ág kevesebb kemoterápiás blokkot tartalmazott, és bevezettek egy új kísérleti ágat, melyben a standard ághoz képest több alkalommal alkalmaztak MTX kezelést. Az alacsony rizikójú ágat a munkacsoport német vezetői hamar betiltották, mert gyakrabban alakult ki utána recidíva. Hazánkban soha nem is alkalmazták, és Magyarország nem is vett részt a COSS munkacsoport hivatalos tanulmányában, így a kísérleti ág sem lett bevezetve. Magyarországon 1988-2006 között az osteosarcomás gyermekeket a 4. ábra Az osteosarcoma kezelése a Semmelweis Egyetem II. Gyermekklinikán 1988-2006 között látható séma szerint kezelték.



4. ábra Az osteosarcoma kezelése a Semmelweis Egyetem II. Gyermekklinikán 1988-2006 között

Sebészi terápia

Az osteosarcoma lokális kezelésében minden esetben, amikor csak lehetséges sebészi megoldásra kell törekedni.²¹ A neoadjuváns kemoterápia hatására a műtétek morbiditása csökkent. A képalkotó vizsgálatok és a protetizálás fejlődése az ortopédusok számára pontosabb preoperatív tervezést és műtéti megoldások szélesebb választékát tette lehetővé. Ezek a lehetőségek jobb sebészi technikák kifejlődéséhez vezettek, kisebb mértékű radikalitással és kevesebb amputációval. Az ortopédiai sebészetben más sebészi területekhez hasonlóan egyre inkább helyet kapnak a minimálisan invazív beavatkozások, a számítógép által vezérelt műtétek és a molekuláris medicina által nyújtott lehetőségek, mint lehetséges kezelési utak. Az olyan eljárások, mint a csípő disarticulatio és az amputáció, ellentmondanak ennek a trendnek, és állandó viták tárgyát képezik²². Már többféle rekonstrukciós technika szóba jöhet. Ilyenek például az allograft beültetés, a tumor endoprotézis, a vegyes allograft protézis vagy arthrodesis. Ezek egyre népszerűbbek a rosszindulatú tumorok rezekciója után is.

Adjuváns és neoadjuváns kezelés

Mióta az 1970-es években bevezették az intenzív kemoterápiát, az osteosarcoma túlélése 10-20 %-ról 50-80 %-ra emelkedett. Doxorubicin, ciszplatin, ifosfamid és MTX a leghatékonyabb citosztatikus szerek osteosarcomában¹⁵.

A preoperatív kemoterápia első gyógyszere az antraciklinek családjába tartozó doxorubicin, amit a *Streptomyces peucetius* var. *caesius* termel²³. A doxorubicin két fő mechanizmuson keresztül fejt ki tumor ellenes hatását. Az egyik a DNS interkalációja, mely a DNS szintézis gátlásához, illetve a topoizomeráz II enzim funkciójának elvesztéséhez vezet²⁴. A másik a szabadgyökök termelődése, mely mind a DNS-t, mind a sejt membránt károsítja²⁵. A doxorubicin akut mellékhatásai közé tartozik a hányinger, hányás, mucositis, citopénia és a szív ritmuszavarok, hosszú távú mellékhatásként pedig dilatatív cardiomyopathia alakulhat ki²⁶.

Az osteosarcoma kezelésének alappillére nagy dózisú intravénás methotrexate (MTX) kezelés. A MTX daganatellenes antimetabolit hatása a folsav metabolizmus kompetitív reverzibilis gátlásán keresztül valósul meg, ezáltal gátolja a DNS, az RNS valamint a fehérje szintézist és a sejtek osztódását. Nagyobb dózisú MTX a csontvelő és a gastrointestinalis nyálkahártya gyorsan osztódó sejteire toxikus hatással van, és gyakran társul hozzá a vese-, illetve májszövet károsodása. A súlyos mellékhatások folinát adásával megelőzhetők, illetve enyhíthetők²⁷. A MTX-ről részletesebben a következő fejezetben írok.

A következő lépés az ifosfamid és cisplatin blokk. Az ifosfamid a DNS-hez kovalensen kötődő alkilező szerek családján belül a mustárnitrogén származékok közé tartozik. A leggyakoribb mellékhatásai a hányinger, hányás, alopecia, húgyhólyag irritáció, hemoglobinuria valamint vese toxicitás. Az ifosfamid nephrotoxikus hatását uromihexán kezeléssel lehet csökkenteni. A cisplatin a DNS-hez kovalensen kötődő platina koordinációs komplexek csoportjába tartozik. A cisplatin több különböző módon alkot keresztkötéseket a DNS-en belül, ezzel lehetetlenné téve a gyorsan osztódó sejtek számára a DNS megkettőződését a mitozishoz. A sérült DNS repair mechanizmusokat indít el, melynek sikertelensége aktiválja az apoptózis folyamatát. A cisplatin kezelésnek súlyos mellékhatásai lehetnek. A leggyakoribb ezek közül a csontvelő károsodás, de az ototoxicitás, neurotoxicitás és nephrotoxicitás szintén gyakori²⁸.

A műtét után a betegeket rizikócsoportokba soroljuk (2. táblázat), és további 6-8 hónap gyógyszeres kezelés következik (4.ábra). A műtétet követően a magas rizikójú kezelési ágban két új gyógyszer jelenik meg: a carboplatin és az etopozid. A carboplatin nagyon hasonló a cisplatinhoz. Szintén keresztkötéseket hoz létre a DNS-ben és gátolja

a tumor sejtek proliferációját, de toxikus mellékhatásai jobban tolerálhatók, mint a cisplatiné. Az etopozid a replikációs fehérjékre ható citosztatikumok közül a topoizomeráz gátlók közé tartozik. A topoizomeráz II kontrollálja a DNS szerkezetének változásait. A kezelést az etopozid által okozott toxicitás korlátozza. Ezek közül a legfontosabb a csontvelő szuppresszió, mely a fehérvérsejt szám csökkenésével infekciókhoz, a vörösvérsejtszám csökkenésével anaemiához és a trombocita szám csökkenésével vérzésekhez vezethet. Emellett előfordulhat alopecia, hányás, stomatitis és hasmenés ²⁸.

3.1.7 Metasztázis és recidíva

A diagnózis időpontjában a betegek 20%-ában már távoli áttét mutatható ki. Az áttétképzés módja lehet közvetlen (pericapsularisan) illetve hematogén. Hematogén úton az osteosarcoma leggyakrabban a tüdőbe ad áttétet. Az osteosarcoma a nyirokcsomókba ritkábban ad áttétet, mint más malignus tumorok. A tüdő metastázisok vagy skip léziók, multiplex csont áttétek, illetve a szomszédos ízületekbe való terjedés legjobban CT vagy MR vizsgálattal detektálható, de a metastázisok felismerésében segítségünkre van a csontszcintigráfia is ¹⁵. A diagnóziskor áttétes, vagy a recidívált esetek prognózisa rossz. A tüdő áttétek standard kezelése sebészi, melynek során a teljes rezekcióra kell törekedni. Az műtéti kezelésen átesett áttétes betegek túlélése 5 év után 36%, 10 év után 26% körül mozog. A második metasztaszektómia után a túlélési esély ugyanakkora, mint az első műtét után, éppen ezért visszaesett metasztatikus osteosarcoma esetén mindig fontolóra kell venni az újraoperálás lehetőségét is ²⁹.

Ha nem sikerült a tumor komplett rezekciója, az jelentősen megnöveli a lokális recidíva veszélyét, és rontja a prognózist. Az irodalomban három faktort említenek következetesen, melyek lokális recidívához vezetnek: inadekvát metszéshatár (az excízió a lézióban, vagy marginálisan van), végtagmegtartó műtét azoknál, akiknél amputációra lett volna szükség és a preoperatív kemoterápiára adott rossz válasz. Lokális relapszusban szenvedő betegek esetében lényegesen nagyobb esélye van a metastázis kialakulásának, mint a recidíva nélküli esetekben. Izolált lokális relapszus esetén nem olyan rossz a prognózis, mint ha metastázis is kialakul mellé ³⁰.

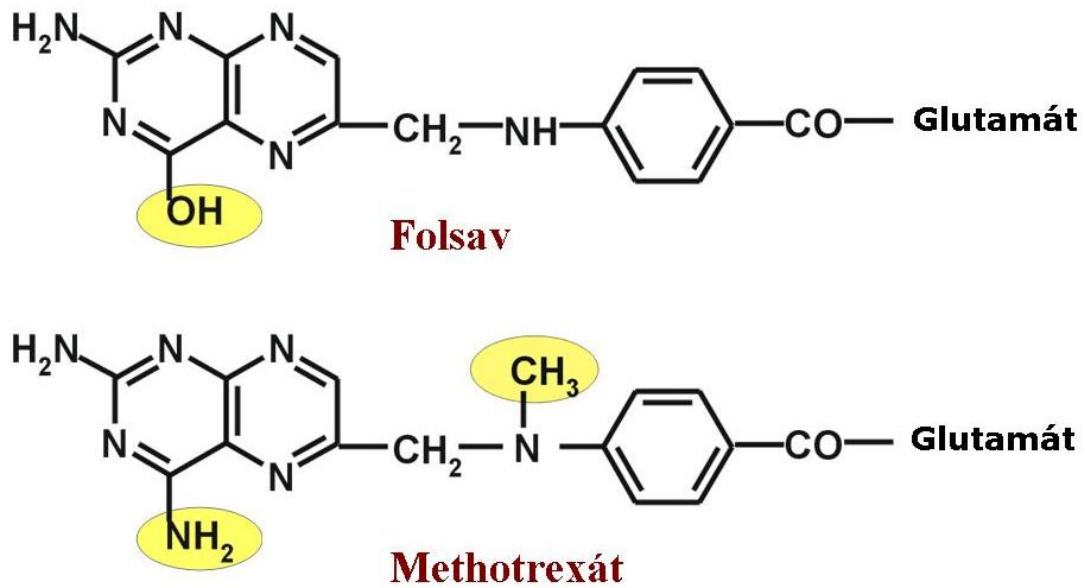
A gyermekkori daganatok túlélőinek száma egyre emelkedik, ami a figyelmet a kedvezőtlen hosszú távú következmények felé fordítja. Az egyik legnyugtalanítóbb szövődmény a rosszindulatú daganat terápiája után a második rosszindulatú daganat kialakulásának veszélye. A primer malignus csont tumorok kezelése után a második solid rosszindulatú daganat kialakulásának kumulatív incidenciája relatíve alacsony, 1,4% a következő 10 évben. Az osteosarcoma túlélőinek körében a második solid malignus tumor kialakulásának általános 10 éves kumulatív incidenciája 0.9%³¹.

3.2 A methotrexate (MTX)

A MTX az első olyan gyógyszerek közé tartozik, amely monoterápiában alkalmazva eliminált humán rosszindulatú daganatot (choriocarcinómát)³².

Napjainkban a MTX-ot emlőtumor, osteosarcoma, fej-nyaki daganatok, agytumorok, choriocarcinoma, urotheliumdaganat, akut lymphoblastos leukemia (ALL) és egyes non-Hodgkin-lymphomák terápiájában használják. Számos nem daganatos betegség, mint például psoriasis, rheumatoid arthritis, dermatomyositis, gyulladásoos bélbetegségek, Wegener-granulomatosis, sarcoidosis, HIV-asszociált bakteriális és parazitás fertőzések kezelésében is alkalmazzák³³.

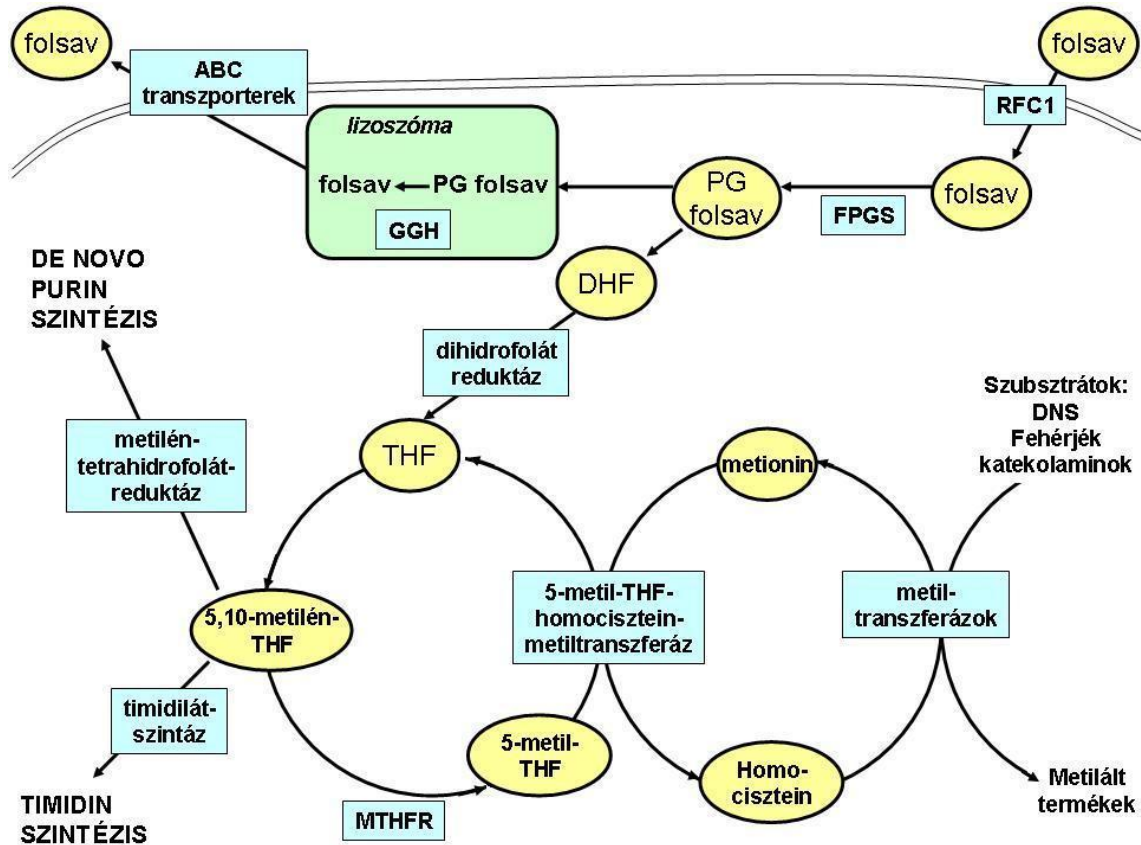
A MTX pteridinből, p-amino-benzoésavból és L-glutaminsavból felépülő folsavszármazék: 4-amino-4-dezoxi-10-metilpteroilglutaminsav²⁸. Molekulaszerkezete a folsavétól abban különbözik, hogy a folsavban a pteridin gyűrűn az aminocsoport helyén oxocsoport van, és nincs metilcsoport a 10-es nitrogénatomon. (5.ábra)



5. ábra A MTX és a folsav kémiai szerkezete

3.2.1 Farmakodinámia

A MTX a folsav antagonistá citsztatikumok közé tartozik. A folátok a szerin és metionin nukleotid prekursorok szintézisében vesznek részt, kofaktorok az egyszénatomos transzfer reakciókban. Mivel az emlősök nem képesek de novo folátszintézisre, ezen származékok felvétele a sejtbe feltétlen szükséges a sejt növekedéséhez és a szövetregenerációhoz. A MTX sejtbe bejutva gátolja a nukleotidok szintéziséhez szükséges kofaktorok termelődését, így a gyorsan osztódó daganatsejtek elpusztulnak a DNS szintézishez szükséges nukleotidok hiánya miatt. A MTX citotoxikus hatását az S fázisban lévő sejtekre fejt ki, mert ekkor van szükség a DNS szintézishez a purin- és pirimidinbázisokra³².



6. ábra A folsav útja a sejtben. RFC1: redukált folát karrier, FPGS: folilpoliglutamát-szintetáz, GGH: gamma-glutamil-hidroláz, PG:poliglutamált, DHF: dihidrofolát, THF: tetrahydrofolát, MTHFR: metilén-tetrahydrofolát reduktáz.

A sejtbe a redukált folát karrier molekulán (RFC1), folátreceptoron vagy anionos transzporterrel át juthatnak be a folsavszármazékok, folsav-analógok. Ezeket a molekulákat a sejtben belül a folilpoliglutamát-szintetáz (FPGS) enzim poliglutamálja, majd belépnek a folsavciklusba, melynek megfelelő működése szükséges a nukleotidok szintéziséhez. A poliglutamált folsav több lépésben tetrahydrofoláttá (THF), majd 5,10-metilén-tetrahydrofoláttá (5,10-metilén-THF) alakul. Ez a timidilát-szintáz esszenciális kofaktora. A timidilát-szintáz deoxyuridin monofoszfátból (dUMP) timidinmonofoszfátot (TMP) képez. A THF és az 5,10-metilén-THF egyaránt 10-formil-tetrahydrofoláttá alakulhat, mely a purin szintézis két enzimének esszenciális kofaktora. A fő élettani folsav származék a humán szérumban az 5-metil-tetrahydrofolát (5-metil-THF), melyet a sejtben belül a metionin szintáz enzim THF-tá alakít, miközben metioninból homociszteint képez. A poliglutamált folsav származékok a lizoszómába kerülnek, ahol a gamma-glutamil-hidroláz (GGH) monoglutamált formává hidrolizálja

őket. A szabad tetrahydrofolátot gyorsan eltávolítja a sejtől egy energiafüggő transzporter³². (6.ábra)

A MTX a redukált folátok által használt karrier transzport mechanizmus útján lép be a sejtekbe. A sejtben belül a MTX poliglutamálódik, azaz gamma-peptid kötésben 2-7 glutamát csoport kapcsolódik hozzá. Ezt a folyamatot szintén a FPGS katalizálja, amely egy mitokondriális és citoplazmatikus enzim. Az FPGS glutamátok ATP-függő addícióját végzi, szubsztátja az összes természetben előforduló folát, illetve számos folát analóg³². A poliglutamált forma nehezebben jut ki a sejtől, így megnöveli a MTX fél-életidejét a sejtben belül³⁴. A poliglutamált MTX (MTX-PG) célpontja több kulczenzim, melyekre gyakran a nem glutamált MTX-nál többszörösen nagyobb hatást gyakorol. A MTX-ot gyakorlatilag pro-drugnak tekinthetjük³⁵. A MTX-PG lebontása a lizozómában történik, ahol a GGH enzim sorban lehasítja a glutamát csoportokat. A szabad MTX kijutása a sejtől az ATB-binding cassette család ABCC1-5 és ABCG2 transzporterein keresztül történik³⁴.

A MTX és a MTX-PG erősen, de reverzibilisen kötődik a dihydrofolát-reduktázhoz, ezzel gátolva a THF képzését, mely elengedhetetlen a timidilát bioszintéziséhez. Ezen kívül a THF biológiailag aktív folát kofaktorok, például a homocisztein-metionin átalakuláshoz szükséges 5-metil-tetrahydrofolát képzésében is fontos szerepet játszik. A MTX poliglutamált formája gátolja a timidilát-szintáz is, mely a deoxitimidilátot deoxitimidiláttá alakítja a pirimidin bázisok szintézise során. A MTX a metilén-tetrahydrofolát-reduktáz (MTHFR), mely szintén a folsavanyagsere egyik enzime, ugyan nem gátolja közvetlenül, az intracelluláris folsavraktár módosításával azonban a MTX ezt az enzimet is befolyásolja³⁵.

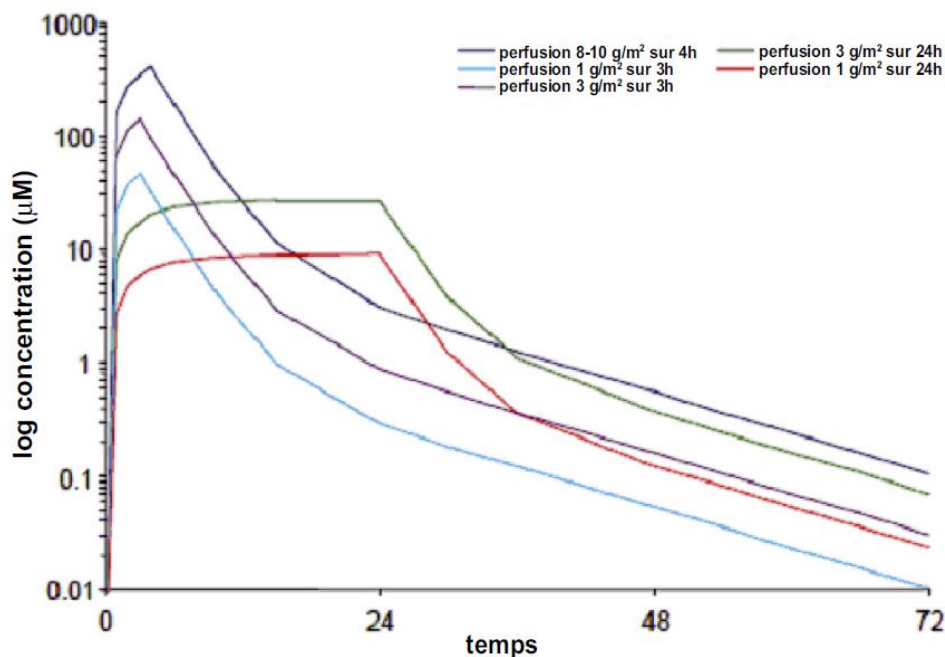
A MTX gyulladásgátló hatásának kialakulásában a purinszintézis befolyásolása bír kritikus szereppel. Az PG-MTX és a dihydrofolát poliglutamátok, melyek a DHFR gátlás miatt akkumulálódtak, gátolják az 5-aminoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotid (AICAR)-transzformiláz enzimet, így intracelluláris AICAR akkumulációt okoznak. Az AICAR és metabolitjai gátolják az adenzin metabolizmus két enzimjét, az adenzin-deaminázt és az AMP-deaminázt. Ez emelkedett intracelluláris adenzin- és adeninnukleotid koncentrációkhoz vezet, melyek későbbi defoszforilációja emelkedett extracelluláris adenzin koncentrációt eredményez. Az adenzin erős gyulladásgátló

vegyület, és a MTX antiproliferatív hatásának egy részét is ennek a mechanizmusnak tulajdonítják³⁵.

3.2.2 Farmakokinetika

A MTX 30 mg/m² dózis alatt jól, 80mg/m² dózis felett már rosszul szívódik fel a vékonybélből. Ennél nagyobb adagoknál az elérhető plazmaszintek az intravénás adással elérhető szintek tizedénél is kisebbek³⁶, ezért ilyen dózisoknál intravénás adagolás javasolt²⁸. Biológiai hasznosulása is függ a dózistól, átlagosan 60%³⁷. Intravénás beadás után a MTX ürülése a plazmából három fázisú. A kezdeti, úgynevezett disztribúciós fázist jellemző fél-életidő $t_{1/2\alpha}=0,75 \pm 0,11$ óra²⁸. A második, úgynevezett celluláris eliminációs fázis sebességét elsősorban a vesén keresztül történő ürülés határozza meg. Ehhez a fázishoz tartozó fél-életidő $t_{1/2\beta}= 2-4$ óra.

Ép vesefunkció esetén a plazmából történő clearance 110 ml/min, ebből 103 ml/min a vesén keresztüli kiválasztás (7. ábra). Intravénás adagolást követően 6 órán belül a MTX dózis 41%-a, 24 órán belül 90%-a, 30 órán belül 95%-a változatlan formában ürül a vizelettel³⁶. Alacsony plazmakoncentrációknál a vesében valószínűleg tubuláris reabszorpció is történik. Magasabb koncentrációknál a renális clearance viszonylag állandó, és magasabb, mint az inulin clearance. Ez valószínűsíti, hogy a MTX nemcsak glomerulárisan filtrálódik, hanem aktívan szekretálódik is a proximális vesetubulusokban. Csökkent vesefunkció és tubuláris szekrécióval ürülő gyenge savakkal történő párhuzamos adagolás jelentősen megnövelheti a MTX szérumszinteket. Intravénás adást követően széklettel ürül a dózis 1-2 %-a. A székletbe a MTX eredeti vegyületként is és metabolitok formájában is biliáris exkréció révén kerül. A per os bevételt követően a széklettel ürülő MTX mennyisége függ a dózistól és a vékonybél abszorpció kapacitásától³⁶.



7. ábra Különböző dózisban és időtartamban adott MTX-infúziók utáni átlagos szérumkoncentrációk az idő (h) függvényében. Forrás: Le Guellec és mtsai, 2010³⁷

A terminális fél-életidő $t_{1/2\gamma} = 10.4 \pm 1.8$ óra³⁶. Ez a szakasz akkor kezdődik, amikor a plazma antifolat koncentráció alacsonyabb lesz, mint $0,1 \mu\text{mol/l}$, mely a beadást követően hagyományos dózis esetén 6-24 óra, nagy dózis esetén 30-48 óra után következik be. A terminális fázist feltehetőleg a MTX enterohepatikus körforgása okozza. A csontvelő- és a gastrointestinalis toxicitás nagy részéért a terminális fél-életidőt tartják felelősnek. A 42 órán belül adott leukovorin rescue a koncentráció-idő görbe „farkánál” lévő alacsony MTX-koncentráció toxikus hatásainak gátlásával kivédi ezt.

A cerebrospinális folyadék, az intrapleurális és az intraperitoneális tér olyan interstitiális folyadékterek, ahová a MTX diffúzió csak lassan, passzív transzporthoz hasonló módon következik be. Ezen a folyadékterek patológiás megnövekedése (például ascites vagy pleurális folyadékgyülem) gyűjtőtartályként funkcionálva megnyújthatja a MTX jelenlétét a szervezetben³⁶. A vér-agy-gát jelentősen lassítja a szisztémásan beadott MTX bejutását a központi idegrendszerbe (KIR). Egyensúlyi állapotban a liquor-plazma arány $0,02-0,05$. Ezért ha a kezelés során magas liquor-koncentrációra van szükség, azt intrathecalis adagolással lehet elérni²⁸.

A vérben a MTX körülbelül 50-80 %-a plazmafehérjékhez, főként albuminhoz kötődik a koncentrációtól függetlenül. A fennmaradó rész szabad formában található meg³⁸. A szabad extracelluláris MTX koncentrációt befolyásolja a plazmafehérjékhez kötődés mértéke, ezáltal pedig hatással van a MTX sejtekbe való bejutására és a vesén keresztül történő kiválasztására is³⁶.

3.2.3 Metabolizmus és gyógyszer-interakciók

Számos MTX metabolit jelenik meg a vérben és a vizeletben, főleg nagydózisú MTX (HD-MTX) kezelés után. Az aldehid-oxidáz enzim a MTX-ből 7-hidroxi-MTX-ot (7-OH-MTX) képez a májban. A HD-MTX infúzió kezdete után 12-24 órával mért szérumban 7-OH-MTX-koncentráció meg is haladja a szérumban MTX koncentrációt³⁹. A 7-hidroxi származék négyszer kevésbé víz-oldékony, mint a MTX. Ez szerepet játszhat a HD-MTX által okozott vese károsodás kialakulásában, a MTX és metabolitjainak kicsapódása a vesetubulusokban ugyanis akut tubuláris nekrozist okoz³⁶.

Az enterohepatikus körforgás során valószínűleg a bélben lévő baktériumok karboxipeptidázai is metabolizálják a MTX-ot. A 2,4-diamino-10-metilpteroilsav (DAMPA) inaktív, kis mennyiségben képződő metabolit. A vizelettel ürülő vegyületek között kevesebb, mint 5%-ban jelenik meg³⁹. Intravénásan adagolt 30mg/m² dózis esetén kevesebb, mint 10%-ban keletkeznek metabolitok. Ugyanezen dózis per os bevétel esetén a felszívódott mennyiség 35%-a metabolizálódik. A szájon át történő adagolást követő fokozottabb anyagcsere alátámasztja a feltevést, hogy emberben főleg a gyomor-bél rendszerben és az enterohepatikus körforgás során történik a metabolizmus³⁶. A MTX anyagcsere termékek a terminális fázis során a plazmakoncentráció harmadát is kitehetik, és ez a szakasz nagymértékben felelős lehet a toxicitásért. Így a metabolizmusnak, főleg a 7-OH-MTX keletkezésének, fontos szerepe lehet a toxicitás kialakulásában.

Számos interakciót figyeltek meg a MTX és más gyógyszerek között. A plazmafehérjékért való versengés révén növelik a szabad MTX koncentrációt a szalicilátok, phenytoin, sulfisoxazol, szulfonamidok, diuretikumok, orális antidiabetikumok, tetraciklinek, chloramphenicol, doxorubicin, ciklofoszfamid és a barbiturátok. A magasabb szabad MTX plazmaszint fokozott toxicitáshoz vezethet. A renális tubuláris szekréciót csökkenti a probenecid, a nem szteroid gyulladásgátlók és

egyéb gyenge savak³⁹. A potenciálisan vesetoxikus szerek, mint például a gentamicin és a cisplatin, károsíthatják a MTX eliminálását, ezzel fokozva a toxicitást⁴⁰. A vinka alkaloidák fokozhatják az intracelluláris MTX és PG-MTX szintet. Módosíthatják a MTX metabolizmusát az antikonvulzív szerek, melyeket gyakran használnak primer központi idegrendszeri (KIR) lymphomákban és KIR áttétek kezelése során. Ezek a szerek növelik a MTX clearance-t és csökkentik a MTX expozíciót⁴¹. Folsavat tartalmazó vitamin vagy orális vaskészítmények módosíthatják a MTX-ra adott terápiás választ.

3.2.4 Toxicitás

A MTX a nem szelektív daganatellenes szerek közé tartozik. Citotoxikus hatását a gyorsan osztódó sejtekre fejt ki, így a tumor sejtek eliminálása céljából végzett kezelés súlyos, nem kívánt mellékhatásokhoz vezethet, melyek a szervezet gyorsan osztódó sejtjeit érintik. Az 1970-es években, a különböző előkészítő eljárások bevezetése előtt, a HD-MTX kezelések toxicitása a halálozás 4,6-6 %-ért volt felelős⁴². A MTX-koncentráció rutin monitorozásának, az ehhez igazított leukovorin adagolásnak, a hidrálásnak és a vizelet alkalizálásnak köszönhetően mára ez az arány jóval alacsonyabb. A MTX kezelések jelentős intra- és interindividuális farmakokinetikai variabilitása miatt azonban máig előfordulnak súlyos mellékhatások. Ugyanakkor fontos hangsúlyozni, hogy jelenlegi tudásunk szerint a MTX-kezelés nem okoz jelentős hosszú távú mellékhatásokat, például infertilitást vagy szekunder malignitást, melyek viszont alkiláló szerek alkalmazása, illetve radioterápia után felléphetnek³⁶.

A MTX toxicitás és farmakokinetika közötti összefüggések megismerése elengedhetetlen az orvosok számára, mert lehetőség nyílik az életveszélyes toxicitások előrejelzésére és elhárítására. Minden szerv, ill. szövet esetében létezik egy küszöbkoncentráció és egy időküszöb. A küszöbkoncentráció egy kritikus minimális extracelluláris koncentráció, melyre jellemző, hogy az adott szerv károsodása csak ezen küszöb feletti gyógyszer szintnél következik be. Az időküszöb egy minimális expozíciós idő, melyet el kell érni ahhoz, hogy a toxicitás kialakuljon. Ennél rövidebb expozíciós idő esetén, függetlenül az extracelluláris koncentrációtól, az adott szerv károsodásának valószínűsége minimális. A toxicitás kialakulásához az expozíciónak a küszöbkoncentrációt és az időküszöböt is meg kell haladnia. A toxicitás súlyossága

közvetlenül a MTX expozíció időtartamával arányos, viszonylag kevésbé függ a küszöbkoncentrációt meghaladó MTX-szint nagyságától ³⁶.

Vesetoxicitás

A MTX két karboxilcsoportot tartalmazó gyenge sav, $pK_{a,s}$ értéke 4,8 és 5,5 közötti. Ebből következően, a MTX ionizált alakban fordul elő, és fiziológiai pH-értéken nem lipidoldékony. A vizeletben való oldhatósága a kémhatás függvénye. Ha a vizelet pH 6-ról 7-re emelkedik, a MTX és metabolitjainak oldhatósága 6-10-szeresre nő ³⁹. Mivel a nagy dózisú kezelés magas MTX koncentrációkat eredményez a vizeletben, a vegyület kicsapódhat a vesében, és vesekárosodást okozhat akut tubuláris nekrozis formájában. Nephrotoxicitás létrejöhet a MTX vesetubulusokra gyakorolt direkt toxikus hatására is. A vizelet alkalizálásával megelőzhető a kicsapódás, így a következményes nephropathia is. A vizelet alkalizálása továbbá ionizálja a vegyületet a vesetubulusban, ami késlelteti a MTX reabszorpcióját, és növeli a renális clearance-t. Ezért szükséges a MTX-infúzió előtt, alatt és után az intravénás hidrálás és a vizelet alkalizálása. Rövidebb idejű infúzió magasabb szérumszint és vizelet MTX-koncentrációt eredményez, ezért ezekben az esetekben nagyobb a vesekárosodás rizikója. A preventív intézkedések elterjedt használatának köszönhetően napjainkban a vesetoxicitás előfordulása 1,8% ⁴³. A MTX-asszociált vesekárosodásnak azonban még ma is előfordulnak súlyos és fatális formái ³⁹.

A MTX által okozott vesekárosodás az ürülés lassulása miatt tartósan magas szérumszintű MTX-koncentrációt eredményez, emiatt pedig hatástalan lehet a leukovorin rescue, és fokozódhatnak az egyéb toxicitások, különösen a myelosuppressio, a mucositis, a hepatitis és a dermatitis. A vesefunkció károsodásának korai jele a MTX-infúzió alatt vagy közvetlen utána jelentkező hirtelen kreatininszint-emelkedés. Ilyen esetben a vizelet alkalizálás, a vizeletmennyiség monitorozás, a szérumszintű kreatinin és szérumszintű MTX-szint követése valamint az ehhez igazított leukovorin rescue válhat szükségessé. További szupportív terápiás eszközök közé tartoznak az antibiotikumok, a folyadék-és elektrolit-háztartás kontrollja, és szükség esetén vérekészítmények adása ³⁹.

Hepatotoxicitás

A MTX kezelés után akut és krónikus májkárosodás is előfordulhat. HD-MTX infúzió után több mint 50%-ban figyelhető meg akut májenzimszint-emelkedés (GOT, GPT) és/vagy hyperbilirubinaemia. Ezekben az esetekben a májfunkciós értékek 1-2 héten belül normalizálódnak. Az átmeneti enzimszint emelkedés mértéke a MTX-expozíció nagyságával hozható összefüggésbe, gyakoriságát pedig korábbi gyógyszerek, altatásos műtét és egyéb májbetegségek növelhetik ⁴⁴. Intermittáló adagolás esetén kevesebb a májfunkciós rendellenesség ³³. Rövid idő alatt adott nagy dózisok általában kevésbé okoznak hepatotoxicitást, mint hosszabb időn át alkalmazott kisebb dózisok ³⁶. A súlyos irreverzibilis májkárosodás (fibrosis, cirrhosis) előfordulása ritka ³³.

Akut májtoxicitás megjelenése esetén silimarin kezelés állítható be, mely a máriatövis kivonataként a népi gyógyászatban régóta ismert. Antioxidáns és szabadgyökfogyó hatásának köszönhetően gátolja a lipidperoxidációt és fokozza a májsejtek regenerációját ²⁸. Hepatikus encephalopathia kivédésére az ornitin-aszpartát alkalmazható, mely az ureaciklus fokozása által elősegíti az extrahepatikus méregtelenítést és az ammónia eltávolítását a keringésből. A máj károsodás megelőzése érdekében fontos a zsírszegény, májkímélő diéta bevezetése.

