

Nagy dózisú metotrexát kezelések farmakokinetikai és farmakogenetikai vizsgálata gyermekkori akut limfoid leukémiában

Doktori értekezés

Dr. Csordás Katalin

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kovács Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Nagy Zsolt, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Kajtár Béla, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Demeter Judit, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Masszi Tamás, Ph.D., egyetemi tanár
Dr. Gyurasics Ágnes, Ph.D., főosztályvezető

Budapest
2014

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés	8
3. Irodalmi áttekintés	10
3.1 Akut limfoblasztos leukémia	10
3.1.1 Az ALL diagnózisa és kezelése	11
3.2 Metotrexát	15
3.2.1 Klinikai alkalmazás	16
3.2.2 Hatásmechanizmus	16
3.2.3 Farmakokinetika	21
3.2.4 Mellékhatások	23
3.2.5 A toxicitás kivédése - rescue lehetőségek	26
3.2.6 Farmakogenetika	28
3.3 Farmakokinetikai és farmakogenetikai vizsgálatok jelentősége	36
4. Célkitűzés	39
5. Módszerek	40
5.1 Betegek, MTX kezelések	40
5.2 Farmakokinetikai paraméterek, toxicitás	43
5.3 Vizsgált polimorfizmusok kiválasztása, genotipizálás	45
5.4 Statisztikai analízis	48
6. Eredmények	54
6.1 Farmakokinetika	54
6.1.1 Szérum MTX, 7-OH-MTX koncentráció	54
6.1.2 Liquor MTX koncentráció	57
6.1.3 Toxicitás	58
6.1.4 Farmakokinetika és toxicitás a különböző korcsoportokban (<6 év és >14 év) és nemek szerint	61
6.2 Farmakogenetika	62
6.2.1 MTX és 7-OH-MTX szintek	63
6.2.2 Toxicitás	67

7. Megbeszélés	72
7.1 Farmakokinetika	72
7.2 Farmakogenetika.....	79
8. Következtetések.....	84
9. Összefoglalás	86
10. Summary.....	87
12. Irodalomjegyzék	88
13. Saját publikációk jegyzéke	101
13.1. Az értekezésben összefoglalt közlemények.....	101
13.2. Egyéb témában megjelent közlemények.....	102
14. Köszönetnyilvánítás	103

1. Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Elnevezés
10-CHO-THF	10-formil-tetrahydrofolát
5,10-CH₂=THF	5,10-metilén-tetrahydrofolát
5-CH₃-THF	5-metil-tetrahydrofolát
5-CHO-THF	5-formil-tetrahydrofolát
6-MP	6-merkaptopurin
7-OH-MTX	7-hidroxi-metotrexát
ABC	ATP-kötő domén (ATP-binding cassette)
ABCB1	ATP-kötő doménnel rendelkező B membránfehérje alcsalád 1-es tagja
ABCC1-4	ATP-kötő doménnel rendelkező C membránfehérje alcsalád 1-4-es tagja
ABCG2	ATP-kötő doménnel rendelkező G membránfehérje alcsalád 2-es tagja
ADA	adenozin deamináz
ADP	adenozin-difoszfát
ALL	akut limfoid leukémia
ALP	alkalikus foszfatáz
AMP	adenozin-monofoszfát
ARID5B	adeninben és timinben gazdag interaktív domén 5B (AT rich interactive domain 5B)
ATIC	5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid formiltranszferáz
ATP	adenozin-trifoszfát
AUC	koncentráció-idő görbe alatti terület (area under the concentration-time curve)
B-ALL	B-sejtes akut limfoid leukémia
BCR/ABL1	fúziós fehérje, Philadelphia kromoszóma

Rövidítés	Elnevezés
BCRP	emlőrák drogrezisztencia fehérje (breast cancer resistance protein)
BFM	Berlin - Frankfurt - Münster
CART	klasszifikációs és regressziós fa (classification and regression tree)
CBS	cisztation-béta szintáz
CI	konfidencia intervallum
CPDG2	karboxipeptidáz-G2, glukarpidáz
CRFL2	citokinreceptor-szerű faktor 2
CSF	liquor (cerebrospinal fluid)
DAMPA	2,4-diamino-10-metilpteróilsav
DHF	dihydrofolát
DHFR	dihydrofolát reduktáz
dNTP	dezoxinukleotid-trifoszfát
dTMP	dezoitimidin-monofoszfát
dUMP	dezoituridin-monofoszfát
E2A-PBX1	fúziós fehérje: transzkripció faktor 3–pre B-sejtes leukémia homebox fehérje 1
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EFS	eseménymentes túlélés (event free survival)
EIA	enzim immunoassay
ERG	eritroblaszt transzformáció-specifikus (ETS) transzkripció faktor családba tartozó regulátor fehérje
ETV6-RUNX1	fúziós fehérje: ets variáns gén 6, TEL onkogén-AML1 onkogén
FBP	folát kötő fehérje (folate binding protein)
FOLR1	folát receptor 1
FPGS	folilpoliglutamát szintáz
GART	foszforibozil-glicinamid formiltranszferáz
GFR	glomeruláris filtrációs ráta

Rövidítés	Elnevezés
GGH	gamma-glutamil hidroláz
GGT	gamma-glutamil transzferáz
GLMM	általános lineáris kevert modell (general linear mixed model)
GOT	glutamin-oxálecetsav transzamináz, aszpartát aminotranszferáz
GPT	glutamát-piruvát transzamináz, alanin aminotranszferáz
GWAS	teljes genom asszociációs vizsgálat (genome wide association study)
GzLMM	általánosított lineáris kevert modell (generalized linear mixed model)
HD-	nagy dózisu (high-dose)
HOX11	T-sejtes leukémia homebox fehérje 1
HOX11L2	T-sejtes leukémia homebox fehérje 3
HPLC	nagy nyomású folyadékkromatográfia (high-pressure liquid chromatography)
HR	magas rizikójú (high risk)
iAMP	21-es kromoszóma intrakromoszómális amplifikációja
IMP	inozitol-monofoszfát
IR	közepes rizikójú (intermediate risk)
JAK1	Janus kináz 1
JAK3	Janus kináz 3
KIR	központi idegrendszer
LYL1	limfoblasztos leukémia transzkripciós faktor 1
MDR	multidrog rezisztencia
MLL	vegyes eredetű leukémia (mixed lineage leukemia)
MLL-AF4	fúziós fehérje: vegyes eredetű leukémia – AF4/FMR2 család 1-es tagja
MLL-ENL	fúziós fehérje: vegyes eredetű leukémia –tizenegy tizenkilenc leukémia fehérje

Rövidítés	Elnevezés
MRD	minimális reziduális betegség (minimal residual disease)
MRP1-2	multidrog rezisztencia protein 1-2
MTHFD1	metilén-tetrahidrofolát dehidrogenáz 1
MTHFR	metilén-tetrahidrofolát reduktáz
MTHFS	5,10-metilén-tetrahidrofolát szintetáz
MTR	5-metil-tetrahidrofolát-homocisztein metiltranszferáz
MTRR	5-metil-tetrahidrofolát-homocisztein metiltranszferáz reduktáz
MTX	metotrexát
MTX2	2 g/m ² /24 óra MTX-ot kapott csoport
MTX5	5 g/m ² /24 óra MTX-ot kapott csoport
MTXPG	metotrexát poliglutamát
MYC	transzkripció faktor P64 (myelocytomatosis viral oncogene homolog)
NHL	non-Hodgkin limfóma
OR	esélyhányados (odds ratio)
OS	össztúlélés (overall survival)
PCR	polimeráz lánreakció (polymerase chain reaction)
P-glikoprotein	permeabilitás glikoprotein
PPAT	foszforibozil pirofoszfát amidotranszferáz
RF	véletlen erdő (random forest)
SAH	S-adenozil-homocisztein
SAM	S-adenozil-metionin
SBE	egy bázispárnyi extenzió (single base extension)
SHMT1	szerin hidroximetil-transzferáz 1
SLC19A1 (RFC1)	szolubilis karrier család 19, 1-es tagja
SLC22A6	szolubilis karrier család 22 (organikus aniontranszporter) 6-os tagja
SLC22A8	szolubilis karrier család 22 (organikus aniontranszporter) 8-as tagja

Rövidítés	Elnevezés
SLC46A1	szolubilis karrier család 46 (folát transzporter) 1-es tagja
SLCO1A2	szolubilis karrier organikus aniontranszporter család 1A2 tagja
SLCO1B1	szolubilis karrier organikus aniontranszporter család 1B1 tagja
SLCO1B3	szolubilis karrier organikus aniontranszporter család 1B3 tagja
SNP	egy nukleotidot érintő polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)
SR	standard rizikójú (standard risk)
TAL1	T-sejtes akut limfoid leukémia fehérje 1
T-ALL	T-sejtes akut limfoid leukémia
TDM	terápiás gyógyszerszint monitorozás (therapeutic drug monitoring)
THF	tetrahydrofolát
TPMT	tiopurin-S-metiltranszferáz
TYMS	timidilát szintetáz
vs.	versus
WBC	fehérvérsejtszám

2. Bevezetés

A gyermekkorban kialakuló daganatok az összes daganatos betegség előfordulásának mindössze 2%-át jelentik (Tompa 2011). Kiemelt jelentőségüket mégis az adja, hogy a fejlett országokban a balesetek mögött a második leggyakoribb halálokot képezik. Az elmúlt évtizedekben az egyre speciálisabb diagnosztikai eljárásoknak és a több támadáspontú kezelési stratégiák bevezetésének, illetve folyamatos fejlesztésének köszönhetően, jelentősen megemelkedett a gyógyulás esélye. Ennek ellenére a gyermekkori daganatos betegségek és kezelésük továbbra is kihívást jelent a betegek, a betegek családja, az őket gondozó hematológiai – onkológiai centrumok, valamint állami népegészségügyi szempontból is.

A gyermekkori akut limfoid leukémia (ALL) képezi a gyermekkori daganatok közel egyharmadát (Lo Nigro 2013). A jelenleg alkalmazott terápiás protokollokkal kezelt gyermekek 5 éves eseménymentes túlélése (EFS) 76-86% között változik a fejlett országokban (Pui és mtsai 2011). A kezelési stratégiák fejlődésével egyre inkább csökken az olyan korábbi, hagyományos prognosztikai faktorok hatása, mint például a férfi nem, vagy a fekete rassz. A jelenlegi ALL-t célzó kutatások ezért nem csak a terápia rezisztens al csoportok túlélésének javítására összpontosítanak, hanem nagy hangsúlyt kap a betegek életminőségének javítása is.

Az ALL terápiája során alkalmazott kemoterápiás szerek számos veszéllyel, mellékhatással járhatnak. A hagyományos klinikai gyakorlatban alkalmazott testtömegre, testfelületre vonatkoztatott dózisdagolás gyakran még egyéni, például szervkárosodás esetén alkalmazott korrekció után sem bizonyul megfelelőnek. A betegek egy részében hatástalan lesz az alkalmazott szer, másoknál súlyos mellékhatások alakulhatnak ki. A kemoterápiás szerek esetén ezért nagy hangsúlyt kap a terápiás gyógyszer szint monitorozás, melyhez azonban elengedhetetlen a kemoterápiás szerek farmakokinetikai paramétereinek ismerete.

A hatvanas évek elején felismerték, hogy a gyógyszerekre adott reakciót örökletes tényezők is befolyásolják, ekkor született meg a farmakogenetika fogalma (Falus és Erdélyi 2007). Az ezt követő évtizedekben az informatika és a biotechnológia rohamos fejlődése lehetővé tette a humán genom és annak variációinak feltérképezését.

Az így elérhetővé vált óriási ismerethalmaz hatalmas lendületet adott a farmakogenetikai kutatásoknak.

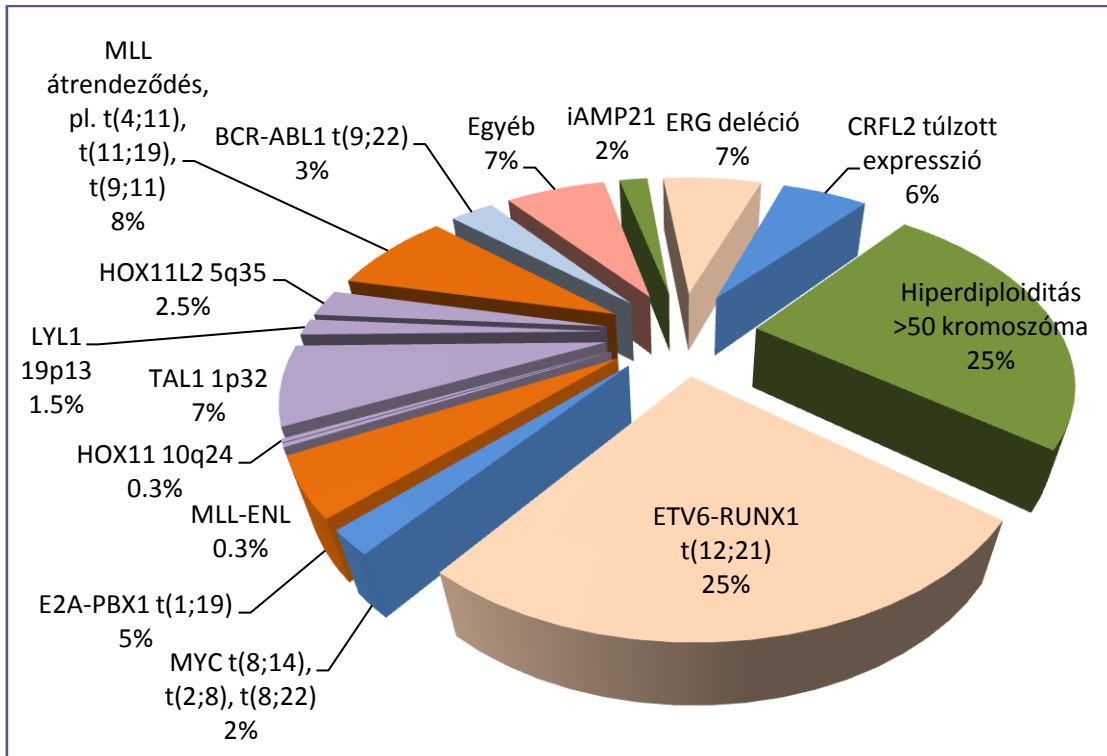
A farmakogenomika a gyógyszerekkel kapcsolatos vizsgálatokat a szervezet genetikai egyedisége alapján közelíti meg, egyidejűleg sok, akár több ezer gén és géntermék szimultán vizsgálatával. Ezzel a prediktív és a személyre szabott orvoslás egyik legfontosabb alapja.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 Akut limfoblasztos leukémia

A leukémia („fehérvérűség”) a vérképzőrendszer klonális betegsége. Az akut leukémiában látható atípusos blasztsejtek egyetlen transzformált elődejtől származnak. A leukémia-utódsejtek érettségi szintje, az ennek megfelelően kifejeződő sejtfelszíni és intracelluláris markerek, molekuláris genetikai jellegzetességek a normális vérképzőrendszer valamely sejtvonalaának egy-egy jellegzetes differenciáltsági stádiumát reprezentálják. A leukémiasejtek morfológiája ugyanakkor eltér a normális csontvelői sejtektől, aberráns jellegű a molekuláris és sejtbiológiai markerek kifejeződése is. A leukémiás sejtpopuláció többségén azonos mintázatban kimutatható markerek citológiai, citokémiai, immunológiai, citogenetikai és molekuláris biológiai vizsgálata lehetőséget nyújt a betegség kórismézésére, pontos besorolására, prognózisának becslésére és a kezelés hatékonyságának megítélésére (Kiss 2006).

A standard genetikai vizsgálatokkal az ALL esetek 75%-ában lehet azonosítani az elsődleges genetikai eltérést (1. ábra). A nagy felbontású, teljes genomot érintő vizsgálatokkal (génexpressziós, DNS kópiaszám változások, heterozigótaság elvesztése, epigenetikus változások) és a teljes genom szekvenálással virtuálisan az összes ALL-es beteget osztályozhatjuk az alapján, hogy milyen specifikus genetikai hibát hordoz (Pui és mtsai 2011). Egy adott genetikai eltérés meghatározhatja a betegség terápiára adott válaszkészségét, relapszusra való hajlamát.



1. ábra. Genetikai eltérések megoszlása ALL-ben. Az ábrát a szerző Pui és mtsai (2011) munkája alapján készítette. *BCR-ABL1*: Philadelphia kromoszóma, fúziós fehérje, *CRFL2*: citokinreceptor-szerű faktor 2, *ERG*: hematopoézisben szerepet játszó transzkripciós faktor, *ETV6-RUNX1*: korábban *TEL-AML1*, transzkripciós faktor, *E2A-PBX1*: fúziós fehérje, *iAMP21*: 21-es kromoszóma intrakromozómális amplifikációja, *MLL*: génexpressziót és hematopoesist szabályozó transzkripciós koaktivátor, *MLL-ENL*: fúziós fehérje, onkogén, *MYC*: transzkripciós faktor, onkogén. A lilával jelölt genetikai eltérések kizárólag T-sejtes ALL-ben fordulnak elő. *HOX11*: T-sejtes leukémia homebox fehérje 1, *HOX11L2*: T-sejtes leukémia homebox fehérje 3, *LYL1*: limfoblasztos leukémia transzkripciós faktor 1, *TAL1*: T-sejtes ALL fehérje 1

3.1.1 Az ALL diagnózisa és kezelése

A fejlett országokban a leukémia incidenciája 3-4/100 000. Hazánkban évente 50-90 új esetet regisztrálunk. A gyermekkori leukémia körülbelül 85%-a ALL, amely 2

és 5 éves kor között halmozódik. Gyakrabban jelentkezik fiúkban, mint lányokban (Kiss 2006).