Myelosuppressio

A HD-MTX kezelés leukovorin rescue-val általában enyhe csontvelő-toxicitást okoz. Az infúzió után gyorsan progrediáló thrombocytopenia, majd leukopenia alakulhat ki. A három sejtvonal nadírja, azaz a legalacsonyabb perifériás sejtszám a 11-14. napra esik ⁴⁵. A vérkép rendszeres ellenőrzése segít észlelni az esetleges transzfúzió szükségessé válását. A csontvelői sejtek növekedését serkentő gyógyszer, a granulocita kolóniastimuláló faktor (G-CSF) alkalmazható az apláziás időszakban.

Neurotoxicitás

A MTX-okozta központi idegrendszeri károsodás akut formában 3-15 %-ban fordul elő, tehát nagyobb arányban krónikus megjelenésű. Akut formájának vaszkuláris eredetére utal, hogy hirtelen kezdődik és reverzibilis. Az eddigi kutatások eredményei szerint a magas szérumszintek vagy az elhúzó MTX-kiválasztás nem növelik a

neurotoxicitás gyakoriságát ⁴⁶. Jelei közé tartozhat a fejfájás, zavartság, hányinger, hányás, a viselkedés megváltozása, dezorientáció, görcsroham, fokális neurológiai deficitek, paresis. A tünetek pár perc vagy óra alatt fejlődnek ki, majd progrediálhatnak vagy visszafejlődhetnek ⁴⁷.

Diagnosztikájában a képalkotó eljárások közül a diffúzió-súlyozott MRI (diffusion-weighted imaging, DWI) bizonyult leghasznosabbnak, mellyel csökkent diffúzió mutatható ki a fehérállomány egyes részein. A vízmolekulák csökkent áramlása az axonok mentén citotoxikus oedema következménye. Követés során a csökkent diffúzió eltűnik ⁴⁸. Kezelése a leukovorin dózis emeléséből, tüneti terápiából (pl. phenytoin, gabapentin), és esetleg iv. aminophyllinből áll ⁴⁸.

A MTX által okozott krónikus agykárosodás hónapokkal vagy évekkel a kezelés után jelenik meg, és irreverzibilis. Leggyakrabban nekrotizáló, demyelinizációs leukoencephalopathiaként lép fel. Progresszív neurológiai hanyatlással jár, mely észrevétlenül kezdődik, majd dementia, dysarthria, ataxia, görcs, kóma alakul ki. Megelőző koponya-besugárzás, intrathecalis MTX-adás és magasabb kumulatív MTX-dózis esetén nagyobb valószínűséggel alakul ki ³⁶.

Gastrointestinalis toxicitás

Általában 2-5 nappal a MTX kezelés után igen fájdalmas felületes nyálkahártya-fekélyek jelenhetnek meg a teljes gyomor-bél traktus területén. A gastrointestinalis mucositis életveszélyes is lehet. A MTX gátolja a bélhámsejtek osztódását. A bolyhok felszínéről lehámló sejtek pótlása így elégtelen lesz, ez pedig fekélyképződéshez vezet. Tüneti terápiája helyi fájdalomcsillapításból és fertőtlenítő öblítésből áll. Herpeszvírusok általi felülfertőződés kezelése acyclovirrel vagy valacyclovirrel történik, ha alkalmazásukat a vesefunkciós értékek nem kontraindikálják ³⁸.

Pulmonális és egyéb toxicitás

A MTX-infúzió után akut mellékhatásként a pleura, a tüdő, a vagina és a húgyhólyag epitheliumának gyulladása is előfordulhat. A MTX által kiváltott allergiás immunreakciók érinthetik a bőrt (erythema, pruritus, urticaria, angio-oedema), a szemet, valamint a tüdőt. Krónikusan tüdőfibrosis, bronchitis, légúti hiperreaktivitás alakulhat ki ⁴⁹. A leggyakoribb tüdőelváltozás az interstitialis pneumonitis. A gyógyszer-indukálta

pneumonitis megállapítása nehéz, mert nincsenek jellegzetes klinikai vagy radiológiai tünetei. Diagnosztikus kritériumai közé tartozik a pulmonális tünetek kialakulását megelőző MTX-expozíció, a fertőzés és egyéb tüdőbetegségek kizárása, új vagy növekvő infiltráció jelenléte a mellkasröntgenen, valamint gyógyszer-indukálta pneumonitisnek megfelelő szövettani kép⁵⁰. A betegség prognózisa viszonylag jó, de ritkán légzési elégtelenségig is súlyosbodhat.

Létezik egy angol mozaikszó a MTX által okozott károsodások összefoglalására: HUMAN LOBSTER (=humán homár). A homár-hasonlat a beteg erythemás bőrére utal.

H	= hepatic (máj)
U	= urinary (kiválasztás)
M	= mucous membrane (nyálkahártyák)
A	= alimentary (táplálkozás)
N	= nervous (idegrendszer)
L	= lung (tüdő)
O	= oral (száj)
B	= bone (csont)
S	= skin (bőr)
T	= temperature (testhőmérséklet)
E	= erythema
R	= renal (vese)

3.2.5 Rezisztencia

Az egyes tumoroknál jelenlévő intrinsic rezisztencia eleve kizárja a gyógyszer használatát, az eredetileg MTX-ra érzékeny daganatokban pedig szerzett rezisztencia alakulhat ki, mely felelős lehet a kezelés eredménytelenségéért³⁶. Sok tanulmány foglalkozik a MTX rezisztencia mechanizmusaival in vitro és in vivo tumorokban egyaránt. Öt fő rezisztenciamechanizmust írtak le a MTX kezelést túlélő sejtekben: csökkent beáramlás a sejtbe (csökkent *SLC19A1* expresszió vagy funkció), ami a MTX

akkumuláció csökkenéséhez vezet; csökkent intracelluláris retenció a poliglutamáció elégtelensége miatt; DHFR gén amplifikációja vagy fokozott transzkripciója, mely az enzim szintjének növekedéséhez vezet; módosult szerkezetű DHFR fehérje, mely kevésbé kötődik a MTX-hoz; a PG-MTX-ot hidrolizáló GGH lizoszomális enzim mennyiségének emelkedése^{51, 52}.

3.2.6 A nagy dózisú methotrexate bevezetésének jelentősége osteosarcomában

HD-MTX

Az esetek 80%-ában már a diagnózis felállításakor pulmonális micrometastasisok vannak jelen, melyek képalkotó eljárásokkal nem megjeleníthetők. Ezek hatékony szisztémás kemoterápia hiányában a primer tumor sebészi eltávolítása után átlagosan 6-9 hónappal manifesztálódnak, kezelés nélkül pedig 2-3 éven belül a beteg halálához vezetnek. A túlélés kemoterápia nélkül a korai radikális műtét ellenére is csak 5-20 % közötti⁵³.

Az 1970-es évek elején az osteosarcoma kezelésébe bevezették az intenzív kemoterápiát. Először nagy dózisú MTXot és doxorubicint alkalmaztak⁴⁵. A MTX hatékonynak bizonyult a tüdő áttétek eliminációjában, valamint a végtagmegtartó műtétek elvégezhetőségének növelésében. A primer tumor eltávolítása után egyedüli terápiás szerként alkalmazva a betegek 40%-a meggyógyult. Neoadjuváns és adjuváns kemoterápiában más szerekkel kombinálva 65-75 %-osra emelkedett a túlélés⁵³. Ha életveszélyes mellékhatások miatt a kemoterápiából a MTX blokkok elhagyása válik szükségessé, az „major bad”, vagyis nagyon rossz prognosztikai faktornak minősül⁵³.

A HD-MTX ($\geq 1\text{g/m}^2$) különösen hatékonyan bizonyult osteosarcoma, gyermekkori ALL, lymphoma, agytumorok és egyes felnőttkori non-Hodgkin lymphomák kezelésében a hagyományos dózissal szemben³⁶, sőt hagyományos dózisokban a MTX gyakorlatilag hatástalan az osteosarcomában, ami feltehetően az osteosarcoma egy belső, ún. „intrinsic” tulajdonsága. Ez a feltételezett intrinsic rezisztencia legyőzhető a HD-MTX alkalmazásával. A rezisztencia egyik lehetséges mechanizmusa a csökkent transzport a redukált folát karrieren keresztül⁵². Nagy dózist alkalmazva az aktív transzport mechanizmus telítődik, így egyre nő a passzív diffúzió

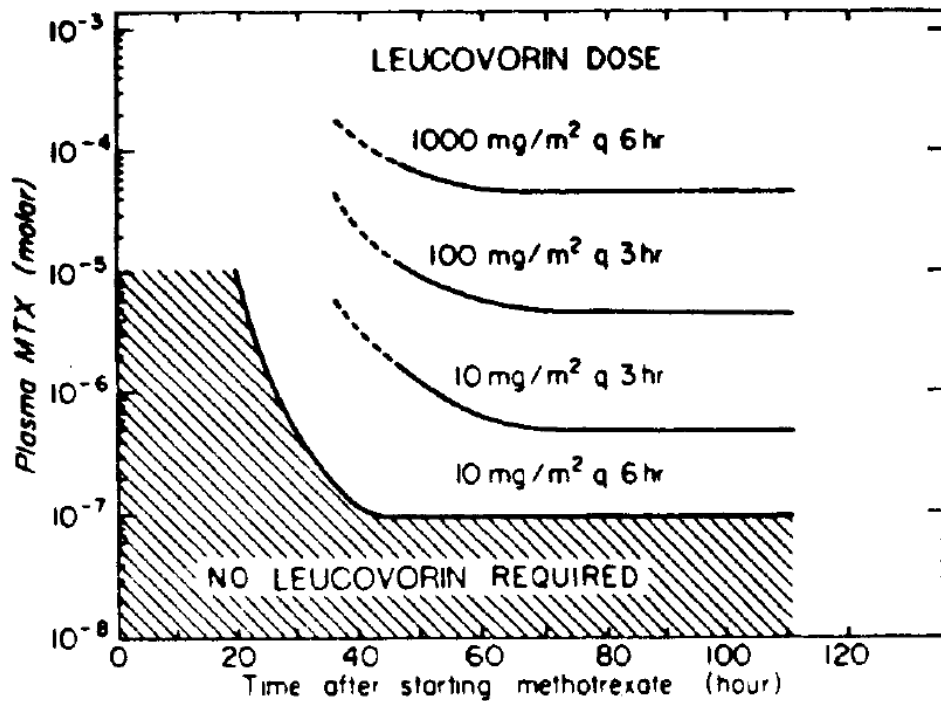
szerepe. Ily módon elegendő MTX juthat be a sejtbe a citotoxikus hatás kialakulásához⁵⁴. A nagy dózisú terápia javítja a gyógyszer disztribúcióját a szervezet vizeitében, a nagyméretű szolid tumorokban, és a specifikus, farmakológiailag nehezen elérhető terekben, például a központi idegrendszerben is. A HD-MTX megelőzheti a gyógyszerrezisztens tumoros sejtvonalak kialakulását⁵⁵. Több korábbi vizsgálat kimutatta, hogy osteosarcomában a jobb túlélés, illetve a kedvező szövettani válasz feltétele, hogy a MTX szérumszint meghaladjon egy bizonyos küszöbkoncentrációt^{37,38,40}.

A HD-MTX kezelés során különösen nagy hangsúlyt kell fektetni a kezelés előtti előkészítésre és a MTX-koncentráció monitorozására. A protokollban meghatározott értékeket meghaladó MTX-szintek fokozzák a toxicitás veszélyét, ezért azonnal szükséges az intravénás folyadékbevitel növelése és leukovorin adása. A HD-MTX kezelés kontraindikációi közé tartozik a fertőzés fennállása, csökkent vesefunkció és a patológiás folyadékgyülem jelenléte (ascites, pleurális folyadék).

Leukovorin

A HD-MTX alkalmazása életveszélyes lenne a redukált folátok infúziót követő adása nélkül. Ezek a redukált folsav származékok megkerülik a MTX nukleotid szintézisre kifejtett blokádját²⁷. Közülük a legelterjedtebben használt a leukovorin (5-formil-tetrahidrofolsav). A leukovorin mind aktív, mind passzív transzporttal bejuthat a sejtbe, ahol több lépésben 5-metil-THF-tá, THF-tá, 5,10-metilén-THF-tá és egyéb redukált kofaktorokká alakul. Ezek a vegyületek belépnek a redukált folsav ciklusba, a MTX által gátolt DHFR-től disztálisan, így áthidalva a MTX által képzett enzimátikus blokkot. A MTX-hoz hasonlóan a leukovorin-metabolitok is poliglutamálódnak a sejten belül, ami meghosszabbítja intracelluláris élettartamukat. Magas extracelluláris MTX-koncentráció esetén a leukovorin koncentrációt a MTX-szinttel arányosan kell növelni, hogy a leukovorin felülkerekedhessen a MTX-on a redukált folát transzporterén keresztül sejtekbe történő bejutásért folyó versenyben. A HD-MTX terápia utáni leukovorin (LV) rescue során naponta szükséges a szérumszint kreatinin és MTX koncentrációjának meghatározása, mely után a LV rescue nomogram szerint történik a leukovorin adagolása (8. ábra). Az LV nomogram megadja, hogy mekkora leukovorin dózis szükséges az adott időpontban mérhető MTX-koncentráció függvényében.

Emelkedett kreatinin-szint vagy csökkent vesefunkció esetén létfontosságú az emelt dózisú, hosszabb idejű leukovorin adagolás. A leukovorin kezelés mindaddig folytatandó, amíg a szérumszint MTX-koncentráció a toxikus $0,3\mu\text{mol/l}$ szint alá nem süllyed ⁵⁶.



8. ábra Leukovorin rescue nomogram, magyarázatát ld. a szövegben. Forrás: Bleyer és mtsai, 1989 ⁵⁵

A leukovorin nem csökkenti a már kialakult toxicitást. Manifesztálódott toxicitás esetében a leukovorin adásának akkor van klinikai haszna, ha a MTX szérumszintek a toxikus tartományban vannak, és így a kezelés a további toxicitást akadályozhatja meg ⁵⁵. Ha azonban a leukovorin rescue-t túl korán kezdik, túl sokáig fenntartják, vagy a szükségesnél nagyobb dózisban adják a leukovorint, semlegesítheti a MTX daganatellenes hatását ²⁷. A rescue után a sejtekben maradhatnak hosszú élettartamú poliglutamált folsavszármazékok, melyek pedig a következő MTX kezelés hatását semlegesíthetik. Ezért fontos a leukovorin rescue és a következő MTX-blokk között eltelt idő hossza.

3.2.7 A gyógyszer-szint-monitorozás jelentősége a daganatterápiában

A terápiás gyógyszer-szint-monitorozást (therapeutic drug monitoring, TDM) az 1960-as évek elején kezdték el bevezetni. A TDM magában foglalja a gyógyszer koncentrációk mérését és értékelését a biológiai folyadék-kompartmentekben. Ezen adatok felhasználhatók a gyógyszeradagolás egyénre szabásában, melynek során a terápiás hatás maximalizálására és a toxicitás minimalizálására kell törekedni. A TDM nem minden gyógyszer esetében hatékony módszer, használhatóságának feltétele, hogy az adott gyógyszerre érvényesüljenek az alábbiak:

1. jelentős egyénen belüli és egyének közötti farmakokinetikai különbségek,
2. bizonyított kapcsolat a koncentráció és a toxicitás, ill. a hatékonyság között,
3. szűk terápiás index,
4. megbízható és a gyakorlatban kivitelezhető koncentrációmérés ⁵⁷.

A daganatellenes szerek esetében a MTX szinte az egyetlen, melyet a kórházak többségében rendszeresen monitoroznak. Ennek legfőbb oka, hogy a legtöbb kemoterápiás szer esetén hiányosak a koncentráció-hatás összefüggésre vonatkozó ismereteink.

A TDM felhasználhatóságát a daganatellenes kezelésben jelenleg még több tényező korlátozza. Egyik ilyen tényező az, hogy a plazma gyógyszer-koncentrációja csak indirekt módon mutatja a célszervben lévő gyógyszer mennyiséget. Ennek oka, hogy a hatás helye gyakran távol esik az intravasculáris tértől, valamint a daganatok különbözhetnek vérellátásukban és sejtszintű jellemzőikben. Ez a kemoterápiás szerekkel szemben különböző fokú érzékenységhez és rezisztenciához vezethet. Ezek az intrinsic sejtszintű jellemzők hozzájárulnak a terápiás válasz interindividuális különbségeihez, és korlátozzák a terápiás tartomány pontos meghatározását ⁵⁸. Másik tényező, hogy sok idő telik el a gyógyszer-szint mérése és az alapvető farmakológiai hatás, a gyógyulás között. Ha a gyógyulási arány változását használjuk a hatás mérésére, akkor minimum 5 év követési időre van szükség a kimenetel megbízható megállapításához. A koncentráció - hatás összefüggés vizsgálata azért is nehéz, mert a daganatok kezelésében a gyógyszereket szinte mindig kombinációban adják. A

kombinációs kemoterápia nemcsak az adott gyógyszer hatásosságának vizsgálatát nehezíti meg, hanem gyakran befolyásolja a toxicitást is. Emiatt nehéz feladat megbízható koncentráció – hatás összefüggések és terápiás tartományok meghatározása^{58, 59}.

Bár bevezetése nehézségekbe ütközik, a terápiás gyógyszer-szint-monitorozás olyan nagy lehetőségeket rejt magában, amelyek hatékonyabbá tehetik a daganatterápiát. Ennek alapvető feltétele a TDM helyes alkalmazása. A daganatellenes szerek általában rendelkeznek a TDM-hez szükséges tulajdonságokkal, vagyis hogy jelentősen variabilis a farmakokinetikájuk és keskeny a terápiás indexük. A kemoterápiás kezelés maximális hatékonysága létfontosságú, hiszen ennek hiánya súlyos következményekkel járhat. A kezelés aluldozírozása egy kemoterápiával gyógyítható daganat gyógyulási esélyeit ronthatja. Egyes citotoxikus mellékhatások, mint például a myelosuppressio, azonban szintén életveszélyesek lehetnek. Tehát egy olyan terápiás tartomány meghatározása lenne a cél, amely megadja a hatékony koncentráció, illetve a nemkívánatos hatásokért felelős koncentráció alsó és felső határát. Számos vizsgálat bizonyította, hogy a nem toxikus tartomány legfelső határán lévő koncentrációk elérése hasznos a kimenetel szempontjából. A TDM alapvető célja tehát a hatékonyság javítása, a toxicitás elkerülése. Ezen felül további haszna a betegek közötti farmakokinetikai variabilitás csökkentése, csökkent máj- vagy vesefunkció esetén az adagolás módosítása és a gyógyszer-interakciók időben történő észlelése. A TDM felhasználható kemoterápia egyénre szabásában⁵⁸.

A MTX-koncentráció mérése történhet fluorometria, radioassay, radioimmunoassay (RIA), enzim multiplikációs immunoassay technika, enzim-inhibíciós assay (EIA), mikrobiológiai assay vagy nagy nyomású folyadék kromatográfia (high-pressure liquid chromatography, HPLC) technikával. Betegpopulációnk MTX-szérumszintjeit HPLC módszerrel mérték. Korábbi kutatások szerint az enzim-inhibitoros és a radioimmun módszerrel összehasonlítva a HPLC lép legkevésbé keresztreakcióba a MTX metabolitjaival, ezért ez a módszer adja meg legpontosabban a MTX koncentrációt⁶⁰. HPLC technikával még a 0,01 µmol/l-es szérumszintek is kimutathatók. Sem a folsav, sem a leukovorin jelenléte nem zavarja meg a mérést. A folyamat gyors, körülbelül 30 perc⁶¹.

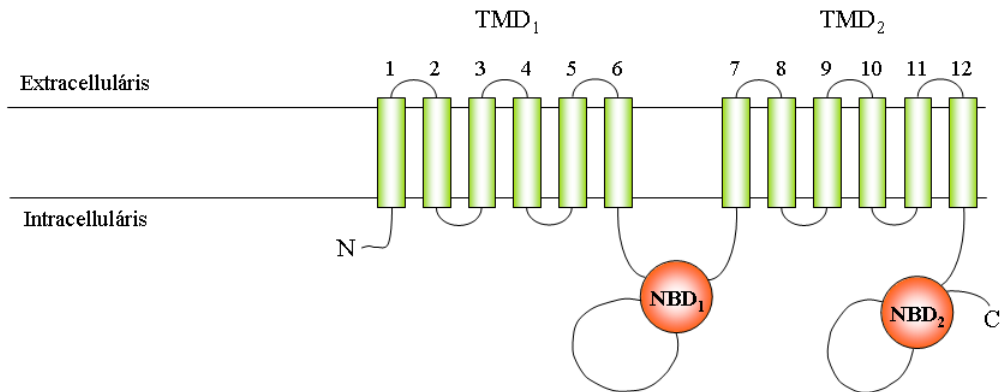
3.3 A methotrexate farmakogenetikai vizsgálata

3.3.1 ABC transzporterek

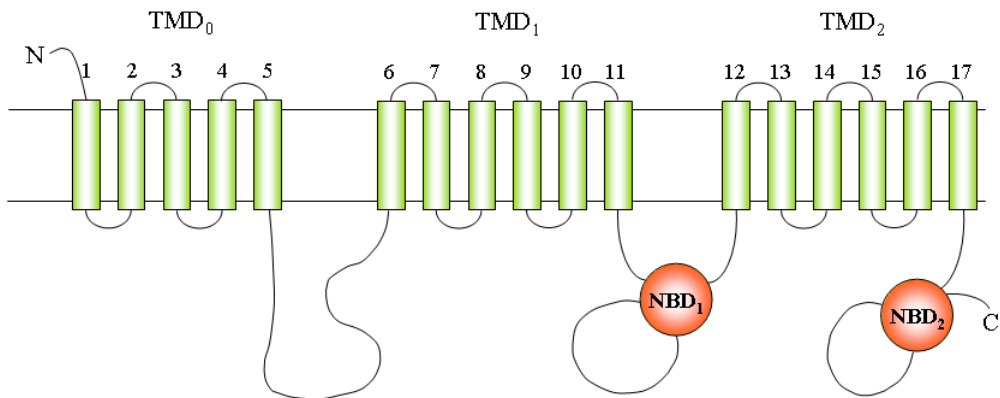
Az ABC-transzporter családba olyan ATP-kötő transzmembrán fehérjék tartoznak, melyek a sejtek méregtelenítésében vesznek részt⁶². Minden szövetben és sejttypusban megtalálhatók, legtöbbjük a sejtmembránban vagy sejt-kompartimentumok membránjában helyezkedik el. Az endogén és az élő szervezet számára idegen metabolitok széles skáláját képesek szállítani^{63,64}. Működésük során a hozzájuk kötött ATP-t hidrolizálják, majd a felszabaduló energia felhasználásával átranzportálják szubsztrátjaikat a sejtmembránon. Transzmembrán doménekből (TMD) (5 vagy 6 transzmembrán régióval) és nukleotidkötő doménekből (NBD) állnak. Az egyes domének között intracelluláris linker régió (L) fordulhat elő⁶⁵. Az ABC-transzportereknek fontos szerepe van szervezetünk xenobiotikumok elleni védekezésében. Az agyban, a herében a szövet, a méhlepényben a magzatot védik az idegen anyagoktól. A bél epitheliális sejtjeiben levő ABC-transzporterek védik ki a xenobiotikumok szervezetbe kerülését. A vesetubulusokban és a hepatociták epekapilláris felőli membránjában levők az idegen anyagok szervezetből való kiürítését végzik.

A tumorok kezelése közben kialakuló multidrog rezisztencia egyik lehetséges mechanizmusa ezen transzporterek révén valósul meg, hiszen működésükkel nagy mértékben befolyásolják a gyógyszerek felszívódását, eloszlását, metabolizmusát és kiürülését⁶². A transzporterfehérjéket kódoló gének polimorfizmusai megváltoztathatják a gének expresszióját, a transzporterek szubsztrát felismerését, aktivitását és működését⁶⁶. Az általunk vizsgált ABC-transzporterek hasonló szubsztrátspektrummal és funkcióval rendelkeznek, ezért a szervezet kémiai védelmében együttes, kiegészítő szerepet töltenek be⁶⁷.

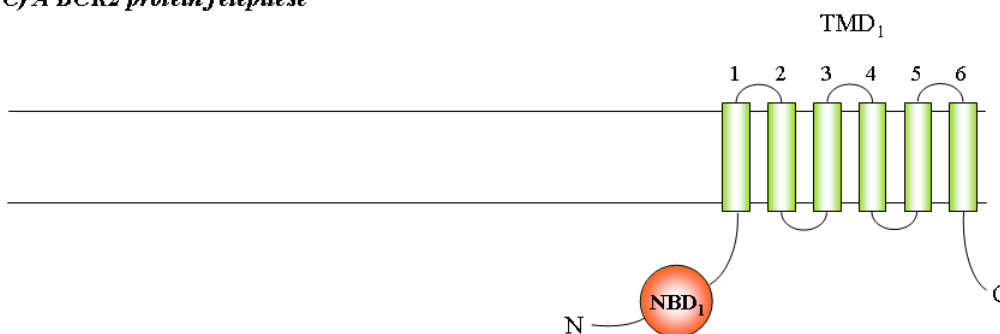
A) Az ABCB1 protein felépítése



B) Az ABCB1, 2, 3, 10 protein felépítése



C) A BCR2 protein felépítése



9. ábra Az ABC transzporterek felépítése

Rövidítések: NBD: nukleotidkötő domén, TMD: transzmembrán domén

ABCB1

Az *ABCB1* (ATP-binding cassette, sub-family B, member 1) az ABC-transzporter géncsalád B1-es génje. Az általa kódolt fehérje volt az első olyan ABC transzporter, melynek gyógyszer rezisztenciát okozó hatását leírták multidrog-rezisztens tumoros sejtvonalakban ⁶⁸. Ebből származik korábbi neve is: *multidrug resistance 1* (*MDR1*). Génje a 7q21 kromoszómarégióban található, a protein felépítése: TMD1-NBD1-L1-TMD2-NBD2 ⁶⁶. (9.ábra)

Az *ABCB1* a szervezet minden szövetében expresszálódik, de legnagyobb mértékben az intesztinális sejtekben, vesekapillárisok epiteliális sejtjeiben, a placenta epiteliális sejtjeiben és a hepatociták epekapilláris felőli membránjában. A transzporter a sejtek apikális membránjában helyezkedik el. Az egyes limfocita csoportokon és a CD34+ hematopoetikus őssejteken is kifejeződik. Ez a transzporter a vér-agy gáton is működik ^{69, 70, 71}. A bélben, az erekben a szubsztrátjainak felszívódása ellen dolgozik, tehát a bél, erek lumene felé szállít. A májsejtek, ill. vesetubulusok sejtjeiben szubsztrátjainak az epén, ill. vizeleten keresztüli kiválasztásában van szerepe, a vér-szövet gátak kialakításában fontos ⁶⁹.

Számos szubsztrátja van, hidrofób és amfipatikus molekulák az ionoktól a kis peptidekig. Ide tartoznak a természetes eredetű xenobiotikumok, a sejt metabolitjai, de szállít rovarirtó szereket, proteáz inhibitorokat, immunszuppresszánsokat, szteroidokat, sztatinokat, antihisztamint és kemoterápiás gyógyszereket is, többek között az osteosarcoma kezelési protokolljában alkalmazottak közül is ^{69, 72, 73}.

Fiziológiás funkciója sokrétű. Szállítja a már említett toxinokat, így fontos a védelemben. Szerepe lehet az apoptózis regulálásban, mert sok apoptózis indukáló szer ellen rezisztenciát biztosít, így megakadályozva a sejt pusztulását. Szállít lipideket, koleszterint, de citokineket (IL-2, IL-4) és interferon-gammát is, szerepet játszva ezzel az immunválasz kialakulásában is ^{69, 74}. Genetikai változások az *ABCB1* génben a transzporter működésének megváltozását okozhatják, így a szervezet toxinok elleni védekezése csökkenhet, a tumorok keletkezésének esélye nőhet ^{69, 73}.

ABCC1

Az *ABCC1* (ATP-binding cassette, sub-family C, member 1) az ABC-transzporter géncsalád C1-es génje, más néven *MRP1* (*multidrug resistance-associated protein 1*), amely a 16p13.1-es kromoszómarégióban található, és egy 1531 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek felépítése: TMD0-L0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2^{63,75}. (9.ábra) A fehérje minden szövetben megtalálható, de legnagyobb mértékben a tüdőben, a herében, a vesében, a szívben és a placentában expresszálódik. Kevésbé fejeződik ki az intestinális sejtekben, vastagbélben, agyban és a fehérvérsejtekben, legkevésbé pedig a májban. Elsősorban a kifejezetten barrier funkciójú, ill. osztódó fázisban levő sejtekben jelenik meg. A sejten belül főleg a plazmamembránban található, de intracellulárisan is előfordul az endocitotikus vezikulákban, lizoszómákban, transz-Golgi vezikulákban. Ez egyrészt a plazmamembránon keresztüli kiszállításon túl egy másik méregtelenítési lehetőséget biztosíthat, másrészt intracelluláris ABCC1 raktárként működhet, hiszen innen gyorsan kikerülhet a sejtfelületre a transzporter^{63,75}.

Az ABCC1 a vér-szövet (vér-agy, vér-cerebrospinális folyadék, placenta, vér- here) gátakban a polarizált sejtek bazolaterális membránjában található, mely arra utal, hogy a fehérjének nem a káros anyagok szervezetből való eltávolítása az elsődleges feladata, hanem a sejteket védi a toxikus hatásoktól, hozzájárul a barrier funkció kialakításához⁷⁵. Az ABCC1 transzporter szubsztrátspecifitása nagyon széles, hidrofób vegyületeket, valamint glutation (GSH), glukuronát és szulfát konjugátumokat is szállít. Működéséhez szükséges glutation jelenléte, mely elősegíti a szállítást. Képes a drog-glutacion konjugátumokat kiszállítani a sejtől^{62,76}. Az ABCC1 részt vesz a sejt oxidatív stressz elleni védekezésében is. Oxidatív stressz esetén a sejt glutacion segítségével redukálja a reaktív oxigéngyököket, miközben glutacion-diszulfát (GSSG) keletkezik. Az ABCC1 exportálja a sejtől a GSSG-t, ha intracelluláris szintje túl magasra válik, valamint a glutacion-konjugátumokat is^{63,75}.

ABCC2

Az *ABCC2* (ATP-binding cassette, sub-family C, member 2) az ABC-transzporter géncsalád C2-es génje, másnéven *MRP2* (*multidrug resistance-associated protein 2*), amely a 10q24-es kromoszómarégióban található, és egy 1545 aminosavból

álló fehérjét kódol, melynek felépítése megegyezik az ABCC1 fehérje felépítésével: TMD0-L0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2⁷⁷. (9.ábra) A hepatocelluláris multiplex organikus anion transzporter csatornák közül elsőként azonosították. Az ABCC2 elsősorban a hepatocyták apikális felszínén expresszálódik, valamint a proximális vesetubulusokban és a bélben is kifejeződik⁷⁸. Ezen kívül az ABCC2 gén mRNS-ét perifériás idegekben, az epehólyag sejtjeiben és CD4 + limfocitákban is kimutatták⁷⁹. Az ABCC2 kifejeződik tüdő, gyomor, vese és colorectalis tumorok sejtvonalaiban⁸⁰. Az ABCC1-hez hasonlóan az ABCC2 transzporternek is sokféle szubsztrátja van. Bizonyos hidrofób molekulákat csak glutathion jelenlétében szállít, de transzportál szerves anionokat, köztük szulfátokat, glucuronidot, és glutathion konjugátumokat is⁸¹. Ezen túlmenően, az ABCC2 szerepet játszik bizonyos endogén konjugátumok, mint például a konjugált bilirubinok biliaris eliminációjában⁸². Ez a szállítófehérje is fontos szerepet játszik endogén metabolitok, valamint a xenobiotikumok és azok metabolitjainak eliminálásában. Mióta ismert, hogy az ABCC2 is részt vesz a gyógyszer konjugátumok ürítésében, számottevő érdeklődés alakult ki a gyógyszerkölsönhatásokban betöltött szerepe iránt.

Jelenleg számos, szerkezetileg nem rokon vegyületről kimutatták, hogy gátolják az ABCC2 aktivitását. Többek között a probenecid, amely a köszvény kezelésében alkalmazott gyógyszer, továbbá a glibenclamid, a rifampicin, az indometacin, a ciklosporin A, és a antibiotikumok közül az azitromicin és a gatifloxacin⁸³. Emelkedett ABCC2 mRNS szintet írtak le néhány ciszplatin és doxorubicin rezisztens sejtvonalonban⁸⁴. Számos különböző mutációját kimutatták Dubin-Johnson szindrómás betegekben, ami egy autoszomális recesszív rendellenesség, mely conjugált hyperbilirubinemiával jár⁷⁸.

ABCC3

Az *ABCC3* az ABC transzporter géncsalád multidrug resistance associated protein alcsaládjának harmadik tagja (*MRP3*), a 17q21.3 kromoszómarégióban található. A fehérje felépítésére jellemző a TMD1-TMD2-NBD1-TMD3-NBD2 szerkezet. Specifikus funkciója még nem tisztázott, de biztosan szerepet játszik a szerves anionok biliaris és intestinális kiválasztódásában. Elsősorban a máj cholangiocytáiban, portalis hepatocytáiban, a vékonybélben, a vastagbélben és a

mellékvesekéregben fordul elő. Kisebb mennyiségben megjelenhet a pancreasban, a placentában és a vese distalis tubulussejteiben. Polarizált sejtek esetében a basolateralis membránban helyezkedik el⁸⁵. A cholangiocytáknak fontos szerepe van az epe kiválasztás szabályozásában és az epe pH-jának beállításában. Cholestasis esetén a felhalmozódott toxikus epesók a cholangiocyták basolateralis membránján át a vérbe transzportálódnak, így nem kerülnek a bélbe. Normál májban alig kimutatható mennyiségben van jelen az ABCC3, és normál fiziológiás körülmények között a basolateralis epesó efflux jelentéktelen. Cholestaticus körülmények között megnő az ABCC3 szintje, így feltételezhető, hogy az szállítja ezeket a toxikus epesókat, így a májsejtek detoxifikáló mechanizmusában vesz részt⁶³. A bélben hasonló funkció feltételezhető, a duodenumba szekretált epesók valószínűleg szintén az MRP3 segítségével transzportálódnak a vérbe⁸⁶.

Az ABCC3 többek között MTX-t is szállít, de annak poliglutamált formáját nem. Kool és munkatársai megfigyelték, hogy az ABCC3-t expresszáló sejtek rövid ideig tartó MTX kezelés után nagy MTX rezisztenciát mutatnak, viszont hosszú ideig tartó MTX kitettség esetén nem alakul ki rezisztencia. Az eltérés a sejtekben történő poliglutamáció miatt volt megfigyelhető, mert a MTX-t nagy affinitással szállítja a fehérje, míg a MTX-Glu₂-t csak lassan vagy a detektálható szint alatt⁸⁵. Ezen kívül az ABCC3 in vitro transzportál folsavat és folát származékokat, pl.: leukovorint, bár a MTX-nál lényegesen kisebb mértékben. Mivel az antifolatokra való érzékenységet nem csupán az intracelluláris antifolat szint, hanem az intracelluláris folát-pool is meghatározza, ezért az ABCC3 működése ilyen módon is befolyásolhatja a gyógyszer hatását⁸⁷.