Az ALL diagnózisa a perifériás vérkép, vérkenet és a csontvelő vizsgálatával történik, melyet az esetleges meningeális érintettség lehetősége miatt, kiegészítünk a liquor vizsgálatával is.

Az ALL terápiája rizikócsoporthoz szerinti kemoterápiás protokollon alapul. A rizikócsoporthoz történő besorolásnál a hagyományos morfológia szerepe csökkent, de ma sem nélkülözhető. A korszerű immunológiai és genetikai vizsgálatok elterjedésével azonban a betegség alcsoportjai jobban elkülöníthetők, és ennek nagy szerepe van a kezelés megválasztásának szempontjából.

Hazánkban a gyermekkori ALL osztályozása és kezelése nemzetközi BFM (az alapító Berlin, Frankfurt, Münster városok nevéből) protokoll alapján történik. Az 1995 és 2011 között hazánkban alkalmazott ALL-BFM 95 (Moricke és mtsai 2008) és ALL IC-BFM 2002 (ALL IC-BFM Trial Steering Committee 2002) protokoll a betegség osztályozása során a beteg életkora, a kezdeti fehérvérsejtszáma, korai terápiás válasza, genetikai markerek – t(9;22), t(4;11), BCR/ABL, MLL/AF4 – alapján három rizikócsoporthoz különböztet meg: standard rizikó (SR), közepes rizikó (IR), magas rizikó (HR) csoportokat (1. táblázat). Jelenleg az ALL IC-BFM 2009 protokoll használatos, amely a prognosztikai faktorok között a hipodiploiditást (≤ 45 kromoszóma) és az indukciós kezelést követő minimális reziduális betegség (MRD) meglétét/hiányát is figyelembe veszi (ALL IC-BFM Trial Steering Committee 2009).

1. táblázat. Rizikócsoporthoz besorolás az ALL IC-BFM 2002 protokoll alapján

Standard rizikó (SR)	Közepes rizikó (IR)	Magas rizikó (HR)
jó szteroid válasz és életkor: $1 \leq < 6$ év és kezdeti WBC < 20 G/l és csontvelői remisszió a 15. és 33. napon	jó szteroid válasz és életkor: < 1 vagy ≥ 6 év és/vagy WBC ≥ 20 G/l és csontvelői remisszió a 15. és 33. napon	rossz szteroid válasz vagy kedvezőtlen citogenetika vagy nincs csontvelői remisszió a 15. vagy 33. napon

Az ALL terápiája indukciós, konszolidációs és fenntartó kezelést foglal magában, melyet központi idegrendszeri (KIR) profilaxis egészít ki (ALL IC-BFM Trial Steering Committee 2002). Az indukciós kezelés célja a remisszió létrehozása és annak fenntartása, a tumortömeg agresszív kezelésével eltüntetni a klinikailag észlelhető sejttömeget. A kezelés az első héten emelkedő dózisú prednizonon monoterápiával kezdődik, majd a következő négy hétben ez az alábbi citosztatikumokkal egészül ki: vinkrisztin, daunorubicin, L-aszparagináz, ciklofoszfamid, citozin-arabinozid és 6-merkaptopurin (6-MP). Az indukciós kezeléssel párhuzamosan történik a KIR profilaxis, amely metotrexát (MTX) intratekális adását jelenti. Két hét terápiás szünet után a konszolidációs kezelés következik, melynek során az indukciós fázist túlélő 10^8 - 10^9 leukémiás sejtszám további csökkentése a cél. Ennek során 2 hetente, 4 alkalommal nagy dózisú szisztémás metotrexátot (HD-MTX) (2 g/m^2 illetve 5 g/m^2) kapnak a gyermekek 24 órás, folyamatos infúzióban (2. táblázat, protokoll mM). A toxikus hatások kivédése céljából a kezelést kalcium-folináttal egészítjük ki. Egyúttal folytatódik a 6-MP kezelés is. A rosszabb prognosztikai csoportokba sorolt betegek ezen kívül egy reindukciós kezelésben és koponya besugárzásban is részesülnek; illetve megfelelő indikációk esetén, a beteg allogén őssejt-transzplantáció jelöltje lesz. Az intenzív terápiát még egy 2 évig tartó fenntartó kezelés (per os MTX és 6-MP) követi, amely a még megmaradt leukémiás sejtek elpusztítására törekszik azzal a céllal, hogy a szövetek repopulálása ne történjen meg.

A magas rizikójú (HR) betegek a konszolidációs kezelés részét képező HD-MTX-ot kombinált kemoterápiás blokkok részeként kapják (a protokoll HR-1 és HR-2 blokkja során, 2. táblázat), amelyekben sor kerül dexametazon, vinkrisztin/vindezin, citarabin/daunorubicin, ciklofoszfamid/ifoszfamid, L-aszparagináz adására is. A KIR profilaxist ebben az esetben hármas kombináció biztosítja: intratekálisan adott MTX, citozin-arabinozid és prednizon triplet.

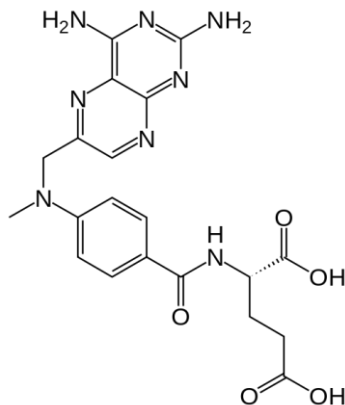
2. táblázat. Az ALL IC-BFM 2002 protokoll szerinti HD-MTX-t tartalmazó konszolidációs kezelés során alkalmazott gyógyszerek rizikócsoporttól függően.

Protokoll mM (SR/IR ALL)	MTX 5g/m ² /24 óra i.v. a 8, 22, 36, 50. napon SR/IR T-ALL esetén, vagy MTX 2 g/m ² /24 óra i.v. a 8, 22, 36, 50. napon SR/IR B-ALL esetén 6-MP 25mg/m ² /nap per os az 1-56. napon MTX i. th. életkor szerinti 6-12 mg dózisban a 9, 23, 37, 51. napon
HR-1 blokk (HR ALL)	Dexametazon 20 mg/m ² /nap per os az 1-5. napon Vinkrisztin 1,5 mg/m ² /nap i.v. az 1, 6. napon MTX 5 g/m ² /24 óra i.v. az 1. napon Ciklofoszfamid 200 mg/m ² /nap i.v. a 2-4. napon Citozin-arabinozid 2000 mg/m ² /nap az 5. napon L-aszparagináz 25000 NE/m ² /nap a 6, 11. napon MTX/citozin-arabinozid/prednizon i.th. életkor szerinti dózisban az 1. napon
HR-2 blokk (HR ALL)	Dexametazon 20 mg/m ² /nap per os az 1-5. napon Vindezin 3 mg/m ² /nap i.v. az 1, 6. napon MTX 5 g/m ² /24 óra i.v. az 1. napon Ifoszfamid 800 mg/m ² /nap i.v. a 2-4. napon Daunorubicin 30 mg/m ² az 5. napon L-aszparagináz 25000 NE/m ² /nap a 6, 11. napon MTX/citozin-arabinozid/prednizon i.th. életkor szerinti dózisban az 1, (5.) napon

i.v.: intravénás, i.th.: intratekális

3.2 Metotrexát

A MTX szerkezetét tekintve 4-amino-4-dezoxi-10-metilpteroil-glutaminsav, amely egy pteridinből, p-amino-benzoésavból és egy L-glutaminsavból felépülő folsavszármazék (2. ábra).



2. ábra. Metotrexát

A második világháborút követő években először Sidney Farber patológus volt az, aki felismerte, hogy a folsav elősegíti a leukémiás sejtek növekedését és a betegség progresszióját. Feltételezte, hogy a folsav antagonisták megakadályozzák a daganatos sejtek proliferációját. 1948-ban publikálta eredményeit, melyek szerint számos folsav antagonist, köztük az aminopterin és az ametopterin, időlegesen remissziót eredményezett akut, nem differenciált leukémiában szenvedő gyermekekben (Farber és Diamond 1948, Miller 2006). A toxikus aminopterin a klinikai gyakorlatban felváltotta a kevésbé toxikus, de szintén hatékony ametopterin, a mai MTX megfelelője, amely ezt követően a leukémia, limfóma, gasztrointesztinális daganatok, emlő karcinóma, csonttumrok, urogenitális malignitások legfontosabb terápiájává vált (Miller 2006). A daganatterápia következő nagy áttörését a kemoterápiás szerek kombinációban történő alkalmazása jelentette. A MTX-ot ALL protokoll részeként elsőként 1965-ben alkalmazták a POMP protokoll (MTX, vinkrisztin, 6-MP és prednizon) kombinációjaként (Markász 2007).

3.2.1 Klinikai alkalmazás

A MTX-ot széles körben alkalmazzák számos malignus illetve autoimmun betegség terápiájában. Indikációs területei elsősorban az oszteosarkóma, koriokarcinómák, emlőkarcinóma, ováriumkarcinóma, leukémiák és limfómák terápiája, immunszuppresszív szerként viszont a reumatoid arthritisz és a pszoriázis bázisterápiája. Alkalmazzák ezen kívül Crohn-betegség, méhen kívüli terhesség, szisztémás lupusz eritematózus, Takayasu-arteritisz kezelésére és akut graft versus host betegség (GVHD) profilaxisaként is.

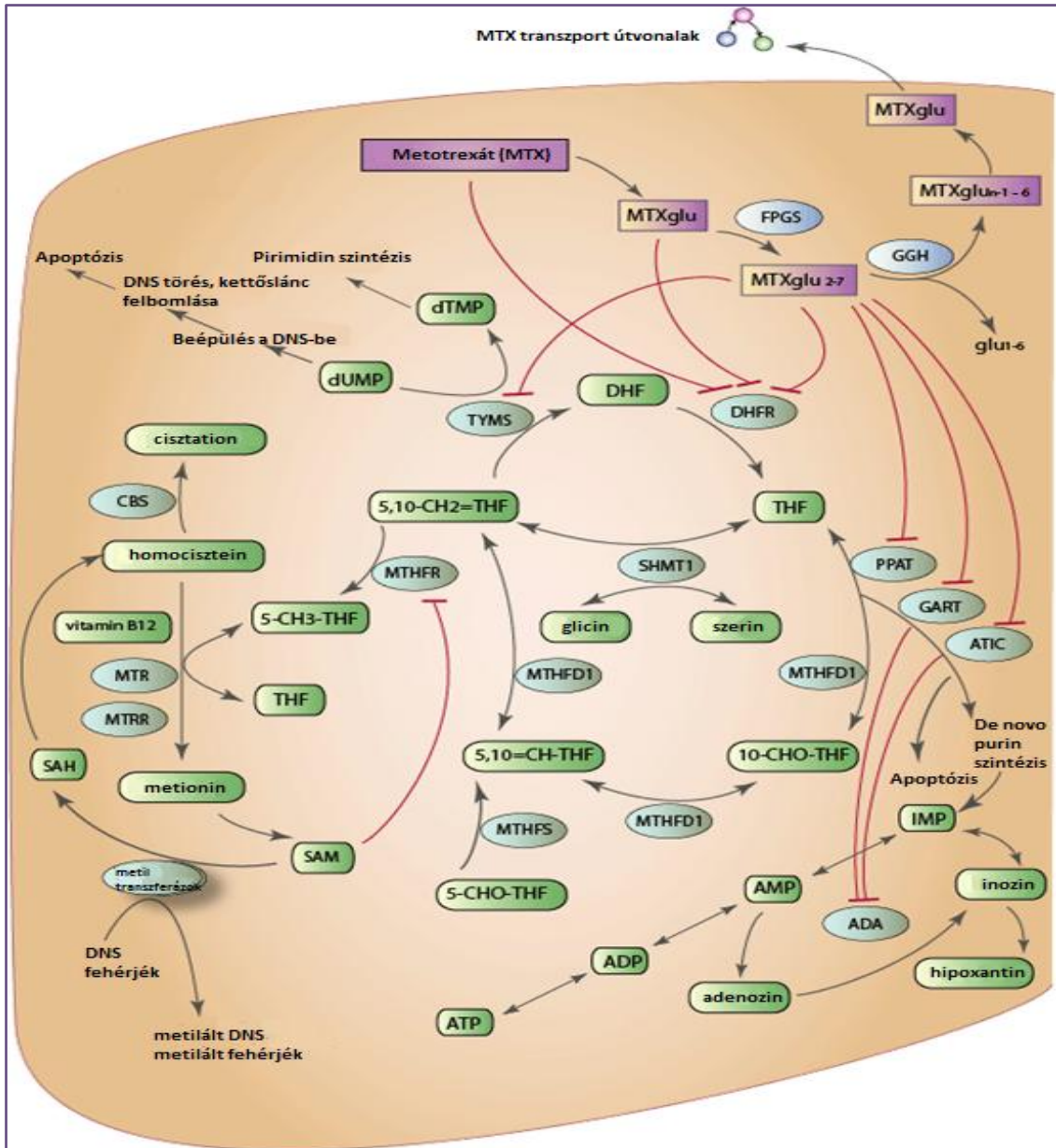
Ellenjavallatot képez a MTX-tal szembeni érzékenység, terhesség, szoptatás, szignifikánsan beszűkült vesefunkció, súlyos májkárosodás, súlyos csontvelő károsodás, immunhiányos állapot.

3.2.2 Hatásmechanizmus

A MTX a folsav antagonistá cistosztatikus antimetabolitok közé tartozik. A folát antagonisták a sejtben hamis folát kofaktorként a timidilát és a purin bioszintézis egy vagy több fontos enzimátikus reakcióját gátolják (Walling 2006). Az emlős sejt de novo timidilát illetve egyéb purin bázisainak szintéziséhez ugyanis teljesen redukált folsavra van szükség. A folsav jelenlétében zajló egy szénatomos transzfer reakciók elengedhetetlenek a sejtek DNS szintéziséhez (Stover 2009). A folsav teljesen redukált formája, az 5,10-metilén-tetrahidrofolát (5,10-CH₂=THF) a timidilát szintetáz (TYMS) által katalizált deoxiuridilát – timidilát átalakulásban fontos kofaktor, míg a 10-formil-tetrahidrofolát (10-CHO-THF) formil csoportjára a purin bioszintézis során van szükség (Walling 2006). A MTX sejtben kifejtett hatásait a 3. ábra szemlélteti.

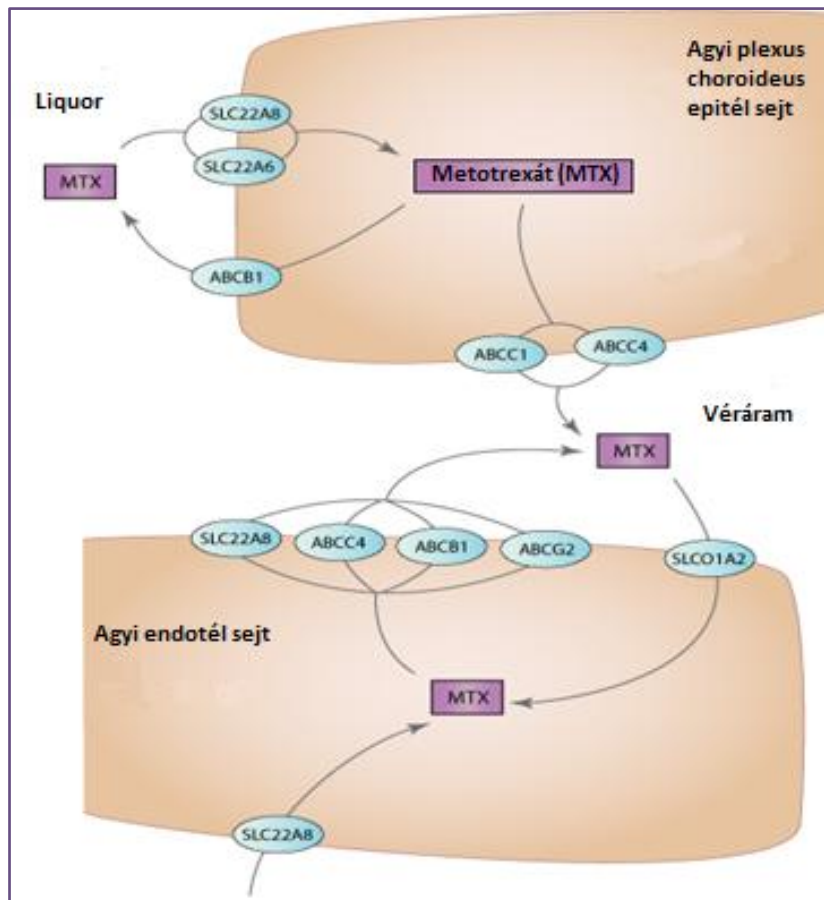
A folsav analóg MTX a sejtekbe jutva elsődlegesen a dihidrofolát reduktáz (DHFR) enzim gátlásán keresztül fejt ki hatását. Megakadályozza az 5,10-CH₂=THF termelődését, lehetetlenné téve ezáltal a timidin illetve egyéb purin bázisok szintézisét. A gyorsan osztódó daganatsejtek elpusztulnak a DNS szintézishez szükséges nukleotidok hiánya miatt. A MTX citotoxikus hatását a sejtciklus S fázisában lévő sejtekre fejt ki, mivel ilyenkor van szükség a DNS-szintézishez purin és pirimidin bázisokra.

A MTX felvétele a sejtekbe a folsavval azonos aktív transzport mechanizmussal, a szolubilis karrier molekulacsalád 19 1-es tagján (SLC19A1, régi nevén redukált folátkarrier 1, RFC1), anionos folátranszporterén vagy egy folátkötő fehérjén (FBP, másnéven folátreceptor 1, FOLR1) keresztül történhet (Assaraf 2007, Walling 2006). HD-MTX kezelések esetén azonban a sejtmembránon keresztül passzív diffúzió is lehetséges (Schmiegelow 2009). Az előbb felsorolt transzporterek közül legnagyobb szerepe az SLC19A1 molekulának van, melynek MTX iránti affinitása megegyezik a természetes folátokéval, ezért a MTX a természetes folátokkal verseng a karrier kötéshelyeiért (Walling 2006). A sejtekben a folilpoliglutamát szintáz enzim (FPGS) egy 2-7 glutaminsavból álló láncot kapcsol a molekulához, mely által az negatív töltésűvé válik, és ez megakadályozza a sejtől való kijutását (Mikkelsen és mtsai 2011, Walling 2006). A poliglutamálódott MTX (MTXPG) affinitása nagyobb a DHFR enzimhez, továbbá gátolja a TYMS enzimet és a ribonukleotid-transzformiláz enzimeket (PPAT, GART, ATIC) (Mikkelsen és mtsai 2011). Ez utóbbi hatása feltehetően a MTX immunszuppresszív tulajdonságához járul hozzá. Az 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid formiltranszferáz (ATIC) gátlásával megakadályozza, hogy az enzim a 10-CHO-THF-tről formilcsoportot vigyen át az 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotidra. Ezáltal 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid halmozódik fel, amely az adenzin deamináz (ADA) gátlásával növeli az adenzin mennyiségét, ez pedig immunszuppresszív hatású. A MTX hatékonysága összefügg a szer sejten belüli koncentrációjával illetve a sejten belül töltött időtartammal. A poliglutamálódott MTX tovább marad a sejtekben, ez adja a magyarázatát annak a jelenségnek, hogy a sejtpusztító hatás arányos a metotrexátexpozíció időtartamával (Jeney és Kralovánszky 2007). Ahhoz, hogy a MTX elhagyhassa a sejtet, a glutaminsav „farok” eltávolítására van szükség, melyet a gamma-glutamil hidroláz (GGH) enzim katalizál. A sejtől ABC-transzporter családba tartozó molekulákon keresztül távozik (elsősorban ABCC1-4, ABCG2) (Schmiegelow 2009). A MTX-ot transzportáló fehérjéket ábrázolja az 4. és 5. ábra.



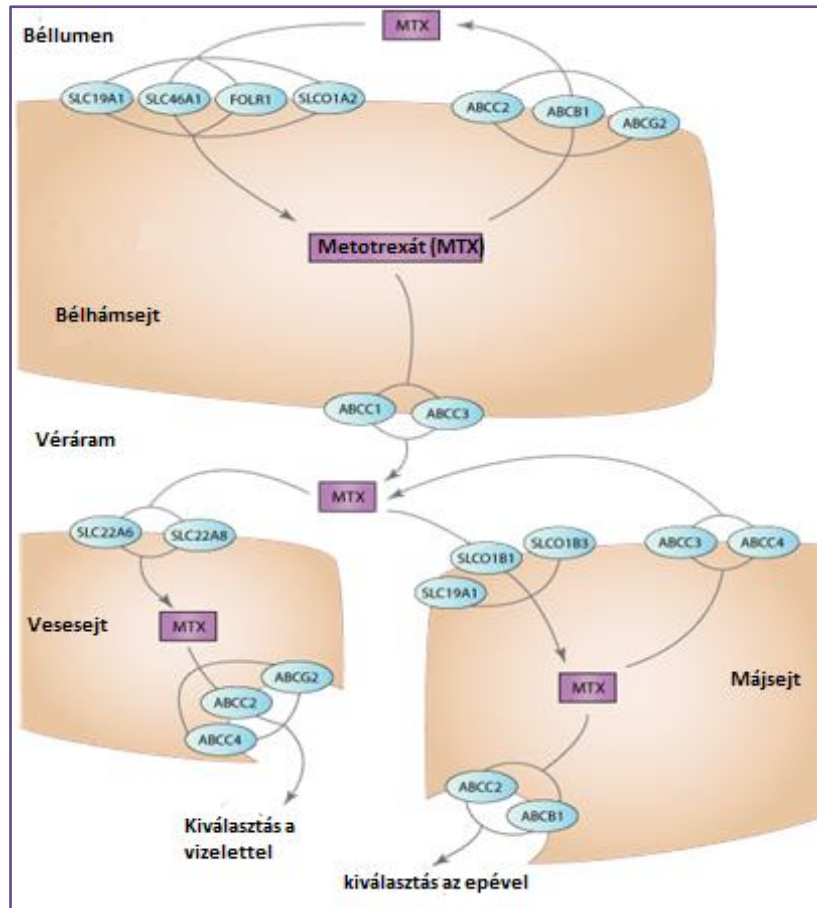
3. ábra. A MTX hatásmechanizmusa. Az ábra Mikkelsen és mtsai (2011) alapján készült. A folyamatok részletes leírását ld. a szövegben. A folyamatot katalizáló enzimek kék, a köztes termékek zöld színnel jelöltek. *ADA*: adenosin deamináz, *ADP*: adenosin-difoszfát, *AMP*: adenosin-monofoszfát, *ATIC*: 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid formiltranszferáz, *ATP*: adenosin-trifoszfát, *CBS*: cisztation-béta szintáz, *DHF*: dihidrofolát, *DHFR*: dihidrofolát reduktáz, *dTMP*: deoxitimidin-monofoszfát, *dUMP*: deoxiuridin-monofoszfát, *FPGS*: folilpoliglutamát szintáz, *GART*: foszforibozil-glicinamid formiltranszferáz, *GGH*: gamma-glutamil hidroláz, *IMP*: inozitol-monofoszfát, *MTHFD1*: metilén-tetrahidrofolát dehidrogenáz 1, *MTHFR*: metilén-tetrahidrofolát reduktáz, *MTHFS*: 5,10-metiléntetrahidrofolát szintetáz, *MTR*:

5-metiltetrahydrofolát-homocisztein metiltransferáz, *MTRR*: 5-metiltetrahydrofolát-homocisztein metiltransferáz reduktáz, *MTXglu*: MTX poliglutamát, *PPAT*: foszforibozil pirofoszfát amidotranszferáz, *SAH*: S-adenozil-homocisztein, *SAM*: S-adenozil-metionin, *SHMT1*: szerin hidroximetil-transzferáz 1, *THF*: tetrahydrofolát, *TYMS*: timidilát szintetáz, *5-CHO-THF*: 5-formil-tetrahydrofolát, *5,10-CH₂=THF*: 5,10-metilén-tetrahydrofolát, *5-CH₃-THF*: 5-metil-tetrahydrofolát.



4. ábra: A MTX transzportja az agyi plexus choroideus epitél sejtjeibe és az agyi endotél sejtbe. Az ábra Mikkelsen és mtsai (2011) tanulmánya alapján készült. *ABCB1*: ATP-kötő doménnel rendelkező B membránfehérje alcsalád 1-es tagja, *ABCC1-4*: ATP-kötő doménnel rendelkező C membránfehérje alcsalád 1-4-es tagja, *ABCG2*: ATP-kötő doménnel rendelkező G membránfehérje alcsalád 2-es tagja, *SLC22A6*: szolubilis karrier molekulacsalád 22 6-os tagja, *SLC22A8*: szolubilis karrier

molekulacsalád 22 8-as tagja, *SLCO1A2*: szolubilis karrier organikus anion transzporter család 1A2 tagja.



5. ábra. A MTX transzportja a bélben, vesében, májban. Az ábra Mikkelsen és mtsai (2011) tanulmánya alapján készült. *ABCB1*: ATP-kötő doménnel rendelkező B membránfehérje alcsalád 1-es tagja, *ABCC1-4*: ATP-kötő doménnel rendelkező C membránfehérje alcsalád 1-4-es tagja, *ABCG2*: ATP-kötő doménnel rendelkező G membránfehérje alcsalád 2-es tagja, *FOLR1*: folátreceptor 1, *SLC19A1*: szolubilis karrier molekulacsalád 19 1-es tagja, *SLC22A6*: szolubilis karrier molekulacsalád 22 6-os tagja, *SLC22A8*: szolubilis karrier molekulacsalád 22 8-as tagja, *SLC46A1*: szolubilis karrier molekulacsalád 46 1-es tagja, *SLCO1A2*: szolubilis karrier organikus anion transzporter család 1A2 tagja, *SLCO1B1-3*: szolubilis karrier organikus aniontranszporter család 1B1-3 tagja.

3.2.3 Farmakokinetika

Az alkalmazott MTX dózis alapján kis (30-150 mg/m² iv.), közepes (120-500 mg/m² iv.) és nagy dózisú (500-12000 mg/m² iv.) kezeléseket különböztethetünk meg. A MTX 25 mg/m² alatt jól felszívódik a gasztrointesztinális traktusból, magasabb dózisoknál azonban a per os bevitt gyógyszer biohasznosulása szignifikánsan alacsonyabb, ezért intravénás adagolást kell alkalmazni (Jeney és Kralovánszky 2007, Schmiegelow 2009). Ugyanazon dózist alkalmazva is nagy inter-és intraindividuális különbségek jellemzik a MTX farmakokinetikáját (Plard és mtsai 2007, Schmiegelow 2009). Általánosságban elmondható, hogy intravénás adagolás után a MTX ürülése a plazmából egy kétkompartmentes rendszerrel írható le (Holmboe és mtsai 2012, Jönsson és mtsai 2007). A kezdeti megoszlási féleletidő ($t_{1/2\alpha}$) 30-45 perc, a terminális féleletidő ($t_{1/2\beta}$) 3-4 óra. A MTX kiválasztódása szinte kizárólag a vesében történik, a teljes elimináció kis dózis (<30 mg/m²) esetén 3-10 óra, nagyobb dózisú kezeléskor 6-20 órát vesz igénybe (Jeney és Kralovánszky 2007). Alacsonyabb dózisú kezeléseket követően (25-100 mg/m²) a MTX csúcskoncentrációja a plazmában 1-10 µmol/l, magasabb dózisú kezeléseket követően (>1,5 g/m²) 0,1-1 mmol/l között mérhető (Messmann és Allegra 1996). Beszűkült vesefunkció esetén a MTX lassabban ürül ki a szervezetből, a szérumból MTX szintek tartósan magasabbak lesznek, a szer toxicitása fokozódik (Messmann és Allegra 1996). A MTX lassan, a passzív transzporthoz hasonlóan bejut az intersticiális folyadékterekbe is (intrapleurális, intraperitoneális tér, liquor). Ha ezen „harmadik” folyadéktér mennyisége megnövekszik (pl. pleurális folyadékgyülem vagy aszcitesz esetén), az szintén megnyújthatja a MTX jelenlétét a szervezetben (Bleyer 1978, Messmann és Allegra 1996, Walling 2006). A szérumból liquorba történő MTX penetráció aránya változó, de a liquorban mérhető szint általában 1-3%-a a plazmáénak (Borsi és mtsai 1990, Schmiegelow 2009). Nagy dózisú intravénás MTX kezelés esetén liquorban az 1 µmol/l feletti MTX koncentrációt tartják hatásosnak (Jönsson és mtsai 2007, Milano és mtsai 1990). Ha magasabb liquor-koncentrációra van szükség, a MTX-ot intratekálisan kell alkalmazni (Jeney és Kralovánszky 2007). A MTX a vérplazmában 50-70%-ban fehérjéhez, elsősorban albuminhoz kötődik (Bleyer 1978). A plazmafehérje-kötés mértéke befolyásolja a

szabad extracelluláris MTX koncentrációt, ezáltal pedig hatással van a MTX sejtekbe való bejutására és a vesén keresztül történő kiválasztására is (Bleyer 1978).

A MTX részt vesz az enterohepatikus körforgásban. A hepatocitákban a poliglutamálódott MTX hosszabb ideig (akár hónapokig is) tárolódhat (Messmann és Allegra 1996, Walling 2006). A HD-MTX kezelést követően két metabolit jelenik meg a vérben és a vizeletben (Walling 2006). A májban található aldehyd-oxidáz a MTX-ot 7-hidroxi-metotrexáttá (7-OH-MTX) alakítja, amely a MTX fő metabolitja. Hozzájárul a MTX hatásainak és mellékhatásainak kialakításához, emellett kompetitíven gátolhatja magát a MTX-ot a sejtbe történő transzport és a poliglutamiláció során (Widemann és Adamson 2006). A poliglutamálódott 7-OH-MTX a DHFR enzim gyenge inhibitora, de a ribonukleotid transzformiláz enzimeket (GART, ATIC) a MTXPG-tal azonos mértékben gátolja (Walling 2006). A HD-MTX infúzió kezdete után 12-24 órával mért szérumban 7-OH-MTX koncentráció meghaladhatja a szérumban MTX koncentrációt (Widemann és Adamson 2006). A másik, kis mennyiségben keletkező, inaktív metabolit a 2,4-diamino-10-metilpteróilsav (DAMPA), a vizelettel ürülő vegyületek között kevesebb, mint 5%-ban jelenik meg (Widemann és Adamson 2006). Feltehetően a bélbe került MTX-ből a bélbaktériumok karboxipeptidázai hidrolizálása útján keletkezik, azután reabszorbeálódik. Mindkét metabolit hat-nyolcszor kevésbé vízdékony, mint a MTX (Schmiegelow 2009, Widemann és Adamson 2006).

Számos interakciót írtak le a MTX és más gyógyszerek között. Minden olyan gyógyszer, amely a vérplazmában albuminhoz kötődik, kompetitív módon gátolja a MTX fehérje kötődését. A plazmafehérjéért való versengés révén növelik a szabad MTX koncentrációt a szalicilátok, fenitoin, szulfametoxazol, szulfonamidok, diuretikumok, orális antidiabetikumok, tetraciklinek, kloramfenikol, doxorubicin, ciklofoszfamid és a barbiturátok. A magasabb szabad MTX plazmaszint fokozott toxicitáshoz vezethet. A probenecid, szulfametoxazol, szalicilátok, penicillinek és a nem-szteroid gyulladásgátlók kompetitíven gátolják a MTX tubuláris szekrécióját, ezzel megakadályozzák a MTX vesén keresztül történő kiválasztását (Evans és Christensen 1985, Gewirtz és Holt 1985, Liegler és mtsai 1969, Paxton 1984, Takeda és mtsai 2002, Widemann és Adamson 2006). A primer KIR limfómákban és a KIR-i áttétek kezelése során alkalmazott antikonvulzív szerek a májban található aldehyd-oxidázon keresztül

módosíthatják a MTX metabolizmusát. Megnövelhetik a MTX clearance-t, ezáltal csökkentve a MTX expozíciót és a terápia hatékonyságát (Ferrerri és mtsai 2004, Relling és mtsai 2000). Megfigyeltek gyógyszer interakciót MTX kezeléssel egyidejűleg alkalmazott protonpumpa inhibitor alkalmazása során, amely a MTX clearance-t csökkentette (Bezabeh és mtsai 2012). A vinka alkaloidák közé tartozó vindezin fokozza a MTX clearance-t, ezáltal csökkenti a hatékonyságát (Bore és mtsai 1986). Az önmagukban is nefrotoxikus szerek, mint például a gentamicin és a ciszplatin, lassíthatják a MTX eliminációját, ezzel fokozva a toxicitást. Szinergista gyógyszer interakció áll fenn a MTX és a 6-MP között. Egyidejűleg alkalmazva a két antimetabolitot, a MTX gátolja a 6-MP lebontásáért felelős xantin-oxidáz enzimet, ezáltal megnöveli a 6-MP szintjét és hatékonyságát (Giverhaug és mtsai 1999).