ABCC10

Az *ABCC10* (ATP-binding cassette, sub-family C, member 10) az ABC-transzporter géncsalád C10-es génje, más néven *MRP7* (multidrug resistance-associated protein 7), amely a 6p12.3-es kromoszómarégióban található, és egy 1492 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek felépítése megegyezik az ABCC1 fehérje felépítésével: TMD0-L0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2⁷⁷. (9.ábra) Noha membrán topológiája hasonló az *MRP* család *C1*, *C2*, *C3* és *C6* tagjaihoz, az ABCC10 fehérjéje mutatja a legkevesebb aminosav azonosságot a család többi tagjával, mindössze 33-36%. A humán *ABCC10*

gén szerkezete és szerveződése is szignifikánsan eltér a többi MRP géntől, 22 exont és 21 intront tartalmaz, mRNS-e nagymértékben expresszálódik a vastagbélben, a bőrben és a herékben, bár más szövetekben is kimutatható ⁸⁸. Az ABCC10 protein egy lipofil anion transzporter. Ez a fehérje mediálja a glukuronát konjugátumok szállítását, valamint kisebb mértékben glutathion konjugátumokat is szállít. Ahogy az MRP család többi tagja, úgy az ABCC10 is rendelkezik egy páros szubsztrátkötő zsebbel, mely kölcsönhatásba léphet anionos és lipofil ligandumokkal is ⁸⁹.

ABCG2

Az *ABCG2* (ATP-binding cassette, sub-family G, member 2) az ABC-transzporter géncsalád G2-es génje, más néven *BCRP* (breast cancer resistance protein). Nevét onnan kapta, hogy humán emlőrák sejtek drogrezisztenciájával hozták először összefüggésbe ⁹⁰. Génje a 4q22 kromoszómarégióban található, a kódolt protein egy N-terminálisan elhelyezkedő NBD-ből és egy TMD-ből áll (9.ábra). Működéséhez homodimert képez, így szállít nagy hibrofób negatív, ill. pozitív töltésű, eltérő szerkezetű molekulákat, többek között citosztatikumokat is ^{63, 68, 67, 91}. Az *ABCG2* legnagyobb sűrűségben a vékonybélben, a májban és a placentában fordul elő, de kimutatták jelenlétét a vesében, a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben, az izomban, a tüdőben, a vér-agy gátban, szívben a mellékvesében, a verejtmirigyekben, az erek és kapillárisok endotheliumában és őssejteken is. Polarizált sejtek esetében az apikális membránban található ⁶⁷.

Az *ABCG2* fiziológias funkciója nem teljesen ismert. A bélben korlátozza a toxikus anyagok felszívódását, a májban fokozza azok epébe történő kiválasztódását, így csökkenti a biológiailag hozzáférhető xenobiotikumok mennyiségét. Hozzájárulhat az endogén szteroidok és/vagy glukuronidok hepatobiliaris exkréciójához. Részt vesz a vér-agy gát kialakításában és a magzat védelmében is ⁹². A hematopoetikus őssejteken expressziója nagyobb, mint az *ABCB1*-é, az elköteleződött sejteken viszont downregulálódik, fontos szerepe lehet tehát az őssejtek védelmében. Az őssejtek érését is befolyásolhatja azáltal, hogy a differenciációhoz szükséges anyagokat kitranszportálja a sejtből, így az nem tud elindulni az elköteleződés irányába ⁹⁰.

3.3.2 A methotrexate hatásmechanizmusában fontos további gének

Metiléntetrahidrofolát-reduktáz (MTHFR)

Az MTHFR a metilációs folyamatok és a DNS szintézis metszéspontjában áll. Katalizálja az 5,10- Metilén-tetrahidrofolát lebontását 5-metiltetrahidrofoláttá, amely szubsztrátja a homocisztein-metionin átalakulásának. Ezután a metionin átalakul az univerzális metil donorrá, S-adenozilmetioninná, mely részt vesz a DNS és a proteinek metilálásában. 5,10- Metilén-tetrahidrofolát szubsztrátja a de novo purin szintézisnek.

Az *MTHFR* génje a 1p36.3 kromoszómarégióban található. Legtöbbet vizsgált polimorfizmusai a *677C>T*, ami Ala222Val cserét, és a *1298A>C*, ami Glu429Ala cserét okoz. Mindkét polimorfizmus esetén csökkent MTHFR aktivitást és megnövekedett homocisztein szintet figyelhettek meg, különösen azokban az egyéneknél, akiknek a plasma folát koncentrációja alacsonyabb volt. A *677C>T* az enzim katalitikus funkcióját érinti, hatására az enzim termolabillá válik. A *1298A>C* az *MTHFR* regulátor doménjére hat. Önmagában egyik polimorfizmus hatása sem szignifikáns, de a *677T-1298A* haplotípust kapcsolatba hozták az ALL relapsus nagyobb esélyével⁹³. Ulrich⁹⁴ és munkatársai, a *677C>T* mutáció és a MTX-ra való toxicitás összefüggését vizsgálták csontvelő transzplantáción átesett AML-es betegekben. Kimutatták, hogy a *677TT* genotípus megnöveli a toxicitásra való hajlamot⁹⁴. MTX-tal kezelt gyermekkori ALL-ben több tanulmány is leírta, hogy *677T* allél esetében szignifikánsan alacsonyabb volt a túlélés esélye (EFS), de nem jelentett rizikófaktort a toxicitás és az agyvérzés esetében^{95, 93}. A T allél különösen gyakori az olasz és a mexikói populációban, míg az afrikai populációban kifejezetten alacsony. A T allél tehát valószínűleg szelektív előnnyel jár bizonyos feltételek mellett a magas folát tartalmú étrenden élők körében⁹⁶. Az *MTHFR 1298A* allél magasabb MTX toxicitással jár reumatoid arthritisz betegeknél a kaukázusi népcsoportban, de ezt az összefüggést nem tudták kimutatni fekete, illetve afroamerikai populációban⁹⁷.

γ -glutamil-hidroláz

A humán γ -glutamil-hidroláz (*GGH*) enzim génje a 8q12.23-q13.1 kromoszómarégióban helyezkedik el. A fehérje egy savas glikoprotein, mely

leggyakrabban a lizoszómákban fordul elő, de létezik szekretált formája is különböző testfolyadékokban, főleg a vérben. Az enzim a folát és antifolát poliglutamátok láncvégi vagy utolsó előtti γ -glutamil csoportját hidrolizálja⁹⁸. Aktiválódásakor homodimert képez, aktív centrumát egy cisztein (Cys110) és egy hisztidin (His220) alkotja. Expressziója a májban és a vesében a legmagasabb, de a szérumban, a placentában, a vastagbélben és az agyban is előfordul⁹⁹. Azon tumorsejtek, melyekben magas a GGH enzimszint, rezisztensek az antifolátokra, és a GGH szint emelkedésével párhuzamosan a rezisztencia mértéke fokozódik. A *GGH* gén expresszióját megvizsgálták olyan DNS mintákon, amelyeket MTX-tal kezelt tüdőrákos ill. leukémiás betegektől származó szövetből és leukémiás sejtvonalból nyertek. A gén szekvenálásával több polimorfizmust találtak. A *-401C>T* (rs3758149) és *-124T>C* promoterpolimorfizmusok fokozzák a promoter aktivitását és így a GGH fehérje expresszióját. A megnövekedett GGH-szint a MTX-poliglutamát csökkent akkumulációjához és MTX rezisztenciához vezethet¹⁰⁰.

Reduced folate carrier

A reduced folate carrier (RFC1), a solute carrier family 19 (SLC19A1) 1-es tagja, az emlős sejtek fő folsavszállító transzportere. Génje a 21q22.2-22.3 kromoszómarégióban helyezkedik el, számos szövetben expresszálódik.

A folátok hidrofil anionos molekulák, melyek diffúzió útján nem tudnak átjutni a biológiai membránokon, így nem meglepő, hogy szofisztikált membrán-transzport-rendszerek fejlődtek ki, hogy elősegítsék az emlős sejtek és szövetek folátakkumulációját. Noha a folát kofaktorok felvétele a sejtekbe és szövetekbe megtörténhet folát receptorok (FR), szerves anion transzporter család (OAT) és proton-folát transzporter (PCFT) útján is, messze a legjobban ismert folát transzporter az ubikviter expresszált redukált folát karrier molekula (RFC-1, más néven SLC19A1). Széles szöveti expressziója révén az SLC19A1-t tartják az emlős sejtekben és szövetekben a folátok és antifolátok fő transzportrendszerének⁵⁴. Az SLC19A1 kétirányú anioncserélő mechanizmussal működik, nem hidrolizál ATP-t. Magasabb az affinitása a MTX-ra és a redukált folátokra (1-5 μmol), mint a folsavra (100-200 μmol)³². Fontos kiemelni, hogy a foláttranszportban betöltött szerepén kívül az SLC19A1 a daganat kemoterápiában használatos antifolátok (MTX, pemetrexed, raltitrexed) fő

transzportere is, és e kemoterápiás szerek hatékonysága szorosan összefügg ezen transzportrendszer mennyiségével és aktivitásával, tumorokban és normál szövetekben egyaránt ⁵⁴.

A génben gyakran vizsgált polimorfizmus a 80G>A, mely Arg27His cserét okoz a protein első transzmembrán doménjében (TMD1), ezáltal a transzporter molekula folt affinitás nő ⁹³. Az SLC19A1AA genotípus esetén így magasabb a MTX beáramlás a sejtbe, mely jobb terápiás választ eredményez, ugyanakkor a toxicitás előfordulása gyakoribb, tehát feltételezhetően befolyásolja a MTX-tal kezelt betegségek kimenetelét.

NR1I2 (SXR)

A *NR1I2* (nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2 vagy régebbi nevén *SXR*: Steroid and Xenobiotic Receptor) gén a sejtmag receptor szupercsaládba tartozik, az 1-es alcsalád, I.csoport 2-es számú tagja, mely a 3q12-q13.3 kromoszóma régióban helyezkedik el, és egy 434 aminosavból álló fehérjét kódol. A sejtmag receptor szupercsalád tagjai transzkripciós faktorok, egy ligand kötő domain és egy DNS kötő domain jellemző rájuk. Az *SXR* által kódolt fehérje a citokróm P450 fehérjét kódoló *CYP3A4* gén transzkripciós szabályozója, heterodimerként kötődik a *CYP3A4* promoter régiójához. Ezt a folyamatot számos komponens aktiválja, ezáltal indukálva a *CYP3A4* átíródását. Ezek közé tartozik a dexamethason és a rifampicin is. Az *SXR* fehérje több más olyan gén transzkripcióját is aktiválja, melyek részt vesznek a potenciálisan káros xenobiotikumok, gyógyszerek és endogén vegyületek metabolizmusában és szekréciójában. Kötődik például az *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCC3* promoter régiójához is. A MTX anyagcseréjében közvetlen szerepet nem tölt be, a gyógyszer rezisztencia kialakításában a génátíródás szabályozása szintjén vesz részt ¹⁰¹,

¹⁰² 77

4 Célkitűzés

Munkám során az alábbi céljaim voltak:

- **A magyarországi osteosarcomás gyermekek adatainak feltérképezése.** Az általános túlélés (OS) és az eseménymentes túlélés (EFS) vizsgálta. Retrospektív adatfeldolgozás során elemezni az adatokat a betegség kiterjedése és lokalizációja, szövettani altípusa szerint, a betegek életkora, neme, a műtét típusa, a tumor preoperatív kemoterápiára adott szövettani válasza, illetve a diagnózis ideje alapján.
- **Az osteosarcoma kezelésének alappillért jelentő nagy dózisu methotrexate kezelés farmakokinetikája, toxicitása és a túlélés közötti összefüggések vizsgálata osteosarcomás gyermekekben.** Elemezni az összefüggéseket a prognosztikai és populációs paraméterek (nem, életkor, metastasis jelenléte, szövettani válasz és a rizikócsoportok), a farmakokinetikai paraméterek, illetve a toxicitás fellépése között. Megvizsgálni, hogy van-e kapcsolat a farmakokinetikai tényezők és a máj-, vese- illetve csontvelő-toxicitás között. Vizsgálni, hogy hogyan változik a toxicitás gyakorisága a kezelés során. Továbbá megnézni, hogy az általános illetve az eseménymentes túlélés mutat-e összefüggést a farmakokinetikai paraméterekkel, illetve a toxicitási adatokkal.
- **A nagy dózisu methotrexate kezelés farmakokinetikájának és a toxicitás kialakulásának vizsgálata genetikai háttér szempontjából.** Osteosarcomás gyermekek véréből DNS izolálása. A MTX metabolizmusában fontos szerepet játszó gének (*ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC10*, *ABCG2*, *GGH*, *SLC19A1*, *SXR*) egy pontos nukleotid polimorfizmusainak (SNP) meghatározása. A polimorfizmusok és különböző farmakokinetikai paraméterek, valamint a toxicitás előfordulása közötti összefüggések vizsgálata.

5 Módszerek

5.1 *Betegek*

Munkánk során 122 beteg kórlapját néztük át és elemeztük részletesen. Mindegyiküket a II. számú Gyermekklinikán kezelték 1988-2006 között a COSS-86 illetve COSS-96 protokoll alapján, ami neoadjuváns és adjuváns kemoterápiát, valamint radikális műtétet foglal magába.

Ezen 122 osteosarcomás beteg közül 105 gyermektől tudtunk retrospektív módon farmakokinetikára és toxicitásra vonatkozó adatokat gyűjteni. Kizártuk az elemzésből azokat, akiket nem a COSS protokoll szerint kezelték (2 beteg), továbbá azokat is, akiknek 3 vagy annál kevesebb MTX-blokk farmakokinetikai adata volt elérhető (5 beteg). A fennmaradó 98 beteg 929 MTX blokkjának elemzéséből kizártuk azokat a blokkokat, melyek esetében előzetes toxicitás miatt dózisredukció történt (129 blokk), illetve azokat, melyek esetében az infúzió hossza 6 óra helyett 4 óra volt (95 blokk). Így 98 beteg 765 MTX blokkja képezte farmakokinetikai elemzésünk homogén adatbázisát, amiben minden beteg azonos dózisban, azonos idő alatt kapta meg a MTX kezelést.

A farmakogenetikai vizsgálatokba egy 60 fős szűkebb betegpopulációt vontunk be. A DNS mintagyűjtés megszervezése és lebonyolítása főleg Dr. Erdélyi Dániel munkája volt. Nem kerültek be ebbe a vizsgálatba a DNS mintagyűjtés kezdete előtt exitált betegek, illetve akiknek a kórházi dokumentációja fizikai károsodás miatt nagyon hiányos volt. Mivel valamennyi vizsgálatunk retrospektív volt, csak a kórlapokon megtalálható adatokat lehetett összegyűjteni, ami sok esetben nem bizonyult elégségesnek. Farmakogenetikai vizsgálatunkba a multilevel statisztikai elemzésnek köszönhetően visszaemelhettük a korábbi elemzésből dózis redukció vagy 4 órás infúzió időtartam miatt kizárt blokkokat, hiszen a vizsgált genetikai különbségek szempontjából pont a legérdekesebb adatokat veszítettük volna el.

A vizsgálatba bevont valamennyi gyermekek a magyar (kaukázusi) populációhoz tartoztak, de a magyarországi statisztika alapján becsült adatok szerint 5%-uk roma származású lehetett. A vizsgálatához írásos beleegyezésüket adták a szülők

betegink kiskorúsága miatt. A tanulmányt a Magyar Etikai Bizottság (Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság, azaz ETT TUKEB) hagyta jóvá.

5.2 Toxicitás és farmakokinetikai paraméterek

A MTX infúzió indítása után 6, 24, 36 és 48 órával mért szérumszinteket, valamint a kezelést követő első kétheti fehérvérsejt, granulocita és trombocita számokat, szérumszinteket, valamint a kezelést követő első kétheti fehérvérsejt, granulocita és trombocita számokat, szérumszinteket glutamát-piruvát-transzamináz (GPT), gamma-glutamil transzferáz (GGT), bilirubin, összfehérje és kreatinin értékeket gyűjtöttük össze, majd a legalacsonyabb összfehérje, fehérvérsejt, granulocita és trombocita számokat, legmagasabb szérumszinteket GPT, GGT, bilirubin, és kreatinin értékeket kategorizáltuk. A toxicitás kategorizálása az Európai Daganatkutatási- és kezelési Szervezet (EORTC) által meghatározott toxicitási kritériumrendszer (Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTC) 3.0 verzió) alapján történt, melynek értékei egyébként megegyeznek a COSS-protokoll által megadott toxicitási értékekkel. A CTC a daganatterápia mellékhatásainak megállapítására elterjedten használt osztályozási rendszer, mely szervenként ill. szervrendszerenként lebontva öt kategóriába sorolja a toxicitási tüneteket (3. táblázat)

<http://www.eortc.be/services/doc/ctc/ctcae3.pdf>

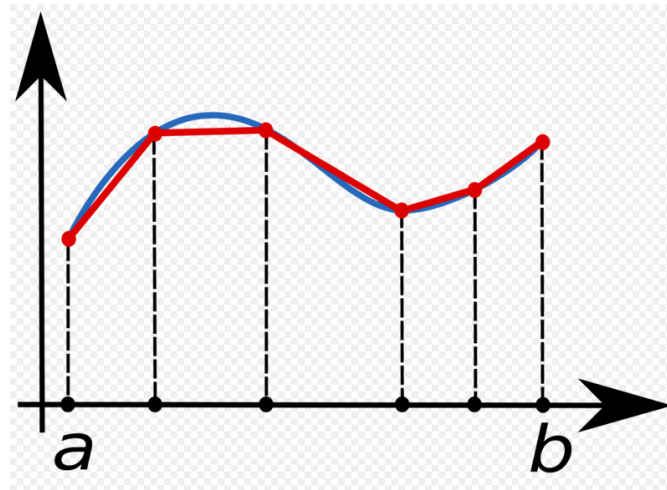
Az összegyűjtött toxicitás mértékét jelző maximális vagy minimális laborértékeket betegenként átlagoltuk, majd a kapott érték szerint a megfelelő kategóriába soroltuk őket. Az elemzéshez szükséges diszkretizáláshoz azt vettük figyelembe, hogy mennyire gyakori volt a toxicitás előfordulása. Máj- és csontvelő toxicitás sok betegnél előfordult a kezelése után, ezért ezekben az esetekben a klinikailag releváns kérdés az volt, hogy a súlyos, akut toxicitás megjelenését milyen tényezők befolyásolják. A kreatinin értékekkel jellemzett glomeruláris vese toxicitás ritkán fordult elő, tehát ebben az esetben azt vizsgáltuk, hogy magát a toxicitás megjelenését milyen faktorok befolyásolják. Így májtoxicitásnak GPT esetében a III-IV. fokú, GGT és bilirubin esetében a II-IV. fokú toxicitás előfordulását, csontvelőtoxicitásnak a fehérvérsejt, granulocita és trombocita számok esetében a II-IV. fokú toxicitás előfordulását, vesetoxicitásnak az I-IV. fokú toxicitás előfordulását definiáltuk.

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

		Toxicitási fokozat				
		0	1	2	3	4
Csontvelő	fehérvérsejt ($10^9/l$)	4.0 - 10.0	3.0 - 4.0	2.0 - 3.0	1.0 - 2.0	< 1
	granulocita ($10^9/l$)	> 2.0	1.5 - 2.0	1.0 - 1.5	0.5 - 1.0	< 0.5
Máj	GPT (U/l)	<40	40 - 100	100 - 200	200 - 800	> 800
	GGT (U/l)	<40	40 - 100	100 - 200	200 - 800	> 800
	Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	<17	17 - 26	26 - 51	51 - 170	> 170
Vese	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	< 100	100 - 150	150 - 300	300 - 600	> 600

A MTX-szintek monitorozásához a II. Gyermekklinikán a 6 órás infúzió befejezésekor (6 óra, csúcskoncentráció), majd az infúzió kezdetétől számított 24, 36, 48 és elhúzódó gyógyszerürülés esetében 66, illetve 72 óra múlva történt a mintavétel. A MTX-szint meghatározását HPLC- (nagy nyomású folyadékkromatográfia) módszerrel végezték 1998-ig a II.sz Gyermekklinika laborjában, 1998-tól 2006-ig az Országos Onkológiai Intézet Farmakokinetikai Laboratóriumában. Betegenként átlagoltuk a csúcskoncentrációkat, valamint a 24 ill. 48 órás szérumszinteket. A csúcskoncentráció szempontjából két csoportra osztottuk a betegeket. A szakirodalomban korábban megállapított 1000 $\mu\text{mol/l}$ -es átlag csúcskoncentráció értéket választottuk a két csoport közötti vágópontnak.

A görbe alatti terület az extracelluláris koncentrációtól és az expozíciós időtől egyaránt függ, ezért ezzel a paraméterrel jól jellemezhető a MTX expozíció. A koncentráció – idő görbét a 6, 24, 36 és 48 órás MTX-szintek alapján tudtuk felvenni. A görbe alatti terület közelítésére az úgynevezett trapezoid módszert használtuk, mely a meglévő pontok alapján trapézokat illeszt a görbéhez, és ezek területéből tudja megbecsülni a görbe alatti terület nagyságát (10. ábra). Elemzésünkben a 0 és a 48 óra közötti időintervallum görbe alatti területét használtuk (AUC_{0-48}), mivel a terület nagyságának közelítéséhez a 48 órán túli rész az alacsony koncentrációk miatt általában elhanyagolható, illetve sok beteg esetében nem volt adat a 48 órán túli szérumszintekről.



10. ábra Illusztráció a trapezoid illesztéses területszámítás elvéről.

A rendelkezésünkre álló adatokból kiszámoltuk a betegek MTX clearance-ét oly módon, hogy a tényleges MTX dózist (testfelület x 12g/m²) elosztottuk a 24 órás farmakokinetikai görbe alatti területtel.

A MTX két kompartmentes ürülését két felezési idővel jellemeztük. A kezdeti disztribúciós fázis felezési ideje esetében ($T_{\alpha 1/2}$) exponenciális függvényt illesztettünk a MTX koncentráció-idő görbe 6 órás és 24 órás pontjai közé, majd kiszámoltuk, hogy a szérum MTX koncentráció mikor éri el a 6 órás csúcskoncentráció felét.

$$MTX_{24} = MTX_6 (1/2)^{18/T_{\alpha 1/2}}$$

$$T_{\alpha 1/2} = 18 / \log_2(MTX_6 / MTX_{24})$$

Hasonló módon jártunk el a második, eliminációs felezési idő kiszámításánál ($T_{\beta 1/2}$), csak ott az exponenciális függvényt a 24 és 48 órás függvénypontok közé illesztettük, és azt számoltuk ki, hogy mikor éri el a MTX koncentráció a 24 órás koncentráció felét.

$$T_{\beta 1/2} = 24 / \log_2(MTX_{24} / MTX_{48})$$

5.3 Genotipizálási módszerek

5.3.1 DNS izolálás és a vizsgált polimorfizmusok kiválasztása

A perifériás vérből történő DNS kivonást dr. Erdélyi Dániel és Féléné dr. Semsei Ágnes végezte. A DNS-t a kezelés befejezése után EDTA-s csőbe vett perifériás vérből szeparálták a QIAamp DNA Blood Maxi és QIAamp DNA Blood Midi kitekkel (Qiagen), a gyártó leírása szerint. PhD munkám kezdetén szerettem volna kiterjeszteni a farmakogenetikai vizsgálatokat a klinikánkon 1988-2006 között kezelt teljes osteosarcomás betegpopulációra. Az ehhez szükséges DNS izolálására lehetőségem lett volna az Ortopédia Klinikán tárolt paraffinba ágyazott műtéti blokkokból. Ezért paraffinba ágyazott anonim műtéti mintákon DNS izolálást végeztem. Az izolálást kifejezetten formalinnal fixált paraffinba ágyazott szövetekhez készült RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kittel (Ambion) végeztem, a gyártó leírása szerint. Bár az így kapott DNS minták DNS koncentrációja elégségesnek bizonyult, az izolált DNS töredezettsége miatt a minták alkalmatlanok voltak a szükséges molekuláris genetikai vizsgálatok elvégzésére. Ezt a munkát egy előkísérletnek szántuk, hogy lássuk, hogy a módszer alkalmas-e további genetikai vizsgálatra.

Munkacsoportunk a nemzetközi irodalom alapján 12 gén összesen 46 egy pontos nukleotid polimorfizmusát genotipizálta. A minor allél frekvencia legalsó határát 10%-nál határoztuk meg. Ezután ellenőriztük, hogy az egyes SNP-k az általunk vizsgált populáción Hardy-Weinberg egyensúlyban voltak-e, illetve kapcsoltsági vizsgálatokat végeztünk a redundáns elemzések elkerülése érdekében. Így az *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC10*, *ABCG2*, *GGH*, *SLC19A1* és *SXR* gének összesen 29 polimorfizmusának hatását vizsgáltuk meg a klinikai adatokra.

A GenomeLab SNPstream rendszerrel vizsgált polimorfizmusok kiválasztását Féléné Dr. Semsei Ágnes végezte PhD munkája során. Ennek módszerét disszertációjában részletesen leírta, az *ABCC1* gén polimorfizmusainak genotipizálását ismertette¹⁰³.

5.3.2 PCR-RFLP módszer

A módszer lényege, hogy a vizsgálni kívánt mutációt tartalmazó DNS szakaszt megfelelő primerekkel polimeráz láncreakció (PCR) segítségével megsokszoroztuk, majd a PCR terméket restriktions endonukleázzal megemésztettük. Az enzimet úgy választottuk, hogy a hasító hely a polimorf pontra essen, így az egyes genotípusok elkülöníthetővé váltak a hasítási mintázat alapján. Ezután a termékeket elektroforetikus mobilitásuk alapján azonosítottuk. A *SLC19A1* 80A>G polimorfizmus (rs1051266) kimutatásához PCR reakciót követően *CfoI* enzimmel történő restriktions emésztést hajtottunk végre. A 230bp hosszú DNS-fragment a Human reduced folate carrier (GenBank accession number U19720) 51 és 281 nukleotidja között található. A primerek szekvenciái:

- SLC19A1_80GA_S: 5' AGTGTCACCTTCGTCCCCTC 3'
- SLC19A1_80GA_AS: 5' CTCCCGCGTGAAGTTCTT 3'

A PCR reakció 50µl-ben zajlott, ennek összetétele: 20ng DNS, 1x DyNazyme™ II DNS polimeráz puffer (Finnzymes), 200µM mindegyik dezinukleotidtrifoszfátból (Amersham Biosciences), 300nM mindkét primerből, 0,5 unit DyNazyme™ II DNS polimeráz (Finnzymes) és desztillált víz. A PCR program: kezdeti denaturáció 95°C 4 perc, ezt követte 35 ciklusban denaturáció 95°C 30 másodperc, anelláció 55°C 1 perc, elongáció 72°C 30 másodperc, majd a végső termináció: 72°C 5 perc. A PCR terméket 10 unit *CfoI* enzimmel emésztettük a gyártó utasításai szerint. A termékeket 3%-os gélen futtattuk, etídium-bromid festékkel mutattuk ki. Szintén ezzel a módszerrel genotipizáltuk a *GGH* rs3758149 polimorfizmust. A polimorfizmus a *GGH* promoter régiójában található, a -401. bázispárt érinti, és C→T bázis cserét okoz.

5.3.3 Real-Time PCR módszer

A Real-Time PCR vizsgálatot TaqMan módszerrel végeztük. Ilyen technikát alkalmaztunk az *ABCC3* -211C>T (rs4793665) mutáció vizsgálatához. A használt RT PCR készülék: ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Az alkalmazott primerek szekvenciái:

- MRP3_EXON1-M211F 5'TGTTAGCCT CGGTATTTAGAGAGACA3';

- MRP3_EXON1-M211R 5'CCCTGGGAGGGACTTTGG3';
- MRP3_EXON1-M211V1 5'/VIC/CCCCCACCTCTG/NFQ/3',
- MRP3_EXON1-M211M1 5'/FAM/CCCCCTACCTCTG/NFQ/3'

A PCR reakció 15µl-ben zajlott, ennek összetétele: 1-20ng DNS, 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (without AmpErase UNG) (Applied Biosystems), 0,1x SNP Assay Mix (Applied Biosystems), ami tartalmazza az MRP3_EXON1-M211F, MRP3_EXON1-M211R, MRP3_EXON1-M211V1, MRP3_EXON1-M211M1 oligonukleotidokat és desztillált vizet. A PCR program lépései: kezdeti denaturáció 95°C 10 perc, ezt követte 35 ciklusban denaturáció 92°C 15másodperc, anelláció és elongáció: 60°C 1 perc, majd a végső termináció: 72°C 5 perc

Az *ABCC3*-211C>T mutáció esetében az MRP3_EXON1-M211V1 oligonukleotid jelölte a -211CC genotípusú egyéneket, az MRP3_EXON1-M211M1 oligonukleotid a -211TT genotípusú egyéneket, és a heterozigóta -211CT egyéneknél mindkét festék által kibocsátott jelet mértünk, de kisebb mértékben.

5.3.4 Egyéb genotipizálási módszerek

Az *ABCB1* polimorfizmusok, valamint az *ABCC2* rs2273697 genotipizálása multiplex polimeráz láncreakciót (PCR: polimerase chain reaction) követő multiplex miniszekvenálással, ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) készüléssel történt. Az *ABCG2* gén két polimorfizmusának vizsgálatához LightCycler PCR módszert használtunk. A régió amplifikálását célzó PCR reakciót követően olvadáspont-analízissel határoztuk meg a minták genotípusát. A többi polimorfizmus genotipizálása GenomeLab SNPstream rendszerrel történt. A GenomeLab SNPstream (Beckman Coulter) genotipizáló rendszer működésének lényege egy multiplex PCR-t követő, jelölt nukleotidokkal történő egy bázispárnyi primer extenzió,. Ezen módszerekkel történő genotipizálás Dr. Erdélyi Dániel és Féléné Dr. Semsei Ágnes munkája volt, a módszereket disszertációjukban részletesen leírták^{103, 104}.

5.4 Statisztikai analízis

A betegek általános és eseménymentes túlélését Kaplan-Meier módszerrel analizáltuk. A nemzetközi ajánlásoknak megfelelően 5 év után tekintjük a betegeket

gyógyulnak, így az általános túlélést (overall survival, OS), vagyis, hogy a betegek hány százaléka él még a betegség diagnózisa után, is 5 évre számítottuk. Ugyanígy az eseménymentes túlélést (event-free survival, EFS), vagyis, hogy a betegek hány százaléka él még recidíva nélkül a betegség diagnózisa után, is 5 évre számítottuk. A megfigyelési adatok alapján túlélési görbéket készítettünk. A betegek túlélése és a különböző szempontok közötti kapcsolatot Kaplan-Meier módszerrel analizáltuk. Kategorikus változók esetében (nem; diagnóziskori életkor kisebb, vagy nagyobb, mint 14 év; metasztázis jelenléte; műtét típusa; alkalmazott protokoll; tumor lokalizációja, szövettani válasza, szövettani altípusa; toxicitás jelenléte) a log-rank tesztet alkalmaztuk. A folytonos változók (farmakokinetikai paraméterek) és a túlélés közötti kapcsolatot Cox proportional hazards modell segítségével állapítottuk meg.

Farmakokinetika – toxicitás összefüggését vizsgáló elemzésünk során egy megfigyelt változó (például májenzimszint-emelkedés) viselkedését egy másik változó (például 24 órás MTX-szérumszint) függvényében vizsgáltuk. Azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy van-e összefüggés a toxicitás fellépése és a farmakokinetikai paraméterek között. Ehhez a betegeket a toxicitás fellépése szerint két csoportra osztottuk, majd megvizsgáltuk, hogy van-e különbség a két csoport között az adott változó (például a 24 órás MTX-szérumszintek) tekintetében. Annak eldöntésére, hogy van-e különbség folytonos változók két független csoportja között, normál eloszlású változók esetében a kétmintás t-próbát, nem normál eloszlású változók esetében a Mann-Whitney féle U tesztet alkalmazhatjuk.

Az általunk vizsgált farmakokinetikai paraméterek közül normál eloszlást mutattak a csúcskoncentráció, a görbe alatti terület (AUC_{0-48}) és a lognormalizált 24 órás szérumszint értékek, így ezekben az esetekben t-tesztet használtunk. A 24 és 48 órás szérumszint értékek, a féléletidők és a MTX clearance elemzéséhez Mann-Whitney próbát alkalmaztunk.

Kategorikus változók közötti kapcsolat vizsgálatára χ^2 -négyzet tesztet használtunk. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy van-e különbség a súlyos toxicitás előfordulásában a fiúk és a lányok, a 14 évnél fiatalabbak és idősebbek, az áttétes és nem áttétes betegek, a jó és rossz szövettani válaszuak, a különböző rizikócsoportok, illetve a különböző genotípus csoportok között. A teszt elvégzésének feltétele, hogy

minden alkategóriában megfelelően nagy elemszám legyen. Ez vizsgálatainkban teljesült.

Az elemzést SPSS 15.1 (SPSS Inc.), illetve Stat Soft STATISTICA 8.0 szoftverekkel végeztük.

Az allélfrekvenciát allélszámolással határoztuk meg. A Hardy-Weinberg egyenlőség (HWE) meglétét az on-line elérhető <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> szoftverrel számoltuk ki, a HWE-től való szignifikáns eltérést $p < 0,01$ érték esetén állapítottunk meg.

A farmakogenetikai adatbázisra szintén a fent ismertetett frekventista statisztikai metódusokat alkalmaztuk, majd Bayes-i statisztikán alapuló módszerekkel elemeztettük a Budapesti Műszaki Egyetem Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszék informatikusainak segítségével. Az elemzés nagy részét Arany Ádám PhD hallgató végezte. Az elemzéshez használt adatfájlban a blokkonkénti adatok betegenkénti adatokká való aggregációja mediánszámítással történt. Az alkalmazott módszerekhez diszkrét értékű változókra volt szükség, ezért a folytonos értékészletű farmakokinetikai változókat diszkrétizáltuk. A gyógyszer szintek esetében rendelkezésre állt klinikailag értelmezhető határérték (csúcskoncentráció esetében $1000 \mu\text{mol/l}$, 48h MTX plazmaszint esetében $0,4 \mu\text{mol/l}$), ezeknél a változóknál ezt használtuk csoportosításra. Ahol nem volt ilyen jellegű egyértelmű vágópont, ott medián, vagy percentilis értékek alapján diszkrétizáltunk. Az elemzésbe bevont diszkrétizált változóknál a változónkénti hiányzás gyakorisága nem haladta meg a teljes betegszám 10%-át.

A Bayesian MultiLevel Analysis of relevance (BMLA) módszer Monte Carlo módszerrel véletlenszerűen felderíti az összes lehetséges kapcsolatrendszer egy reprezentatív halmazát (Monte Carlo módszer: egy matematikai eszköz, mely alkalmas arra, hogy véletlen események sorozatával oldjunk meg determinisztikus problémákat), és minden egyes teljes modellre megvizsgálja, hogy milyen valószínűséggel igaz ez a modell az adatok tükrében¹⁰⁵. Ezek a kapcsolati hálóok csomópontokból (diszkrét változók) és nyilakból, ún. élekből állnak. A nyilak jelölik a kapcsolatokat az egyes csomópontok között. A nyíl iránya meghatározza, hogy melyik változó hat melyikre. Kiszámolható, hogy két változó között az egyes éleket a modellek milyen valószínűséggel támasztják alá: összeadjuk azon modellek valószínűségét, amik

tartalmazzák az élt. Ez a valószínűség fogja megadni, hogy egy él milyen erős. Ha egy él *a posteriori* valószínűsége közel 1, az azt jelenti, hogy 1 a valószínűsége annak, hogy az adott kapcsolat releváns, valódi. Nem tudjuk ugyan egyértelműen felderíteni a jelen adatmennyiségből a teljes összefüggésrendszert, de szinte az összes hihető modellben közös, hogy az adott kapcsolatnak meg kell lennie.