3.2.4 Mellékhatások

A MTX citotoxikus hatását a gyorsan osztódó sejtekre fejt ki. A malignus sejtek mellett a szervezet saját, aktívan proliferáló szövetei, mint a csontvelő, magzati sejtek, bőrhám- és a nyálkahártya sejtek általában fokozottan érzékenyek a MTX hatásaira. Az 1970-es években, a plazma MTX koncentráció rutin monitorozása és az ehhez igazított leukovorin adagolás bevezetése előtt, a HD-MTX kezelésekhez kötődő halálozás 5% körül mozgott (Schmiegelow 2009, Widemann és Adamson 2006). Az ebben az időben végzett vizsgálatok során megállapították, hogy a toxicitás kialakulásának esélye egyértelmű összefüggést mutatott a 24 órás ($>5-10 \mu\text{mol/l}$), 48 órás ($>1 \mu\text{mol/l}$) és 72 órás ($>0,1 \mu\text{mol/l}$) MTX szintekkel, a kialakult toxicitás pedig ellensúlyozható vagy megelőzhető volt megfelelően alkalmazott kalcium-folinát (leukovorin) kezeléssel (Schmiegelow 2009, Widemann és Adamson 2006). Ezért a HD-MTX kezelések során kötelezővé vált a MTX plazma szintjének monitorozása, az ehhez igazított leukovorin „rescue”, a megfelelő hidrálás és a vizelet alkalinizálása (Schmiegelow 2009, Widemann és Adamson 2006). Bár a jelentős inter- és intraindividuális MTX farmakokinetikai különbségek miatt máig előfordulhatnak súlyos mellékhatások, mára ez az arány jóval alacsonyabb.

Általánosságban igaz, hogy a mellékhatások előfordulásának gyakorisága és súlyossága dózisfüggő. Alacsony dózisu, rövid távú MTX kezeléseket ritkán követ

súlyos, kontrollálhatatlan mellékhatás. ALL és non-Hodgkin limfóma (NHL) esetén alkalmazott fenntartó kezelés során leggyakrabban csontvelő depresszióval (a klonális depresszió inkább terápiás cél, mint mellékhatás) és hepatotoxicitással kell számolni, amely leukémiás gyermekekben általában enyhe, reverzibilis, csak ritkán vezet májcirrózishoz (Schmiegelow 2009). Ezzel szemben (elsősorban autoimmun betegségek esetén) alacsony dózisban, hosszú távon alkalmazott kezelés során májcirrózis, intersticiális pneumonitisz, oszteoporózis, alopecia és elsősorban T-limfocita diszfunkcióval járó immunosuppresszív állapot is kialakulhat (Bleyer 1978).

A nagy dózisu kezelések legfőbb mellékhatásai a nefrotoxicitás, hepatotoxicitás, csontvelő depresszió, gasztrointesztinális mukozitisz és a neurotoxicitás.

A HD-MTX kezelés során kialakuló vesekárosodás valószínűleg a tubulusokban történő MTX és metabolitjainak precipitációja, valamint a MTX direkt tubulotoxikus hatásának következménye (Gronroos és mtsai 2006, Widemann és Adamson 2006). A MTX több, mint 90%-a a vesén keresztül eliminálódik a szervezetből. Acidotikus pH-n vízoldékonysága alacsony, ráadásul metabolitjainak (7-OH-MTX, DAMPA) vízoldékonysága még ennél is sokkal alacsonyabb. A vizelet pH-jának emelkedése (pH 6-ról pH 7-re) a MTX és a metabolitok oldékonyságát öt-nyolcszorosára emeli. A vesetoxicitás megelőzése szempontjából ezért nagy jelentőséggel bír a HD-MTX terápiát megelőző, illetve egyidejűleg alkalmazott hidrálás és a vizelet alkalizálása. A vesekárosodás az esetek többségében tünetmentesen kezdődik, nem alakul ki oliguria, anuria. A vesekárosodást jelzi azonban a szérum kreatinin szint, amely a HD-MTX kezelés alatt, vagy azt követően rövid időn belül hirtelen megemelkedik. A károsodott vesefunkció a MTX további eliminációját is megakadályozza, a tartósan magas szérum MTX szint pedig további toxicitás kialakulásához, a meglévők súlyosbodásához vezethet (Widemann és Adamson 2006). A HD-MTX kezelést követő akut vesekárosodás az esetek többségében reverzibilis, ritkán azonban előfordulhat tartós glomeruláris vagy tubuláris károsodás is (Gronroos és mtsai 2008). A rövidebb idejű HD-MTX infúziókat követő magasabb szérum és vizelet MTX szintek, egyéb vesetoxikus gyógyszerekkel történő kombinációk (pl. ciszplatinnal), acidózis illetve meglévő vesekárosodás esetén a nefrotoxicitás kialakulásának esélye nagyobb.

A hepatotoxicitás jeleként a szérumban a transzaminázok és a bilirubin szintje átmenetileg emelkedik (Holmboe és mtsai 2012, Wiela-Hojenska és mtsai 2001). A

HD-MTX terápiát követően a szérum transzaminázok (GPT, GOT) szintje a normál érték két- vagy akár húszszorosára is emelkedhet, megfelelő leukovorin rescue ellenére is. Az akut transzamináz szintemelkedés a betegek 60-80%-át is érintheti, és általában a kezelést követő két héten belül spontán megszűnik. Az alacsony dózisu kezelésekkel ellentétben, a súlyos, irreverzibilis májkárosodás (fibrózis, cirrózis) előfordulása rendkívül ritka (Messmann és Allegra 1996). A májkárosodás biokémiai alapja nem ismert. A MTX lipid felhalmozódást okoz a májban, feltehetőleg a kolinszintézis gátlása révén, amelyhez egyszénatomos transzferreakcióra van szükség. Erre utal az a megfigyelés, hogy patkányokban az akut hepatotoxicitás kolin adagolásával visszafordítható volt. A HD-MTX-tal (1 g/ttkg) kezelt patkányokban a 7-OH-MTX biliáris precipitációja révén alakult ki kolesztázis (Messmann és Allegra 1996).

A korábban a HD-MTX kezelést követő súlyos mielotoxicitás incidenciája a leukovorin rescue terápia bevezetése után jelentősen csökkent (Messmann és Allegra 1996). Különös figyelmet érdemelnek azonban az önmagukban is mielotoxikus kezelések (mint például a sugárterápia), gyógyszerek, ugyanis a MTX kezeléssel együtt nagyobb mértékben károsítják a csontvelő hematopoetikus őssejt készletét, és súlyos pancytopeniát, következményesen súlyos vérzéseket, infekciókat okozhatnak.

A gasztrointesztinális mukozitisz fájdalmas, felületes nyálkahártya-fekélyek formájában jelentkezhet a gyomor-bélrendszer egész területén (Pico és mtsai 1998). A gyorsan osztódó mukóza sejtek érzékenyek a MTX citotoxikus hatásával szemben. A bazális epitélium megújító képessége nem tudja pótolni az elpusztult sejteket, amely a mukóza atrófiájához, kollagén töréshez, végső soron fekélyképződéshez vezet. Klinikailag a direkt mukotoxikus hatás nem sokkal a terápia befejezését követően kezdődik, legsúlyosabb a 7-10. napon, és két héten belül általában megszűnik. A fájdalom miatt a beteg per os táplálékbevitel akadályozott, a sérült mukóza barrier funkciója megszűnik, az endogén flóra és exogén patogének számára átjárhatóvá válik (Pico és mtsai 1998).

A MTX okozta idegrendszeri károsodás változatos formában jelentkezhet, aszeptikus meningitisz, akut és szubakut enkefalopátia, leukoenkefalopátia is előfordulhat (Rubnitz és mtsai 1998). Az intravénás HD-MTX-t követően 24 órán belül kialakuló akut neurotoxicitás leggyakrabban szomnolencia, zavartság, görcsrohamok képében jelentkezik. A tünetek általában spontán és szövődménymentesen elmúlnak. A

hetente, kéthetente alkalmazott HD-MTX kezelés esetén szubakut, „stroke-szerű” idegrendszeri tünetek, úgy mint tranziens fokális neurológiai deficit, zavartság, görcsrohamok jöhetnek létre. A tünetek általában hat nappal a kezelést követően kezdődnek és 15 perc – 72 óráig tarthatnak, majd szövődménymentesen, spontán elmúlnak. Az intratekális MTX leggyakoribb idegrendszeri mellékhatása az aszeptikus meningitisz, de ritkán transzverz mielopátia is kialakulhat. A leukoenkefalopátia a MTX kezelések legsúlyosabb késői szövődménye, kialakulása függ az alkalmazott dózistól és az alkalmazás módjától. Gyakrabban fordul elő azokban a betegekben, akik egyidejűleg vagy megelőzően sugárterápiás kezelésben részesültek. Kialakulásának mechanizmusa nem ismert, feltételezhetően a vér-agy gát károsodása következtében a MTX nagy koncentrációban éri az agy állományát. Klinikai lefolyása változó, legsúlyosabb, irreverzibilis formában disszeminált nekrotizáló leukoenkefalopátia alakul ki, amely halálos kimenetelű (Rubnitz és mtsai 1998).

A pulmonális toxicitás bár gyakoribb alacsony dózisu, hosszú távú MTX kezelés során, HD-MTX terápiát követően is kialakulhat (Imokawa és mtsai 2000). A MTX kezelést követő pneumonitisz szövettani képe változatos lehet, intersticiális gyulladás, fibrózis, nem nekrotizáló granulomák, óriássejtek, szöveti eozinofília, alveoláris károsodás képében jelentkezhethet. A patológiai és a klinikai kép sem specifikus a MTX-ra, más gyógyszer indukálta pulmonális károsodás esetén is megfigyelhető. Kialakulásának mechanizmusa feltehetően független a MTX folát anyagcserét befolyásoló hatásától, mivel a pulmonális toxicitás nem csökkenthető folinsav rescue-val. A betegség prognózisa viszonylag jó, de ritkán légzési elégtelenségig súlyosbodhat (Imokawa és mtsai 2000).

A HD-MTX kezelések során a jellemző alopecia mellett változatos bőrelváltozások alakulhatnak ki (Hansen és mtsai 1971). A betegek körülbelül 14-15%-ában nem specifikus, nyakra és törzsre lokalizálódó, viszkető makulák, morbilliform kiütés jelentkezik. Kialakulhat továbbá fényérzékenység, hiperpigmentáció is.

3.2.5 A toxicitás kivédése - rescue lehetőségek

A betegek állapotának egyéni értékelése, a meglévő szervkárosodások felmérése, megfelelően alkalmazott hidrálás és a vizelet alkalizálása, gyógyszer-

interakciók kivédése, kóros mennyiségű „harmadik” folyadéktér megszüntetése, pontos farmakokinetikai - farmakodinámiás monitorozás, rescue terápiák alkalmazása mind-mind jól tolerálhatóvá teszik a HD-MTX kezelést (Treon és Chabner 1996).

A HD-MTX kezelés esetén a hatás felfüggesztéséhez és a toxikus hatások csökkentéséhez, szigorúan meghatározott szabályok szerint, teljesen redukált folsavat (folinsav, leukovorin) kell adagolni (Schmiegelow 2009, Treon és Chabner 1996). A beadandó leukovorin adagját és időtartamát pedig a szérumban lévő MTX szinthez kell alakítani. A leukovorin a sejtekbe a MTX-hoz hasonlóan az SLC19A1 molekulán keresztül jut be, és ott 5-CH₃-THF-vá alakul, ezáltal felfüggeszti a MTX által blokkolt anyagcsere-folyamatokat. A MTX hatását kompetitív módon gátolja, ezért magas szérumban lévő MTX szintek esetén a szokásosnál magasabb leukovorin dózisokra van szükség (Widemann és Adamson 2006).

A HD-MTX-hez társult veseelégtelenség és a tartósan magas szérumban lévő MTX szint életveszélyes mellékhatásokat okozhat, amikor a leukovorin rescue már önmagában nem elég (Treon és Chabner 1996, Widemann és Adamson 2006). Ezekben az esetekben rekombináns bakteriális karboxipeptidáz-G2 enzimet (CPDG2) alkalmazva lehetőség nyílik a MTX alternatív úton történő eliminációjára. A CPDG2 a MTX-et inaktív DAMPA metabolittá alakítja.

A MTX-nak kevesebb, mint 10%-a ürül ki a gasztrointesztinális traktuson keresztül. Beszűkült veseműködés esetén azonban az enterohepatikus körforgás nagyobb szerepet kap a gyógyszer eliminálásában. Ilyen esetben aktív szén vagy anioncserélő gyanta, kolesztiramin alkalmazásával a MTX a vesét elkerülve gyorsabban kiürülhet a szervezetből (Messmann és Allegra 1996, Shinozaki és mtsai 2000).

További alternatív rescue lehetőséget biztosíthat a timidin nukleozid alkalmazása, amely normál vesefunkció mellett hatékonyan megszüntetheti a MTX toxicitását (Widemann és Adamson 2006). A leukovorinnal ellentétben nem gátolja kompetitíven a MTX-et, de a sejtekben közvetlenül timidin-monofoszfáttá (TMP) alakul a timidin kináz enzim hatására. Ezzel közvetlenül felfüggeszti a nukleotid bioszintézis MTX általi blokádját. A timidin azonban egyelőre nincs forgalomban.

3.2.6 Farmakogenetika

A fent említett, a MTX sejt szintű hatásainak kialakításában közvetlenül részt vevő enzimeken kívül több, a folát anyagcserében szerepet játszó enzim közvetetten befolyásolhatja a MTX hatását és kinetikáját. A MTX-tal kapcsolatban álló enzimeket, transzportereket kódoló gének polimorfizmusai (egy nukleotidot érintő polimorfizmus, SNP) kapcsolatban állhatnak egyes személyek fokozott MTX érzékenységének – így a gyakrabban jelentkező toxikus tünetek –, vagy ellenkezőleg, a MTX rezisztencia – így a szer hatástalanságának – kialakulásával (Mikkelsen és mtsai 2011). (A következőkben részletezett enzimek, transzporter molekulák a 3-5. ábrákon látható folyamatokban vesznek részt.)

SLC19A1 (RFC1)

A korábban redukált folát karrierek (RFC1) nevezett 19-es szolubilis karrier molekulacsalád 1-es tagja (SLC19A1) az emlős sejtek legfőbb folát transzportere. Az SLC19A1 nagy-kapacitású, az 5-CH₃-THF és a tiamin-monofoszfát kétirányú transzportját teszi lehetővé. Szintén nagy szerepe van az antifolatok, mint például a MTX, sejtbe történő felvételében. Az emlős sejtek folsav homeosztázisában is fontos szerepet játszik, folát deficiencia esetén down-regulálódik (Yee és mtsai 2010). Az *SLC19A1* gén a 21-es kromoszómán található (21q22.3). Az emberben található gén polimorf, különböző genetikai variánsainak hatását olyan klinikai állapotokban vizsgálják, amelyek kapcsolatban állnak a folát transzporttal, szintézissel és a folsav anyagcserével.

Leggyakrabban vizsgált nem szinonim polimorfizmusa az rs1051266 (80G>A, Arg27His), amely aminosav cserét eredményez. A 27-es pozícióban lévő hisztidin argininre cserélődik, ezzel megváltozhat a transzporter affinitása. A transzporter megváltozott működése a MTX transzportját, ezáltal a terápia hatékonyságát, toxicitását is befolyásolhatja. Egyes tanulmányok összefüggést találtak a homozigóta AA genotípus és a magasabb plazma folát szintek között (Yee és mtsai 2010). Összefüggést mutattak ki gyermekkori ALL HD-MTX kezelése esetén az AA genotípus és a magasabb plazma MTX szintek között, valamint megfigyelték, hogy az AA genotípus esetén gyakrabban fordult elő toxicitás, és a betegség prognózisa (össztúlélés, OS)

rosszabb volt (Laverdiere és mtsai 2002). Reumatoid artritiszes betegek alacsony-dózisú MTX kezeléseit követően is az AA genotípusú csoportban mértek magasabb MTXPG szinteket (Dervieux és mtsai 2004). A 80G>A polimorfizmus összefüggést mutatott a HD-MTX kezelést követően kialakult gasztrointesztinális, csontvelői és májtoxicitással is (Yee és mtsai 2010). Gregers és mtsai (2010) tanulmányában azonban az AA genotípust hordozó ALL-es gyermekek 50%-kal nagyobb eséllyel maradtak remisszióban, mint a GG vagy GA genotípusúak.

SLCO1B1

A MTX májba történő felvétele a szolubilis karrier organikus aniontranszporter család 1B1 és 1B3 tagján (SLCO1B1 és SLCO1B3) keresztül történik. Az *SLCO1B1* gén polimorfizmusai szerepet játszhatnak a HD-MTX kezelést követő interindividuális farmakokinetikai különbségek kialakításában (Trevino és mtsai 2009a). Az *SLCO1B1* gén terméke elsősorban a hepatociták szinuszoidális membránján fejeződik ki, de az enterocitákban is megtalálható (Trevino és mtsai 2009a). Szubsztrátjai között szerepel többek között a bilirubin illetve a MTX-on kívül egyéb gyógyszerek, mint például a sztatinok, angiotenzin-konvertáló enzim inhibitorok vagy a rifampicin. Szubsztrátjait a szinuszoidális vérből a hepatociták belsejébe transzportálja. Az *SLCO1B1* gén polimorfizmusai a transzporter működését megváltoztathatják.

Leggyakrabban vizsgált nem szinonim polimorfizmusa, az rs4149056 (521T>C, Ala174Val) számos szubsztrát vonatkozásában a transzporter funkció csökkenésével jár (Niemi és mtsai 2011). Az rs4149056 polimorfizmus MTX farmakokinetikával való összefüggését több tanulmány is megerősíti (Radtke és mtsai 2013, Ramsey és mtsai 2013, Trevino és mtsai 2009a). Az *SLCO1B1* gén további polimorfizmusai (rs11045879, rs4149081) is összefüggést mutattak a MTX clearance-szel valamint a kezelést követő gasztrointesztinális toxicitással (Lopez-Lopez és mtsai 2013, Lopez-Lopez és mtsai 2011, Trevino és mtsai 2009a).