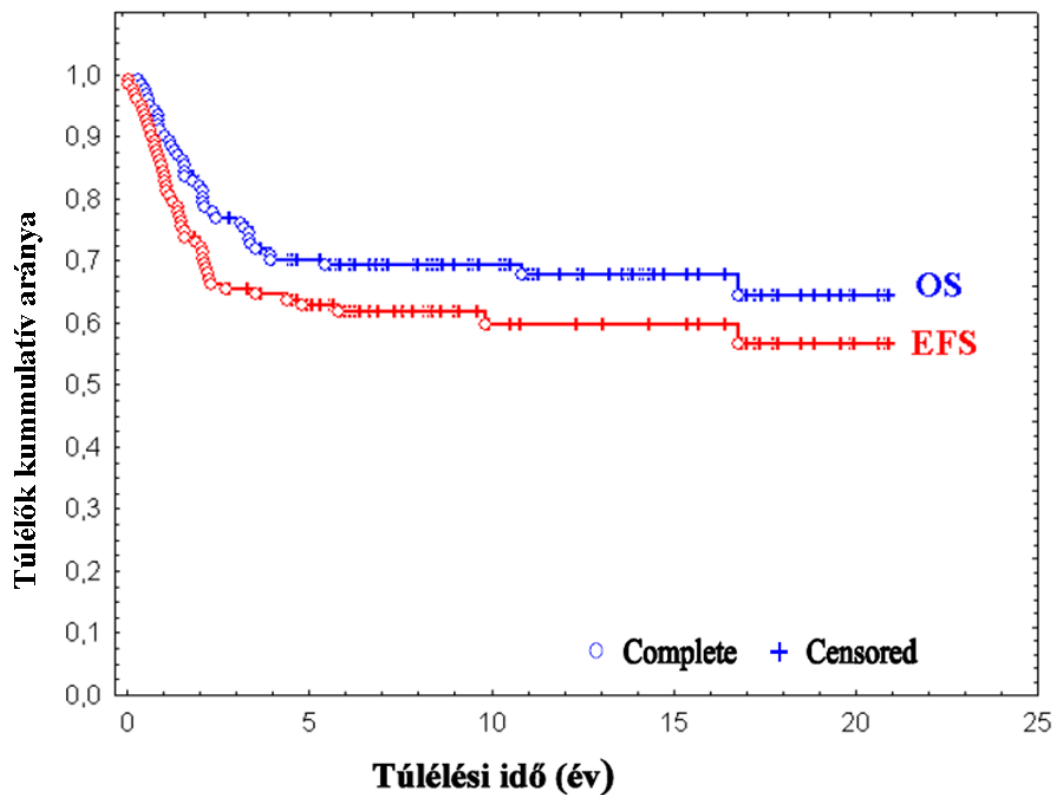
A Markov Blanket Membership (MBM) elemzés a modellek éleinek un. Markov-takaróbeliségét is vizsgálja, nem csupán a meglétét¹⁰⁶. Az élekkel operáló, kapcsolatok felderítését célzó elemzésben nem volt kitüntetett változó, általános összefüggési hálózatra voltunk kíváncsiak. Itt azonban minden esetben egy célváltozóhoz viszonyítva vizsgáljuk a magyarázó változók relevanciáját. A Markov-takaró elemei statisztikai értelemben elszigetelik a célváltozót az összes többi közvetett magyarázó változótól, tehát a Markov-takaró elemei pontosan azok a változók, amelyek közvetlenül relevánsak a célváltozóra. Azt adjuk tehát meg minden magyarázó változóra, hogy mekkora valószínűséggel elemei a célváltozó Markov-takarójának. A módszer szemléltetésére jó példa, hogy ismerjük egy betegcsoportban a cigarettavásárlás mennyiségét, az elszívott cigaretták számát, és a tüdőrák prevalenciáját. Nyilvánvaló függés mutatható ki a vásárolt mennyiség és a tüdőrák kialakulásának rizikója között, de csak akkor, ha nem tudjuk közvetlenül az elszívott cigaretta mennyiségét mérni. Amennyiben ez az adat rendelkezésre áll, a vásárlási adat már nem releváns, ezt elszigeteli az új változó. A vásárlási adat ekkor nem eleme a Markov-takarónak.

6 Eredmények

6.1 A gyermekkori osteosarcoma kezelésének eredményei hazánkban

Munkánk során 122 beteg kórlapját néztük át és elemeztük részletesen. Mindegyiküket a II. számú Gyermekklinikán kezelték 1988-2006 között. A 122 beteg közül 57 lány és 65 fiú volt, átlagéletkoruk $13,8 \pm 3,6$ év volt. A betegek kezelése a COSS-86 illetve COSS-96 protokoll alapján történt, ami neoadjuváns és adjuváns kemoterápiát, valamint radikális műtétet foglal magába. A 122 osteosarcomás beteg fő jellemzőit az 4. táblázatban foglaltuk össze.

Az egész betegcsoportra vonatkozóan az 5 éves általános túlélés (OS) 68 %, az eseménymentes túlélés (EFS) 61,5 %. (11. ábra) Eredményeinket az 5. táblázatban foglaltuk össze.



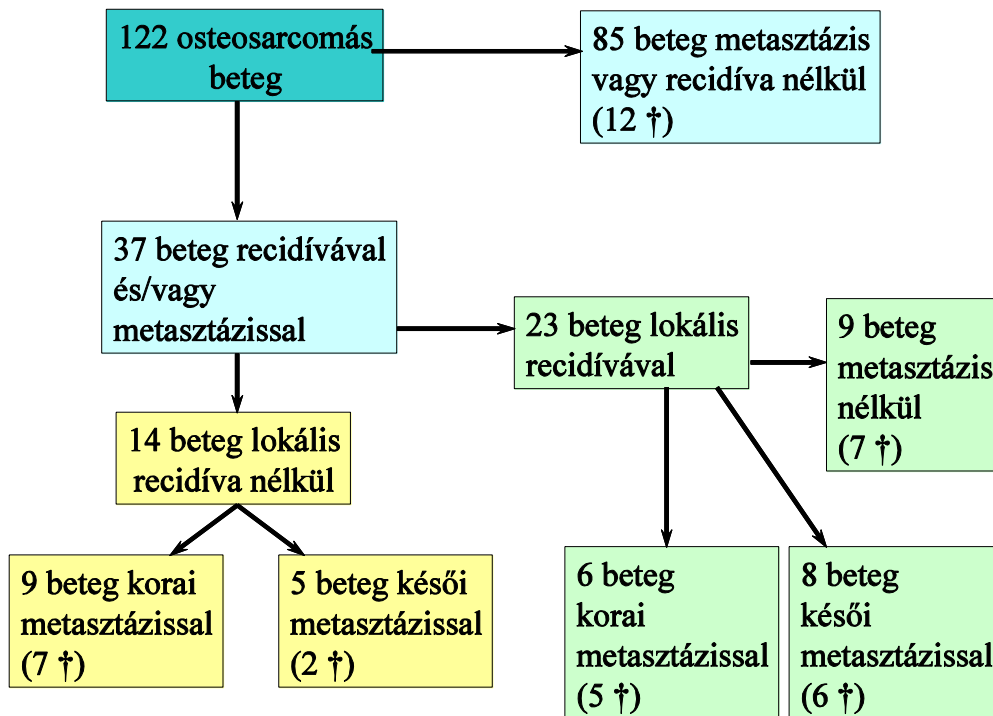
11. ábra Gyermekkori osteosarcoma általános túlélése = 68,03% (kék vonal), eseménymentes túlélése = 61,48% (piros vonal) Magyarországon 1988-2006

4. táblázat A II. Gyermekklinikán 1988-2006 között kezelt osteosarcomás betegcsoport adatai

Szempont	Csoportok	Betegek száma
Összesen	Minden beteg	122
Metastasis	Nincs metastasis	95
	Korai metastasis	15
	Késői metastasis	12
Műtét típusa	Biopszia	6
	Amputatio	30
	Végtagmegtartó	82
Diagnózis ideje	1988-1995 (COSS86)	58
	1996-2006 (COSS96)	64
Lokalizáció	Törzs	9
	Felső végtag	16
	Alsó végtag	97
Nem	Fiú	65
	Lány	57
Szövettani altípus	Osteoblastos	62
	Chondroblastos	16
	Fibroblastos	15
	Egyéb	29
Neoadjuváns kemoterápiára adott szövettani válasz	Rossz válasz (>10% túlélő sejt)	38
	Kedvező válasz (< 10% túlélő sejt)	44
Diagnóziskori életkor	≤ 14 éves	58
	> 14 éves	64

5. táblázat Osteosarcomás gyermekpopuláción elemzett prognosztikai tényezők áttekintése

Szempont	Csoportok	Általános túlélés (OS) (%)	p(OS)	Eseménymentes túlélés (EFS) (%)	p(EFS)	
Általában	Teljes populáció	68,03		61,48		
Metasztázis	Nincs áttét	78,95	0,00002	81,12	< 0,00001	
	Korai áttét	16,66		22,1		
	Késői áttét	41,66		13,05		
Műtét típusa	Biopszia	0	< 0,00005	0	0,00005	
	Amputáció	63,33		56,66		p=0,3
	Végtagmegtartó	76,82		68,29		
Diagnózis dátuma	1988-1995	62,04	0,3	56,9	0,6	
	1996-2006	73,44		64,06		
Tumor lokalizációja	Törzs	33,33	0,01626	22,22	0,0133	
	Felső végtag	68,75		56,25		p=0,7
	Alsó végtag	71,13		64,94		
Nem	Fiú	66,15	0,6	56,92	0,5	
	Lány	70,18		64,91		
Szöveti altípus	Osteoblastos	67,74	0,9	64,56	0,8	
	Chondroblastos	62,5		56,25		
	Fibroblastos	73,33		60,00		
	Egyéb	68,96		58,62		
Neoadjuváns kemoterápiára adott válasz	Rossz válasz	55,26	0,00974	50,00	0,0182	
	Jó válasz	84,09		77,27		
Életkor a diagnóziskor	< vagy = 14 év	77,59	0,04383	74,14	p=0,0085	
	> 14 év	59,38		48,4		



12. ábra Folyamatábra a budapesti II. számú Gyermekklinikán 1988 – 2006 között kezelt osteosarcomás gyermekekről

A 122 gyermek közül 37 esetben fordult elő metasztázis, lokális recidíva, vagy mindkettő (12. ábra). Korai áttétként definiáltuk azokat a metasztázisokat, melyek a diagnózis idejében már képalkotó eljárásokkal kimutathatók voltak. Későinek definiáltuk azokat az áttéteket, melyek a kezelés közben, vagy a kezelés befejezése után váltak kimutathatóvá a betegekben. A 37 betegből 15 esetében volt jelen a diagnóziskor korai metasztázis, az ő általános túlélésük 16,6% volt. Közülük 11 metasztázis a tüdőre lokalizálódott, 3 esetben disszeminált csont metasztázist észleltünk, és egy gyermeknél a vesében találtunk áttétet. Ezen korai áttétes betegek közül sajnos csak három gyermek élte túl a betegséget. A mi beteg populációnkban 13 gyermeknél fordult elő késői metasztázis, az ő általános túlélésük 41,6% volt. Valamennyi esetben az áttét a tüdőre lokalizálódott, 4 esetben a regionális nyirokcsomókban is megjelent, 8 esetben pedig lokális recidíva is kísérte a tüdő folyamatot. A késői tüdőáttétes betegeket thoracotómiával és posztoperatív kemoterápiával kezelték. A 13 beteg közül öten hosszú távú túlélők. Az áttét nélküli betegcsoport általános túlélése 79%,

eseménymentes túlélése 77% volt. (13.A ábra) A metasztázis megjelenése szignifikáns összefüggést mutatott a túléléssel($p=0.00002$).

23 betegnél újult ki lokálisan a daganat, 18 közülük exitált (12. ábra). A recidívák valamennyi esetben a primer tumor műtétje után alakultak ki. Tizenhat gyermek esetében végtagmegtartó műtét történt a relapsus előtt. Hat esetben a recidíva mellett korai áttét is jelen volt, közülük ötöt elveszítettünk. Nyolc gyermeknél a recidíva és a késői áttét együtt alakult ki, hatan közülük exitáltak. Izolált daganat kiújulás 9 betegnél volt megfigyelhető, közülük ketten hosszú távú túlélők. A lokális recidíva felfedezése átlagosan a diagnózis után 16 hónappal történt (terjedelem 0,4 hónap - 118,3 hónap).

Az áttét és recidíva nélküli betegcsoport 12 halálesetének okait vizsgálva hét beteg esetében vagy a kezelés visszautasítása vagy a betegség inoperabilitása miatt a halál oka a progresszív betegség volt. Négy esetben a halál oka a kezelés okozta toxicitás volt (toxikus cardiomyopathia, szepszis, toxikus májelégtelenség, oedema pulm et cerebri shock szindróma, Wernicke encephalopathia, pneumonia). Egy gyermek 16,8 évvel a diagnózis után exitált felnőtt gyógyászati ellátásban.

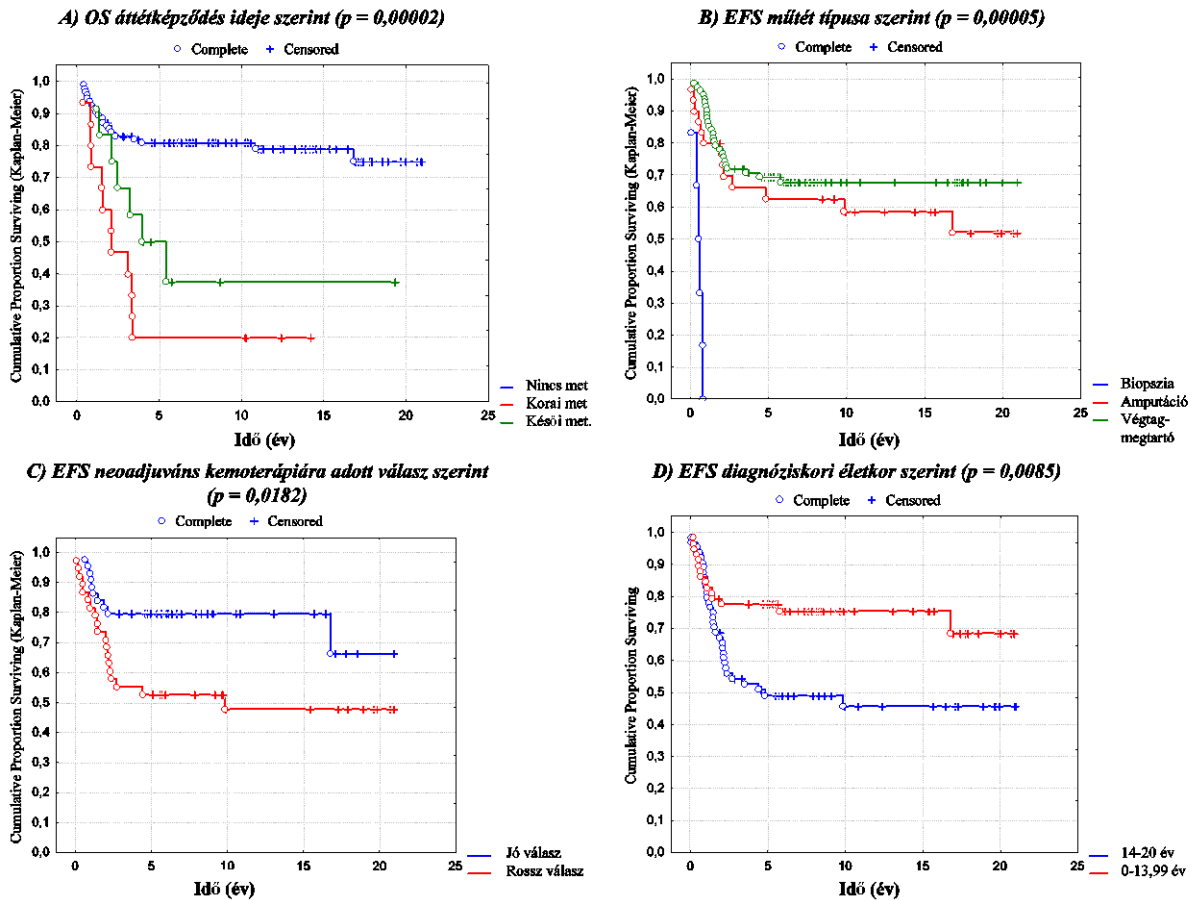
Vizsgáltuk a túlélést a műtét típusa szerint. (13.B ábra) Azok a betegek, akiknél csak biopszia történt, mert a daganatot nem lehetett eltávolítani, valamennyien meghaltak. A radikális műtét lehet amputáció ill. végtagmegtartó műtét. Az elmúlt 10 évben 85% fölött volt a végtagmegtartó műtétek száma. A betegek nagy része a műtét során endoprotézist kapott. Az eseménymentes túlélés amputáció esetében 57 %, végtagmegtartó műtét esetén 68%. Statisztikailag nem találtunk szignifikáns különbséget a két különböző műtéti típussal kezelt betegek túlélésében ($p=0,3$).

A neoadjuváns kemoterápiára adott válasz alapján szignifikáns különbséget találtunk a túlélésben ($p=0,018$). A jól reagáló betegcsoport EFS 77% volt, míg a rosszul reagáló betegcsoporté 50% (13.C ábra). Az adatok életkor szerinti elemzésekor azt az eredményt kaptuk, hogy a fiatalabb gyermekek gyógyulási eredményei szignifikánsan jobbak ($p=0,008$). Míg a 14 évesnél idősebb gyermekek EFS-e csak 48,4% volt, addig a 14 év alattiak EFS-e 74,14%. (13.D ábra)

Nem volt szignifikáns különbség az 1995. előtt (COSS86 protokoll) és után (COSS96 protokoll) kezelt betegek túlélésében sem. (14.A ábra) A COSS86 protokoll

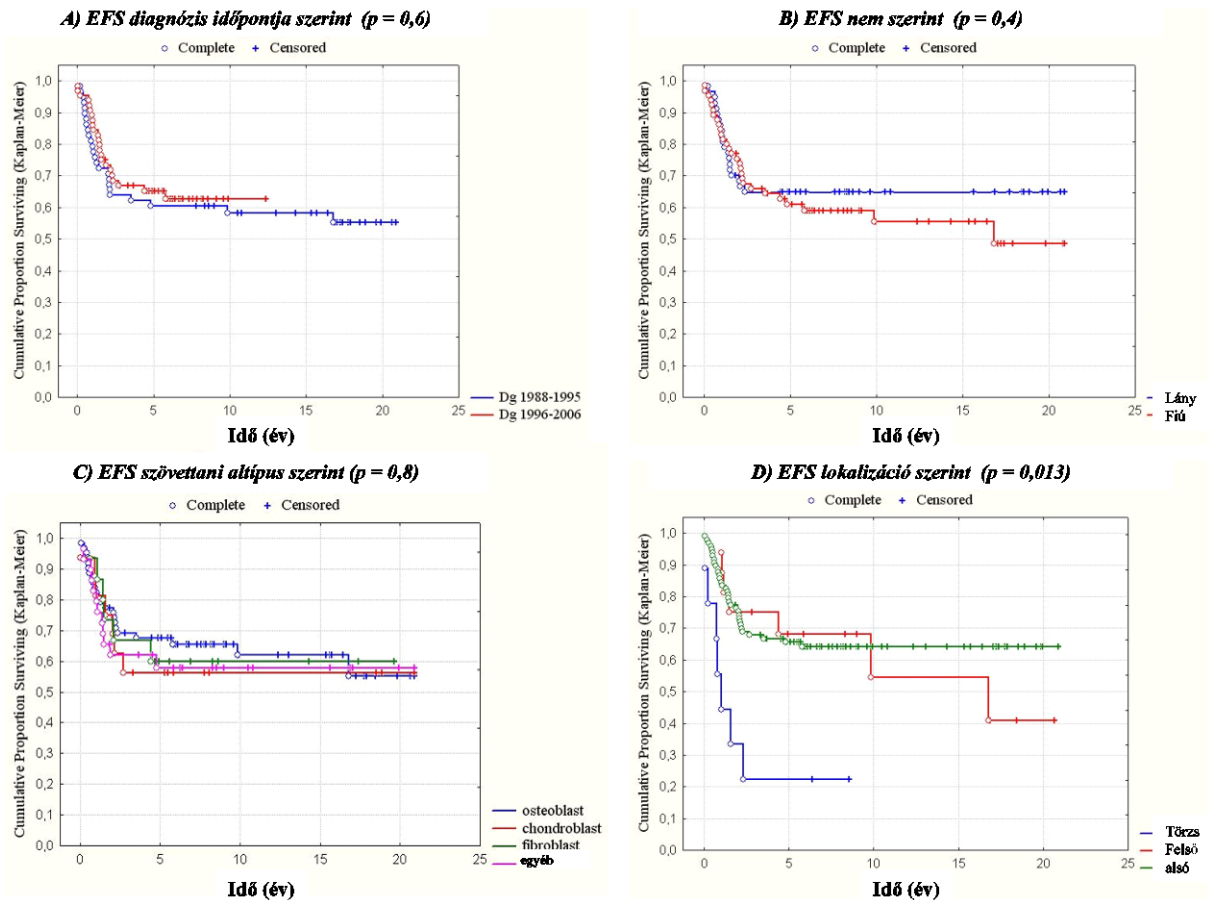
alapján kezelt betegek esetében EFS=57%, a COSS96 protokoll alapján kezelt betegek esetében EFS=64%. Vizsgáltuk az eseménymentes túlélést a daganat elhelyezkedése alapján is. A törzsi lokalizációjú tumoroknak rossz a prognózisa, az EFS csupán 22,5 %. Az alsó végtagon és a felső végtagon elhelyezkedő tumorok gyógyulási eredményeiben nincs szignifikáns különbség ($p=0,7$). Az EFS felső végtagi tumor esetén 56,3 %, alsó végtagi tumor esetén 65 % (14.D ábra). Nincs szignifikáns különbség a fiúk és a lányok eseménymentes túlélésében sem ($p=0,48$). (14.B ábra) A fiúk esetében az EFS 57 %, a lányokéban pedig 65 %. A szövettani altípusok tekintetében sem találtunk szignifikáns különbséget. ($p=0,9$). (14.C ábra)

A 39 haláleset okait vizsgálva azt találtuk, hogy 20 esetben metasztázis, vagy disszeminált betegség, 7 esetben lokálrecidíva, 6 esetben primeren nem operálható betegség, 4 esetben toxicitás és 2 esetben progresszív, a terápiára nem reagáló betegség volt az ok.



13. ábra Szignifikáns jelentőségű prognosztikai faktorok a magyar osteosarcomás gyermekpopulációban.

- A:** OS áttétképződés ideje szerint ($p = 0,00002$) Nincs áttét (kék vonal) OS=78, 95% - Korai áttét (piros vonal) OS=16, 66%, Késői áttét (zöld vonal) OS=41, 66%;
- B:** EFS műtét típusa szerint ($p = 0,00005$) Biopszia (kék vonal) EFS=0, 00% - Amputáció (piros vonal) EFS=56, 66%, Végtagmegtartó műtét (zöld vonal) EFS=68, 29%;
- C:** EFS neoadjuváns kemoterápiára adott válasz szerint ($p = 0,018$) Rossz válasz (piros vonal) EFS=50, 00%, Jó válasz (kék vonal) EFS=77, 27%;
- D:** EFS diagnóziskori életkor szerint ($p = 0,008$) 14 éves kor alatt (piros vonal) EFS=74, 14%, 14 éves kor fölött (kék vonal) EFS=48, 4%



14. ábra Nem szignifikáns jelentőségű prognosztikai faktorok a magyar osteosarcomás gyermekpopulációban.

- A:** EFS diagnózis(Dg.) időpontja szerint ($p = 0,6$) Dg. 1988-1995 között (kék vonal) EFS= 56, 9%, Dg. 1996-2006 között (piros vonal) EFS= 64, 06;
- B:** EFS nem szerint ($p = 0,4$)Lányok (kék vonal) EFS = 64, 91%, Fiúk (piros vonal) EFS = 56, 92%;
- C:** EFS szövettani altípus szerint ($p = 0,8$) Osteoblastos (kék vonal) EFS=64, 56 %, Chondroblastos (piros vonal) EFS=56, 25%, Fibroblastos (zöld vonal) EFS=60, 00%, egyéb (lila vonal) EFS=58, 62 %;
- D:** EFS lokalizáció szerint ($p = 0,013$) Törzs (kék vonal) EFS=22, 22%, Felső végtag (piros vonal) EFS=56, 25%, Alsó végtag (zöld vonal) EFS=64, 94%

6.2 Farmakokinetikai tényezők osteosarcomás gyermekek MTX kezelésében

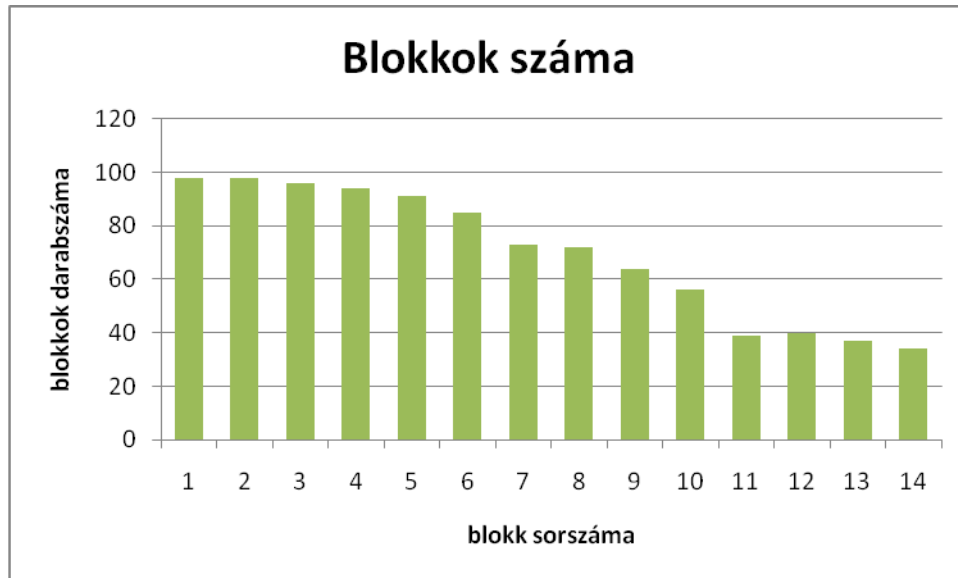
A II. számú Gyermekklinika korábban leírt 122 fős osteosarcomás beteganyagából 98 betegről volt elérhető megfelelő mennyiségű farmakokinetikára és toxicitásra vonatkozó adat. A farmakokinetikai elemzésben résztvevő populáció főbb jellemzőit a 6. táblázat foglalja össze. A betegek átlagéletkora $13,7 \pm 3,6$ év volt.

6. táblázat A vizsgált betegek fő jellemzői

Betegek száma		98
Nem	Fiú	49
	Lány	49
MTX blokkok száma	Összes MTX blokk	929
	MTX blokkok száma betegenként (átlag)	9,68
	Kizárások utáni MTX blokk	765
	Kizárások utáni MTX blokkok száma betegenként (átlag)	7,81
Életkor	Életkor átlaga (év)	13,69
	14 év alatti	46
	14 év feletti	52
Rizikócsoport	Standard rizikó	69
	Magas rizikó	25
	Nem ismert a rizikócsoport	4
Szöveti válasz	Rossz (>50% túlélő daganatsejt)	14
	Mérsékelt (10-50 % túlélő daganatsejt)	15
	Jó (<10% túlélő daganatsejt)	39
	Nem ismert a szövettani válasz	30

A betegek 70,4%-a, azaz 69 beteg került a standard rizikó csoportba, 25 beteg került a magas rizikójú ágra, és 4 beteg rizikócsoportjáról nem volt biztos adatunk. A 98 beteg összesen 989 MTX blokkot, egy fő átlagosan 9,68 blokkot kapott a kezelés során.

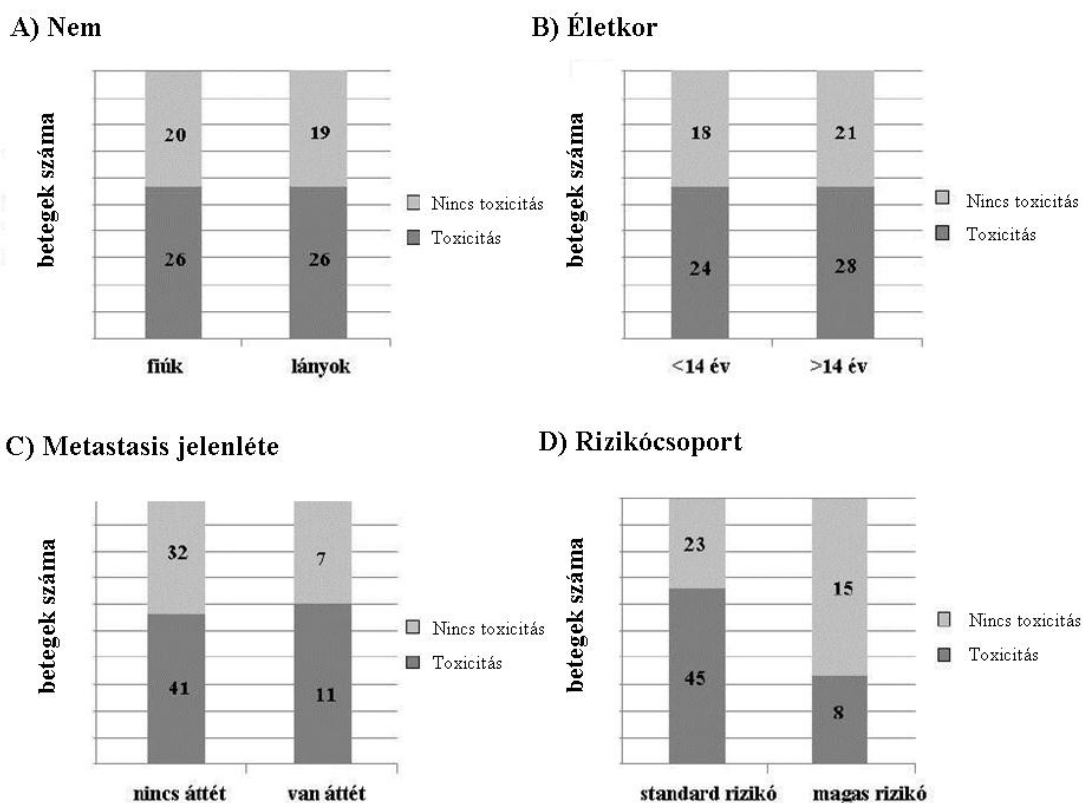
A dózis csökkentések és dózis elhagyások miatt a vizsgált blokkok száma a terápia előrehaladása során egyre csökkent. (15. ábra)



15. ábra Melyik blokkot hány beteg kapta meg, a blokk sorszáma szerint csoportosítva

Az egyes kezelések indulásakor észlelt laboratóriumi paramétereiket a protokoll által előírt értéken belül voltak. A kezdeti GPT szint átlaga: 40,51U/l \pm 35,27, a kezdeti GGT szint átlaga: 46,4U/l \pm 24,81, a kezdeti bilirubin szint átlaga: 8,75 μ mol/l \pm 3,46, a kezdeti kreatinin szint átlaga: 59,78 μ mol/l \pm 13,48 volt.

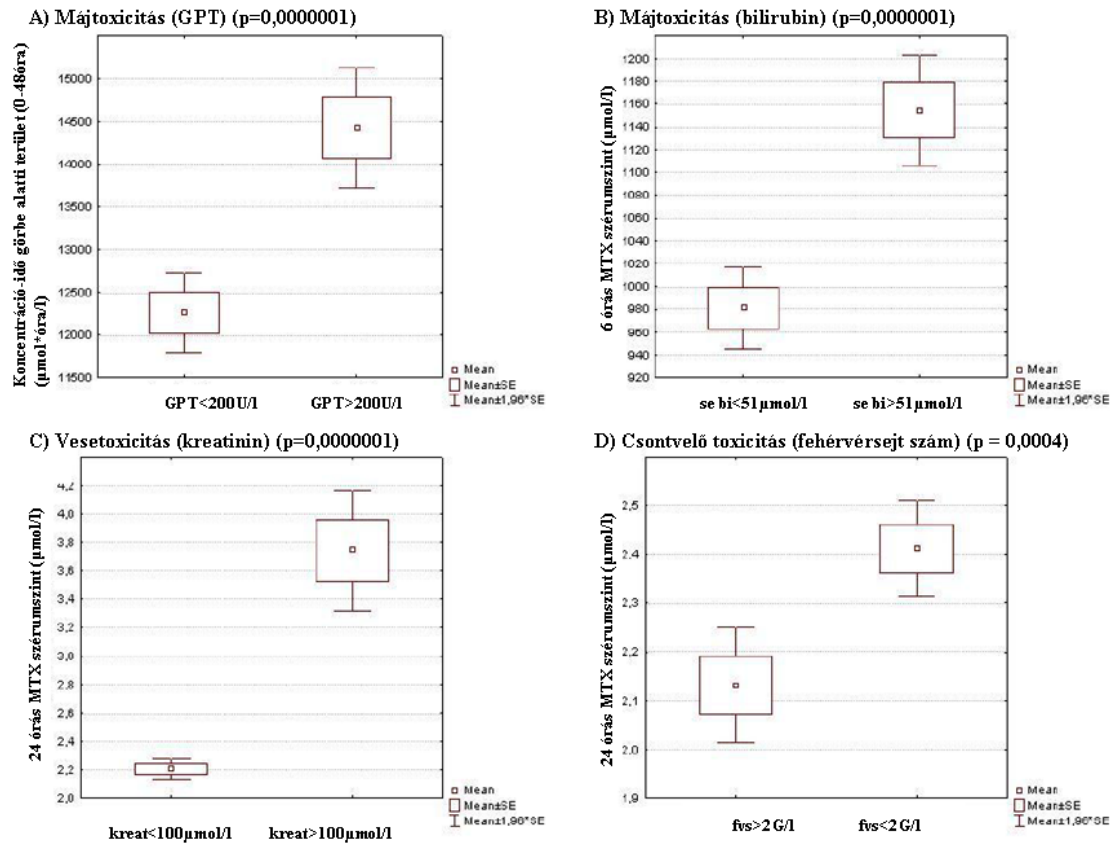
A kezelések utáni súlyos májtoxicitás előfordulási gyakorisága 35% (szérum GPT >200 U/l vagy szérum bilirubin >17 μ mol/l), a csontvelő-toxicitása 60% (fehérvérsejt-szám < 3x10⁹/l vagy granulocita-szám < 1,5x10⁹/l), a vesetoxicitása 5,8% (kreatinin szint<100 μ mol/l) volt. A farmakokinetikai paramétereiben és a toxicitás előfordulásában nem volt szignifikáns különbség a nem, az életkor, a metastasis jelenléte és a szövettani válasz szempontjából. Jelentős különbséget találtunk azonban rizikócsoportok szerint. A magas rizikójú csoportban alacsonyabb volt a 48 órás görbe alatti terület (átlag=11057,5 μ mol/l*h), mint a standard rizikó csoportban (átlag = 13562,5 μ mol/l*h, p= 0,000001). A standard rizikócsoportúak között gyakoribb volt a toxikus bilirubinszint, mint a magas rizikójú csoportban (Odds Ratio (OR): 0,2726, 95 % CI: 0,1009–0,7368, p = 0,0083) (16. ábra).



16. ábra Májtoxicitás előfordulása a különböző betegcsoportokban

Szignifikáns összefüggéseket találtunk a farmakokinetikai paraméterek és a toxicitás fellépése között. Azon blokkok esetében, melyek után az első heti legmagasabb szérumban GPT szint III-IV. fokú májtoxicitást jelzett, szignifikánsan magasabb volt a csúcskoncentráció (hepatotoxikus betegcsoport átlaga = 1183,8 $\mu\text{mol/l}$ vs. nem hepatotoxikus betegcsoport átlaga = 999,1 $\mu\text{mol/l}$, $p=0,0000001$) és a 48 órás görbe alatti terület (hepatotoxikus betegcsoport átlaga = 14425,2 $\mu\text{mol/l}\cdot\text{h}$ vs. nem hepatotoxikus betegcsoport átlaga = 12259,2 $\mu\text{mol/l}\cdot\text{h}$, $p=0,0000001$) (17.A ábra), miközben alacsonyabb volt a MTX clearance (hepatotoxikus betegcsoport átlaga = 1,29 $\text{kg}\cdot\text{l}\cdot\text{h}/\mu\text{mol}$ vs. nem hepatotoxikus betegcsoport átlaga = 1,47 $\text{kg}\cdot\text{l}\cdot\text{h}/\mu\text{mol}$, $p=0,00005$). A szérumban GGT- és bilirubin-szintek a hepatotoxicitásnak szintén indikátorai. Ezen enzimértékek alapján történt elemzés során az előbbivel megegyező, szignifikáns összefüggéseket kaptunk (17.B ábra). Jóval gyakrabban fordult elő nephrotoxicitás magasabb 24 órás MTX szérumszintek után (nephrotoxicus betegcsoport átlaga = 3,74 $\mu\text{mol/l}$ vs. nem nephrotoxicus betegcsoport átlaga = 2,2

$\mu\text{mol/l}$, $p=0.0000001$) (17.C ábra). A csontvelő-toxicitás előfordulása összefüggést mutatott a magasabb 24 órás MTX szérumszintekkel (myelotoxikus betegcsoport átlaga = $2,4 \mu\text{mol/l}$ vs. nem myelotoxikus betegcsoport átlaga = $2,1 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,0004$) (17.D ábra) és a magasabb 48 órás MTX szérumszintekkel (myelotoxikus betegcsoport átlaga = $0,44 \mu\text{mol/l}$ vs. nem myelotoxikus betegcsoport átlaga = $20,38 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,001$)



17. ábra Farmakokinetikai paraméterek és a toxicitás közötti összefüggések.

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

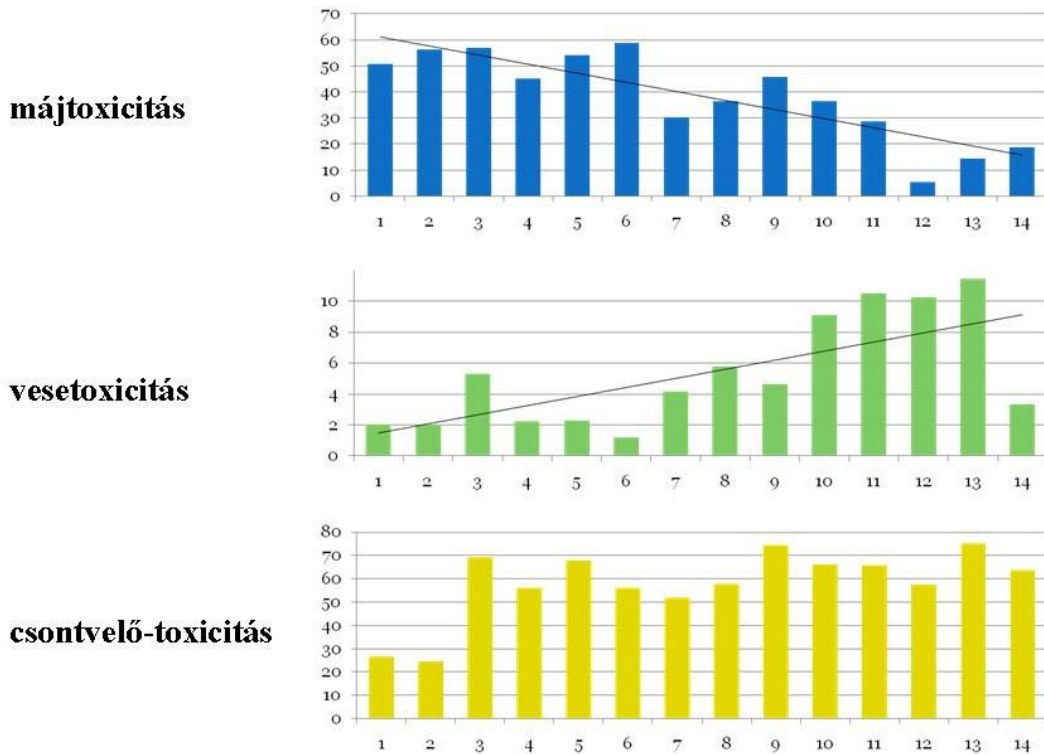
Megvizsgáltuk, hogyan változott a toxicitás fellépése a kezelés során. A májtoxicitás előfordulási gyakorisága csökkenő tendenciát mutatott. Ezt a terápia során alkalmazott dóziscsökkentések, halasztások, illetve a szervezet sejszintű alkalmazkodása magyarázhatja. A vesetoxicitás gyakorisága mindvégig igen alacsony volt, de a kezelés előrehaladtával növekedett. Ennek hátterében a vesekárosító cisplatin kumulatív dózisének növekedése állhat. Alapvetően az általunk vizsgált betegpopulációban, illetve a kizárások után fennmaradó MTX blokkok után ritkán fordultak elő kóros kreatinin értékek, ezért a nephrotoxicitásról blokkonkénti bontásban érdemben, kellő statisztikai alapokon nyugvó kijelentéseket nem tudunk tenni. A dolgozatban mindenképp megemlítendőnek ítéltük a vese toxicitással kapcsolatban megfigyelt tendenciákat, de az ezzel kapcsolatos megfigyelésink bizonyítása, megalapozása, így például a kezelések során adott egyéb vesekárosító anyagok hatásainak kiszűrése, további vizsgálatokat igényelne. A csontvelő-toxicitás előfordulása a 3., 5., 9., 13. blokkban mutat kiugrást. Ezt a MTX kezelést megelőző cisplatin-ifosfamid blokk okozhatta (18. ábra).

Megvizsgáltuk, hogy van-e korreláció a toxicitás előfordulása és a terápia kimenetele között. Eredményeink azt mutatják, hogy nem volt összefüggés a toxicitási paraméterek és az általános, illetve az eseménymentes túlélés között. Eredményeinket a 7. táblázatban foglaltuk össze.

7. táblázat A túlélés és a toxicitás kapcsolatának elemzése során kapott p-értékek

		p-értékek	
		OS	EFS
Csontvelő	Fehérvérsejt-mélypont (0-I vs II-IV. fokú toxicitás)	0,3567	0,8883
	Granulocita-mélypont (0-I vs II-IV. fokú toxicitás)	0,4208	0,7342
Máj	GPT első heti csúcs (0-II vs III-IV. fokú toxicitás)	0,8448	0,8562
	GGT első heti csúcs (0-I vs II-IV. fokú toxicitás)	0,5739	0,3659
	Bilirubin első heti csúcs (0 vs I-IV. fokú toxicitás)	0,8347	0,7667
Vese	Kreatinin első heti csúcs (0 vs I-IV. fokú toxicitás)	0,2828	0,5444

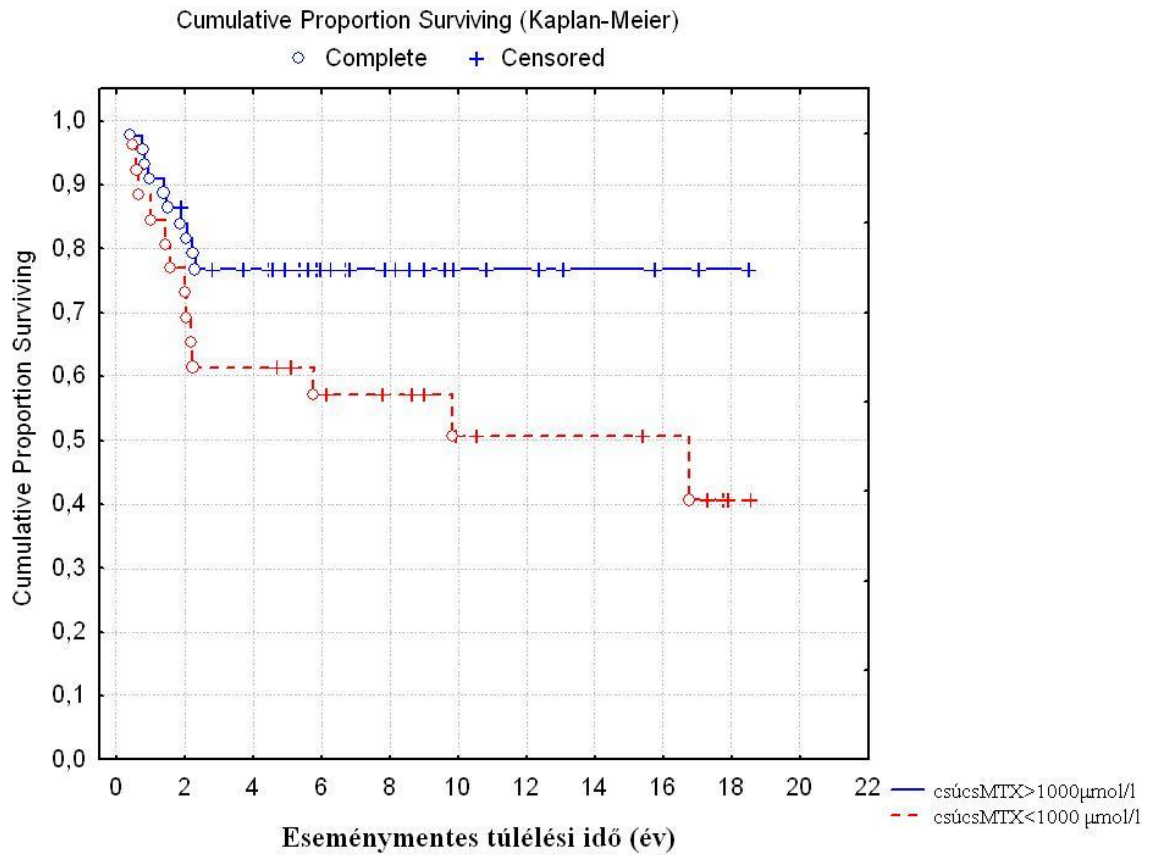
Toxicitás előfordulása a kezelés során



18. ábra A májtoxicitás, a vesetoxicitás és a csontvelő-toxicitás előfordulási gyakorisága blokkonként a kezelés során

A 48 órás MTX szérumszint a Cox proportional hazards modell teszt szerint szignifikáns korrelációt mutatott az eseménymentes ($p=0,047$) és az általános túléléssel ($p=0,008$) is. Magasabb szérumszintek esetében jobb volt a betegek túlélése. A csúcskoncentráció és a túlélés kapcsolatát is megvizsgáltuk. Nem volt szignifikáns különbség az 1000 $\mu\text{mol/l}$ feletti ill. alatti csúcskoncentrációjú betegek túlélésében ($p=0,061$ EFS-re, $p=0,45$ OS-re), de 1000 $\mu\text{mol/l}$ feletti átlag csúcskoncentráció esetén valamivel jobbák voltak az eseménymentes túlélési eredmények (19. ábra). Több vizsgálat a csúcskoncentráció-túlélés összefüggés helyett a csúcskoncentráció-szöveti válasz kapcsolat elemzésével írja le a csúcskoncentráció szerepét a terápia kimenetelében. Ezt a kérdést is megvizsgálva nem találtunk összefüggést az átlag csúcskoncentráció és a szöveti válasz között ($p=0,172$). A túlélésre vonatkozóan nem

volt kimutatható összefüggés sem a görbe alatti területtel (AUC_{0-48}), sem a felezési idővel, sem a MTX clearance-szel.



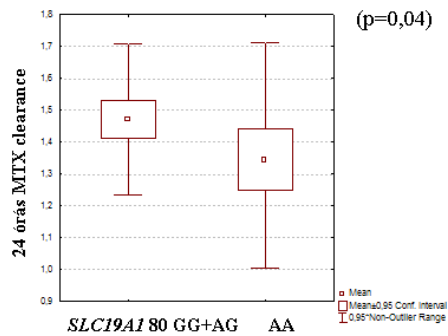
19. ábra Az eseménymentes túlélés 1000 µmol/l feletti ill. alatti átlag csúcskoncentrációjú betegek esetében ($p=0,061$)

6.3 Polimorfizmusok szerepe a methotrexate farmakokinetikájában és toxicitásában

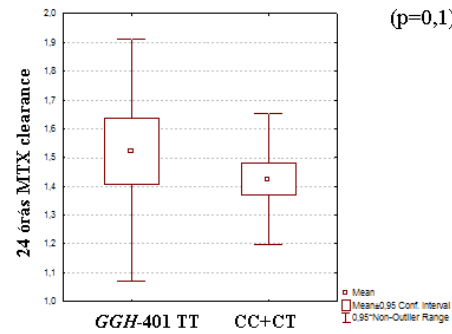
Farmakogenetikai elemzéseink kezdetén a *GGH* és *SLC19A1* gének polimorfizmusai és a MTX kinetika illetve toxicitás közötti összefüggéseket vizsgáltuk hagyományos frekventista statisztikai módszerekkel. Az elemzések során csak azon MTX blokkok adatait használtuk fel, melyek esetében 12 g/m² dózisban 6 órán keresztül kapták a gyógyszert a betegek. Így összesen 62 beteg 571 MTX blokkjának adatait elemeztük. Míg a *GGH*-401 C>T polimorfizmus esetében nem volt szignifikáns különbség (p=0,1) (20.B ábra), addig az *SLC19A1* 80AA genotípusú betegcsoportban alacsonyabb volt a 24 órás MTX clearance, mint az *SLC19A1* 80 G allélt hordozók körében (p=0,04) (20.A ábra). A 48 órás szérumban MTX szint értékei szignifikánsan alacsonyabbak voltak a *GGH*-401 TT genotípusú betegeknél, mint a C allélt hordozó beteg csoportban (p= 0,016), (20.D ábra), míg az *SLC19A1* 80G>A polimorfizmus esetében nem volt szignifikáns különbség (p=0,53). (20.C ábra).

A súlyos akut májkárosodás (CTC grade III-IV) előfordulása ritkább volt a *GGH* -401TT csoportban, mint a C allélt hordozókban (p=0,00061), és gyakoribb az *SLC19A1* 80AA homozigóta betegeknél, mint a G allélt hordozóknál (p=0,00245). A különbség erősödött azoknál a betegeknél, akik *SLC19A1* 80AA és *GGH*-401CC/CT genotípusúak voltak (p=0,00014). Tehát a *GGH* -401TT genotípusú betegek methotrexat-eliminációja gyorsabb és a súlyos mellékhatások előfordulása ritkább, mint a -401CC/CT gyermekeknél. Az *SLC19A1* 80A allél jelenléte esetén a súlyos mellékhatások előfordulása gyakoribb és a különbség erősödik, ha a *GGH* -401TT genotípus védő hatása nincs jelen a betegeknél (21.ábra).

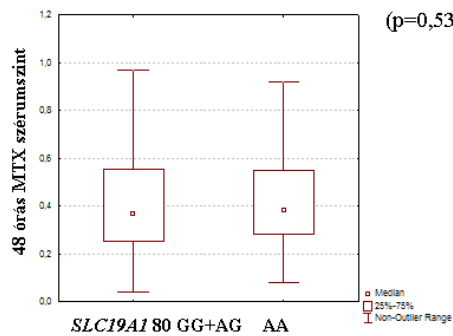
A) 24 órás MTX clearance *SLC19A1* 80 GG+AG vs AA (p=0,04)



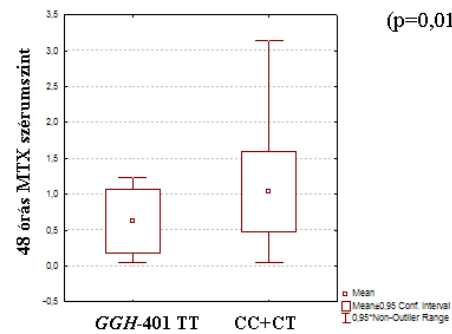
B) 24 órás MTX clearance *GGH-401* CC+CT vs TT (p=0,1)



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



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



20. ábra A *GGH-401* C>T és az *SLC19A1* 80 A>G polimorfizmusok szerepe a MTX farmakokinetikájában

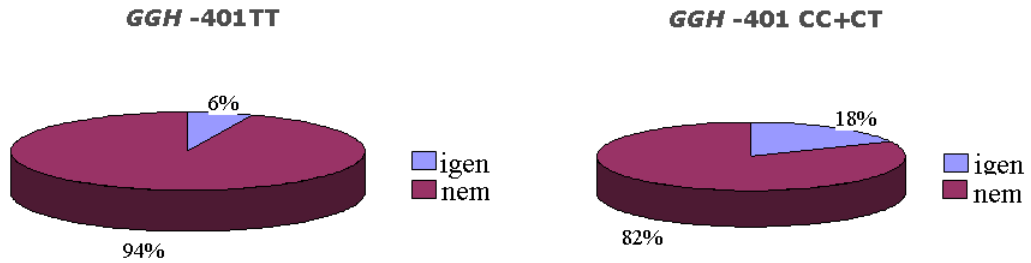
A: 24 órás MTX clearance az *SLC19A1* 80 A>G polimorfizmus esetében (p=0,04)

B: 24 órás MTX clearance a *GGH-401* C>T polimorfizmus esetében (p=0,1)

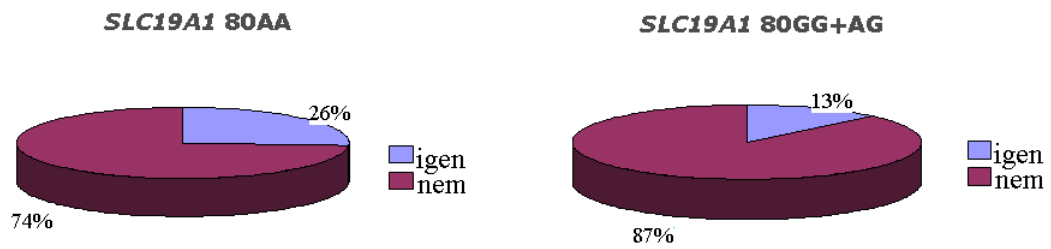
C: 48 órás MTX szérumszint az *SLC19A1* 80 A>G polimorfizmus esetében (p=0,53)

D: 48 órás MTX szérumszint az *GGH-401* C>T polimorfizmus esetében (p=0,016)

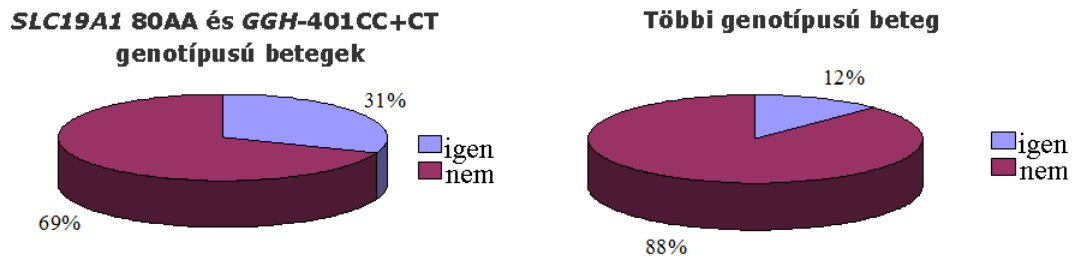
A) Hepatotoxicitás a GGH-401CC+CT és a GGH-401TT genotípusú betegekben ($p=0,00061$)



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



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



21. ábra A GGH-401 C>T és az SLC19A1 80 A>G polimorfizmusok szerepe a MTX toxicitásában

8. táblázat A MTX metabolizmusában fontos gének polimorfizmusai, genotípus- és allélfrekvenciái

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

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

² MAF: Minor allélfrekvencia (%)

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

Az elemzés következő lépéseként 9 gén összesen 29 polimorfizmusának hatását vizsgáltuk a MTX farmakokinetikájára és toxicitására Bayes-i statisztikán alapuló módszerekkel. A 29 SNP vizsgált populáción kapott genotípus- és allélfrekvenciáit a 8. táblázatban tüntettük fel. A polimorfizmusok Hardy-Weinberg egyensúlyban voltak.

A farmakogenetikai adatbázist elemeztük egyváltozós SNP-célváltozó asszociációs vizsgálattal. Megvizsgáltuk, hogy az SNP vad és mutáns allélfrekvenciáiban van-e szignifikáns különbség a diszkretizált farmakokinetikai értékek szerint, illetve toxicitás jelenléte - nem jelenléte szerint létrehozott csoportok között. A kapott eredményeket az 9. táblázatban foglaltuk össze.

Egyváltozós asszociációs vizsgálatunkban a MTX szintek magasabb első felezési idői ($T_{\alpha 1/2}$) asszociáltak az *ABCG2* rs2231142 (OR:4,2, $p=0,037$) ritka alléljának jelenlétével, továbbá szintén pozitív összefüggést mutatott az *SXR* rs7643038 (OR:2,6, $p=0,02$), rs3814055 (OR:2,22, $p=0,04$) SNPk jelenléte. Az *ABCB1* rs9282564 (OR:4,2, $p=0,04$) variáns allél jelenléte esetében magasabb, az *ABCC3* rs4793665 (OR:0,24, $p=0,03$) variáns allél, illetve az *ABCC2* rs3740066 homozigóta variáns genotípus (OR:0,096, $p=0,01$) esetében alacsonyabb AUC_{0-48} értékek fordultak elő. Az *ABCB1* rs9282564 (OR:8,8, $p=0,02$) polimorfizmus jelenlétében a csúcs MTX koncentrációk magasabbak voltak. Az *SXR* rs3732361, rs6785049 SNPk variáns alléljainak jelenléte magasabb 48 órás MTX koncentráció értékekkel mutatott összefüggést. A májtoxicitás kockázata alacsonyabb volt az *SXR* rs3732361, rs3814058, rs6785049 SNP ritka alléljainak jelenlétében. A csontvelő toxicitás rizikója magasabb volt az *ABCC2* rs2273697 (OR:3,3, $p=0,02$) mutációja, alacsonyabb az *ABCC2* rs3740066 (OR:0,4, $p=0,02$) és az *SXR* rs3732361, rs3814058, rs6785049 SNPk ritka alléljainak esetében.

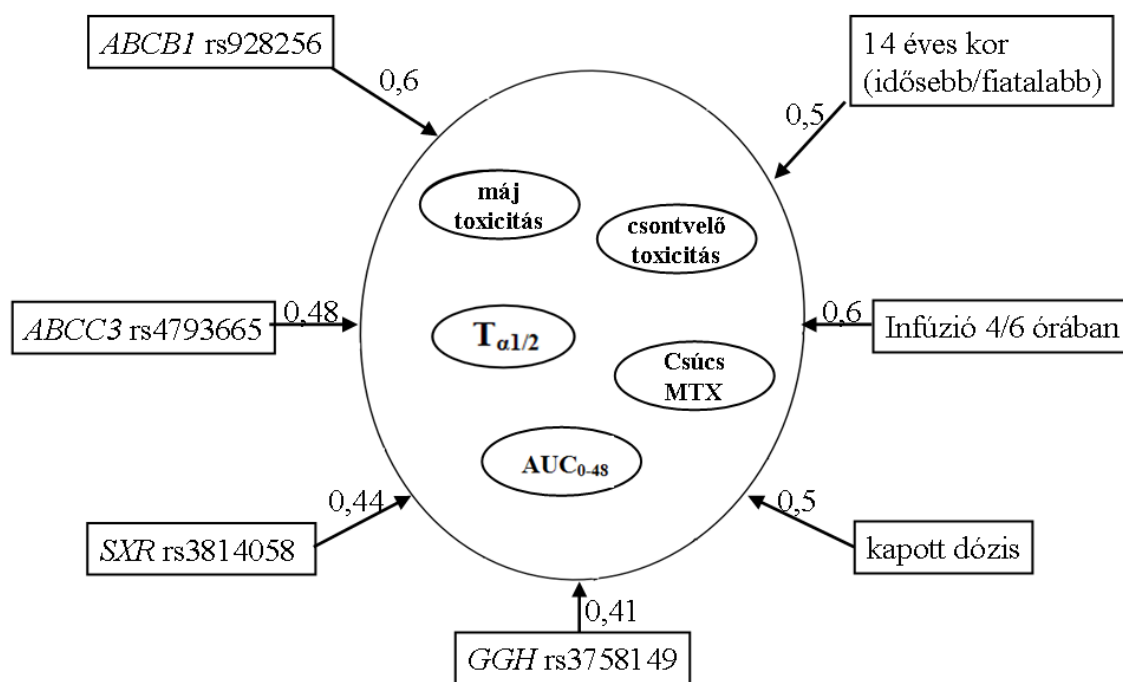
9. táblázat Egyváltozós snp-célváltozó asszociációs vizsgálat releváns p értékei

Gén	Polimorfizmus	T _{α1/2}	AUC ₀₋₄₈	Csúcs MTX	48h MTX	máj	Csontvelő
ABCB1	rs1045642	-	-	-	-	-	-
ABCB1	rs1128503	-	-	-	-	-	-
ABCB1	rs9282564	-	↑0,04	↑0,02	-	-	-
ABCC1	rs4148358	-	-	-	-	-	-
ABCC1	rs246219	-	-	-	-	-	-
ABCC1	rs246221	-	-	-	-	-	-
ABCC1	rs12922588	-	-	-	-	-	-
ABCC1	rs215060	-	-	-	-	-	-
ABCC1	rs4148330	-	-	-	-	-	-
ABCC2	rs2273697	-	-	-	-	-	↑0,02
ABCC2	rs3740066	-	↓0,01	-	-	-	↓0,02
ABCC2	rs717620	-	-	-	-	-	-
ABCC3	rs4793665	-	-	-	-	-	-
ABCC3	rs2107441	-	-	-	-	-	-
ABCC3	rs2412333	-	-	-	-	-	-
ABCC3	rs733392	-	-	-	-	-	-
ABCC3	rs12602161	-	-	-	-	-	-
ABCC10	rs1214748	-	-	-	-	-	-
ABCC10	rs831314	-	-	-	-	-	-
ABCC10	rs1214752	-	-	-	-	-	-
ABCG2	rs2231142	↑0,037	-	-	-	-	-
GGH	rs3758149	-	-	-	-	-	-
SLC19A1	rs1051266	-	-	-	-	-	-
SXR	rs7643038	↑0,02	-	-	-	-	-
SXR	rs3814055	↑0,04	-	-	-	-	-
SXR	rs1054190	-	-	-	-	-	-
SXR	rs3732361	-	-	-	↑0,01	↓0,035	↓0,035
SXR	rs3814058	-	-	-	-	↓0,006	↓0,006
SXR	rs6785049	-	-	-	↑0,006	↓0,02	↓0,02

„-„:nem mutatkozott trend a variáns allélt hordozók számával (p>0,05)

Nyíl iránya: a variáns allél jelenléte milyen irányba változtatja a farmakokinetikai célváltozó értékét, vagy a toxicitás előfordulásának gyakoriságát

Több célváltozós BMLA elemzésben a célváltozóhalmaz (farmakokinetikai és toxicitási adatok) minden lehetséges belső kapcsolatrendszere és a magyarázó változók (életkor, nem, kapott dózis, infúzió hossza valamint a 29 SNP) minden lehetséges kapcsolatrendszere mellett vizsgáljuk, hogy mely magyarázó változók relevánsak közvetlenül a célváltozók halmazára. Releváns hatásúnak találtuk a célváltozó halmazra az *ABCB1* rs928256 (0,6) SNPt, melynek az egyváltozós elemzésben is kimutatható hatása volt a görbe alatti területre és a csúcskoncentrációra is, valamint az *ABCC3* rs4793665 (0,48) és a *GGH* rs3758149 (0,41) SNPket is, melyek az egyváltozós elemzéssel is kimutatható befolyással voltak a görbe alatti területre. Hatással bírhat a farmakokinetika-toxicitás összefüggés rendszerére az *SXR* rs3814058 (0,44), mely egyváltozós BMLA módszerrel a farmakokinetikai adatokkal volt kapcsolatba hozható, egyváltozós asszociációs módszerrel pedig a toxicitás megjelenésével mutatott összefüggést (23.ábra).



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

23. ábra Illusztráció a MTX farmakokinetikai és toxicitási rendszerét (AUC₀₋₄₈, csúcskoncentráció, $T_{a1/2}$, máj, illetve csontvelő) befolyásoló SNPk (*ABCB1* rs9282564, *ABCC3* rs4793665, *SXR* rs3814058, *GGH* rs3758149) és egyéb magyarázó változók (életkor, kapott dózis, infúzió hossza) különböző függőségi kapcsolatairól, többváltozós BMLA elemzéssel számolt *a posteriori* valószínűségekkel

7 Megbeszélés

7.1 A gyermekkori osteosarcoma kezelésének eredményei hazánkban

Adatainkat összefoglalva elmondhatjuk, hogy klinikánkon a COSS 86 és COSS 96 protokollokat alkalmazva a gyermekkori osteosarcoma jól gyógyítható, a betegek 68%-a tartósan meggyógyul. A korábbi COSS protokolloknak rosszabb túlélési eredményei voltak. A COSS77 protokoll esetében az általános túlélés csak 47% volt ¹⁰⁷.

Eredményeink megfelelnek a legjobb nemzetközi adatoknak. A sebészet és a többféle gyógyszerből álló kemoterápia kombinálásának köszönhetően a végtagi osteosarcomák 5 éves eseménymentes túlélése jelenleg 50–70 % ²¹. S.Ferrarinak és munkatársainak tanulmányában a 40 év alatti, áttét nélküli, végtagon lokalizálódó osteosarcomás betegek várható túlélése 70%, mely methotrexaton, cisplatinon, doxorubicinen és ifosfamidon alapuló kemoterápiás kezeléssel érhető el. Hosszú utánkövetés szükséges a késői mellékhatások, a második tumorok és a késői recidívák kialakulásának rizikója miatt ¹⁰⁸. Jaffe tanulmányában megállapította, hogy az amerikai populációban a betegségmentes túlélés kevesebb mint 20%-ról 55-75 %-ra emelkedett a hatékony kemoterápia bevezetése után, továbbá, hogy a végtagmegtartó műtétek aránya 80%-ra nőtt ¹⁰⁹. Egy Nyugat-Európa, Törökország, Horvátország, és az Egyesült Államok közötti nemzetközi együttműködés keretében vizsgálták az osteosarcoma kimenetelét és az azt befolyásoló prognosztikai faktorokat. A tanulmányban szereplő 2680 beteg 78%-át műtét és kemoterápia együttes alkalmazásával kezelték, 14% csak sebészeti kezelésben részesült, 3% csak kemoterápiában és 5% esetében más kombinációkat vagy kezeléseket írtak le. A teljes kollaborációra vonatkozó 5 éves túlélés 52% volt. A metasztázis vagy lokális recidíva megjelenése megháromszorozta a betegség mortalitásának kockázatát ¹¹⁰.

Az osteosarcoma legfontosabb rizikófaktorai a következők: a tumor rezekálhatósága, a betegség kiterjedése a diagnóziskor, kezdeti tumor volumen és a preoperatív kemoterápiára adott szövettani válasz. Az elmúlt évtizedekben a rekonstruktív műtéti technikák látványosan fejlődtek, ami különösen fontos a fiatal

betegek esetében, akiknek csontozata még fejlődésben van. A diafizisre lokalizálódó tumorokat úgy operálják meg, hogy az érintett ízület funkcióját a lehető legnagyobb mértékben megőrizték. Egy biológiai rekonstrukciós módszer során vaszkularizált fibulát ültetnek be. Nemzetközi tendencia gyermekek és fiatal felnőttek esetében, hogy az amputációs műtétek helyét átveszik a modern expandálható, vagy „növekedő” endoprotézisek. Osteosarcomával foglalkozó tanulmányok következetesen leírták, hogy bár a lokális relapszus aránya a végtagmegtartó műtétek után magasabb, mint amputáció után, a halálozást a műtét típusa nem befolyásolta. A helyi recidíva megjelenése közvetlenül összefüggésbe hozható a sebészi metszés radikalitásával és a primer tumor kemoterápia iránti érzékenységgel. Ha a sebészi metszés nem szélesen az épben történik, és a neoadjuváns kemoterápia után a túlélő tumor sejtek aránya több, mint 10%, a lokális kiújulás esélye akár 30% is lehet ¹¹¹. Rozeman tanulmányában a végtagmegtartó műtétek után a lokális recidívák előfordulása (5-10%) magasabb volt, mint amputációk után (0,5-2%) ¹⁵. A mi adatbázisunkban a végtagmegtartó műtétek utáni lokális recidívák előfordulása ennél valamivel magasabb (14%). Az osteosarcoma helyi kiújulása hozzávetőlegesen 90-95 %-ban a végtagmegtartó műtétek után következik be, különösen akkor, ha a sebészi metszés nem volt eléggé radikális. Ugyanakkor az amputációval kezelt betegek terápiája nem vezetett jobb túléléshez, mint a végtagmegtartó technikák. Az amputáció utáni túlélési eredmények valamivel rosszabbak, mint a végtagmegtartó műtétek után. Ennek oka az lehet, hogy napjainkban akkor döntenek az ortopéd sebészek az amputáció mellett az osteosarcoma kezelésében, ha nagyon nagy a kezdeti tumor volumen, vagy a neoadjuváns kemoterápia elégtelennek bizonyul, és nem állítja meg a daganat növekedését. Így az alapvetően rosszabb prognózisú betegek esetében történik amputáció. Az osteosarcomás gyermeket kezelő sebész nagy kihívása úgy rekonstruálni az érintett végtagot, hogy amennyire csak lehetséges, a gyermek normálisan növekedhessen tovább ¹¹².

Az osteosarcomás betegek 30–40 %-ánál jelenik meg metasztázis, melyeknek 80%-a a tüdőre lokalizálódik, 15%-a távoli csont áttét. Eredményeink azt mutatják, hogy a diagnóziskor felfedezhető léziók jelenlétének és számának prognosztikai jelentősége van osteosarcomában. A metasztázis vagy lokális recidíva jelenléte háromszorosára emeli a halálozás esélyét. Egy többváltozós elemzés során kimutatták, hogy áttét megjelenése esetén ötszörösére nő a beteg esélye egy újabb metasztázisra, de

semmilyen más klinikai vagy demográfiai jellemző nem asszociált függetlenül az áttét kialakulásának kockázatával ¹¹⁰. A tüdő metasztázisokat agresszív kemoterápia és műtéti rezekció kombinálásával kezelik ¹¹³. Tanulmányunkban az átlagos túlélés tüdő áttéttel rendelkező osteosarcomás betegek esetében 10-30 %. Az eseménymentes időintervallum a diagnózis után szintén fontos prognosztikai tényező. Korai áttét esetében majdnem az összes beteget elveszítettük, míg a késői áttétes betegek általános túlélése 42% volt a vizsgált populációnkban. Briccoli és munkatársai tanulmányában a tüdő műtéten átesett betegek 5 éves túlélése 36%, 10 éves túlélése 26% volt ²⁹.