SLC22A8

A vesébe a MTX a 22-es szolubilis karrier molekulacsaládba tartozó organikus aniontranszporterek 6-os és 8-as tagján keresztül jut be (SLC22A6 és SLC22A8). A fehérjéket kódoló gének egymáshoz kapcsoltnak a 11-es kromoszómán (11q12.3)

találhatók (Rizwan és Burckhardt 2007). Az *SLC22A6/SLC22A8* géneket érintő haplotípus eltérések összefüggést mutathatnak a MTX clearance-szel (Lopez-Lopez és mtsai 2013).

ABC-transzporterek

A MTX terápia hatékonyságát és a kialakuló mellékhatások súlyosságát a MTX sejtekből történő eltávolításának gyorsasága is befolyásolja. A MTX a sejtől ABC-transzportereken (ATP-kötő doménnel rendelkező membránfehérje család) keresztül távozik (Mikkelsen és mtsai 2011). Az ABC-transzporter családba tartozó transzmembrán fehérjék a sejtek méregtelenítésében vesznek részt, fontos szerepük van szervezetünk xenobiotikumok elleni védekezésében. Működésük során ATP hidrolízise során felszabaduló energia felhasználásával transzportálják szubsztrátjaikat a sejtmembránon keresztül. A kemoterápiás kezelések során kialakuló multidrog rezisztencia kialakulásáért felelősek, ezért multidrog rezisztencia (MDR) fehérjéknek is nevezzük őket (Dean 2009). A transzporterfehérjéket kódoló gének polimorfizmusai megváltoztathatják a gének expresszióját, az expresszálandó fehérje szubsztrát affinitását, aktivitását, működését. A legelsőként azonosított, gyógyszer rezisztenciáért felelős MDR transzporter az ATP-kötő doménnel rendelkező B-membránfehérje alcsalád 1-es tagja, *ABCB1* (korábban *MDR1*) gén által kódolt permeabilitásért felelős glikoprotein (P-glikoprotein) volt, de azóta az ABC-transzporter családba számos más tagját azonosították (Xia és Smith 2012). A legtöbbet tanulmányozott MDR fehérjék közé tartozik a P-glikoprotein kivételével, az ATP-kötő doménnel rendelkező C-membránfehérje alcsalád 1-es tagja, az *ABCC1* gén terméke, a multidrog rezisztencia protein 1 (MRP1) és az ATP-kötő doménnel rendelkező G-membránfehérje alcsalád 2-es tagja, az *ABCG2* gén által kódolt emlőrák drogrezisztencia protein (BCRP).

Az *ABCB1* gén terméke a szervezet számos szövetében expresszálandó. Az enterociták apikális membránján, a vese proximális tubulusában az epiteliális sejtek lumen felületén, a hepatociták kanalikuláris membránján, a vér-agy gáton, a placentában, még a CD34+ hematopoetikus őssejteken is kifejeződik (Dean 2009, König és mtsai 2013). A xenobiotikumok eltávolítását végzi a véráramba, bélbe, epébe, vizeletbe. A MTX mellett számos más kemoterápiás szer is a szubsztrátja, mint a vinka alkaloidok, antraciklinek, etopozid, taxánok, imatinib, irinotekán és a mitoxantron

(Dean 2009, Konig és mtsai 2013). Az *ABCB1* gén fokozott expressziója hozzájárulhat a leukémiás sejtek gyógyszerrezisztenciájához. Akut mieloid leukémiás és ALL-es betegekben megfigyelték, hogy azokban, akikben az *ABCB1* túlzottan expresszáldott, az indukciós kezelést követő remissziós arány majdnem a felére csökkent azokkal szemben, akikben az overexpresszió nem volt kimutatható (de Moraes és mtsai 2013).

Az *ABCC1* expresszáldik a perifériás vér hematopoetikus sejtjein, tüdőben, herében, placentában, agyban, vesében, mellékvesében, bélben, szívben és a vázizomban. Nagy szerepet játszik a sejtek fiziológiás detoxikálásában, ugyanis az exogén toxinok mellett a sejt saját anyagcsere-folyamatai során keletkező káros anyagok eltávolítását is végzi. Működéséhez glutationra van szükség. A MTX mellett több kemoterapeutikum is a szubsztrátja (vinka alkaloidák, antraciklinek). Számos tanulmány szól amellett, hogy az *ABCC1* expressziója összefüggést mutat különböző daganatok kezelése során kialakult rezisztenciával. Akut leukémiák kezelése során szerzett tapasztalatok azonban ellentmondásosak. Leukémiás sejtek vizsgálatát ugyanis nehezíti az a körülmény, hogy a transzporter az egészséges vérképző sejteken is kifejeződik (de Moraes és mtsai 2013). Fontos hangsúlyozni, hogy a legtöbb tumorsejt az *ABCB1* és *ABCC1* géntermékeket egyszerre expresszálja. Ezt figyelembe véve, feltehetően a leukémiás sejteken is egyszerre több membrán transzporter fejeződik ki, és ezek együtt hozzák létre a sejt multidrog rezisztens fenotípusát (de Moraes és mtsai 2013).

Az *ABCG2* gén terméke, a BCRP, nevét humán emlőráksejtek drogrezisztenciájáról kapta. Kifejeződik a bélben, vesében, májban, agyban, herében és a placentában (Konig és mtsai 2013). A CD34+ őssejtek nagyobb mértékben expresszálják, mint az MDR1-et (Dean 2009). A progenitor és érett vérképző sejteken azonban már nem található meg. Feltételezik, hogy a szervezet és az őssejtek toxinokkal szembeni védekezésében játszik szerepet (Dean 2009). Úgynevezett „fél ABC-transzporter”, működése során homodimerizálódik (Konig és mtsai 2013). A MTX-on kívül számos endogén és exogén szubsztrátja van. A transzporterén keresztül nem szállítódik, de működését gátolja a ciklosporin, takrolimusz, saquinavir, omeprazol és pantoprazol (Konig és mtsai 2013). Leggyakrabban tanulmányozott nem szinonim, aminosav cserével járó rs2231142 (421C>A, Gln141Lys) polimorfizmusa csökkent

fehérje expressziót eredményezhet, amely a következményes magas gyógyszerszintek miatt a toxicitás fokozódásához vezethet (Robey és mtsai 2007).

A MTX effluxa a májban, vesében, bélben az ATP-kötő doménnel rendelkező C-membránfehérje alcsalád 2-4-es tagja, az *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4* gének által kódolt transzportereken keresztül is végebeemehet (Mikkelsen és mtsai 2011). A hepatocitákból a vérbe elsősorban a bazolaterális membránon található *ABCC3* és *ABCC4* transzportereken keresztül jut vissza. Az *ABCC2* az *ABCB1* transzporter mellett a MTX epébe történő kiválasztását végzi. Alacsony dózisu, per os MTX kezelés esetén pedig a MTX az enterocitákból az *ABCC2* transzporterén keresztül a béltraktusba, az *ABCC1* mellett az *ABCC3* transzporterén keresztül pedig a vérbe kerül. A veséből történő eltávolításában az *ABCG2* mellett az *ABCC2* és *ABCC4* transzporter fehérje játszik szerepet. Az *ABCC2* gént érintő SNP-k elhúzódo MTX ürülést okozhatnak (Cascorbi 2006, Mikkelsen és mtsai 2011). Az *ABCC2* gén által kódolt multidrog rezisztencia protein 2 (*MRP2*) az epitél sejtek apikális – lumenális membránjában található. Fontos szerepet játszik a detoxikációs folyamatokban. Számos konjugátlan és konjugált vegyület (glukuronidok, szulfátok, glutationok – többek között a konjugált bilirubin) aktív transzportját végzi. Szubsztrátjai között számos daganatellenes szer is szerepel. Az autoszomális recesszív Dubin-Johnson szindróma (szimptomás konjugált hiperbilirubinémia) a májban található *MRP2* hiányához köthető (Cascorbi 2006).

FPGS/GGH

A transzport mechanizmusokon kívül az intracelluláris MTXPG akkumulációt a folilpoliglutamát szintáz (FPGS) és a gamma-glutamil hidroláz (GGH) enzimek által katalizált ellentétes reakciók aránya határozza meg. Fokozódik az intracelluláris MTXPG mennyisége a FPGS enzim fokozott és a GGH enzim csökkent működése esetén (Panetta és mtsai 2010). Ezzel szemben a FPGS enzim csökkent és a GGH enzim túlzott működése esetén a sejt rezisztenssé válhat a MTX-tal szemben (Assaraf 2007).

A *FPGS* gén a 9-es kromoszómán helyezkedik el (9q34.1). Az enzim a MTXPG kialakulását katalizálja, működése során egy 2-7 glutaminsavból álló láncot kapcsol a MTX molekulához. A FPGS aktivitás különbözhet ALL-es betegekben a leukémia fenotípusa, diploiditása és molekuláris altípusai szerint (Panetta és mtsai 2010). Megfigyelték, hogy magasabb volt B fenotípusú, hiperdiploid ALL-ben, míg

alacsonyabb volt a t(12;21) transzlokációt hordozókban (Panetta és mtsai 2010). A *FPGS* gén több funkcionális polimorfizmusát azonosították, ennek ellenére az ALL-es betegekről készült farmakogenetikai vizsgálatok még hiányosak (Schmiegelow 2009). Reumatoid artritiszes betegek esetén pedig ezidáig nem lehetett egyértelmű összefüggést kimutatni a vizsgált SNP-k és a MTX kezelés hatékonysága, toxicitása között (Owen és mtsai 2013).

A *GGH* gén a 8-as kromoszómán található (8q12.3). Terméke, a GGH enzim, a poliglutamát lánc lehasítását végzi, amely által lehetővé válik a MTX eltávolítása a sejtéből. A gén rs11545078 (452C>T, Thr151Ile) polimorfizmusa az enzim csökkent működésén keresztül, a MTXPG intracelluláris felhalmozódásához és fokozott citotoxicitáshoz vezethet leukémiás sejtekben. Ezzel ellentétben az rs3758149 (-401C>T) SNP a csökkent MTXPG szinttel mutatott összefüggést reumatoid artritiszes betegekben, azt sugallva, hogy az SNP fokozott enzimaktivitást okoz (Schmiegelow 2009). A GGH enzim fokozott expressziója a poliglutamát lánc gyorsabb lehasítását eredményezi, melynek következtében a sejtek nem képesek az antifolátok akkumulálására, így azok hatása csökken.

DHFR, MTHFD1, SHMT1, MTHFR, TYMS, MTR, MTRR

A MTX hatását elsődlegesen a DHFR enzim gátlásán keresztül fejti ki. A DHFR enzim génje az 5-ös kromoszómán található (5q11.2-q13.2). Az enzim a dihidrofolátot tetrahidrofoláttá alakítja, amely azután biztosítja a de novo purin és timidilát szintézishez szükséges egyszénatomos fragmentumokat. A gén egyes polimorfizmusai és haplotípusa összefüggést mutattak az enzim fokozott expressziójával és a gyakoribb ALL relapsussal (Al-Shakfa és mtsai 2009, Schmiegelow 2009). A DHFR enzim deficiencia megaloblasztos anémiát okozhat (Cario és mtsai 2011).

A 17-es kromoszómán található szerin hidroximetil-transzferáz 1 (*SHMT1*) gén által kódolt SHMT1 enzim a reverzibilis szerin – glicin és THF – 5,10-CH₂=THF átalakulást katalizálja. Az *SHMT1* gén rs1979277 (1420C>T, Leu474Phe) polimorfizmusa csökkent MTX érzékenységet okozhat (de Jonge és mtsai 2005). Az CC genotípus pedig megnövekedett homocisztein szinttel, alacsony folát státusszal, és magasabb ALL rizikóval állhat kapcsolatban (de Jonge és mtsai 2005).

A metilén-tetrahidrofolát dehidrogenáz 1 enzim (MTHFD1) három különböző reakciót katalizál, amelyek során a THF egyszénatomos derivátumai egymásba átalakulhatnak. A reakció szubsztrátjai a metionin, timidilát és a de novo purin szintézishez szükségesek. Génje a 14-es kromoszómán helyezkedik el (14q24). Az *MTHFD1* rs2236225 (1958G>A, Arg653Gln) polimorfizmus AA genotípusa kapcsolatban állhat a megnövekedett relapszus rizikóval ALL-es gyermekekben (Krajinovic és mtsai 2004, Schmiegelow 2009). Kimutatták továbbá, hogy az A allél szignifikánsan csökkentette a hepatotoxicitás kialakulásának esélyét (Erculj és mtsai 2012).

Az egyik leggyakrabban vizsgált enzim a metilén-tetrahidrofolát reduktáz (MTHFR), amely az 5,10-CH₂=THF átalakulását katalizálja 5-CH₃-THF-tá, amely a homocisztein – metionin átalakuláshoz szükséges kofaktor. A *MTHFR* gén az 1-es kromoszómán található (1p36.3). Legtöbbet vizsgált polimorfizmusai az rs1801133 (677C>T, Ala222Val) és az rs1801131 (1298A>C, Glu429Ala) (Schmiegelow 2009). Mindkét SNP csökkent enzimműködést eredményez, a 677C>T allél valamivel nagyobb mértékben, mint az 1298A>C allél. A két SNP-t érintő egyidejű homozigótáság előfordulása rendkívül ritka, de a kaukázusi populáció körülbelül 15%-a heterozigóta mindkét SNP-re nézve. Ezekben az egyéneknél az enzimaktivitás csökkenése megegyezik a 677C>T homozigótákéval (Schmiegelow 2009). A 677>T allél heterozigóta és homozigóta formában is a folát kínálat egyensúlyának zavarát, következésképpen hiperhomociszteinémiát okozhat (Taub és mtsai 2002). Az SNP-k hatása a MTX farmakokinetikára és a kezelést követő toxicitás kialakulására nem egyértelmű. Csökkent MTHFR aktivitás megnövekedett in vitro MTX érzékenységgel társulhat (Taub és mtsai 2002). Leírták ugyanakkor összefüggését magasabb relapszus rizikóval és az ALL progressziójával is (Krajinovic és mtsai 2004). Találtak összefüggést az SNP-k jelenléte és a magasabb arányban jelentkező toxicitás között, de léteznek olyan vizsgálatok is, ahol ezt az összefüggést megerősíteni nem tudták (Seidemann és mtsai 2006), sőt olyan is, amelyben a 677C>T allél jelenléte esetén a hepatotoxicitás és a mielotoxicitás aránya alacsonyabb volt (Costea és mtsai 2006).

A TYMS enzim a deoxiuridin-monofoszfát (dUMP) metilációját katalizálja, amelynek során deoxitimidin-monofoszfát (dTMP) keletkezik. A reakció kofaktora az 5,10-CH₂=THF. A dTMP kínálat fontos a DNS replikációhoz és repair-hez. A *TYMS*

gén a 18-as kromoszómán található (18p11.32). A *TYMS* expresszió szabályozásában a gén promoter enhancer régiójában található 28-bázispár hosszúságú szekvencia kettős (2R) vagy hármas (3R) tandem ismétlődése is szerepet játszik. A 3R ismétlődés fokozott génátíródást és a *TYMS* szint emelkedését okozza, amely a MTX kezelés toxicitásának csökkenéséhez (Faganel Kotnik és mtsai 2011), de akár MTX rezisztenciához is vezethet (Horie és mtsai 1995).

A metionin szintáz (5-metiltetrahydrofolát-homocisztein metiltransferáz, MTR) a homocisztein – metionin átalakulást katalizálja. A reakcióhoz 5-CH₃-THF-ra és metilkobalaminra van szükség. A metionin szintáz reduktáz (5-metiltetrahydrofolát-homocisztein metiltransferáz reduktáz, MTRR) a metionin szintáz aktiválásáért és a metilkobalamin kínálat fenntartásáért felelős. A *MTR* gén az 1-es (1q43), a *MTRR* gén az 5-ös (5p15.31) kromoszómán helyezkedik el. A *MTR* rs1805087 (2756A>G, Asp919Gly) polimorfizmusa alacsony enzimaktivitást eredményezhet, de az SNP és a MTX toxicitás közötti összefüggés egyelőre ismeretlen (Faganel Kotnik és mtsai 2011). A *MTRR* gén rs1801394 (66A>G) polimorfizmusa kapcsolatban állhat a MTX toxicitással, de hematológiai malignitásokban még hiányosak az SNP-vel kapcsolatos ismereteink (Faganel Kotnik és mtsai 2011).