A kezdeti tumor volumen egy fontos prognosztikai tényező osteosarcomában. Nagyobb daganat esetén kiterjedtebb lehet a szomszédos szövetek érintettsége, a radikális műtét bonyolultabb, a távoli metasztázis esélye nagyobb, így a túlélés rosszabb. Bacci és munkatársai egy tanulmányukban leírták, hogy a 200 ml-nél nagyobb daganatok esetében szignifikánsan magasabb volt a recidíva előfordulása ¹¹⁴. A St. Jude Children's Research Hospital összefoglalójában szignifikáns kapcsolatot mutattak ki a 8 cm-nél nagyobb tumor átmérő és a metasztázis megjelenése között ($p = 0.002$) ¹¹⁵. Egyes kórlapok károsodása, valamint a korábbi évekből származó dokumentációk hiányossága miatt a betegek több, mint 60%-ától nem állt rendelkezésünkre adat a kezdeti tumor volumenről, ezért saját betegpopulációnkon nem tudtuk elemezni a kezdeti tumor méret hatását a betegség prognózisára.

A neoadjuváns kemoterápiára adott szövettani válasz szorosan korrelál a recidíva vagy áttét megjelenésének rizikójával. A jól reagálók esetében a túlélő tumor sejtek aránya kevesebb, mint 10%. Klinikánkon ennek a betegcsoportnak az 5 éves OS-e 84%, EFS-e 77,3% volt, míg a rosszul reagálók OS-e csak 55,3% , EFS-e csak 50% volt. Számos nemzetközi tanulmány alátámasztja a neoadjuváns kemoterápiára adott tumor válasz fontosságát a túlélésben. Pakos munkacsoportja megállapította, hogy a tumor preoperatív kemoterápia hatására bekövetkezett nekrozisa minden nagyobb klinikai eredménynek erős prediktora. ¹¹⁰. Egy másik 497 beteget összefoglaló tanulmány azonban azt mutatta, hogy az intenzívebb kemoterápia anélkül javítja a szövettani választ, hogy a betegségmentes vagy az általános túlélésen emelne ¹¹⁶.

A törzsi lokalizációjú daganatok prognózisa sokkal rosszabb, mint a végtagi tumoroké. Ennek oka, hogy a törzsi tumorok műtete sebészeti nehézségekbe ütközik, és

a tumort általában nem lehet teljesen eltávolítani. A sebészet kulcsszerepet játszik az osteosarcoma kezelésében. Radikális műtét nélkül, csak kemoterápiával a betegeknek mindössze 10%-a gyógyítható ¹¹⁷.

A nemzetközi irodalom nem egyértelmű abban a kérdésben, hogy az életkor a diagnóziskor fontos prognosztikai faktor-e osteosarcoma esetén. Az életkor prognosztikai értékét vizsgálva Bielack és munkatársai jobb gyógyulási eredményeket találtak fiatalabb betegek esetében (40 éves kor fölött a 10 éves túlélés 41,6%; 40 éves kor alatt a 10 éves túlélés 60,2%; $p=0,012$) ¹¹⁸. Hartingnak és munkatársainak egy kutatásában 438 osteosarcomás beteg vett részt mindenféle korosztályból. Őket 1980 és 2000 között diagnosztizáltak, és a kezelési protokolljuk nagy részét végig megkapták. Egyváltozós elemzésük során a 40 év fölötti életkort rossz prognosztikai faktornak találták ¹¹⁹. Szendrői és munkatársai egy retrospektív elemzés során azt találták, hogy a 30 év feletti életkornak indirekt negatív hatása van az osteosarcoma kimenetelére, mivel az idősebb betegek kevésbé képesek tolerálni a nagy dózisú kemoterápiás kezeléseket, és a kooperáció is nehezebb orvos és beteg között idősebb életkorban ¹²⁰. Bacci és munkatársai azt tapasztalták, hogy a 14 éves, vagy annál fiatalabb gyermekek gyógyulási eredményei rosszabbak, mint az idősebb betegeké ¹¹⁴. Ezzel ellentétben, a mi tanulmányunkban szignifikánsan jobb az 5 éves általános és eseménymentes túlélés a 14 évesnél fiatalabb betegcsoportban, mint a 14 éves és annál idősebb páciensek között. Pakos nemzetközi tanulmányában 2680 osteosarcomás beteg adatainak többváltozós elemzése során idősebb korban rosszabb túlélést talált, élet-évtizedenként 7%-ot növelt a halálozás relatív rizikója ¹¹⁰.

Az osteosarcoma gyanús betegek kivizsgálásának, valamint az igazolt diagnózisú gyermekek felmérésének és kezelésének speciális onkológiai centrumokban kell zajlania multidiszciplináris szarkóma program keretében. Ennek során a beteget gyermekgyógyász, onkológus, radiológus, onkológiára szakosodott ortopéd sebész és patológus egyaránt követi. Ezen kívül pszichológusok, gyógytornászok és pedagógusok segítik a gyermek rehabilitációját, lelki, szellemi fejlődését. A sikeres kezelés alapfeltétele a pontos diagnózis, a neoadjuváns és adjuváns polikemoterápia, valamint a radikális műtéti terápia, egyre nagyobb hangsúlyt fektetve a végtagmegtartó műtétekre. Az osteosarcomával kezelt betegek szoros után követést igényelnek mind a kemoterápia

okozta késői mellékhatások, mind a betegség kiújulásának korai észrevétele és kezelése érdekében¹²¹.

Az osteosarcoma radiorezisztens tumor¹²¹. A sugárkezelést palliatív célból alkalmazzák azon osteosarcomás betegek esetében, akiknek a daganata radikálisan nem operálható¹²². Két beteg esetében alkalmaztunk palliatív sugárterápiát.

Saját adatainkat összefoglalva elmondhatjuk, hogy ma Magyarországon az osteosarcomás betegek kétharmada tartósan meggyógyítható intenzív kemoterápia és radikális műtét segítségével. Az esetek nagy részében az érintett végtag is megtartható, és így a betegek életminőségében jelentős javulást lehet elérni. Nagyon rossz azon betegek prognózisa, akiknél primeren tüdő metasztázis vagy multiplex csont áttét igazolható, illetve akiknél a radikális tumor eltávolítás nem kivitelezhető. Nincs szignifikáns különbség a túlélésben a nem, a szövettani altípus, a diagnózis felállításának ideje, az alkalmazott protokoll, illetve a műtét típusa szerint, bár a végtagmegtartó műtétek esetében valamivel magasabb a lokális recidíva aránya. Ugyanakkor a 14 év alatti, áttét nélküli, végtagi elhelyezkedésű osteosarcomás betegek túlélése eléri a 80%-ot. A magyarországi eredmények megegyeznek a legjobb nemzetközi adatokkal. A túlélés javítása szempontjából döntő jelentősége van a korai diagnózisnak, mert ezzel lehet a primeren metasztatikus esetek számát csökkenteni. Eredményeink alapján a betegek diagnóziskori életkorát is figyelembe kéne venni az osteosarcomás betegek rizikó besorolásánál. Hangsúlyosak a túlélés javításában a preklinikai alaputatások is, melyek segíthetnek az osteosarcoma kialakulásának megértésében, valamint olyan új molekuláris célpontok felfedezésében, amelyek célzottabb terápiát tennének lehetővé. A farmakokinetikai és farmakogenetikai kutatások pedig felvetik az egyéni gyógyszeradagolás jövőbeni hasznát. A maximálisan tolerálható dózis pontosabb meghatározásával javítani lehetne a túlélést, és el lehetne kerülni az életveszélyes mellékhatásokat.

7.2 Farmakokinetikai tényezők osteosarcomás gyermekek methotrexate kezelésében

Az osteosarcoma túlélőinek száma folyamatosan emelkedik, következésképpen az akut komplikációk és a késői mellékhatások alapos megismerése elengedhetetlen az

őket gondozó orvosok számára. Az összes daganat közül az osteosarcoma kezelésében alkalmazzák a legmagasabb dózisban a MTX-ot (12 g/testfelület m²). A farmakokinetika és a MTX-hatás közötti összefüggés jobb megismerése hatalmas előnyöket rejt magában. Biztonságosabbá és még hatékonyabbá lehetne tenni a MTX alkalmazását.

Vizsgálatunkban 98 osteosarcomás gyermek MTX-kezelésének farmakokinetikai paraméterei, toxicitása és túlélése közötti kapcsolatokat elemeztük. Szignifikáns összefüggést találtunk a májtoxicitás és a farmakokinetikai paraméterek között. A csúcskoncentráció, a 24 és 48 órás MTX-szint, a 48 órás görbe alatti terület és a MTX clearance is szignifikáns összefüggést mutatott a súlyos májtoxicitás fellépésével. Ezek az eredmények alátámasztják a korábbi feltevéseket ⁴⁴, melyek szerint a májtoxicitás megjelenése a szisztémás gyógyszer-expozíció nagyságával van összefüggésben. Ez azért lehetséges, mert a májtoxicitás kialakulása a májsejtekre gyakorolt citotoxikus hatás révén következik be, mely nagy részben a gyógyszer-expozícióval arányos. A túlélést befolyásoló fatális májkárosodás nem fordult elő.

A csontvelő-toxicitás az osztódó sejtekre ható DNS-szintézis gátlásával jön létre, amikor a sejt a sejtciklus S-fázisába lép. A megfelelő időben és mennyiségben alkalmazott leukovorin rescue a MTX nukleotidszintézisre kifejtett blokádjának feloldásával hatékonyan akadályozza meg a súlyos myelosuppressio kialakulását ⁵⁵. Egy korábbi vizsgálat kapcsolatot talált az AUC és a IV. fokú csontvelő-toxicitás előfordulása között, és 12000 µmol*h/l-es toxicitási küszöböt határozott meg ¹²³. Jelen elemzés eredményei összhangban vannak ezzel a megállapítással, hiszen szignifikáns összefüggést találtunk a csontvelő toxicitás megjelenése és a magasabb 24 illetve 48 órás szérumszintek között

Vizsgálatunkban a vesetoxicitás gyakrabban fordult elő magasabb 24 órás MTX szérumszintek után. A vesetoxicitás kialakulását a vesetubulusban lévő oldhatósági viszonyok határozzák meg, így fontos szerep jut a megfelelő hidrálásnak és vizelet alkalizálásnak a MTX-infúzió előtt, alatt és után. Magasabb szérum gyógyszer koncentrációknál és elhúzódó kiválasztásnál fokozott a károsodás veszélye ³⁹. Munkacsoportunk leukémiás betegeken végzett farmakokinetikai vizsgálata során

szoros korreláció mutatkozott a 24. órában mért 7-hidroxi-MTX koncentráció és a szérumkreatinin-szint emelkedése között¹²⁴.

A máj-, vese- és csontvelő-toxicitás előfordulása nem mutatott szignifikáns összefüggést a nemmel, az életkorral, a metastasis jelenlétével és a szövettani válasszal. Ez a megállapítás összhangban van Schmiegelow és mtsai. eredményeivel, akik 115 gyermek vizsgálata során megállapították, hogy nincs összefüggés a májenzimszint-emelkedés alapján definiált májtoxicitás és az életkor illetve a nemek között⁴⁴.

Klinikánkon a kezelések során a májtoxicitás fellépésének gyakorisága a kezelés előrehaladásával csökkent. Ennek háttérében egyrészt az állhat, hogy több betegnél a súlyos toxicitás fellépése után dózisredukcióra került sor. Másrészt előfordult, hogy a súlyos mellékhatások miatt a szülők nem járultak hozzá a kezelés folytatásához, így lehetséges, hogy pont a toxicitás szempontjából veszélyeztetettebb betegek nem kapták már meg a későbbi blokkokat. Harmadrészt a gyógyszer jelenléte beindítja a szervezet sejtszintű alkalmazkodási mechanizmusait, melyek a toxicitás kivédésének érdekében hatnak. A vesetoxicitás előfordulása esetében éppen ellentétes tendencia volt megfigyelhető, mint a májnál. A vesefunkció-romlás gyakoriságának növekedése mögött a közismerten vesekárosító kemoterápiás szerek (pl. cisplatin) halmozódó károsító hatása állhat. Crews munkacsoportja megfigyelte, hogy a kezelés során növekvő kumulatív cisplatin és ifosfamid dózis elhúzódozó MTX kiválasztással jár. Ennek háttérében a szerzők a vesefunkció romlását valószínűsítették⁴⁰. A csontvelő-toxicitás gyakorisága a 2. blokkot követően emelkedett meg és kiugrás volt tapasztalható a 3., 5., 9. és 13. blokkban. Ezek éppen azok a blokkok, melyeket a protokollban a cisplatin-ifosfamid blokkok előznek meg, így felvetődik, hogy ezek a csontvelő-károsító ágensek fokozták-e az utánuk következő MTX-blokk myelosuppressív hatását. További vizsgálatok szükségesek annak megállapítására, hogy a cisplatin és az ifosfamid hogyan befolyásolja a MTX csontvelő-toxicitását.

A standard rizikócsoportú betegeknél magasabb görbe alatti területet, alacsonyabb MTX clearance-t és fokozott májtoxicitást észleltünk, mint a magas rizikócsoportban. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy a MTX-ra érzékenyebb anyagcseréjű szervezetben a tumor ellenes hatás is erősebb, ami sokkal jobb szövettani választ eredményez, és ezért ezek a betegek a műtét után a standard rizikócsoportba

kerülnek. Ezen kívül a magas rizikójú ágon nem alkalmaznak MTX-ot, így ezektől a betegektől csak neoadjuváns blokkok adatai szerepelnek az elemzésben. A standard ágon használt gyógyszerek nephrotoxikusak, így az adjuváns MTX kiürülése a vesén keresztül rosszabb, mint a neoadjuváns blokkok esetében mért ürülés. Comandone és munkatársai nem találtak összefüggést osteosarcomás betegek MTX kezeléseinek koncentráció-idő görbe alatti területei és a szövettani válasz között, ellenben beteganyagukban 1000 $\mu\text{mol/l}$ feletti csúcskoncentráció esetén szignifikánsan alacsonyabb volt a túlélő tumorsejtek aránya ¹²³.

Osteosarcoma esetében a MTX kezelés legtöbbet vizsgált kérdése, hogy van-e kapcsolat a farmakokinetikai paraméterek és a terápia hatékonysága között. A terápia hatékonyságának megítélésére több vizsgálat a túlélésnél sokkal könnyebben és hamarabb megítélhető szövettani választ használta, melyet a kimenetel egyik legerősebb prognosztikai faktorának tartanak. Saját eredményeinkben a csúcskoncentráció és a szövettani válasz között nem volt szignifikáns összefüggés.

Delepine és mtsai ¹²⁵ 1995-ben arról számoltak be, hogy jobb lett a neoadjuváns kemoterápiára adott szövettani válasz, ha egyénre szabott dozírozással elérték az 1000 $\mu\text{mol/l}$ -es csúcskoncentrációt. Comandone munkacsoportja ¹²³ azt figyelte meg, hogy szignifikánsan jobb volt a szövettani válasz, ha a 4 órás MTX infúzió végén mérhető szérumban MTX-koncentráció 1000 $\mu\text{mol/l}$ felett volt. Smeland tanulmányában összefüggést mutattak ki a 24 ill. a 48 órás MTX-szintek és a tumor szövettani válasza között ¹²⁶. Ezzel ellentétben Zelcer 2005-ben ¹²⁷, és Bacci 2006-ban ¹²⁸ közölt publikációjában nem találtak kapcsolatot a MTX-csúcskoncentráció és a szövettani válasz között. A két álláspont között helyezkedik el Graf munkacsoportja ¹²⁹, akik három különböző protokollal kezelt 198 beteg adatait elemezték retrospektíven. Leírt eredményeik szerint csak egy protokoll, a COSS-80 esetében volt jobb a szövettani válasz az 1000 $\mu\text{mol/l}$ feletti csúcskoncentrációt elérő betegcsoportban ¹²⁹. A COSS-80 protokoll neoadjuváns kemoterápiájában csak MTX szerepel egyedüli szerként. A többkomponensű neoadjuváns kemoterápiát alkalmazó protokollok esetében nem volt kimutatható összefüggés a csúcskoncentráció és a szövettani válasz között. Az ellentmondó eredményeket a protokollok különbözősége magyarázhatja, ahogy azt Graf és mtsai előbb említett eredményei is mutatják. A MTX mellett adott egyéb kemoterápiás szerek nagymértékben befolyásolhatják a hatékonyságot.

Több vizsgálat kimutatta, hogy jobb az eseménymentes túlélés, ha a 6 órás infúzió végén a MTX szérumszint eléri 700 ill. 1000 $\mu\text{mol/l}$ -t^{125, 129, 130}. Aquerreta és mtsai 2004-es tanulmányukban összefüggést találtak a HD-MTX expozíció (AUC) és a betegségmentes túlélés (DFS) között osteosarcomás gyermekekben¹³¹. Saját elemzésünkben nem találtunk szignifikáns összefüggést a csúcskoncentráció ill. az AUC és a túlélés között, azonban a 48 órás MTX-szintek jelentős korrelációt mutattak a túléléssel. Így vizsgálatunk azokat a kutatási eredményeket támasztja alá, melyek a terápiás kimenetel meghatározó tényezői között nem a csúcskoncentrációt, hanem a szisztémás expozíciót, vagyis a tartós, fokozott MTX-jelenlétet tartják hangsúlyosnak.

Noha a farmakokinetikai összefüggések miatt fokozottabb toxicitás esetén jobb túlélést várnánk, vizsgálatunkban nem volt szignifikáns kapcsolat a toxicitás fellépése és a terápia kimenetele között. Ez a megfigyelés azzal magyarázható, hogy magasabb toxicitás esetén a szükséges dózisredukciók és halasztások ronthatták a MTX kezelés hatékonyságát. Ennek igazolására további vizsgálatok szükségesek.

Összefoglalva tehát megállapíthatjuk, hogy magasabb MTX szérumszinteknél és elhúzódó kiválasztásnál fokozott a máj- és csontvelő-toxicitás fellépésének a veszélye, de jobb a betegek gyógyulási aránya. Ezért eredményeink alátámasztják a nagy dózisú terápia létjogosultságát, és kiemelik a MTX-koncentráció monitorozásának fontosságát a toxicitás kivédése érdekében, illetve hogy akiknél nem elég magas a koncentráció-idő görbe alatti területtel jellemezhető MTX expozíció, azoknál a MTX dózis további emelése javíthat a kezelés hatékonyságán. Eredményeink alapján a neoadjuváns MTX blokkok során mért 48 órás görbe alatti területét figyelembe kéne venni az osteosarcomás betegek rizikó besorolásánál. A MTX anyagcsere és farmakokinetika jelentős variabilitásának pontosabb megértése várható a farmakogenetika vizsgálatok és az adatfeldolgozó matematikai programok területén végbemenő nagymértékű fejlődésnek köszönhetően.

A farmakokinetika megfigyelésekkel kapcsolatban komoly nehézséget jelent, hogy csak az általunk jelenleg ismert befolyásoló faktorok (hidráció, vizelet pH, leukovorin, anatómiai és élettani paraméterek, protokollok különbözőségei és még rengeteg tényező) torzító hatását, a sejtszintű folyamatok egyéni különbségei mögött álló genetikai adottságokat mind egybevetve hatalmas mennyiségű adattal kell

dolgoznunk, mely a megfelelő informatikai és matematikai háttér nélkül lehetetlen lenne.

A populációs farmakokinetika a gyógyszer-koncentráció interindividuális különbségeit vizsgálja standard dozírozású protokollok esetében. A hagyományos farmakokinetikai elemzés az adott egyének farmakokinetikai paramétereiből indul ki, és ebből von le következtetéseket. Ezzel szemben a populációs farmakokinetika a farmakokinetikai információk tendenciáira koncentrálnak, másféle adatfeldolgozási technikájának köszönhetően kevés vagy hiányos adatból képes elvégezni az elemzést

132

Az egyéni gyógyszeradagolás *apriori*, teszt-dózis vagy *aposteriori* módszerekkel történhet. Az *apriori* módszerekkel a beteg anatómiai és élettani jellemzői (testsúly, testmagasság, életkor, nem, vese- és májfunkciós értékek) alapján, a populációban korábban felállított összefüggések birtokában lehet kiszámítani a megfelelő expozíció eléréséhez szükséges dózist. Bár ezt a módszert már a legelső kezelésnél lehet alkalmazni, mivel nem használ koncentrációs adatokat, pontossága elmarad a többi módszerétől. A teszt-dózis módszerrel egy csökkentett dózis adásakor meghatározzák az adott egyén farmakokinetikai paramétereit az adott gyógyszerre, majd ezek alapján számítják ki a megfelelő expozícióhoz szükséges dózist. Ez a technika csak lineáris farmakokinetikára működik, késlelteti a terápia elkezdését, ezért ma már ritkán használják. Az *aposteriori* módszerek a kezdeti szérumkoncentrációkhoz igazítva adják meg a kezelés során alkalmazandó dózist, leggyakrabban a feltételes valószínűségekre alapuló Bayes-i közelítést alkalmazva. A Bayes-i módszer a legrugalmasabb a különböző mintavételi idők és a hiányos adatok kezelésében, így a legjobban használható a mindennapokban. Egy ilyen modell kidolgozása bonyolult, használata viszont annál egyszerűbb.

A Maximum *aposteriori* (MAP) Bayes-i közelítés populációs farmakokinetikai modellre épül. Számos paramétert előre tud jelezni a populációs adatok és a kezelés alatt gyűjtött szérumkoncentrációk alapján. Láthatjuk tehát, hogy a populációs farmakokinetikai modell megbízhatósága az egész módszer pontosságának az alapja. Ha hiba van a modellben, téves következtetésekre, téves dózisokra lehet belőle jutni.

A Rousseau munkacsoportja által használt farmakokinetikai program osteosarcomás gyermekek kezelése során a 6 és a 24 órás MTX-szérumszintek alapján 90%-os pontossággal előre jelezte a görbe alatti területet és a MTX clearance-t⁷². Dupuis és mtsai felnőtt osteosarcomás betegek kezelése során alkalmazták a Bayes-i megközelítést. Nyolc órás HD-MTX infúzió első hat órájában mindenki 18 grammot kapott. A 3,5 és 4,5 órás MTX-szintek alapján a Bayes-módszert használva a program kiszámolta, hogy az utolsó két órában kinek mennyi MTX-ot kell még kapnia, hogy az infúzió végén a csúcskoncentráció elérje az 1000 $\mu\text{mol/l}$ -es szintet¹³³.

A MAP Bayes-i módszerek előnye, hogy képesek előre jelezni mind farmakokinetikai tényezőket, mind expozíciós paramétereket. Ezen kívül pontossága a kezelés során bármikor ellenőrizhető egy újabb szérumszint-méréssel, illetve nem igényel szigorúan megszabott mintavételi időpontokat, mert rugalmasan kezeli azokat. A populációs modell folyamatosan pontosítható régi betegek újabb blokkjaiból vagy új betegektől származó újabb adatok beépítésével. Már két-három vérminta elegendő az egyéni farmakokinetikai paraméterek megbízható előrejelzéséhez. A Bayes-módszert alkalmazó klinikai vizsgálatokban a toxicitások száma csökkent, annak ellenére, hogy a fix standard adagokhoz képest általában magasabb dózist adtak be ezen tanulmányok során¹³⁴.

A populációs farmakokinetikai modellek megalkotásánál elengedhetetlen a validáció, melynek során igazolni kell a modell érvényességét és megbízhatóságát. Ezt egy ún. validációs populáción végzik. A validálás azt jelenti, hogy ezen betegcsoport kezelése során a kapott valós farmakokinetikai paramétereket összehasonlítják a modell alapján előre jelzett értékekkel¹³⁴. A populációs modellek valódi előnyeit a terápia kimenetele alapján kellene megítélni, amihez azonban prospektív, randomizált vizsgálatokra lenne szükség¹³⁵.

7.3 Polimorfizmusok szerepe a methotrexate farmakokinetikájában és toxicitásában

A farmakokinetika jellemzése és elemzése csak kezdeti lépés a kezelés hatékonyságának és toxicitásának megítélésében. A MTX bonyolult anyagcsereje és hatásmechanizmusa révén a klinikai adatok mögött számtalan, ma még nem ismert

összefüggés és befolyásoló tényező rejtőzik. Az általunk már ismert és bizonyított befolyásoló faktorok, mint a hidráció, vizelet pH, leukovorin adagolás, anatómiai és élettani paraméterek, protokollok különbözőségei és még rengeteg tényező torzíthatja egy nagyobb vizsgálat elemzését. Ezeken felül a sejtszintű folyamatok egyéni különbségei mögött nagy részben a genetikai adottságok állnak. A MTX anyagcserét befolyásoló genetikai tényezők jelentőségének feltérképezésében még nagyon az út elején vagyunk. A farmakokinetikai adatgyűjtéssel párhuzamosan elkezdjük az osteosarcomás gyermekek véréből izolált DNS-ből a MTX metabolizmusában fontos szerepet játszó gének SNP-inek genotipizálását. Ezek között szerepelnek *ABC transzporterek*, *GGH*, *SLC19A1*, *SXR* gének polimorfizmusai.

A nemzetközi irodalomban ismert, hogy a GGH (γ -glutamil-hidroláz) fontos a MTX sejtől történő eliminációjában. A gén legtöbbet vizsgált polimorfizmusa az expressziót szabályozó promoter régióban található *-401C>T SNP*. A TT genotípus esetén a génexpressziós aktivitás fokozódását, gyorsabb MTX eliminációt, illetve kevesebb súlyos mellékhatást figyeltek meg¹³⁶. Elemzésünkben a variáns alléllal homozigóta betegek 24 órás MTX clearance értékei nem tértek el jelentősen a vad alléllal hordozó betegekéhez képest ($p=0,1$), míg a 48 órás szérumszintjeik szignifikánsan alacsonyabbak voltak ($p=0,016$). A súlyos akut májkárosodás előfordulása szignifikánsan alacsonyabb volt a *-401TT* genotípusú csoportban, mint a C alléllal hordozók körében ($p=0,00061$). Egyváltozós asszociációs vizsgálatunkban nem jött ki szignifikáns eredmény ezzel a polimorfizmussal kapcsolatban, de egyváltozós BMLA elemzésünkben az SNP jelenléte 0,45 valószínűséggel befolyásolta a 48 órás görbe alatti területet, illetve a többváltozós BMLA elemzésben is 0,41 valószínűséggel hatással volt a MTX farmakokinetika-toxicitás rendszerére.

A *GGH -401C>T* promoterpolimorfizmus és vörösvérsejtek poliglutamált MTX-szintje közötti összefüggést vizsgálták olyan rheumatoid arthritisben szenvedő betegekben, akiket hetente alacsony dózisú MTX-tal kezeltek. Azt találták, hogy a *GGH-401TT* genotípusú pácienseknek 4,8-szor nagyobb valószínűséggel volt a *MTXPG_{3,5}* szintje a csoportmedián alatt, mint a *GGH-401CC* vagy *CT* genotípusúaknak. Az enzim fokozott expressziója csökkenti az antifolatok hatását, mert a sejt nem képes akkumulálni őket poliglutamált formában¹³⁶. Ugyanakkor azonban a fokozott GGH aktivitás miatt gyorsabban szabadul fel a folsav is, melynek

eredményeképpen megnőhet az antifolatokra való érzékenység⁹⁸. Cole és munkatársai szerint a GGH fokozott expressziója nem biztosít rezisztenciát rövid ideig tartó MTX kitettség esetén a tumoros sejtekben. Ennek oka az lehet, hogy az enzim nem csak a MTX anyagcserére és akkumulációjára hat, hanem a folsavéra is, ez kompenzálhatja a MTX-ra gyakorolt hatást¹³⁷. A GGH enzim egyértelműen fontos szerepet játszik a sejtek folát és antifolat metabolizmusában, de direkt szerepét az antifolat gyógyszer rezisztenciában egyértelműen nehéz meghatározni. Egyrészt a GGH csak egy a számos tényezőtől, ami hatással van az antifolat szintre, és működése feltételezhetően direkt kapcsolatban van más enzimekével. Másrészt a folát homeosztázis rendkívül fontos a sejtek túlélése szempontjából, ezért a sejtek feltételezhetően kifejlesztettek egy kompenzáló mechanizmust arra az esetre, ha a GGH vagy egyéb más folát metabolizmusban fontos enzim valamilyen okból módosulna. Mindamelllett, a GGH szint mérése értékes információval szolgálhat a tumorok antifolat érzékenységének meghatározásában¹³⁸.

A redukált folát karrier (*RFC1* alias *SLC19A1*) az egyik legnagyobb MTX transzporter fehérjét kódoló gén. Az *SLC19A1* 80G>A polimorfizmus Arg/His aminosav cserét okoz a protein első transzmembrán doménjében, mely által a transzporter molekula folát affinitás nő. Így *SLC19A1* AA genotípus esetén magasabb a MTX beáramlás a sejtbe, mely jobb terápiás választ eredményez, ugyanakkor a toxicitás előfordulása gyakoribb⁹³. Az *SLC19A1* 80AA genotípusú betegcsoportban alacsonyabb volt a 24 órás MTX clearance, mint az *SLC19A1* 80 G allélt hordozók körében (p=0,04), míg a 48 órás gyógyszerürülésben nem volt különbség a különböző genotípus csoportok között (p=0,53). Ezek az eredmények koherensek az *SLC19A1* transzporter molekula és a GGH enzim farmakokinetikai szerepével, hiszen az *SLC19A1*-nek a MTX kinetika kezdeti fázisában van szerepe, míg a gamma glutamil hidroláznak az ún. celluláris eliminációs fázis alatt. A súlyos akut májkárosodás előfordulása gyakoribb volt az *SLC19A1* 80AA homozigóta betegeknél, mint a G allélt hordozóknál (p=0,00245). A különbség erősödött azoknál a betegeknél, akik *SLC19A1* 80AA és GGH-401CC/CT genotípusúak voltak (p=0,00014) a többi genotípusú beteggel szemben. Tehát az *SLC19A1* 80A allél jelenléte esetén a súlyos mellékhatások előfordulása gyakoribb és a különbség erősödik, ha a GGH -401TT genotípus védő hatása nincs jelen a betegeknél. Az *SLC19A1* 80G>A polimorfizmusa már a hagyományos elemzésünkben is gyenge

erősségű összefüggést mutatott a farmakokinetikával, egyváltozós asszociációs, illetve egyváltozós és többváltozós BMLA vizsgálatunkban pedig már egyáltalán nem találtuk releváns hatásúnak a MTX farmakokinetika és toxicitás rendszerére.

A MTX farmakológiájának tanulmányozása során kimutatták, hogy a MTX sejtbe áramlásáért felelős transzportáló mechanizmusok defektusa fontos tényező a MTX-rezisztencia kialakulásában ALL-es gyermekek esetében ¹³⁹. Az *SLC19A1* komplementer DNS-szálát felhasználva szoros korrelációt találtak az *SLC19A1* alacsony szintű expressziója és a csökkent MTX felvétel között. ALL-es gyermekek esetében összefüggést találtak a relapsus aránya ill. plazma MTX szintje és az SNP között. Egészséges egyéneket vizsgálva azonban nem függött össze a plazma folsav szintjével a 80G>A polimorfizmus jelenléte, de a *MTHFR* 677C>T polimorfizmusával együtt vizsgálva, a 80AA-677CC haplotípusú egyének esetében magasabb plazma-folát koncentrációt figyeltek meg ¹⁴⁰. Egy skandináv kutatócsoport szerint az *SLC19A1* 80 AA genotípusú ALL-es gyermekek 50%-kal nagyobb eséllyel maradnak remisszióban, mint G allélt hordozó betegtársaik. Szintén ebben a tanulmányban figyelték meg, hogy az *SLC19A1* AA genotípus csoportban szignifikánsan magasabb fokú csontvelő toxicitás fordult elő, mint a G allélt hordozó genotípus csoportban ¹⁴¹. Psoriasisban szenvedő betegeknél figyelték meg, hogy az *SLC19A1* 80A allél jelenléte asszociál a MTX indukálta hepatotoxicitás kialakulásával ¹⁴². Ugyanakkor a St. Jude Gyermekkórház tanulmányában szintén nem tudtak összefüggést kimutatni az *SLC19A1* 80 AA genotípus és a plazma MTX koncentráció között prekurzor sejtes ALL-es betegeknél ¹⁴³.

Az ABC transzporterek fontos szerepet játszanak a gyógyszerek felszívódásában, eloszlásában, lebontásában és eliminációjában. Összesen 6 ABC gén 21 SNP-je esetében vizsgáltuk, hogy van-e releváns hatásuk a MTX farmakokinetikájára és toxicitására.

Az *ABCB1* gén több genetikai polimorfizmusát leírták már ¹⁴⁴. Bemutatott eredményeinkben nem találtunk szignifikáns összefüggést a MTX farmakokinetikája, toxicitása és az *ABCB1* rs1045642, illetve rs1128503 SNPk jelenléte között sem egyváltozós asszociációs vizsgálattal, sem egy-és többváltozós BMLA elemzéssel. Az rs 1045642 SNP az egyik leggyakrabban vizsgált *ABCB1* polimorfizmus, mely a 27-es

exonban az 3435. bázispárnál C>T báziscserével jár és szinonim, vagyis aminosav cserét nem okoz (Izoleucin145Izoleucin). Egy 2000-ben megjelent tanulmány leírta, hogy ezen SNP esetében megváltozott az ABCB1 duodenális expressziója, transzporter-aktivitása és szubsztrát-specifitása. Az SNP jelenléte esetén csökkent transzporter-aktivitást írtak le a duodenumban ^{145,146}. Ez a megfigyelés keltette fel az érdeklődést eziránt a „silent” SNP iránt, habár ismételt vizsgálatok nem támasztották alá, és nem találtak semmilyen fenotípusos asszociációt ezzel a polimorfizmussal. Azóta már sokan vizsgálták a polimorfizmus hatását a protein expressziójára, aktivitására, farmakokinetikai tulajdonságaira és tumorgenezisben betöltött szerepére. Bár ellentmondóak az eredmények, a 3435C>T allélcseré valószínűleg csökkenti az ABCB1 expressziót, megváltozott szubsztrát-specifitást és tumorokra való fokozott hajlamot eredményez ¹⁴⁷. Kimchi-Sarfaty és munkacsoportja szintén megváltozott szubsztrátspektrumot írtak le a variáns allél jelenlétekor. Ezt a megfigyelést a fehérje megváltozott átíróadási sebessége miatt kialakult eltérő térszerkezetére vezették vissza. A 3435T allél esetén az eredeti ATC kód helyett ATT van a DNS-en. Mindkettő izoleucint kódol, de ha az mRNS ritka kodont tartalmaz, ez befolyásolja az átíró sebességét és így a fehérje foldingját. Erre legnagyobb hatása a kodon harmadik nukleotidjának van. Nagy mennyiségű ABCB1 szintézise esetén a ritka kodon használatának lassító hatása még inkább érvényesülhet, főleg ha a megfelelő tRNS tartalék kiürült. A 3435 pozícióban levő SNP esetén a kodonhasználat 47%-ról 35%-ra csökken ¹⁴⁶. Kooloos és munkatársai 205 fős farmakogenetikai vizsgálatukban azt találták, hogy az rs1045642 variáns (T) alléljának jelenléte a toxikus mellékhatások magasabb rizikójával jár MTX-tal kezelt rheumatoid arthritises betegek esetében a vad C allélhoz képest ($p=0,037$, OR:2,6), habár ha a multiplex elemzésnek megfelelően korrigálták a p értékét, a szignifikancia eltűnt ¹⁴⁸.