ARID5B

Az előzőektől eltérő módon, az *ARID5B* gén egy transzkripció-s fehérvj kódol. A gén terméke az adeninben és timinben gazdag interaktív domént (AT-rich interaction domain, ARID) tartalmazó fehérjecsald 5B tagja. Az ARID család DNS kötő fehérjékből áll. A gén a 10-es kromoszómán található (10q21.2). Az *ARID5B* gén szerepet játszik az adipogenezisben, a máj fejlődésében, de a sejtnövekedésben és a B-limfocita progenitorok differenciálódásában is (Trevino és mtsai 2009b). Kimutatták, hogy az *ARID5B* gén variánsai összefüggést mutatnak a B-sejtes hiperdiploid ALL kialakulásával (Healy és mtsai 2010, Trevino és mtsai 2009b). Továbbá, ezekben a betegekben ugyanazok az allélok, amelyek a B-hiperdiploid ALL-re hajlamosítottak, összefüggést mutattak a megnövekedett intracelluláris MTXPG akkumulációval is (Trevino és mtsai 2009b). Ismert, hogy a B-sejtes hiperdiploid ALL jobban reagál HD-MTX kezelésre. Mindez felveti annak a lehetőségét, hogy a leukemogenezis és az antileukémiás terápiára adott válaszreakciók egy közös – egyelőre ismeretlen –

útvonalon konvergálnak (Xu és mtsai 2012). Az *ARID5B* gén MTX farmakokinetikával vagy toxicitással kapcsolatos összefüggéseit ez idáig nem vizsgálták.

3.3 Farmakokinetikai és farmakogenetikai vizsgálatok jelentősége

Egy kemoterápiás szer farmakokinetikai és farmakodinámiás tulajdonságai meghatározzák, hogy az adott szer a szervezetben milyen terápiás és toxikus hatásokat fejt ki (Groninger és mtsai 2004). A gyógyszer sorsa a szervezetben azonban nagy személyek közötti variabilitást mutat, mind a szer hatékonyságát, mind mellékhatásspektrumát tekintve. A farmakokinetikán alapuló gyógyszeradagolás ezért nagy jelentőséggel bír, ezáltal lehetővé válik a maximális terápiás hatás elérése amellet, hogy a mellékhatásokat minimálisra csökkentjük. A kemoterápiás szerek alkalmazása egyedülálló klinikai és toxikológiai kompromisszumot jelent (McMahon és O'Connor 2009). A kemoterápiás szerek többsége ugyanis citotoxikus hatású, viszont a célsejtek és a szervezet egészséges sejtjeinek érzékenysége a kemoterapeutikumokkal szemben hasonló. A betegség súlyossága miatt alkalmazott nagy dózisoktól való kis eltérés is könnyen súlyos toxicitást okozhat, vagy aluldozírozva, egy kemoterápiával gyógyítható daganat gyógyulási esélyeit ronthatja.

A terápiás gyógyszer szint monitorozása (TDM) segítséget nyújt a hatásos, biztonságos és gazdaságos gyógyszeres kezeléshez. A gyógyszer szint követésével ellenőrizhető, hogy a gyógyszer plazmaszintje az elérni kívánt terápiás tartományba vagy azon kívül esik. A TDM alkalmazásával biztonságosan alkalmazhatók olyan gyógyszerek, amelyek esetén az alkalmazott dózis és plazmakoncentráció összefüggése nem egyértelmű, terápiás és/vagy toxikus tartományuk keskeny, az alul- vagy túladagolásuk esetleg visszafordíthatatlan következményekkel jár, kísérő gyógyszerelés és/vagy kísérőbetegségek lényegileg megváltoztathatják a szóban forgó vegyület farmakokinetikáját (Gahályi és Lakner 2008).

A kemoterápiás szerek esetén ideális lenne a rutinszerűen alkalmazott TDM. A kezelések nagy részében a TDM felhasználhatósága azonban jelenleg még korlátozott (Hon és Evans 1998, Lennard 1999). Nincs olyan egyértelmű farmakológiai mutató, amely közvetlenül mutatná a terápia hatékonyságát. Ha a gyógyulást tekintjük a kezelés

hatékonyságának, akkor hosszú idő telik el a gyógyszer szint mérésétől a hatékonyság megítélésig (Hon és Evans 1998). A gyógyszerek metabolizmusa bonyolult, szintmérésük sokszor költséges, ráadásul legtöbb esetben kombinált kemoterápiás protokollokat alkalmazunk, amely a gyógyszer interakciók miatt megnehezíti a farmakokinetikai és farmakodinámiás tulajdonságok pontos feltérképezését. Szükség lenne továbbá minden gyógyszer esetén a pontos terápiás tartomány ismeretére (Lennard 1999).

A HD-MTX infúziót követő TDM bár jól ismert, de nem tökéletes példa arra, hogy a farmakokinetikai ismereteket hogyan lehet sikeresen alkalmazni a klinikai gyakorlatban. A HD-MTX kezelést követő szérumban, liquor MTX és 7-OH-MTX szintek monitorozásának, az emellett megfelelően alkalmazott rescue és szupportív terápiának köszönhetően, a HD-MTX az esetek nagy részében biztonságosan alkalmazható kemoterapeutikum. Mindezek ellenére a világban többféle protokoll részeként más és más dózisban alkalmazzák, az optimális MTX szint meghatározása máig számos kutatás tárgyát képezi.

A farmakokinetikai vizsgálatokra a gyermek hematológia, onkológia területén is szükség van. A felnőttekből származó farmakokinetikai adatokat ugyanis nem lehet csak egyszerűen extrapolálni a gyermekekre. Különbözik például a bleomicin, ciklofoszfamid, ifoszfamid, citarabin, doxorubicin, idarubicin és a MTX kezelések farmakokinetikája felnőttek és gyermekek esetén, de még a gyermekpopuláción belül az idősebb és fiatalabb gyermekek között is (Groninger és mtsai 2004). Az ilyen vizsgálatok elvégzése során több etikai és logisztikai, technikai kihívással is számolni kell. Többek között a vérminták mennyiségének és gyakoriságának minimálisra csökkentésére, nagyon érzékeny gyógyszer szintmérő metodikára, limitált adatgyűjtési stratégiára van szükség. Mindezek tükrében nem meglepő, hogy a gyermekekben alkalmazott kemoterápiás szerek farmakokinetikai tulajdonságaival kapcsolatos tudásunk ma még közel sem teljes (Groninger és mtsai 2004).

Alapos farmakokinetikai ismeretek mellett is előfordul, hogy ugyanazon dózist alkalmazva is nagy egyéni különbségeket találunk a gyógyszerek felszívódását, metabolizmusát, eliminációját, a létrejött hatást, mellékhatást tekintve. Ez a

változékonyság részben a fentebb említett metabolikus és transzport folyamatokban részt vevő fehérjéket kódoló gének variabilitásával magyarázható.

A farmakogenetika a gyógyszerválasz interindividuális különbségeit az egyéni genetikai változékonyság megnyilvánulásaként vizsgálja (Gahályi és Lakner 2008). A genetikai sokféleség sok esetben funkcionális variabilitást is jelent, tehát kapcsolat állhat fent a genetikai variáns (például egy SNP vagy több SNP együttes mintázata) és a gyógyszerhatás – mellékhatás között. Ma még nem teljesen feltárt és értett génasszociációk miatt, ez akkor is így van, ha az adott genetikai variabilitás nem okoz közvetlenül fehérjeszinten való eltérést. Tehát genetikai jellegzetességek alapján a gyógyszerek hatékonysága, toxicitása az adott személy esetén prediktálható (Falus és Erdélyi 2007).

A farmakogenetikán alapuló dózis meghatározásnak célja, a költséghatékonyság mellett, hogy pontosabb dozírozás legyen elérhető, mint ha az csak a toxicitáson vagy a betegség aktivitásán alapulna (Nersting és Schmiegelow 2009). A purinanalóg antimetabolitok közé tartozó 6-MP metabolizmusában szerepet játszó tiopurin-S-metiltranszferáz (TPMT) enzimet érintő genetikai eltérések jó például szolgálnak arra, hogy a farmakogenetika hogyan járulhat hozzá az individualizált gyógyszereléshez. Az alacsony TPMT aktivitással járó homozigóta deficiens egyének súlyos, életveszélyes mellékhatásokat szenvedhetnek, ezért esetükben jelentős dóziscsökkentésre van szükség (Nersting és Schmiegelow 2009). A fejlett országokban ezért a purinantagonista szerek alkalmazása előtt egyre terjed a gén, illetve az enzimaktivitás rutin klinikai vizsgálata.

A MTX-tal kapcsolatos, nagyszámú farmakogenetikai vizsgálat eredménye nem egybehangzó ugyan, mégis azt sugallja, hogy a jövőben kulcsszerepet játszik majd a terápia hatékonyságának még további növelésében (Castaldo és mtsai 2011).

4. Célkitűzés

Munkám során az alábbi célkitűzéseim voltak:

Farmakokinetikai vizsgálatok:

1. Részletes, összehasonlító elemzést készíteni a Magyarországon alkalmazott, két különböző dózisu HD-MTX kezelést követően a MTX és 7-OH-MTX farmakokinetikai paramétereiről szérumban és liquorban egyaránt.
2. Összehasonlítani a különböző dózisu kezeléseket követő korai toxicitást.
3. Megvizsgálni a farmakokinetikai és toxicitási eredmények életkor és nemek szerinti különbségeit.

Farmakogenetikai vizsgálatok:

4. Megvizsgálni a folát anyagcserében szerepet játszó, transzporter, valamint transzkripciós fehérjéket kódoló gének polimorfizmusai (SNP) és a MTX, valamint a 7-OH-MTX farmakokinetikája közötti összefüggéseket.
5. Megvizsgálni, hogy ugyanezen SNP-k összefüggést mutatnak-e a kezeléseket követő akut toxicitással.

5. Módszerek

5.1 Betegek, MTX kezelések

Összesen 153 olyan beteg adatait elemeztük, akiket ALL diagnózissal 1998-2011 között a Semmelweis Egyetem II. Sz. Gyermekgyógyászati Klinikáján kezeltek. Minden gyermeket bevontunk a vizsgálatba, aki ez alatt az idő alatt HD-MTX kezelésben részesült. Az adatgyűjtés retrospektív módon történt. A gyermekek kemoterápiás kezelése az ALL-BFM 95 és ALL IC-BFM 2002 protokoll alapján zajlott (ALL IC-BFM Trial Steering Committee 2002, Moricke és mtsai 2008). Az intravénás HD-MTX infúzióra minden esetben a terápia konszolidációs fázisában, 24 órás folyamatos infúzió formájában került sor. Az ALL-BFM 95 protokoll alapján minden beteg egységesen 5 g/m^2 dózisú ($n= 33$ gyermek) MTX infúzióban részesült. Az ALL IC-BFM 2002 protokoll alapján az alacsony és közepes rizikócsoportha sorolt (SR, IR) T-sejtes és a magas rizikócsoportha sorolt (HR) gyermekek ($n= 32$ gyermek) 5 g/m^2 dózisú, az alacsony és közepes rizikócsoportha sorolt (SR, IR) B-sejtes ALL-es gyermekek ($n= 88$ gyermek) 2 g/m^2 dózisú MTX infúziót kaptak (3. táblázat). Az $5 \text{ g/m}^2/24$ óra dózisú infúziók esetén összesen 241, a $2 \text{ g/m}^2/24$ óra dózis esetén összesen 342 MTX kezelést elemeztünk és hasonlítottunk össze. A betegek átlagéletkora a diagnóziskor 6,4 év (1,0-17,9 év) volt.

Farmakokinetikai vizsgálataink során a betegeket diagnóziskori életkoruk szerint további alcsoportokba osztottuk: 6 éves kor alatti (<6 év) és 14 éves kor feletti (>14 év) csoportokba, mivel az ALL incidenciája magasabb az első csoportban, és a fiatalabb gyermekeket fiziológiásan gyorsabb gyógyszer elimináció jellemzi (Borsi és Moe 1987, Groninger és mtsai 2004, Plard és mtsai 2007). Ezzel szemben az idősebb gyermekek gyógyszer metabolizációs és eliminációs képessége a felnőttekéhez hasonló (Strolin Benedetti és Baltés 2003).

3. táblázat. Betegek és MTX kezelések jellemzői

Betegek/kezelések		Érték	
Betegek száma összesen		153	
Nem n (%)	Fiú	102 (66,7)	
	Lány	51 (33,3)	
Átlagéletkor		6,4 (1,0-17,9) év	
Protokoll n (%)	ALL-BFM 95	33 (21,6)	
	ALL IC-BFM 2002	120 (78,4)	
Rizikó csoport n (%)	SR	52 (34)	
	IR	70 (45,8)	
	HR	31 (20,2)	
Immunfenotípus n (%)	B-ALL	120 (78,4)	
	T-ALL	31 (20,3)	
	Bifenotípusos	2 (0,01)	
MTX dózis n (%)	MTX5	Betegek 65 (42,5)	
		MTX kezelések 241 (41,3)	
	MTX2	Betegek 88 (57,5)	
		MTX kezelések 342 (58,7)	
MTX kezelések száma összesen		583	
MTX5 n (%)	<6 év	Betegek	35 (53,8)
		MTX kezelések	130 (53,9)
	>14 év	Betegek n (%)	9 (13,8)
		MTX kezelések n	27 (11,2)
MTX2 n (%)	<6 év	Betegek n (%)	60 (68,2)

	MTX kezelések n	230 (67,3)
>14 év	Betegek n (%)	7 (8)
	MTX kezelések n	23 (7)

MTX5: 5 g/m²/24 óra MTX, MTX2: 2 g/m²/24 óra MTX

A gyermekek a protokolloknak megfelelően kéthetente, összesen 4 alkalommal kapták a HD-MTX-ot. A rendelkezésre álló klinikai adatok függvényében, az általunk vizsgált MTX kezelések száma betegenként 1-4 között változott. Összesen 583 HD-MTX kezelést elemeztünk (3. táblázat).

A protokolloknak megfelelően az SR, IR csoportba sorolt gyermekek (B és T-sejtes, n= 122 gyermek) a konszolidációs terápia során a HD-MTX mellett végig per os 6-MP-t (25 mg/m²/nap dózisban) kaptak. A HR csoportba sorolt betegek (B és T-sejtes, n= 31 gyermek) a HD-MTX-ot terápiás blokkok részeként kapták. A terápiás blokk első napján került sor az 5 g/m²/24 óra dózisú HD-MTX infúzióra. A HD-MTX mellett dexametazont (20 mg/m²/nap az 1-5. napon), vinkrisztint (1,5 mg/m² az 1. és 6. napon) vagy vindezint (3 mg/m²/nap az 1. és 6. napon), ciklofoszfamidot (200 mg/m²/nap a 2-4. napon) vagy ifoszfamidot (800 mg/m² a 2-4. napon), citozin-arabinozidot (2000 mg/m²/nap az 5. napon) vagy daunorubicint (30 mg/m²/nap az 5. napon) és L-aszparaginázt (25000 NE/m²/nap a 6. napon) kaptak a betegek (ALL IC-BFM Trial Steering Committee 2002, Moricke és mtsai 2008). Az intratekális MTX beadására (monoterápia és triplet részeként is) minden esetben a HD-MTX infúzió végét követően, közvetlenül a liquor mintavétel után került sor.

A HD-MTX kezelést kiegészítő hidrálásra alkalikus intravénás infúzióval a kezelést megelőzően 1500 ml/m²/12 óra, a kezelés alatt illetve azt követően 3000 ml/m²/24 óra mennyiségben a kezelést követő 48-72. óráig került sor.

A protokolloknak megfelelően a MTX hatásának felfüggesztésére kalcium-leukovorint kaptak a gyermekek 15 mg/m² dózisban az infúzió kezdetétől számított 42., 48. és 54. órában. Ezt követően további leukovorin kezelésre került sor mindaddig, amíg a szérum MTX szint nem csökkent 0,25 µmol/l alá.

DNS mintát 118 betegről tudtunk gyűjteni, így farmakogenetikai elemzéseink során csak e szűkebb betegpopuláció MTX kezeléseit vettük figyelembe. Nem kerültek

be ebbe a vizsgálatba a DNS mintagyűjtés kezdete előtt exitált betegek. A vizsgálatba bevont valamennyi gyermek a magyar (kaukázusi) populációhoz tartozott, de a magyarországi statisztika alapján becsült adatok szerint 3%-uk roma származású lehetett. A szülők, a betegek kiskorúságára való tekintettel, a vizsgálathoz írásos beleegyezésüket adták. A tanulmányt a Magyar Etikai Bizottság (Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság, ETT TUKEB) jóváhagyta.

5.2 Farmakokinetikai paraméterek, toxicitás

A szérumban MTX és 7-OH-MTX szintmérésekhez az infúzió kezdetétől számított 24, 36, 48, és elhúzódozó gyógyszer elimináció esetén, további 66, 72, 96, 120 óra múlva történt a mintavétel. A liquorból az infúzió kezdetét követő 24. órában, az intratekális MTX profilaxis előtt történtek a MTX szintmérések. A MTX és 7-OH-MTX szintméréseket 1998-2006 között az Országos Onkológiai Intézet Farmakokinetikai Laboratóriumában nagy nyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel, 2006 után a Semmelweis Egyetem laboratóriumában enzim immunoassay (EIA) módszerrel végezték.

Fiziológiásan a MTX szintje a szérumban a 48. órára $0,25 \mu\text{mol/l}$ alá csökken, így további szintmérésekre, több leukovorin kezelésre nincs szükség. A betegek többségében ezért nem állt rendelkezésünkre adat a 48. órán túli MTX és 7-OH-MTX koncentrációkról, így számításaink során a 24, 36, 48. órában mért értékeket használhattuk fel. Clearance és fél-életidők számolására a rendelkezésre álló adatokból nem volt lehetőségünk. Ennek oka az, hogy a MTX ürülése legpontosabban egy biexponenciális görbével jellemezhető, ennek modellezéséhez minimum 4 időpontban szükséges a MTX szintek mérése.