Az rs 1128503 SNP a 13as exonban van és az 1236-os bázispárnál T>C cserével jár, mely szintén szinonim változást eredményez (Glycin412Glycin) ¹⁴⁹. Bár számos tanulmány vizsgálta, az rs 1128503 SNP szerepéről mai napig nincs konszenzus a nemzetközi irodalomban. Schaich és munkatársai a temozolomide kezelés hatékonyságát vizsgálták glioblastomás betegekben és magasabb gyógyszer hatékonyságot írtak le 1236 CC genotípus esetén, mint a T allélt hordozók esetében ¹⁵⁰. Estrela munkacsoportja lopinavir és ritonavir szérumban, sperma és nyál koncentrációjának

lehetséges predictorait vizsgálták antiretrovírus terápiával kezelt HIV fertőzött férfiakban. Cikkük szerint ez az SNP nincs hatással a gyógyszerkoncentrációra ezekben a testnedvekben ¹⁵¹.

Az ABCB1 rs9282564 számú SNPje a gén 2-es exonjának 61-es bázispárjánál T>C cserével jár. Missense polimorfizmus, vagyis olyan génhiba, amely egy génen belüli kodont egy másik, nem funkcióképes aminosav kodonjává változtat. Jelen esetben a fehérje 21es aminosava helyén Asparagin (Asn) helyett Aspartát épül be. Egyváltozós asszociációs elemzésünkben ezen polimorfizmus variáns alléljának jelenlétében magasabb volt az AUC₀₋₄₈ és a csúcskoncentráció, mint a homozigóta TT genotípusú betegekkel szemben. Egyváltozós BMLA elemzésünk szerint a görbe alatti területtel (0,47) és a csúcskoncentrációval (0,7) is nagy valószínűséggel kapcsolatba hozható. Releváns hatásúnak találtuk a kinetikát és toxicitást összefoglaló célváltozó halmazra ezt az ABCB1 SNPt (0,6) a több célváltozós elemzésben is.

A polimorfizmus szerepét több gyógyszerrel kapcsolatban vizsgálták, de nem találtak csökkent gyógyszerürülést bisantrene, calcein, forskolin, prazosin, verapamil, vinblastin és paclitaxel esetében a homozigóta CC genotípussal összefüggésben HeLa sejtvonalakban ¹⁵². Kimchi-Sarfaty és munkatársai nem találtak csökkent génexpressziót ezen polimorfizmus jelenlétében HeLa sejtvonalban ¹⁵². Egy spanyol kutatás szívátültetésen átesett betegek cyclosporin kezelésével kapcsolatban vizsgálta ezt az SNPt és azt találta, hogy az átültetés után egy évvel szignifikáns különbség volt a vérnyomásban a különböző genotípus csoportok között ¹⁵³. Sainz és munkatársai colorectális daganatok kialakulásával kapcsolatban vizsgálták a polimorfizmust és férfiakban szignifikáns asszociációt mutattak ki a colorectális daganatok rizikójával ¹⁵⁴. Gow munkacsoportja in vitro megfigyeléseket végzett, hogy hogyan befolyásolják a különböző ABCB1 polimorfizmusok a fehérje által mediált transzportot. Ehhez úgynevezett szonda szubsztrátokat alkalmaztak. Az rs9282564 esetében szubsztrát függő módon megváltozott intracelluláris akkumulációt írtak le a referencia sejtekhez képest ¹⁵⁵. A nemzetközi irodalomban nem találtam olyan tanulmányt, mely ezen polimorfizmus és a MTX farmakológiája közötti összefüggést vizsgálta volna.

Az elemzésünkbe bevett egyik ABCCI gént érintő SNP sem mutatott összefüggést a MTX farmakokinetikájával. Az egyváltozós BMLA elemzés szerint az

ABCC1 rs246219 SNP 0,6 valószínűséggel kapcsolatba hozható a májtoxicitás kialakulásával. A per os adagolt MTX szervezetbeli hasznosulása függ az ABC transzporterektől, azon belül is az *ABCC1* elsősorban a gyógyszer vörösvértestekből a vérbe való kipumpálásért felelős¹⁵⁶. Letourneau és munkatársai in vitro kísérletekben tanulmányozta az *ABCC1* gén 10 különböző nem szinonim polimorfizmusát (Thr73Ile, Ser92Phe, Thr117Met, Arg230Gln, Arg633Gln, Arg723Gln, Ala989Thr, Cys1047Ser, Arg1056Gln, and Ser1512Leu). Az *ABCC1* expresszió vizsgálatára transzfektált sejtekből izolált membrán vezikulákat használtak fel, és három ismert *ABCC1* szubsztrát (LTC₄, östradiol-17- β -glucuronid, és MTX) transzportjának aktivitását mérték. Nem találtak szignifikáns változást sem a transzporter funkciójában sem a gén expressziójában a különböző variánsok között¹⁵⁷. Wojnowski munkacsoportja a fent említett Gly671Val polimorfizmus és az antraciklinek által indukált kardiotoxicitást vizsgálta doxorubicinnel kezelt non-Hodgkin lymphomás betegeken. A szerzők emelkedett doxorubicin akkumulációt figyeltek meg a szívben¹⁵⁸. Azonban az, hogy ezt az összefüggést valóban az aminosav csere okozhatta a doxorubicin transzport csökkentése által, ez a következtetés még további vizsgálatokat igényel. Warren és munkatársai psoriasisban szenvedő betegek MTX kezelésével kapcsolatban végeztek farmakogenetikai vizsgálatokat. Az *ABCC1* rs246240 polimorfizmus variáns allélját hordozó betegeknél szignifikánsan alacsonyabb volt a MTX toxicitás kialakulásának esélye, mint a homozigóta vad allél esetében. Az rs2238476 homozigóta vad allélokkel rendelkező betegeknél jobb volt MTX kezelésre adott válasza, de magasabb volt a toxicitás kockázata, mint a variáns allélt hordozó betegeknél. Az rs35592 polimorfizmus szintén összefüggést mutatott a kezelésre adott válasszal, homozigóta vad genotípus esetén szignifikánsan jobb volt, mint a variáns allélt hordozó betegeknél. Az rs3784862 polimorfizmus pedig a toxicitás esetében volt befolyásoló tényező, homozigóta vad genotípus esetén nagyobb valószínűséggel alakult ki toxicitás, mint a vad allélt hordozók esetében¹⁵⁹. Az *ABCC1* polimorfizmusainak gyógyszer rezisztenciában és toxicitásban betöltött valamint in vivo élettani szerepe továbbra is tisztázatlan, további kutatásokat igényel¹⁵⁶.

In vitro kísérletek kimutatták, hogy az *ABCC2* szállítja a kemoterápiás szerek egy részét, köztük a MTX-ot is⁸⁴. Elemzésünkben a gént érintő valamennyi általunk vizsgált polimorfizmus összefüggést mutatott a MTX kinetikájával és/vagy

toxicitásával. Egyváltozós asszociációs vizsgálattal az *ABCC2* rs3740066 homozigóta variáns genotípus esetén az AUC értéke és a csontvelő toxicitás rizikója is alacsonyabb volt. A csontvelő toxicitás rizikója magasabb volt az *ABCC2* rs2273697 variáns allél jelenlétében. Szintén a csontvelő toxicitással volt kapcsolatba hozható az *ABCC2* rs717620 jelenléte egyváltozós BMLA elemzésünkben 0,56 valószínűséggel.

Az *ABCC2* rs3740066 polimorfizmusa a 3972-es bázispárnál C>T cserével jár. Szinonim SNP, a fehérje 1324-es aminosava nem változik, izoleucin marad. Simon és munkatársai lymphomás betegeken végzett farmakogenetikai vizsgálata nem talált összefüggést a variáns (T) allél jelenléte és a MTX clearance között¹⁶⁰. A nemzetközi irodalomban nem foglalkoznak további tanulmányok ezen SNP szerepével a MTX metabolizmusban, de nem egységes az álláspont a polimorfizmus antiepileptikum kezeléssel kapcsolatos hatásáról sem. Hilger és munkatársai szerint a T allél jelenléte epilepsziás betegeken nem jár emelkedett antiepileptikum rezisztenciával, nincs különbség az évi rohamok számában a különböző genotípus csoportok között¹⁶¹. Míg Puranik munkacsoportja szerint a CT + TT genotípus csökkent carbamazepin metabolizmussal jár epilepsziás férfiakban, CC genotípussal összehasonlítva¹⁶². Fluorouracillal, leucovorinnal és oxiplatinnal kezelt colorectalis daganatban szenvedő betegek farmakogenetikai vizsgálata során a homozigóta variáns genotípus esetén a kezelés súlyosabb neurotoxicitással járt, mint a vad allélt hordozó betegeken¹⁶³.

Az *ABCC2* rs2273697 polimorfizmusa az 1388-as bázispárnál G>A cserével jár, mely missense változást eredményez. A fehérje 417-es aminosava helyén valin helyett izoleucin épül be. Simon tanulmányában ez az SNP is szerepelt, és szintén nem volt kimutatható hatása a variáns (A) allél jelenlétének a MTX clearance-re¹⁶⁰. Egy másik tanulmány szerint MTX-tal kezelt rheumatoid arthritises betegek körében a homozigóta AA genotípus esetén magasabb a gastrointestinalis toxicitás kialakulásának esélye, mint a GG+AG genotípus esetén¹⁶⁴. A mi elemzésünkben szintén magasabb volt a toxicitás rizikója az SNP jelenlétében.

Az *ABCC2* rs717620 polimorfizmusa a gén 5'UTR végén helyezkedik el, a promotor régió -24. bázispárjánál okoz C>T báziscserét. Mivel nem a fehérjét kódoló régióban van, ezért aminosav cserét nem okoz. Simon munkacsoportja ezt az SNPt is vizsgálta lymphomás betegeken végzett farmakogenetikai elemzésében és azt találta,

hogy a variáns (T) allél jelenléte emelkedett MTX clearance-szel jár homozigóta CC genotípushoz képest¹⁶⁰. Szintén az rs3740066 polimorfizmussal kapcsolatban említett colorectalis daganatos betegekkel foglalkozó tanulmány szerint az rs717620 homozigóta TT genotípus a kezelés kapcsán kialakuló neurotoxicitás súlyosságának fokozódásával jár a C allélt hordozókhoz képest¹⁶³.

Bár asszociációs vizsgálattal csak gyenge összefüggést tudunk kimutatni a görbe alatti területtel, egyváltozós és többváltozós BMLA elemzésben is relevánsnak találtuk az *ABCC3* rs4793665 polimorfizmusát. A görbe alatti területtl 0,31 valószínűséggel, a csúcskoncentrációval 0,6 valószínűséggel volt kapcsolatba hozható vizsgálatunkban ez az SNP, a MTX farmakokinetika és toxicitás rendszer Markov takarójának pedig 0,48 valószínűséggel tagja. Az SNP a gén promoter régiójában található és a -211-es bázispárnál okoz C>T cserét. A humán *ABCC3* génjét vizsgálták 103 egészséges fehér egyén DNS-ének szekvenálásával olyan polimorfizmusokat keresve, aminek jelenléte összefügg a májban mért *ABCC3* mRNS és protein szinttel. A májban mért mRNS szint és az *ABCC3* protein mennyisége nem korrelált egymással, de a -211C>T (rs4793665) polimorfizmus esetében találtak kapcsolatot az mRNS szint és az egyik allélvariáns között. A -211TT egyénekben szignifikánsan alacsonyabb volt az *ABCC3* mRNS szintje, mint a CT és CC egyénekben. Kimutatták továbbá azt is, hogy a polimorfizmus jelenléte a nukleáris faktorok kötődésére van hatással¹⁶⁵. Juvenilis idiopathias arthritises betegek MTX kezelésével kapcsolatban vizsgálva szignifikáns hatásúnak találták a kezelésre adott válasz szempontjából. A variáns (T) allél jelenlétében gyakrabban volt elérhető terápiás válasz a MTX kezelésre, mint más genotípusú betegek esetében¹⁶⁶.

Az *ABCC10* gén polimorfizmusai vizsgálatunkban nem bizonyultak releváns hatásúnak a MTX farmakokinetikájában és a toxicitás kialakulásában. In vitro vizsgálatokban kimutatták, hogy az *ABCC10* felelős a docetaxel, paclitaxel, vincristin és vinblasztin rezisztenciáért, de részt vesz a nukleozid alapú gyógyszerek, például Ara-C, valamint a mikrotubulusokat stabilizáló szerek elleni rezisztencia kialakításában is^{167, 168}. Vincristinnel kezelt human és egér nyálmirigy adenocarcinoma sejtekben nem csak az *ABCBI* és *ABCCI* gének expressziója emelkedett meg, hanem az *ABCC10* géné is¹⁶⁹. Jelenleg azonban nincs olyan klinikai vizsgálat, mely egyértelműen meghatározná az *ABCC10* gén szerepét a klinikai gyógyszer rezisztenciában¹⁷⁰.

Az *ABCG2* rs2231142 polimorfizmusa csak az egyváltozós asszociációs elemzésben mutatkozott befolyásoló tényezőnek a MTX felezési idejére, a BMLA vizsgálatainkban nem találtuk releváns hatásúnak. A MTX szint $T_{a1/2}$ felezési ideje magasabb volt a polimorfizmus ritka alléljának jelenlétében. Az *ABCG2* fehérje génje nagyon konzervált, viszonylag kevés polimorfizmust írtak le exonban. Ezek közül az ötödik exonban a 421-es bázispárnál C>A cserét okozó rs2231142 SNP a NBD-ban található 141. aminosav esetében Glicin-Lysin cserét hoz létre¹⁷¹. A polimorfizmusról kimutatták in vitro kísérletekben, hogy variáns fehérje esetében a drogrezisztencia tizedére csökkent a vad típusú proteinhez képest, 2-, 3-szorosára fokozódott drogakkumuláció és csökkent efflux volt mérhető. A megfigyelés hátterében az ATP-áz aktivitás csökkenése és a K_m érték 1,4-szeresére növekedése állt. A fehérje expressziót nem befolyásolta az SNP¹⁷². MTX-tal kezelt rheumatoid arthritises betegeken vizsgálva a homozigóta variáns genotípus esetében csökkent a mellékhatás kialakulásának valószínűsége a homozigóta vad genotípusú betegekhez képest¹⁷³.

A *NR1I2*, más néven *SXR* indukálja a többi enzim és transzporter, köztük a *CYP3A4*, *CYP3A5* és az *ABCB1* expresszióját⁷⁷.

Az rs3814055 polimorfizmus a gén 5'-UTR régiójában a 705-ös bázispárnál okoz C>T cserét. Egyváltozós asszociációs vizsgálatunkban az SNP variáns alléljának jelenlétében magasabb volt a MTX szint $T_{a1/2}$ felezési ideje, bár a szignifikancia szint nem mutatott erős összefüggést. Ezt az SNPt több kutatócsoport vizsgálta már egyrészt különböző betegségek kialakulásának rizikója, másrészt gyógyszerek farmakogenetikája szempontjából. Epilepsziás betegeknél a T allél jelenléte esetén csökkent carbamazepin clearance-t figyeltek meg¹⁶². Lamba munkacsoportja 2008-as tanulmányában alacsonyabb *SXR* expressziót írt le T allél esetén férfiakból származó donor máj mintákban¹⁷⁴. Később egy finn munkacsoport vizsgálta a polimorfizmust vese átültetett betegek cyclosporin kezelésével kapcsolatban. Ők C allél esetében találtak csökkent gyógyszer hasznosulást a homozigóta TT genotípushoz képest¹⁷⁵. A polimorfizmus MTX farmakológiájában betöltött szerepéről egyelőre nem írtak a nemzetközi irodalomban.

Egyváltozós asszociációs elemzésünkben az rs3732361 és az rs6785049 variáns alléljainak jelenlétében egyrészt magasabb volt a 48 órás MTX koncentráció, másrészt

alacsonyabb volt a csontvelő és a máj toxicitás rizikója is. Az *SXR*, mint a nukleáris receptor szupercsalád tagja, számos enzim transzkripcióját indukálja, ezzel gyorsítja a gyógyszer clearance-t, de májenzim szint emelkedést is eredményez. A fehérje feltételezhetően alacsonyabb aktivitása így magasabb gyógyszer szintekhez, ugyanakkor csökkent májfunkciós értékekhez vezethet.

Az rs3732361 SNP a gén 3'-UTR régiójában A>G báziscserét okoz. Az SNP hatásáról a gén működésében gyakorlatilag nem található egyértelmű állásfoglalás a nemzetközi irodalomban. Az rs6785049 polimorfizmus a gén 5. intronjában található, a 7635-ös bázispárnál okoz A>G cserét. A polimorfizmus a *CYP3A4* expresszióját befolyásolja: az intestinális sejtekben a *CYP3A4* indukcióját növeli¹⁰². Sookoian és munkatársai nem alkoholos zsírmáj betegség genetikai hátterét vizsgálták és az rs6785049 polimorfizmusról leírták, hogy a variáns allél része a betegség súlyosságával szignifikánsan összefüggésbe hozható haplotípusnak¹⁷⁶. Egy dán prospektív kutatásban nem találták rizikót növelő tényezőnek ezt az SNPt colorectális daganatok kialakulása terén¹⁷⁷. Szintén ennek a munkacsoportnak egy évvel később megjelent munkájában a colitis ulcerosa kialakulásának nagyobb rizikójával és a betegség kiterjedésének nagyobb mértékével hozták összefüggésbe a polimorfizmus variáns alléljának jelenlétét 40 évesnél fiatalabb populációban¹⁷⁸. Az SNP gyógyszerkinetikával való összefüggéséről egyelőre nem írtak a nemzetközi irodalomban.

Az általunk vizsgált *SXR* polimorfizmusok közül az rs3814058 tűnt a legmeghatározóbbnak a *MTX* farmakológiájában. Egyváltozós asszociációs vizsgálatunkban a csontvelő és a máj toxicitás rizikója is alacsonyabb volt az rs3814058 ritka alléljának jelenlétében. Egyváltozós BMLA elemzésünkben görbe alatti területtel 0,38 valószínűséggel, a csúcskoncentrációval 0,58 valószínűséggel mutatott összefüggést ez az SNP. Többváltozós BMLA elemzésünkben a polimorfizmus hatással bírt a farmakokinetika-toxicitás összefüggés rendszerére (0,44). Ez a polimorfizmus is kevésbé dokumentált a nemzetközi irodalomban. A gén 3'-UTR régiójában, a 42961 pozícióban T>C báziscserét okoz. Egy skandináv tanulmányban az *SXR* gén egyes polimorfizmusainak prognosztikai szerepét vizsgálták primer sclerotizáló cholangitis esetében, többek között az rs3814058 SNP-jét is. Egyik *SXR* polimorfizmus sem volt a betegségre hajlamosító tényező, de az rs3814058 homozigóta variáns genotípus esetén alacsonyabb volt a betegek medián túlélése¹⁷⁹. Zhang munkacsoportja az *SXR* gén

variánsait összefoglaló cikkében leírta, hogy heterozigóta genotípusú betegek bél biopsziás mintáiban 1,45-ször alacsonyabb volt a P-glikoprotein szint, mint a homozigóta vad genotípusú betegek mintáiban ¹⁰².

Eredményeinkből is látszik, hogy egyetlen genetikai eltérés azonosítása nem lesz elegendő MTX hatékonyságának megfelelő előrejelzéséhez, hiszen a MTX anyagcseréjében rengeteg metabolikus út érintett, hatását több molekulán fejt ki. A genetikai variációk szerepének megfelelő megértéséhez prospektív, nagy betegszámú, sok SNP hatását vizsgáló kutatásokra lesz szükség. Végül pedig fontos kiemelni, hogy a farmakogenetikai tényezőket a MTX anyagcsere epigenetikai, poszt translációs, biokémiai különbségeivel együtt kell figyelembe venni a jelentőségük értékelésekor.

A jelenleg legelterjedtebb, egyetlen génből kiinduló megközelítések helyét fokozatosan a genomszintű elemzések veszik át. Genomszintű adatok elemzéséhez bonyolult statisztikai és adatkezelési szoftverekre van szükség, melyek segítségével új, eddig ismeretlen gének vagy genetikai változatok szerepére derülhet fény. A távoli jövőben a genetikán alapuló egyéni terápia a következő négy lépésben valósulhatna meg: 1) az adott betegségben, az adott gyógyszerek esetében legnagyobb jelentőséggel bíró genetikai polimorfizmusok azonosítása, 2) ezek beépítésével egy multigénes farmakogenetikai profil kialakítása, 3) a profil szerint beállított személyre szabott terápia hatékonyságának bizonyítása, 4) a kifejlesztett farmakogenetikai profil populációs szintű alkalmazása ¹⁸⁰.

8 Következtetések

A II. sz. Gyermekklinikán 1988-2006 között diagnosztizált 122 osteosarcomás gyermek 5 éves általános túlélése 68%, eseménymentes túlélése 62% volt, melyek megfelelnek a legjobb nemzetközi adatoknak. Prognosztikai tényezőket elemezve eredményeink azt mutatták, hogy fiatalabb életkorban végtagmegtartó műtéttel és kemoterápiával kezelt, végtagra lokalizálódott, áttét nélküli osteosarcomás betegek túlélési esélyei kiválóak. Új megfigyelésnek bizonyult a nemzetközi irodalomban az az eredményünk, hogy a 14 év alatti osteosarcomás gyermekek eseménymentes túlélése szignifikánsan jobb volt, mint 14 év feletti betegtársaiké.

Farmakokinetikai elemzésünkben kitűnik, hogy magasabb MTX expozíciónál fokozott a toxicitás fellépésének veszélye, ugyanakkor magasabb MTX szérumszintek esetén szignifikánsan jobb volt a túlélés. Nem volt szignifikáns összefüggés a toxicitás és a túlélés között. Bár a MTX elhúzódó jelenléte a szervezetben súlyos mellékhatásokhoz vezet, előnyös, mert a terápia hatékonyságát növeli. Ezért eredményeink alátámasztják a nagy dózisú MTX terápia létjogosultságát, illetve hogy akiknél nem elég magas a koncentráció-idő görbe alatti területtel jellemezhető MTX expozíció, azoknál a MTX dózis további emelése javíthat a kezelés hatékonyságán. A standard rizikócsoportú betegeknél magasabb görbe alatti területet, alacsonyabb MTX clearance-t és fokozott májtoxicitást észleltünk, mint a magas rizikócsoportban. Eredményeink alapján a betegek diagnóziskori életkorát, illetve a neoadjuváns MTX blokkok során mért 48 órás görbe alatti területet figyelembe lehetne venni az osteosarcomás betegek rizikó besorolásánál.

Farmakogenetikai elemzéseink során azt találtuk, hogy a *GGH* -401TT genotípusú betegek MTX-eliminációja gyorsabb és a súlyos mellékhatások előfordulása ritkább, mint a -401CC/CT gyermekeknél. Az *SLC19A1* 80A allél jelenléte esetén a súlyos mellékhatások előfordulása gyakoribb, és a különbség erősödik, ha a *GGH* -401TT genotípus védő hatása nincs jelen a betegeknél. További elemzésünk során 3 féle statisztikai módszerrel kerestünk összefüggést a genotípus és a klinikai adatok között. Az *ABCB1* rs928256, az *ABCC3* rs4793665, a *GGH* rs3758149 és az *SXR* rs3814058 SNP-k mind az egyváltozós, mind a többváltozós vizsgálatokban releváns

hatásúnak bizonyultak. A farmakokinetikai és a fenti 4 SNP-n alapuló haplotípus adatok alapján lehetővé válhatna egy populációs farmakokinetikai modell kidolgozása, mely a MTX terápia megkezdése előtt egyénre szabottan előre jelezné a várható farmakokinetikai paramétereket, és így egyéni gyógyszeradagolást tenne lehetővé.

9 Összefoglalás

Az osteosarcoma a leggyakoribb primer malignus csonttumor gyermekkorban. Az elmúlt évtizedekben bevezették az intenzív kemoterápiát, melynek köszönhetően napjainkban az osteosarcomás gyermekek 2/3-a tartósan meggyógyul. A II. sz. Gyermekklinikán 1988-2006 között diagnosztizált 122 osteosarcomás gyermek adataiból 68% 5-éves OS-t és 62% 5-éves EFS-t számoltunk. Prognosztikai tényezőket elemezve eredményeink azt mutatták, hogy fiatalabb életkorban végtagmegtartó műtéttel és kemoterápiával kezelt, végtagra lokalizálódott, áttét nélküli osteosarcomás betegek túlélési esélyei kiválóak.

Azonban még így is jelentős különbségek vannak a betegek között a terápiás válaszban és a mellékhatások kialakulásában. Az osteosarcoma kezelésének egyik alappillére a nagy dózisú intravénás MTX. A 122 gyermektől összesen 98 beteg epidemiológiai adatait, kemoterápiára adott szövettani válaszát, metastasis előfordulását, valamint a kezelésük során kapott 929 MTX blokkjának adatait tudtuk összegyűjteni, és a MTX-kinetika, toxicitás és a túlélés közötti összefüggéseket elemeztük. A súlyos májtoxicitásban szenvedő betegeknél szignifikánsan magasabb volt a 48 órás MTX expozíció, csontvelő-toxicitás fellépése esetén nagyobb volt a MTX felezési idő. Magasabb 48 órás szérumszintek esetén jobb túlélés volt kimutatható. A toxicitás és a túlélés között nem találtunk összefüggést. Eredményeink azt mutatják, hogy a MTX elhúzódó jelenléte a szervezetben ugyan súlyos mellékhatásokhoz vezethet, azonban a terápia hatékonyságát növeli.

A 98 beteg közül 62 betegtől tudunk DNSt izolálni és 11 génnek összesen 29 polimorfizmusát meghatározni. Elemzésünk során 3 féle statisztikai módszerrel kerestünk összefüggést a genotípus és a klinikai adatok között. Az *ABCB1* rs928256, az *ABCC3* rs4793665, a *GGH* rs3758149 és az *SXR* rs3814058 SNP-k mind az egyváltozós, mind a többváltozós vizsgálatokban releváns hatásúnak bizonyultak. Az esetszám növelésére és további vizsgálatokra van szükség, de eddigi eredményeink felvetik egy populációs farmakokinetikai modellen és bizonyos polimorfizmusokon alapuló egyéni gyógyszeradagolás jövőbeni hasznát.

10 Summary

Osteosarcoma is the most common primary malignant bone tumor in children and adolescents. The cure rates for patients with osteosarcoma have been improving dramatically since the introduction of multi-agent chemotherapy in the past decades. Currently about two thirds of the children with osteosarcoma can be cured. We reviewed 122 cases treated at the Second Department of Pediatrics in Budapest between 1988 and 2006. The 5-year OS was 68% and 5-year EFS was 62%. Our results of the analysis of prognostic factors demonstrate that younger patients with localized osteosarcoma of the extremities who receive limb-salvage surgery and chemotherapy have an excellent survival.

However, there are still huge differences between patients in therapeutic response and in development of side effects. Number of survivors of osteosarcoma keeps increasing, therefore it is essential to learn extensively the acute and late side effects. Intravenous high-dose methotrexate is a cornerstone of therapy for osteosarcoma. Pharmacokinetic, toxicity and epidemiologic data of 98 patients from these 122 with osteosarcoma treated with 929 HDMTX courses were evaluated. There was correlation between MTX exposure and the incidence of toxicity. Higher serum concentrations at 48 hours were associated with a better 5-year OS and EFS. These results suggest that higher MTX exposure may lead to serious side effects, but it also improves treatment outcome.

We managed to isolate DNS and determine 29 SNPs from 11 genes in case of 62 of 98 patients with MTX pharmacologic data. We search for correspondence between genotype and clinical data with our analysis by three different statistical methods. The ABCB1 rs928256, ABCC3 rs4793665, GGH rs3758149 and SXR rs3814058 SNPs were proved to have relevant effect both in single- and multi-variable trials. There is a need for increase the number of cases and for further examinations but our current results raise the possibility of future population pharmacokinetic model with pharmacogenetic data based dose individualization, because with the approximation of the dosis toleranta maxima, the serious dangerous side effects can be avoided.

11 Irodalomjegyzék

1. Tang N, Song WX, Luo J, Haydon RC, He TC. (2008) Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clin Orthop Relat Res*, 466: 2114-30.
2. Klein MJ, Siegal GP. (2006) Osteosarcoma: anatomic and histologic variants. *Am J Clin Pathol*, 125: 555-81.
3. Cade S. (1955) Osteogenic sarcoma; a study based on 133 patients. *J R Coll Surg Edinb*, 1: 79-111.
4. Gaffney R, Unni KK, Sim FH, Slezak JM, Esther RJ, Bolander ME. (2006) Follow-up study of long-term survivors of osteosarcoma in the prechemotherapy era. *Hum Pathol*, 37: 1009-14.
5. Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R. (2004) Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *Oncologist*, 9: 422-41.
6. Ottaviani G, Jaffe N. (2009) The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res*, 152: 3-13.
7. Unni KK, editor. *Dahlin's Bone Tumors*. 5th ed. Philadelphia, New York: Lippincott-Raven, 1996.
8. Ta HT, Dass CR, Choong PF, Dunstan DE. (2009) Osteosarcoma treatment: state of the art. *Cancer Metastasis Rev*, 28: 247-63.
9. Fraumeni JF, Jr. (1967) Stature and malignant tumors of bone in childhood and adolescence. *Cancer*, 20: 967-73.
10. Price CH. (1958) Primary bone-forming tumours and their relationship to skeletal growth. *J Bone Joint Surg Br*, 40-B: 574-93.
11. Fuchs B, Pritchard DJ. (2002) Etiology of osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res*: 40-52.
12. Mendoza SM, Konishi T, Miller CW. (1998) Integration of SV40 in human osteosarcoma DNA. *Oncogene*, 17: 2457-62.
13. Sabourin SM, Jayashankar A, Mullins ME. (2008) Imaging of osteosarcoma after irradiation: self-assessment module. *AJR Am J Roentgenol*, 191: S28-30.
14. Koshy M, Paulino AC, Mai WY, Teh BS. (2005) Radiation-induced osteosarcomas in the pediatric population. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 63: 1169-74.

15. Rozeman LB, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PC. (2006) Pathology of primary malignant bone and cartilage tumours. *Int Orthop*, 30: 437-44.
16. Li N, Yang R, Zhang W, Dorfman H, Rao P, Gorlick R. (2009) Genetically transforming human mesenchymal stem cells to sarcomas: changes in cellular phenotype and multilineage differentiation potential. *Cancer*, 115: 4795-806.
17. Miller CW, Aslo A, Won A, Tan M, Lampkin B, Koeffler HP. (1996) Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 122: 559-65.
18. Deshpande A, Hinds PW. (2006) The retinoblastoma protein in osteoblast differentiation and osteosarcoma. *Curr Mol Med*, 6: 809-17.
19. Unni KK. (1998) Osteosarcoma of bone. *J Orthop Sci*, 3: 287-94.
20. Bramer JA, van Linge JH, Grimer RJ, Scholten RJ. (2009) Prognostic factors in localized extremity osteosarcoma: a systematic review. *Eur J Surg Oncol*, 35: 1030-6.
21. Bielack SS, Carrle D, Hards J, Schuck A, Paulussen M. (2008) Bone tumors in adolescents and young adults. *Curr Treat Options Oncol*, 9: 67-80.
22. Marulanda GA, Henderson ER, Johnson DA, Letson GD, Cheong D. (2008) Orthopedic surgery options for the treatment of primary osteosarcoma. *Cancer Control*, 15: 13-20.
23. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C. (1969) Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng*, 11: 1101-10.
24. Bodley A, Liu LF, Israel M, Seshadri R, Koseki Y, Giuliani FC, Kirschenbaum S, Silber R, Potmesil M. (1989) DNA topoisomerase II-mediated interaction of doxorubicin and daunorubicin congeners with DNA. *Cancer Res*, 49: 5969-78.
25. Wang S, Kotamraju S, Konorev E, Kalivendi S, Joseph J, Kalyanaraman B. (2002) Activation of nuclear factor-kappaB during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic: the role of hydrogen peroxide. *Biochem J*, 367: 729-40.
26. Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V. (2009) Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep*, 61: 154-71.

27. Treon SP, Chabner BA. (1996) Concepts in use of high-dose methotrexate therapy. *Clin Chem*, 42: 1322-9.
28. Fürst Z, editor. *Farmakológia*. Budapest: Medicina Könyvkiadó Rt, 2001.
29. Briccoli A, Rocca M, Salone M, Bacci G, Ferrari S, Balladelli A, Mercuri M. (2005) Resection of recurrent pulmonary metastases in patients with osteosarcoma. *Cancer*, 104: 1721-5.
30. Grimer RJ, Sommerville S, Warnock D, Carter S, Tillman R, Abudu A, Spooner D. (2005) Management and outcome after local recurrence of osteosarcoma. *Eur J Cancer*, 41: 578-83.
31. Goldsby R, Burke C, Nagarajan R, Zhou T, Chen Z, Marina N, Friedman D, Neglia J, Chuba P, Bhatia S. (2008) Second solid malignancies among children, adolescents, and young adults diagnosed with malignant bone tumors after 1976: follow-up of a Children's Oncology Group cohort. *Cancer*, 113: 2597-604.
32. Bruce N. Cronstein JRB, editor. *Methotrexate*. Basel-Boston-Berlin: Birkhauser, 2000.
33. van Outryve S, Schrijvers D, van den Brande J, Wilmes P, Bogers J, van Marck E, Vermorken JB. (2002) Methotrexate-associated liver toxicity in a patient with breast cancer: case report and literature review. *Neth J Med*, 60: 216-22.
34. Hider SL, Bruce IN, Thomson W. (2007) The pharmacogenetics of methotrexate. *Rheumatology (Oxford)*, 46: 1520-4.
35. Ranganathan P, McLeod HL. (2006) Methotrexate pharmacogenetics: the first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 54: 1366-77.
36. Bleyer WA. (1978) The clinical pharmacology of methotrexate: new applications of an old drug. *Cancer*, 41: 36-51.
37. Le Guellec C, Blasco H, Benz I, Hulin A. (2010) [Therapeutic drug monitoring of methotrexate after its administration in high-dose protocols]. *Thérapie*, 65: 163-9.
38. Reutenauer SC, D.; Récher, C. (2009) Surdosage au méthotrexate : complications, prise en charge et prévention. *Reanimation*, 18: 654-58.
39. Widemann BC, Adamson PC. (2006) Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist*, 11: 694-703.