A MTX és 7-OH-MTX ürülésének jellemzésére ezért egyrészt a szérumszintek átlag és medián értékeit, másrészt a három időpont szimultán változását (24h + 36h + 48h – egy célváltozóként), valamint a három mérési időpont alapján kapott koncentráció – idő görbe alatti területeket (area under the concentration – time curve, AUC) alkalmaztuk. A görbe alatti terület az extracelluláris koncentrációtól és az expozíciós időtől egyaránt függ, ezért ezzel a paraméterrel jól jellemezhető a MTX expozíció. A

görbe alatti terület közelítésére a trapezoid módszert alkalmaztuk. A meglévő pontok alapján trapézokat illesztettünk a görbéhez, és ezek területéből megbecsültük a görbe alatti terület nagyságát (AUC).

Regisztráltuk az elhúzódó MTX ürüléssel járó eseteket, azaz, ha a MTX szintje a szérumban a 48. órában a 0,25 vagy 0,5 $\mu\text{mol/l}$ értéket meghaladta.

A szérumból liquorba történő penetráció arányát a 24. órában mért liquor és szérum MTX szintek hányadosával határoztuk meg: liquor MTX_{24h}/szérum MTX_{24h}.

A toxicitás vonatkozásában regisztráltuk a kezelést megelőző (0. nap) és az infúzió kezdetét követő 1, 2. napon, valamint 7. napon mért szérum hemoglobin koncentrációt, fehérvérsejtszámot, neutrofil granulocitaszámot, trombocitaszámot, összfehérjeszintet, transzamináz enzimszinteket (GPT és GGT), bilirubin koncentrációt, kreatinin szinteket. Az értékeket nemzetközi kritériumrendszer, a National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0 scoring system (National Cancer Institute 2010), alapján kategorizáltuk, és a legsúlyosabb, 3-4-es toxicitási fokozatba sorolt mellékhatások MTX – 7-OH-MTX szérum szintekkel illetve a későbbiekben részletezett gének polimorfizmusaiával való összefüggéseit vizsgáltuk (4. táblázat).

4. táblázat. A vizsgált toxicitási kritériumok

Toxicitás	Vizsgált paraméter	Kritérium
Csontvelői toxicitás	hemoglobin koncentráció	<80 g/l
	fehérvérsejtszám	<2x10 ⁹ /l
	neutrofil granulocitaszám	<1x10 ⁹ /l
	trombocitaszám	<50x10 ⁹ /l
Hepatotoxicitás	GPT aktivitás	>200 U/l
	GGT aktivitás	>200 U/l
	bilirubin koncentráció	>50 $\mu\text{mol/l}$
Szérum összfehérjeszint		<60 g/l
Nefrotoxicitás	kreatinin szint	>100 $\mu\text{mol/l}$

5.3 Vizsgált polimorfizmusok kiválasztása, genotipizálás

A genetikai vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetében végeztük.

Az irodalom, elsősorban a teljes genomot érintő asszociációs vizsgálatok (GWAS), alapján kiválasztottunk 14 gént, amelyek kapcsolatban állnak a MTX metabolizmusával illetve a folát anyagcserével. A gének SNP-i kiválasztásának egyik fontos szempontja volt, hogy a minor allélfrekvencia >10% legyen a populációnkban. Az SNP-ket funkcionalitásuk illetve azon tulajdonságaik alapján osztályoztuk, hogy az irodalmi adatok alapján milyen kapcsolatban állhatnak a MTX farmakokinetikával. Összesen 63 SNP-t választottunk ki. Az 5. táblázatban láthatók a kiválasztott gének és SNP-k részletes adatai.

5. táblázat. A kiválasztott gének és SNP-k

SNP (rs#)	Gén	Allél (1/2)*	Pozíció**	Funkció**
rs9967368	<i>TYMS</i>	G/C	chr18:656020	near-gene-5
rs2853741	<i>TYMS</i>	C/T	chr18:657352	near-gene-5
rs2853533	<i>TYMS</i>	G/C	chr18:658064	intron
rs1004474	<i>TYMS</i>	A/G	chr18:660383	intron
rs2612100	<i>TYMS</i>	G/A	chr18:672363	intron
rs2966952	<i>MTRR</i>	C/T	chr5:7868030	near-gene-5
rs1801394	<i>MTRR</i>	G/A	chr5:7870973	missense, Ile>Met
rs326120	<i>MTRR</i>	A/G	chr5:7874847	intron
rs1532268	<i>MTRR</i>	G/A	chr5:7878179	missense, Ser>Leu
rs162036	<i>MTRR</i>	A/G	chr5:7885959	missense, Lys>Arg
rs3776455	<i>MTRR</i>	A/G	chr5:7896511	intron
rs10380	<i>MTRR</i>	C/T	chr5:7897191	missense, His>Tyr
rs11888	<i>JAK3</i>	T/C	chr19:17935626	untranslated-3
rs3212713	<i>JAK3</i>	G/A	chr19:17955001	intron
rs2842951	<i>TPMT</i>	C/T	chr6:18135683	intron
rs2518463	<i>TPMT</i>	T/C	chr6:18143769	intron

rs4449636	<i>TPMT</i>	G/A	chr6:18148019	intron
rs1979277	<i>SHMT1</i>	G/A	chr17:18232096	missense, Leu>Phe
rs12937300	<i>SHMT1</i>	C/T	chr17:18233810	intron
rs9909104	<i>SHMT1</i>	T/C	chr17:18248021	intron
rs643333	<i>SHMT1</i>	C/A	chr17:18267039	near-gene-5
rs17328763	<i>SLCO1B1</i>	T/C	chr12:21282570	near-gene-5
rs11045818	<i>SLCO1B1</i>	G/A	chr12:21329761	coding synonym, Ser>Ser
rs11045819	<i>SLCO1B1</i>	C/A	chr12:21329813	missense, Pro>Thr
rs4149056	<i>SLCO1B1</i>	T/C	chr12:21331549	missense, Val>Ala
rs11045823	<i>SLCO1B1</i>	G/A	chr12:21333745	intron
rs4363657	<i>SLCO1B1</i>	T/C	chr12:21368722	intron
rs10841769	<i>SLCO1B1</i>	G/A	chr12:21395019	unknown
rs7499	<i>SLC19A1</i>	G/A	chr21:46932328	untranslated-3
rs4819128	<i>SLC19A1</i>	T/C	chr21:46949649	intron
rs1051266	<i>SLC19A1</i>	G/A	chr21:46957794	missense, His>Arg
rs4149183	<i>SLC22A8</i>	T/C	chr11:62765869	intron
rs2276299	<i>SLC22A8</i>	A/T	chr11:62766431	coding synonym, Thr>Thr
rs3809069	<i>SLC22A8</i>	T/C	chr11:62783772	near-gene-5
rs4509706	<i>ARID5B</i>	T/C	chr10:63661340	untranslated-5
rs4948487	<i>ARID5B</i>	A/C	chr10:63669865	intron
rs10821936	<i>ARID5B</i>	T/C	chr10:63723577	intron
rs4506592	<i>ARID5B</i>	G/A	chr10:63727187	intron
rs7089424	<i>ARID5B</i>	T/G	chr10:63752159	intron
rs4948496	<i>ARID5B</i>	C/T	chr10:63805617	intron
rs4948502	<i>ARID5B</i>	T/C	chr10:63839417	intron
rs1076991	<i>MTHFD1</i>	A/G	chr14:64855041	untranslated-5
rs1950902	<i>MTHFD1</i>	C/T	chr14:64882380	missense, Lys>Arg
rs2236225	<i>MTHFD1</i>	C/T	chr14:64908845	missense, Arg>Gln
rs745686	<i>MTHFD1</i>	A/G	chr14:64930632	near-gene-5
rs310225	<i>JAK1</i>	G/A	chr1:65324683	intron

rs12063205	<i>JAK1</i>	A/G	chr1:65372052	intron
rs11208538	<i>JAK1</i>	G/C	chr1:65389289	intron
rs10280101	<i>ABCB1</i>	A/C	chr7:87153585	intron
rs2032582	<i>ABCB1</i>	G/T	chr7:87160618	missense, Ser>Thr/Ala
rs2235013	<i>ABCB1</i>	G/A	chr7:87178626	intron
rs1128503	<i>ABCB1</i>	T/C	chr7:87179601	coding synonym, Gly>Gly
rs1202179	<i>ABCB1</i>	A/G	chr7:87204279	intron
rs9282564	<i>ABCB1</i>	A/G	chr7:87229440	missense, Asn>Asp
rs1544105	<i>FPGS</i>	G/A	chr9:130562725	promoter
rs10106	<i>FPGS</i>	A/G	chr9:130576075	untranslated-3
rs4451422	<i>FPGS</i>	A/C	chr9:130576597	near-gene-3
rs12759827	<i>MTR</i>	A/G	chr1:236972186	intron
rs4659724	<i>MTR</i>	G/A	chr1:236974124	intron
rs3768142	<i>MTR</i>	T/G	chr1:237028564	intron
rs10925257	<i>MTR</i>	A/G	chr1:237046160	intron
rs1805087	<i>MTR</i>	A/G	chr1:237048500	missense, Asp>Gly
rs2853523	<i>MTR</i>	C/A	chr1:237062198	untranslated-3

*Allél a vezetőszálon: 1: major allél; 2: minor allél, **A pozíció és funkció megjelölése az NCBI Genome Build 36.0 és az UCSC Genome alapján történt: <http://genome.ucsc.edu/>.

A DNS izolálás perifériás vérmintából, remisszió során, retrospektív módon történt. Az izoláláshoz a QIAmp DNA Blood Midi Kit-et (Qiagen, Hilden, Németország) használtuk, munkánk során a gyártó előírásait követtük. A DNS izolálás EDTA-s csőbe gyűjtött, átlagosan 2 ml mennyiségű vérmintából történt. A protokoll alapján 2 ml vérmintához 200 µl Protein K oldatot adtunk, majd alapos összerázás után 2,4 ml AL pufferrel forgattuk össze. A lizátumhoz 10 perces 70 °C-os inkubálás után 2 ml 96%-os etanolt adtunk, jól összeráztuk, majd felvittük az oszlopra. Az elegyet több lépésben 3 percig 300 rpm sebességgel centrifugáltuk, a lecentrifugált részt (filtrátumot, alsó folyadék részt) mindig előntve. Ezt követően az oszlopot először 2 ml AW1 pufferrel (1 perces centrifugálással, 5000 rpm sebeséggel), majd 2 ml AW2

pufferoldattal (15 perces centrifugálással, 5000 rpm sebességgel) mostuk át. Az oszlopon maradt DNS leoldásához, 300 µl AE puffert vagy desztillált vizet adtunk az oszlophoz, majd 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően 2 perc 5000 rpm sebességű centrifugálás következett. A maximális hozam érdekében ezt az utolsó lépést még egyszer ajánlott elvégezni. A DNS minta koncentrációját és tisztaságát ezután NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) készülékkel határoztuk meg.

A genotipizálás Sequenom iPLEX Gold MassARRAY technológiával a kanadai McGill Egyetem és Génome Québec Innovációs Központban (Montréal) történt. A DNS minták genotipizálási feltétele a 30 µl térfogat és a 20 µg/µl koncentráció volt. A módszer alapja a nagy specificitású és érzékeny tömegspektrometriás detektálással történő multiplex PCR reakció. A genotipizálás első lépése a kísérlet megtervezése, azaz a szükséges PCR és extenziós primerpárok tervezése a mintaszám és a meghatározni kívánt markerek függvényében. Az amplifikációs lépést, a multiplex PCR-t követően a nem kötődött, feleslegben lévő dezoxi-nukleotid (dNTP) molekulákat defoszforilálják a SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) enzimmel, hogy elkerüljék a tömegspektrumon megjelenő álcúcsok keletkezését. Ezek után egy templát (minta) által irányított egy bázispárnai extenziós (SBE) lánctermináció megy végbe a próba felhasználásával (iPlex reakció). Az így kapott mintát átviszik egy ún. SpectroCHIP® bioarray-re, amin a reakciótermékek (PCR) elválasztása és detektálása történik egy mátrix közvetítésével végzett lézer deszorpciós ionizációs tömegspektrometriai (MALD-TOF MS) technikával az egyes nukleotidok eltérő tömege alapján. Az így kapott tömegspektrumot egy előhívó szoftver dolgozza fel és alakítja át számunkra is értelmezhető genotípus információvá.

5.4 Statisztikai analízis

Farmakokinetika

A farmakokinetikai és toxicitási elemzéseket a StatSoft STATISTICA (7.0 verzió) programmal végeztük. A 24 órás 7-OH-MTX, AUC MTX és AUC 7-OH-MTX értékek normál eloszlást mutattak. A többi nem normális eloszlású paramétert logaritmus transzformációval normális eloszlásúvá alakítottuk. Abban az esetben, ha a

változó eloszlása továbbra sem felelt meg a normál eloszlás követelményeinek, nem parametrikus próbákat (Mann-Whitney U, chi-négyzet, Wilcoxon-próba, és Spearman korreláció), máskülönben parametrikus tesztek (Student t-teszt, Pearson korreláció) alkalmaztunk. Szignifikancia szintnek a $p < 0,05$ értéket tekintettük. A többszörös összehasonlítások során a p érték Bonferroni korrekcióját alkalmaztuk.

Farmakogenetika

Az allélfrekvenciát allélszámolással határoztuk meg. A Hardy-Weinberg egyensúly meglétét chi-négyzet teszttel ellenőriztük (online elérhető: <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>). Az egyensúlytól való eltérést $p < 0,05$ érték esetén állapítottuk meg. Ha a vizsgált SNP domináns és recesszív alléljainak gyakorisága különbözött a Hardy-Weinberg egyensúly alapján várttól, az SNP-t nem vontuk be a statisztikai elemzésbe. Mindezek alapján összesen 4 SNP-t zártunk ki a vizsgálatból. A vizsgált SNP-k genotípus megoszlását és az allélfrekvenciát a 6. táblázat szemlélteti.

6. táblázat. A vizsgált SNP-k genotípusa és allélfrekvenciája

SNP (rs#)	Genotípus gyakoriság ^a			Allélfrekvencia ^b	
	vt	het	var	p	q
rs9967368	0,37 (41)	0,52 (58)	0,11 (12)	0,63	0,37
rs2853741	0,50 (58)	0,43 (49)	0,07 (8)	0,72	0,28
rs2853533	0,77 (88)	0,19 (22)	0,04 (4)	0,87	0,13
rs1004474	0,34 (39)	0,49 (56)	0,17 (20)	0,58	0,42
rs2612100	0,48 (55)	0,40 (46)	0,12 (14)	0,62	0,38
rs2966952	0,69 (79)	0,29 (33)	0,03 (3)	0,83	0,17
rs1801394	0,30 (35)	0,45 (52)	0,24 (28)	0,53	0,47
rs326120	0,68 (78)	0,30 (34)	0,03 (3)	0,83	0,17
rs1532268	0,39 (45)	0,48 (55)	0,13 (15)	0,63	0,37
rs162036	0,83 (96)	0,16 (18)	0,01 (1)	0,91	0,09
rs3776455	0,43 (46)	0,50 (53)	0,07 (8)	0,68	0,32

rs10380	0,88 (100)	0,11 (13)	0,01 (1)	0,93	0,07
rs11888	0,35 (40)	0,54 (62)	0,11 (13)	0,62	0,38
rs3212713	0,52 (60)	0,43 (49)	0,05 (6)	0,73	0,27
rs2842951	0,54 (61)	0,37 (42)	0,10 (11)	0,72	0,28
rs2518463	0,27 (31)	0,47 (54)	0,26 (30)	0,5	0,5
rs4449636	0,27 (31)	0,47 (54)	0,26 (30)	0,5	0,5
rs1979277	0,50 (57)	0,43 (50)	0,07 (8)	0,71	0,29
rs12937300*	1 (115)	0	0	1	0
rs9909104	0,64 (73)	0,28 (32)	0,08 (9)	0,78	0,22
rs643333	0,52 (59)	0,43 (49)	0,05 (6)	0,73	0,27
rs17328763	0,74 (84)	0,21 (24)	0,04 (5)	0,85	0,15
rs11045818	0,74 (84)	0,23 (26)	0,03 (3)	0,86	0,14
rs11045819	0,74 (81)	0,28 (25)	0,03 (3)	0,86	0,14
rs4149056	0,67 (76)	0,31 (35)	0,03 (3)	0,82	0,18
rs11045823	0,74 (84)	0,23 (26)	0,03 (3)	0,86	0,14
rs4363657	0,64 (74)	0,33 (38)	0,03 (3)	0,81	0,19
rs10841769	0,26 (30)	0,51 (59)	0,23 (26)	0,52	0,48
rs7499	0,28 (32)	0,52 (60)	0,20 (23)	0,54	0,46
rs4819128	0,25 (29)	0,53 (61)	0,22 (25)	0,52	0,48
rs1051266	0,25 (29)	0,55 (63)	0,20 (23)	0,53	0,47
rs4149183	0,54 (62)	0,39 (45)	0,07 (8)	0,73	0,27
rs2276299	0,75 (86)	0,21 (24)	0,04 (5)	0,85	0,15
rs3809069	0,66 (76)	0,32 (37)	0,02 (2)	0,82	0,18
rs4509706	0,84 (97)	0,16 (18)	0	0,92	0,08
rs4948487	0,25 (28)	0,57 (65)	0,18 (21)	0,53	0,47
rs10821936	0,30 (34)	0,57 (65)	0,14 (16)	0,58	0,42
rs4506592	0,30 (35)	0,55 (63)	0,15 (17)	0,58	0,42
rs7089424	0,30 (349)	0,57 (65)	0,14 (16)	0,58	0,42
rs4948496	0,28 (32)	0,50 (58)	0,22 (25)	0,53	0,47
rs4948502	0,48 (55)	0,39 (45)	0,13 (15)	0,67	0,33