40. Crews KR, Liu T, Rodriguez-Galindo C, Tan M, Meyer WH, Panetta JC, Link MP, Daw NC. (2004) High-dose methotrexate pharmacokinetics and outcome of children and young adults with osteosarcoma. *Cancer*, 100: 1724-33.
41. Ferreri AJ, Guerra E, Regazzi M, Pasini F, Ambrosetti A, Pivnik A, Gubkin A, Calderoni A, Spina M, Brandes A, Ferrarese F, Rognone A, Govi S, Dell'Oro S, Locatelli M, Villa E, Reni M. (2004) Area under the curve of methotrexate and creatinine clearance are outcome-determining factors in primary CNS lymphomas. *Br J Cancer*, 90: 353-8.
42. Von Hoff DD, Penta JS, Helman LJ, Slavik M. (1977) Incidence of drug-related deaths secondary to high-dose methotrexate and citrovorum factor administration. *Cancer Treat Rep*, 61: 745-8.
43. Widemann BC, Balis FM, Kempf-Bielack B, Bielack S, Pratt CB, Ferrari S, Bacci G, Craft AW, Adamson PC. (2004) High-dose methotrexate-induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma. *Cancer*, 100: 2222-32.
44. Schmiegelow K, Pulczynska M. (1990) Prognostic significance of hepatotoxicity during maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer*, 61: 767-72.
45. Jaffe N, Paed D, Farber S, Traggis D, Geiser C, Kim BS, Das L, Frauenberger G, Djerassi I, Cassady JR. (1973) Favorable response of metastatic osteogenic sarcoma to pulse high-dose methotrexate with citrovorum rescue and radiation therapy. *Cancer*, 31: 1367-73.
46. Rubnitz JE, Relling MV, Harrison PL, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rivera GK, Thompson SJ, Evans WE, Pui CH. (1998) Transient encephalopathy following high-dose methotrexate treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 12: 1176-81.
47. Janeway KA, Grier HE. (2010) Sequelae of osteosarcoma medical therapy: a review of rare acute toxicities and late effects. *Lancet Oncol*, 11: 670-8.
48. Inaba H, Khan RB, Laningham FH, Crews KR, Pui CH, Daw NC. (2008) Clinical and radiological characteristics of methotrexate-induced acute encephalopathy in pediatric patients with cancer. *Ann Oncol*, 19: 178-84.

49. M. Hlaing UFM, D. Powell. (2008) Methotrexate induced Hypersensitivity pneumonitis: Review of Literature with Case report. *The Internet Journal of Rheumatology*, 4.
50. Imokawa S, Colby TV, Leslie KO, Helmers RA. (2000) Methotrexate pneumonitis: review of the literature and histopathological findings in nine patients. *Eur Respir J*, 15: 373-81.
51. Bertino JR, Goker E, Gorlick R, Li WW, Banerjee D. (1996) Resistance Mechanisms to Methotrexate in Tumors. *Oncologist*, 1: 223-26.
52. Guo W, Healey JH, Meyers PA, Ladanyi M, Huvos AG, Bertino JR, Gorlick R. (1999) Mechanisms of methotrexate resistance in osteosarcoma. *Clin Cancer Res*, 5: 621-7.
53. Jaffe N, Gorlick R. (2008) High-dose methotrexate in osteosarcoma: let the questions surcease--time for final acceptance. *J Clin Oncol*, 26: 4365-6.
54. Matherly LH, Hou Z, Deng Y. (2007) Human reduced folate carrier: translation of basic biology to cancer etiology and therapy. *Cancer Metastasis Rev*, 26: 111-28.
55. Bleyer WA. (1989) New vistas for leucovorin in cancer chemotherapy. *Cancer*, 63: 995-1007.
56. Chabner BA, Young RC. (1973) Threshold methotrexate concentration for in vivo inhibition of DNA synthesis in normal and tumorous target tissues. *J Clin Invest*, 52: 1804-11.
57. Galpin AJ, Evans WE. (1993) Therapeutic drug monitoring in cancer management. *Clin Chem*, 39: 2419-30.
58. Hon YY, Evans WE. (1998) Making TDM work to optimize cancer chemotherapy: a multidisciplinary team approach. *Clin Chem*, 44: 388-400.
59. McMahon G, O'Connor R. (2009) Therapeutic drug monitoring in oncology: does it have a future? *Bioanalysis*, 1: 507-11.
60. Howell SK, Wang YM, Hosoya R, Sutow WW. (1980) Plasma methotrexate as determined by liquid chromatography, enzyme-inhibition assay, and radioimmunoassay after high-dose infusion. *Clin Chem*, 26: 734-7.
61. Nelson JA, Harris BA, Decker WJ, Farquhar D. (1977) Analysis of methotrexate in human plasma by high-pressure liquid chromatography with fluorescence detection. *Cancer Res*, 37: 3970-3.

62. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*, 92: 1295-302.
63. Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SP. (2004) The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab*, 5: 21-53.
64. Sparreboom A, Danesi R, Ando Y, Chan J, Figg WD. (2003) Pharmacogenomics of ABC transporters and its role in cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat*, 6: 71-84.
65. Kruh GD, Belinsky MG. (2003) The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene*, 22: 7537-52.
66. Kerb R, Hoffmeyer S, Brinkmann U. (2001) ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics*, 2: 51-64.
67. Sarkadi B, Ozvegy-Laczka C, Nemet K, Varadi A. (2004) ABCG2 -- a transporter for all seasons. *FEBS Lett*, 567: 116-20.
68. Klein I, Sarkadi B, Varadi A. (1999) An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1461: 237-62.
69. Jamroziak K, Robak T. (2004) Pharmacogenomics of MDR1/ABCB1 gene: the influence on risk and clinical outcome of haematological malignancies. *Hematology*, 9: 91-105.
70. Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM, Dalton WS. (1994) P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood*, 83: 2451-8.
71. Bunting KD. (2002) ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells*, 20: 11-20.
72. Urayama KY, Wiencke JK, Buffler PA, Chokkalingam AP, Metayer C, Wiemels JL. (2007) MDR1 gene variants, indoor insecticide exposure, and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16: 1172-7.
73. Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson MR. (2007) ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J*, 7: 154-79.

74. Hoffmann U, Kroemer HK. (2004) The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug Metab Rev*, 36: 669-701.
75. Bakos E, Homolya L. (2007) Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Arch*, 453: 621-41.
76. Zhou SF, Wang LL, Di YM, Xue CC, Duan W, Li CG, Li Y. (2008) Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr Med Chem*, 15: 1981-2039.
77. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, Altman RB, Klein TE. (2012) Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther*, 92: 414-7.
78. Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ, Tytgat GN, Borst P, Baas F, Oude Elferink RP. (1997) A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology*, 25: 1539-42.
79. Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F, Borst P. (1997) Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res*, 57: 3537-47.
80. Narasaki F, Oka M, Nakano R, Ikeda K, Fukuda M, Nakamura T, Soda H, Nakagawa M, Kuwano M, Kohno S. (1997) Human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) is expressed in human lung, gastric, and colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 240: 606-11.
81. Konig J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. (1999) Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1461: 377-94.
82. Nies AT, Keppler D. (2007) The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch*, 453: 643-59.
83. Chen ZS, Kawabe T, Ono M, Aoki S, Sumizawa T, Furukawa T, Uchiumi T, Wada M, Kuwano M, Akiyama SI. (1999) Effect of multidrug resistance-reversing agents on transporting activity of human canalicular multispecific organic anion transporter. *Mol Pharmacol*, 56: 1219-28.

84. Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D. (1999) Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol*, 55: 929-37.
85. Kool M, van der Linden M, de Haas M, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ, Jansen G, Peters GJ, Ponne N, Scheper RJ, Elferink RP, Baas F, Borst P. (1999) MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 6914-9.
86. Kruh GD, Zeng H, Rea PA, Liu G, Chen ZS, Lee K, Belinsky MG. (2001) MRP subfamily transporters and resistance to anticancer agents. *J Bioenerg Biomembr*, 33: 493-501.
87. Zeng H, Chen ZS, Belinsky MG, Rea PA, Kruh GD. (2001) Transport of methotrexate (MTX) and folates by multidrug resistance protein (MRP) 3 and MRP1: effect of polyglutamylation on MTX transport. *Cancer Res*, 61: 7225-32.
88. Hopper E, Belinsky MG, Zeng H, Tosolini A, Testa JR, Kruh GD. (2001) Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett*, 162: 181-91.
89. Chen ZS, Hopper-Borge E, Belinsky MG, Shchaveleva I, Kotova E, Kruh GD. (2003) Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCC10). *Mol Pharmacol*, 63: 351-8.
90. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 15665-70.
91. Huang Y. (2007) Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev*, 26: 183-201.
92. Allen JD, Schinkel AH. (2002) Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Mol Cancer Ther*, 1: 427-34.
93. Krajcinovic M, Moghrabi A. (2004) Pharmacogenetics of methotrexate. *Pharmacogenomics*, 5: 819-34.
94. Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner JL, Bigler J, Ariail KS, Keener CL, Li S, Liu H, Farin FM, Potter JD. (2001) Pharmacogenetics of

- methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood*, 98: 231-4.
95. Aplenc R, Lange B. (2004) Pharmacogenetic determinants of outcome in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 125: 421-34.
 96. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP, Namour F, Chabi NW, Sanni A, Anello G, Bosco P, Romano C, Amouzou E, Arrieta HR, Sanchez BE, Romano A, Herbeth B, Guillard JC, Mutchinick OM. (2006) Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr*, 83: 701-7.
 97. Hughes LB, Beasley TM, Patel H, Tiwari HK, Morgan SL, Baggott JE, Saag KG, McNicholl J, Moreland LW, Alarcon GS, Bridges SL, Jr. (2006) Racial or ethnic differences in allele frequencies of single-nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and their influence on response to methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 65: 1213-8.
 98. Galivan J, Ryan TJ, Chave K, Rhee M, Yao R, Yin D. (2000) Glutamyl hydrolase. pharmacological role and enzymatic characterization. *Pharmacol Ther*, 85: 207-15.
 99. Li H, Ryan TJ, Chave KJ, Van Roey P. (2002) Three-dimensional structure of human gamma -glutamyl hydrolase. A class I glutamine amidotransferase adapted for a complex substrate. *J Biol Chem*, 277: 24522-9.
 100. Chave KJ, Ryan TJ, Chmura SE, Galivan J. (2003) Identification of single nucleotide polymorphisms in the human gamma-glutamyl hydrolase gene and characterization of promoter polymorphisms. *Gene*, 319: 167-75.
 101. Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA. (1998) The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest*, 102: 1016-23.
 102. Zhang J, Kuehl P, Green ED, Touchman JW, Watkins PB, Daly A, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Wrighton SA, Hancock M, Kim RB, Strom S, Thummel K, Russell CG, Hudson JR, Jr., Schuetz EG, Boguski MS. (2001) The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and

- functional characterization of natural allelic variants. *Pharmacogenetics*, 11: 555-72.
103. Semsei ÁF. Transzportfehérjék genetikai polimorfizmusainak szerepe akut limfoid leukémiában; farmakogenetikai vizsgálatok [PhD]. Semmelweis Egyetem, 2011.
104. Erdélyi DJ. ABC-transzporter génpolimorfizmusok jelentősége gyermekkori akut limfoid leukémiában [PhD]. Semmelweis Egyetem, 2009.
105. Baldwin SA, Fellingham GW. (2012) Bayesian Methods for the Analysis of Small Sample Multilevel Data With a Complex Variance Structure. *Psychol Methods*.
106. Han B, Park M, Chen XW. (2010) A Markov blanket-based method for detecting causal SNPs in GWAS. *BMC Bioinformatics*, 11 Suppl 3: S5.
107. Bielack S, Kempf-Bielack B, Schwenger D, Birkfellner T, Delling G, Ewerbeck V, Exner GU, Fuchs N, Gobel U, Graf N, Heise U, Helmke K, von Hochstetter AR, Jurgens H, Maas R, Munchow N, Salzer-Kuntschik M, Treuner J, Veltmann U, Werner M, Winkelmann W, Zoubek A, Kotz R. (1999) [Neoadjuvant therapy for localized osteosarcoma of extremities. Results from the Cooperative osteosarcoma study group COSS of 925 patients]. *Klin Padiatr*, 211: 260-70.
108. Ferrari S, Palmerini E. (2007) Adjuvant and neoadjuvant combination chemotherapy for osteogenic sarcoma. *Curr Opin Oncol*, 19: 341-6.
109. Jaffe N. (2009) Osteosarcoma: review of the past, impact on the future. The American experience. *Cancer Treat Res*, 152: 239-62.
110. Pakos EE, Nearchou AD, Grimer RJ, Koumoullis HD, Abudu A, Bramer JA, Jeys LM, Franchi A, Scoccianti G, Campanacci D, Capanna R, Aparicio J, Tabone MD, Holzer G, Abdolvahab F, Funovics P, Dominkus M, Ilhan I, Berrak SG, Patino-Garcia A, Sierrasesumaga L, San-Julian M, Garraus M, Petrilli AS, Filho RJ, Macedo CR, Alves MT, Seiwerth S, Nagarajan R, Cripe TP, Ioannidis JP. (2009) Prognostic factors and outcomes for osteosarcoma: an international collaboration. *Eur J Cancer*, 45: 2367-75.
111. Picci P, Sangiorgi L, Bahamonde L, Aluigi P, Bibiloni J, Zavatta M, Mercuri M, Briccoli A, Campanacci M. (1997) Risk factors for local recurrences after limb-salvage surgery for high-grade osteosarcoma of the extremities. *Ann Oncol*, 8: 899-903.

112. Grimer RJ. (2005) Surgical options for children with osteosarcoma. *Lancet Oncol*, 6: 85-92.
113. Bacci G, Briccoli A, Ferrari S, Saeter G, Donati D, Longhi A, Manfrini M, Bertoni F, Rimondini S, Monti C, Forni C. (2000) Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with synchronous lung metastases: treatment with cisplatin, adriamycin and high dose of methotrexate and ifosfamide. *Oncol Rep*, 7: 339-46.
114. Bacci G, Longhi A, Versari M, Mercuri M, Briccoli A, Picci P. (2006) Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: 15-year experience in 789 patients treated at a single institution. *Cancer*, 106: 1154-61.
115. Rodriguez-Galindo C, Liu T, Krasin MJ, Wu J, Billups CA, Daw NC, Spunt SL, Rao BN, Santana VM, Navid F. (2007) Analysis of prognostic factors in ewing sarcoma family of tumors: review of St. Jude Children's Research Hospital studies. *Cancer*, 110: 375-84.
116. Lewis IJ, Nooij MA, Whelan J, Sydes MR, Grimer R, Hogendoorn PC, Memon MA, Weeden S, Uscinska BM, van Glabbeke M, Kirkpatrick A, Hauben EI, Craft AW, Taminiau AH. (2007) Improvement in histologic response but not survival in osteosarcoma patients treated with intensified chemotherapy: a randomized phase III trial of the European Osteosarcoma Intergroup. *J Natl Cancer Inst*, 99: 112-28.
117. Jaffe N, Carrasco H, Raymond K, Ayala A, Eftekhari F. (2002) Can cure in patients with osteosarcoma be achieved exclusively with chemotherapy and abrogation of surgery? *Cancer*, 95: 2202-10.
118. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Werner M, Winkelmann W, Zoubek A, Jurgens H, Winkler K. (2002) Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol*, 20: 776-90.
119. Harting MT, Lally KP, Andrassy RJ, Vaporciyan AA, Cox CS, Jr., Hayes-Jordan A, Blakely ML. (2010) Age as a prognostic factor for patients with osteosarcoma: an analysis of 438 patients. *J Cancer Res Clin Oncol*, 136: 561-70.

120. Szendroi M, Papai Z, Koos R, Illes T. (2000) Limb-saving surgery, survival, and prognostic factors for osteosarcoma: the Hungarian experience. *J Surg Oncol*, 73: 87-94.
121. Federman N, Bernthal N, Eilber FC, Tap WD. (2009) The multidisciplinary management of osteosarcoma. *Curr Treat Options Oncol*, 10: 82-93.
122. Hundsdoerfer P, Albrecht M, Ruhl U, Fengler R, Kulozik AE, Henze G. (2009) Long-term outcome after polychemotherapy and intensive local radiation therapy of high-grade osteosarcoma. *Eur J Cancer*, 45: 2447-51.
123. Comandone A, Passera R, Boglione A, Tagini V, Ferrari S, Cattel L. (2005) High dose methotrexate in adult patients with osteosarcoma: clinical and pharmacokinetic results. *Acta Oncol*, 44: 406-11.
124. Csordas K, Hegyi M, Eipel OT, Muller J, Erdelyi DJ, Kovacs GT. (2013) Comparison of pharmacokinetics and toxicity after high-dose methotrexate treatments in children with acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Drugs*, 24: 189-97.
125. Delepine N, Delepine G, Cornille H, Brion F, Arnaud P, Desbois JC. (1995) Dose escalation with pharmacokinetics monitoring in methotrexate chemotherapy of osteosarcoma. *Anticancer Res*, 15: 489-94.
126. Smeland S, Muller C, Alvegard TA, Wiklund T, Wiebe T, Bjork O, Stenwig AE, Willen H, Holmstrom T, Folleras G, Brosjo O, Kivioja A, Jonsson K, Monge O, Saeter G. (2003) Scandinavian Sarcoma Group Osteosarcoma Study SSG VIII: prognostic factors for outcome and the role of replacement salvage chemotherapy for poor histological responders. *Eur J Cancer*, 39: 488-94.
127. Zelcer S, Kellick M, Wexler LH, Shi W, Sankaran M, Lo S, Healey J, Huvos AG, Meyers PA, Gorlick R. (2005) Methotrexate levels and outcome in osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer*, 44: 638-42.
128. Bacci G, Loro L, Longhi A, Bertoni F, Bacchini P, Versari M, Picci P, Serra M. (2006) No correlation between methotrexate serum level and histologic response in the pre-operative treatment of extremity osteosarcoma. *Anticancer Drugs*, 17: 411-5.
129. Graf N, Winkler K, Betlemovic M, Fuchs N, Bode U. (1994) Methotrexate pharmacokinetics and prognosis in osteosarcoma. *J Clin Oncol*, 12: 1443-51.

130. Bacci G, Ferrari S, Delepine N, Bertoni F, Picci P, Mercuri M, Bacchini P, Brach del Prever A, Tienghi A, Comandone A, Campanacci M. (1998) Predictive factors of histologic response to primary chemotherapy in osteosarcoma of the extremity: study of 272 patients preoperatively treated with high-dose methotrexate, doxorubicin, and cisplatin. *J Clin Oncol*, 16: 658-63.
131. Aquerreta I, Aldaz A, Giraldez J, Sierrasesumaga L. (2004) Methotrexate pharmacokinetics and survival in osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer*, 42: 52-8.
132. Aarons L. (1991) Population pharmacokinetics: theory and practice. *Br J Clin Pharmacol*, 32: 669-70.
133. Dupuis C, Mercier C, Yang C, Monjanel-Mouterde S, Ciccolini J, Fanciullino R, Pourroy B, Deville JL, Duffaud F, Bagarry-Liegey D, Durand A, Iliadis A, Favre R. (2008) High-dose methotrexate in adults with osteosarcoma: a population pharmacokinetics study and validation of a new limited sampling strategy. *Anticancer Drugs*, 19: 267-73.
134. Bagarry-Liegey D, Nicoara A, Duffaud F, Guillet P, Pignon T, Catalin J, Durand A, Favre R. (1996) [Individual dose adjustment of high-dose methotrexate in clinical practice]. *Rev Med Interne*, 17: 689-98.
135. Rousseau A, Marquet P. (2002) Application of pharmacokinetic modelling to the routine therapeutic drug monitoring of anticancer drugs. *Fundam Clin Pharmacol*, 16: 253-62.
136. Dervieux T, Kremer J, Lein DO, Capps R, Barham R, Meyer G, Smith K, Caldwell J, Furst DE. (2004) Contribution of common polymorphisms in reduced folate carrier and gamma-glutamylhydrolase to methotrexate polyglutamate levels in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics*, 14: 733-9.
137. Cole PD, Kamen BA, Gorlick R, Banerjee D, Smith AK, Magill E, Bertino JR. (2001) Effects of overexpression of gamma-Glutamyl hydrolase on methotrexate metabolism and resistance. *Cancer Res*, 61: 4599-604.
138. Schneider E, Ryan TJ. (2006) Gamma-glutamyl hydrolase and drug resistance. *Clin Chim Acta*, 374: 25-32.
139. Longo-Sorbello GS, Bertino JR. (2001) Current understanding of methotrexate pharmacology and efficacy in acute leukemias. Use of newer antifolates in clinical trials. *Haematologica*, 86: 121-7.

140. Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS, Nicolas JP. (2000) A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab*, 70: 310-5.
141. Gregers J, Christensen IJ, Dalhoff K, Lausen B, Schroeder H, Rosthøj S, Carlsen N, Schmiegelow K, Peterson C. (2010) The association of reduced folate carrier 80G>A polymorphism to outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia interacts with chromosome 21 copy number. *Blood*, 115: 4671-7.
142. Campalani E, Arenas M, Marinaki AM, Lewis CM, Barker JN, Smith CH. (2007) Polymorphisms in folate, pyrimidine, and purine metabolism are associated with efficacy and toxicity of methotrexate in psoriasis. *J Invest Dermatol*, 127: 1860-7.
143. Kishi S, Cheng C, French D, Pei D, Das S, Cook EH, Hijiya N, Rizzari C, Rosner GL, Frudakis T, Pui CH, Evans WE, Relling MV. (2007) Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood*, 109: 4151-7.
144. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, Altman RB. (2011) Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics*, 21: 152-61.
145. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, Johné A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 3473-8.
146. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. (2007) A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*, 315: 525-8.
147. Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm MF, Kaskas B, Metzler J, Stange E, Herfarth H, Schoelmerich J, Gregor M, Walker S, Cascorbi I, Roots I, Brinkmann U, Zanger UM, Eichelbaum M. (2003) Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 124: 26-33.

148. Kooloos WM, Wessels JA, van der Straaten T, Allaart CF, Huizinga TW, Guchelaar HJ. (2010) Functional polymorphisms and methotrexate treatment outcome in recent-onset rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*, 11: 163-75.
149. Fung KL, Gottesman MM. (2009) A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta*, 1794: 860-71.
150. Schaich M, Kestel L, Pfirrmann M, Robel K, Illmer T, Kramer M, Dill C, Ehninger G, Schackert G, Krex D. (2009) A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients. *Ann Oncol*, 20: 175-81.
151. Estrela Rde C, Ribeiro FS, Barroso PF, Tuyama M, Gregorio SP, Dias-Neto E, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. (2009) ABCB1 polymorphisms and the concentrations of lopinavir and ritonavir in blood, semen and saliva of HIV-infected men under antiretroviral therapy. *Pharmacogenomics*, 10: 311-8.
152. Kimchi-Sarfaty C, Gribar JJ, Gottesman MM. (2002) Functional characterization of coding polymorphisms in the human MDR1 gene using a vaccinia virus expression system. *Mol Pharmacol*, 62: 1-6.
153. Jordan de Luna C, Herrero Cervera MJ, Sanchez Lazaro I, Almenar Bonet L, Poveda Andres JL, Alino Pellicer SF. (2011) Pharmacogenetic study of ABCB1 and CYP3A5 genes during the first year following heart transplantation regarding tacrolimus or cyclosporine levels. *Transplant Proc*, 43: 2241-3.
154. Sainz J, Rudolph A, Hein R, Hoffmeister M, Buch S, von Schonfels W, Hampe J, Schafmayer C, Volzke H, Frank B, Brenner H, Forsti A, Hemminki K, Chang-Claude J. (2011) Association of genetic polymorphisms in ESR2, HSD17B1, ABCB1, and SHBG genes with colorectal cancer risk. *Endocr Relat Cancer*, 18: 265-76.
155. Gow JM, Hodges LM, Chinn LW, Kroetz DL. (2008) Substrate-dependent effects of human ABCB1 coding polymorphisms. *J Pharmacol Exp Ther*, 325: 435-42.
156. Gradhand U, Kim RB. (2008) Pharmacogenomics of MRP transporters (ABCC1-5) and BCRP (ABCG2). *Drug Metab Rev*, 40: 317-54.
157. Letourneau IJ, Deeley RG, Cole SP. (2005) Functional characterization of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the gene encoding human

- multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pharmacogenet Genomics*, 15: 647-57.
158. Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, Schluter G, Schmidt A, Rosenberger A, Vonhof S, Bickeboller H, Toliat MR, Suk EK, Tzvetkov M, Kruger A, Seifert S, Kloess M, Hahn H, Loeffler M, Nurnberg P, Pfreundschuh M, Trumper L, Brockmoller J, Hasenfuss G. (2005) NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation*, 112: 3754-62.
159. Warren RB, Smith RL, Campalani E, Eyre S, Smith CH, Barker JN, Worthington J, Griffiths CE. (2008) Genetic variation in efflux transporters influences outcome to methotrexate therapy in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol*, 128: 1925-9.
160. Simon N, Marsot A, Villard E, Choquet S, Khe HX, Zahr N, Lechat P, Leblond V, Hulot JS. (2012) Impact of ABCC2 polymorphisms on high-dose methotrexate pharmacokinetics in patients with lymphoid malignancy. *Pharmacogenomics J*.
161. Hilger E, Reinthaler EM, Stogmann E, Hotzy C, Patariaia E, Baumgartner C, Zimprich A, Zimprich F. (2012) Lack of association between ABCC2 gene variants and treatment response in epilepsy. *Pharmacogenomics*, 13: 185-90.
162. Puranik YG, Birnbaum AK, Marino SE, Ahmed G, Cloyd JC, Remmel RP, Leppik IE, Lamba JK. (2013) Association of carbamazepine major metabolism and transport pathway gene polymorphisms and pharmacokinetics in patients with epilepsy. *Pharmacogenomics*, 14: 35-45.
163. Cecchin E, D'Andrea M, Lonardi S, Zanusso C, Pella N, Errante D, De Mattia E, Polesel J, Innocenti F, Toffoli G. (2012) A prospective validation pharmacogenomic study in the adjuvant setting of colorectal cancer patients treated with the 5-fluorouracil/leucovorin/oxaliplatin (FOLFOX4) regimen. *Pharmacogenomics J*.
164. Ranganathan P, Culverhouse R, Marsh S, Mody A, Scott-Horton TJ, Brasington R, Joseph A, Reddy V, Eisen S, McLeod HL. (2008) Methotrexate (MTX) pathway gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 35: 572-9.
165. Lang T, Hitzl M, Burk O, Mornhinweg E, Keil A, Kerb R, Klein K, Zanger UM, Eichelbaum M, Fromm MF. (2004) Genetic polymorphisms in the multidrug

- resistance-associated protein 3 (ABCC3, MRP3) gene and relationship to its mRNA and protein expression in human liver. *Pharmacogenetics*, 14: 155-64.
166. de Rotte MC, Bulatovic M, Heijstek MW, Jansen G, Heil SG, van Schaik RH, Wulfraat NM, de Jonge R. (2012) ABCB1 and ABCC3 gene polymorphisms are associated with first-year response to methotrexate in juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol*, 39: 2032-40.
167. Hopper-Borge E, Chen ZS, Shchaveleva I, Belinsky MG, Kruh GD. (2004) Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. *Cancer Res*, 64: 4927-30.
168. Hopper-Borge E, Xu X, Shen T, Shi Z, Chen ZS, Kruh GD. (2009) Human multidrug resistance protein 7 (ABCC10) is a resistance factor for nucleoside analogues and epothilone B. *Cancer Res*, 69: 178-84.
169. Naramoto H, Uematsu T, Uchihashi T, Doto R, Matsuura T, Usui Y, Uematsu S, Li X, Takahashi M, Yamaoka M, Furusawa K. (2007) Multidrug resistance-associated protein 7 expression is involved in cross-resistance to docetaxel in salivary gland adenocarcinoma cell lines. *Int J Oncol*, 30: 393-401.
170. Chen ZS, Tiwari AK. (2011) Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases. *FEBS J*, 278: 3226-45.
171. Imai Y, Nakane M, Kage K, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Miki Y, Sugimoto Y. (2002) C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Mol Cancer Ther*, 1: 611-6.
172. Mizuarai S, Aozasa N, Kotani H. (2004) Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. *Int J Cancer*, 109: 238-46.
173. Stamp LK, Chapman PT, O'Donnell JL, Zhang M, James J, Frampton C, Barclay ML, Kennedy MA, Roberts RL. (2010) Polymorphisms within the folate pathway predict folate concentrations but are not associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Pharmacogenet Genomics*, 20: 367-76.
174. Lamba J, Lamba V, Strom S, Venkataramanan R, Schuetz E. (2008) Novel single nucleotide polymorphisms in the promoter and intron 1 of human pregnane X

- receptor/NR1I2 and their association with CYP3A4 expression. *Drug Metab Dispos*, 36: 169-81.
175. Fanta S, Jonsson S, Karlsson MO, Niemi M, Holmberg C, Hoppu K, Backman JT. (2010) Long-term changes in cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation in children: evidence for saturable presystemic metabolism and effect of NR1I2 polymorphism. *J Clin Pharmacol*, 50: 581-97.
176. Sookoian S, Castano GO, Burgueno AL, Gianotti TF, Rosselli MS, Pirola CJ. (2010) The nuclear receptor PXR gene variants are associated with liver injury in nonalcoholic fatty liver disease. *Pharmacogenet Genomics*, 20: 1-8.
177. Andersen V, Christensen J, Overvad K, Tjønneland A, Vogel U. (2010) Polymorphisms in NFκB, PXR, LXR and risk of colorectal cancer in a prospective study of Danes. *BMC Cancer*, 10: 484.
178. Andersen V, Christensen J, Ernst A, Jacobsen BA, Tjønneland A, Krarup HB, Vogel U. (2011) Polymorphisms in NF-kappaB, PXR, LXR, PPARgamma and risk of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 17: 197-206.
179. Karlsen TH, Lie BA, Frey Frosli K, Thorsby E, Broome U, Schrumpf E, Boberg KM. (2006) Polymorphisms in the steroid and xenobiotic receptor gene influence survival in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*, 131: 781-7.
180. Davies SM. (2006) Pharmacogenetics, pharmacogenomics and personalized medicine: are we there yet? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 111-7.

12 Saját publikációk jegyzéke

12.1 *Értekezésben összefoglalt közlemények*

Hegy M, Gulácsi A, Cságoly E, Csordás K, Eipel OT, Erdélyi DJ, Müller J, Nemes K, Lautner-Csorba O, Kovács GT. (2012) Clinical relations of methotrexate pharmacokinetics in the treatment for pediatric osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 138: 1697-1702.

Hegy M, Félné Semsei A, Jakab Z, Antal I, Kiss J, Szendrői M, Csóka M, Kovács G. (2012) [Results of the treatment of pediatric osteosarcoma in the Hungarian population]. *Az osteosarcoma kezelésének eredményei gyermekkorban - hazai adatok. Magy Onkol*, 56: 30-37.

Hegy M, Semsei AF, Jakab Z, Antal I, Kiss J, Szendroi M, Csoka M, Kovacs G. (2011) Good prognosis of localized osteosarcoma in young patients treated with limb-salvage surgery and chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer*, 57: 415-422.

Csordas K, Hegyi M, Eipel OT, Muller J, Erdelyi DJ, Kovacs GT. (2013) Comparison of pharmacokinetics and toxicity after high-dose methotrexate treatments in children with acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Drugs*, 24: 189-97.

Csordas K, Eipel O, Hegyi M, Csoka M, Pap E, Kovacs G. (2011) Pharmacokinetic analysis of high-dose methotrexate treatments in children with hematologic malignancies. *Orv Hetil*, 152: 1609-1617.

Majoros Xenia, Székelyhidi Zita, Csóka Monika, Erdélyi Dániel, Hegyi Márta, Cságoly Edit, Kovács Gábor. (2008) Citosztatikus kezelések korai és késői nefrotoxicitása. *Gyermekgyógyászat*, 59: 214-218.

12.2 Egyéb témában megjelent közlemények

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

Lautner-Csorba O, Gézsi A, Semsei Á, Antal P, Edélyi DJ, Schermann G, Kutszegi N, Csordás K, Hegyi M, Kovács G, Falus A, Szalai C. (2012) Candidate gene association study in pediatric acute lymphoblastic leukemia evaluated by Bayesian network based Bayesian multilevel analysis of relevance. *BMC Med Genomics*, 5: 42.

Semsei AF, Erdelyi DJ, Ungvari I, Csagoly E, Hegyi M, Kiszél PS, Lautner-Csorba O, Szabolcs J, Masat P, Fekete G, Falus A, Szalai C, Kovacs GT. (2012) ABCC1 polymorphisms in anthracycline induced cardiotoxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell Biol Int*, 36: 79-86.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Szabó Andrásnak, a II. sz. Gyermekklinika jelenlegi vezetőjének, illetve Prof. Dr. Fekete Györgynek, aki doktori munkám kezdetén a Klinika vezetője volt, hogy lehetőséget adtak arra, hogy az intézetben dolgozhassak.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Kovács Gábornak, hogy elindított a doktori képzés útján. Köszönöm neki a bizalmat és a bátorítást, amivel mindig támogatott. Köszönöm a munkám közben nyújtott szakmai segítségét.

Köszönöm Prof. Dr. Falus Andrásnak és Dr. Szalai Csabának, akik lehetőséget adtak arra, hogy a Genetikai-, Sejt- és Immunbiológiai intézetben végezzem a farmakogenetikai vizsgálatokhoz szükséges méréseket.

Köszönöm Dr. Erdélyi Dánielnek, hogy ezt a munkát annak idején Dr. Szalai Csaba PhD hallgatójaként elkezdte és már TDK hallgatóként a munkacsoport tagja lehettem. Köszönöm, hogy klinikai, adatfeldolgozási és statisztikai kérdésekben elmélyített tudása mindig biztos háttérrel jelentett kutató munkám során és segítőkészségének nem szabott határ sem az időbeli korlátozottság sem a földrajzi távolság.

Köszönöm Féléné Dr. Semsei Áginak, hogy PhD munkám kezdetén megtanította a DNS minták kezelését és többféle genotipizálási módszert is. Köszönöm, hogy doktori munkám évei alatt mindvégig számíthattam rá. Nyugodtságával, szerénységével és szorgalmával példát mutatott számomra, biztató szavaival sokszor adott erőt a munka folytatásához.

Köszönöm Dr. Cságoly Editnek a klinikai adatgyűjtésben nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Csordás Katalinnak és Dr. Eipel Olivérnek, hogy hasonló kutatómunkát végző kollégákként sok kérdésemet megbeszélhettem velük, és hogy így hárman egy csapatná kovácsolódtunk.

Köszönöm Dr. Antal Péternek és Arany Ádámnak a statisztikai analízisben nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Csóka Mónikának, Dr. Müller Juditnak, Dr. Jakab Zsuzsának, Dr. Nemes Karolinának, Lautner-Csorba Orsolyának, Dr. Molnár Viktornak, Dr. Schermann Gézának, Dr. Bolgár Bencének, Dr. Gulácsi Áginak, Dr. Szabó Lénának, Dr. Botlik Dórának, Dr. Liptovszky Jankának, a II. sz. Gyermekklinika haematológia osztály nővéreinek sokféle, akár baráti, akár szakmai segítségét.

Köszönöm Pilissy Tamásnak a sok bátorítást és hogy informatikai tudásával segítséget nyújtott az értekezés szerkesztésében.

Mindenekelőtt pedig hálás vagyok a szüleimnek, testvéreimnek, sógornőimnek és sógoromnak, akik mindannyian hozzájárultak ahhoz, hogy kellő időt és energiát fordíthassak a doktori munkámra. Szavakba nem önthető az a feltétel nélküli szeretet, segíteni akarás és biztató légkör, amivel engem és kislányomat körbe vettek. Mindvégig mellettem álltak, bátorítottak és elviselték a munkám miatti nehézségeket. Nélkülük ez a munka nem készülhetett volna el.