rs1076991	0,25 (29)	0,51 (59)	0,23 (27)	0,51	0,49
rs1950902	0,66 (76)	0,33 (38)	0,01 (1)	0,83	0,17
rs2236225	0,40 (46)	0,40 (46)	0,20 (23)	0,6	0,4
rs745686	0,49 (56)	0,39 (45)	0,12 (14)	0,68	0,32
rs310225	0,53 (60)	0,40 (46)	0,07 (8)	0,73	0,27
rs12063205	0,78 (90)	0,19 (22)	0,03 (3)	0,88	0,12
rs11208538*	1 (115)	0	0	1	0
rs10280101*	0,90 (89)	0,08 (8)	0,02 (2)	0,94	0,06
rs2032582	0,35 (40)	0,41 (46)	0,24 (27)	0,56	0,44
rs2235013	0,27 (30)	0,45 (51)	0,28 (32)	0,49	0,51
rs1128503*	1 (115)	0	0	1	0
rs1202179	0,51 (59)	0,40 (46)	0,09 (10)	0,71	0,29
rs9282564	0,82 (93)	0,16 (18)	0,02 (2)	0,9	0,1
rs1544105	0,36 (41)	0,46 (53)	0,18 (20)	0,59	0,41
rs10106	0,38 (42)	0,46 (51)	0,17 (19)	0,6	0,4
rs4451422	0,36 (35)	0,49 (48)	0,14 (14)	0,61	0,39
rs12759827	0,55 (63)	0,39 (44)	0,06 (7)	0,75	0,25
rs4659724	0,40 (43)	0,50 (54)	0,10 (11)	0,65	0,35
rs3768142	0,32 (36)	0,55 (63)	0,13 (15)	0,59	0,41
rs10925257	0,64 (73)	0,33 (38)	0,03 (3)	0,81	0,19
rs1805087	0,64 (73)	0,33 (38)	0,03 (3)	0,81	0,19
rs2853523	0,33 (38)	0,55 (64)	0,11 (13)	0,61	0,39

^aAz adatok a gyakoriságot, zárójelben a betegek számát jelzik. vt: homozigóta vad típusú beteg; het: heterozigóta variáns beteg; var: homozigóta variáns beteg, ^bAz allél frekvenciák Hardy-Weinberg-féle jelölése; p: a vad típusú (domináns) allél gyakorisága; q: a variáns (recesszív) allél gyakorisága, *Az allél frekvencia eltér a Hardy-Weinberg egyensúlytól

A farmakokinetikai – toxicitási paraméterek és az SNP-k közötti kapcsolatot az R (2.15 verzió) programmal elemeztük (R Development Core Team 2010).

Magyarázó változóként a betegek jellemzőit, prognosztikai tényezőket (nem, életkor, ALL immunfenotípus, rizikó csoport, kezelési protokoll), az alkalmazott MTX dózist (2 vagy 5 g/m²), az egyes betegek MTX kezeléseinek számát (1-4), a MTX koncentráció mérésének módját (HPLC vagy EIA) és az 59 SNP-t mind figyelembe vettük az elemzés során.

A relatív kevés mérési időpont és a nagyszámú magyarázó változó miatt az elemzéseket egy időpontenkénti random forest (RF) elemzéssel (Strobl és mtsai 2008) kezdtük, amellyel kiválogattuk az egyes célváltozók esetén a szóba jöhető magyarázó változókat. A RF elemzést a *party* csomag (1.0-6. verzió) *cforest* függvényével végeztük (Hothorn 2013, Strobl és mtsai 2008). A random módon kiválasztott változók száma (*mtry*) megegyezett a mintaszám négyzetgyökével (\sqrt{n}). A fák száma (*ntree*) 1000 volt. A vágási ponthoz szükséges teszt-statisztika (1-p) értéke (*mincriterion*) 0,8 volt. A RF segítségével változószelekciót végeztünk; az összes magyarázó változó közül kiválasztottuk a fontosnak tartott változókat, amelyeket azután a későbbi elemzésekben felhasználtunk. Fontosnak, illetve informatívnak tekintettünk egy változót, ha értéke meghaladta a legalacsonyabb negatív értékű változó abszolút értékét (Strobl és mtsai 2009).

Következő lépésben, a RF eredményeként kapott változókkal klasszifikációs és regressziós döntési fákat (CART) állítottunk (Strobl és mtsai 2009). Ezzel a módszerrel tovább finomítottuk a változószelekciót feltárva az esetleges interakciókat is. A CART elemzést a *party* csomag *ctree* függvényével végeztük (Hothorn és mtsai 2006). A vágási ponthoz szükséges teszt-statisztika (1-p) értéke (*mincriterion*) 0,95 volt. A vágáshoz szükséges minimum elemszám a leveleken (*minsplit*) 2 volt. A terminális leveleken a minimális elemszám (*minbucket*) 1 volt. A CART során már lehetőségünk adódott az egy célváltozóhoz tartozó különböző mérési időpontokban mért értékeket együttesen elemezni. A CART eredményeként létrejött fán azok a magyarázó változók ábrázolódnak, melyek befolyásolhatják (önállóan és/vagy interakcióban más változókkal) a célváltozót. A CART automatikusan felismeri az interakciókat, és a nem-linearitás sem probléma az elemzés során.

Elemzéseink utolsó lépésében lineáris kevert modelleket illesztettünk a korábbi lépések során kiválogatott genetikai magyarázó változókkal, illetve a demográfiai paraméterekkel. Ebben a modellben már lehetőség volt arra, hogy az adatokban lévő

korrelációs struktúrát (azonos betegeken végzett ismételt mérések) figyelembe vesszük, úgyhogy ezen elemzés eredményét tekintettük véglegesnek, illetve a CART technikával felépített döntési fa megerősítésének. A logaritmikusan transzformált MTX és 7-OH-MTX szintek és az SNP-k közötti összefüggés esetén általános lineáris kevert modellt (GLMM), a binomiális toxicitási változók és az SNP-k közötti különbség esetén általánosított lineáris kevert modellt (GzLMM) alkalmaztunk (Bates és mtsai 2012, Pinheiro és Bates 2000). A toxicitás – genotípus összefüggéseket a betegek által kapott MTX dózis alapján, az 5 és 2 g/m² csoportokban külön elemeztük. A modellek illeszkedését az F-értékkel (GLMM) és a likelihood arány teszttel (GzLMM) vizsgáltuk. Szignifikancia szintnek a $p < 0,05$ értéket tekintettük. A modellek hatáserejét jellemző ún. pseudo-R² értékeket Nakagawa és Schielzeth (2013) szerint határoztuk meg. A marginális $[R^2_{GLMM(m)}]$ és kondicionális $[R^2_{GLMM(c)}]$ R² értékeket egyaránt meghatároztuk. Az esélyhányadosok (OR) 95%-os konfidencia intervallumát (95% CI) Wald-féle módszerrel határoztuk meg (Agresti 2002).

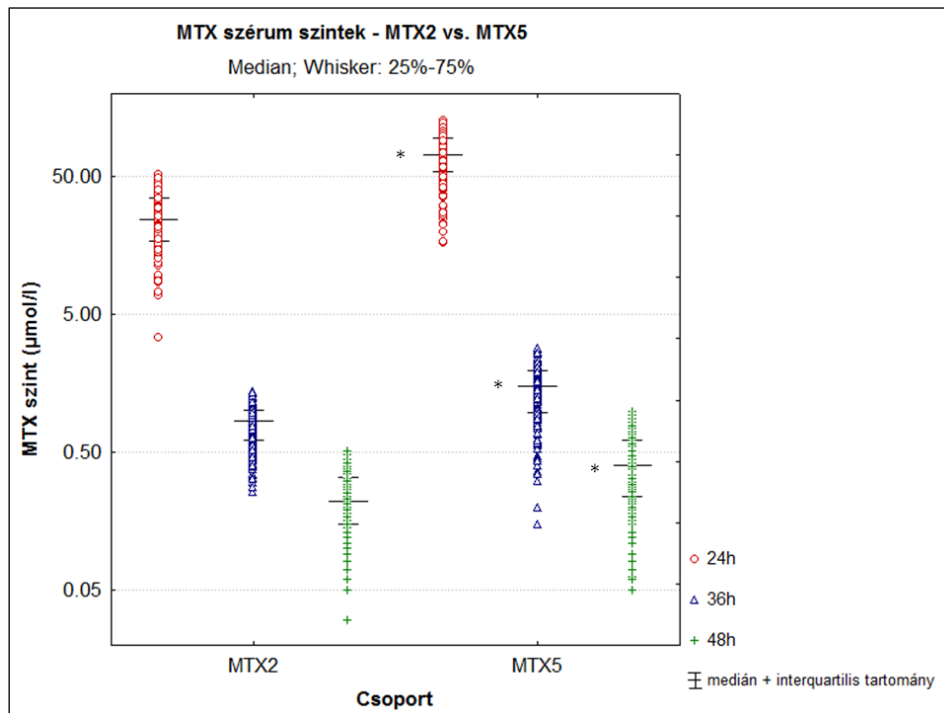
A lineáris kevert modellek statisztikai erejét az *nlmeU* csomag (0.70-3. verzió) *Pwr* függvényével határoztuk meg (Galeczki és Burzikovszky 2013). A modellek statisztikai ereje 62-86% volt.

6. Eredmények

6.1 Farmakokinetika

6.1.1 Szérum MTX, 7-OH-MTX koncentráció

A szérum MTX és 7-OH-MTX szintek a 24, 36, 48. órában szignifikánsan magasabbak voltak az 5 g/m²/24 óra dózist (MTX5) kapott gyermekek HD-MTX kezelése során ($p < 0,0001$, 6. ábra, 7. táblázat). A szérumszintek minkét csoportban jelentős inter- és intraindividuális különbségeket mutattak. A számított AUC_{MTX} és $AUC_{7-OH-MTX}$ értékek szintén szignifikánsan magasabbak voltak az MTX5 csoportban ($p < 0,0001$). A 48 órás szérum MTX koncentráció $>0,25 \mu\text{mol/l}$ volt az MTX5 kezelések 72,20%, az MTX2 kezelések 44,44%-ában ($p < 0,0001$), $>0,5 \mu\text{mol/l}$ volt az MTX5 esetek 33,20%, az MTX2 kezelések 12,57%-ában ($p < 0,0001$).



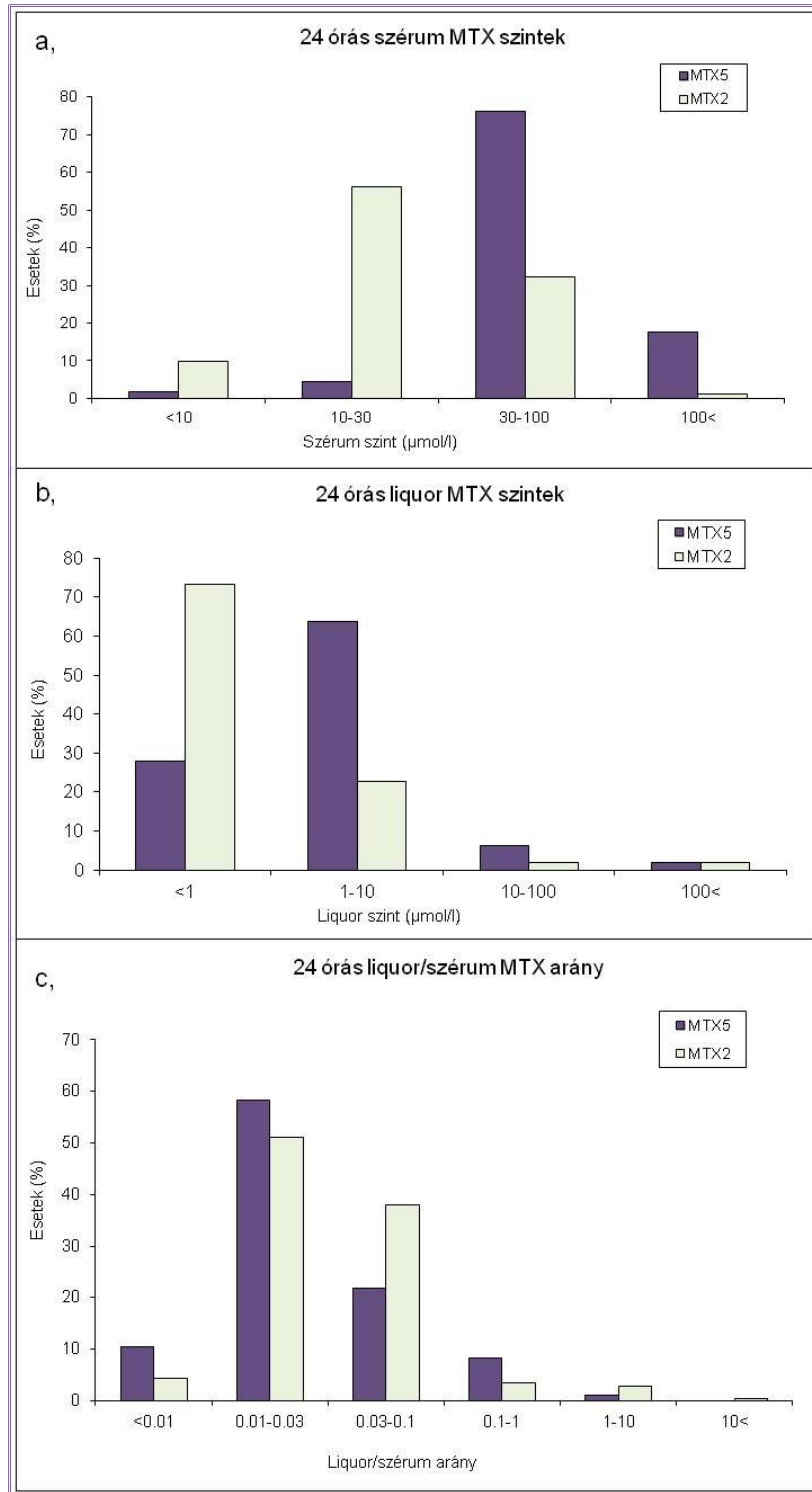
6. ábra. Szérum MTX szintek az MTX2 és MTX5 csoportban. *Az MTX5 csoportban mindhárom időpontban (24, 36, 48. óra) szignifikánsan magasabb szérum MTX szinteket mértünk ($p < 0,0001$).

7. táblázat. MTX és 7-OH-MTX szérum és liquor szintek a HD-MTX kezeléseket követően

	24h ($\mu\text{mol/l}$)	36h ($\mu\text{mol/l}$)	48h ($\mu\text{mol/l}$)	AUC	Liquor ($\mu\text{mol/l}$)
MTX					
5 g/m²/24h (n=241)	72,26* (54,04-95,33)	1,51* (0,99-2,01)	0,4* (0,24-0,63)	1319,34* (990-1732,2)	1,7* (0,99-2,78)
2 g/m²/24h (n=342)	24,77 (17,19-34,93)	0,84 (0,62-1,01)	0,22 (0,15-0,33)	455,85 (318,42-646,32)	0,62 (0,48-1,04)
7-OH-MTX					
5 g/m²/24h (n=124)	21,36* (14,11-32,48)	5,47* (3,25-8,84)	2,11* (1,11-3,34)	468,99* (307,23-708,15)	NM,
2 g/m²/24h (n=127)	9,11 (7,06-12,89)	3,87 (2,66-5,11)	1,38 (1,04-1,93)	227,1 (167,76-295,02)	NM,

Az adatok medián (interkvartilis tartomány) értékeit jelölnék. n: vizsgált MTX kezelések száma, NM: nem mért, *A MTX és 7-OH-MTX szintek a szérumban, liquorban, és az AUC_{MTX} és AUC_{7-OH-MTX} értékek szignifikánsan magasabbak az MTX5 csoportban.

Az ajánlott terápiás tartományt [10-100 $\mu\text{mol/l}$ a 24. órában (Lennard 1999, Xu és mtsai 2007)] az MTX2 kezelések szignifikánsan kevesebb esetben érték el, mint az MTX5 esetén. A 24 órás MTX szintek az MTX2 kezelések 9,88%-ában, az MTX5 kezelések 1,67%-ában alacsonyabbak voltak a kívánt 10 $\mu\text{mol/l}$ értéknél ($p=0,0007$). Az MTX5 kezelések legnagyobb részében a 24 órás MTX szint 30-100 $\mu\text{mol/l}$ közé esett. Ezt a tartományt az MTX2 kezelések során szignifikánsan ritkábban érte el a MTX szérumszintje (MTX5: 76,15% vs. MTX2: 32,33%, $p<0,0001$). A 100 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációt az MTX5 kezelések 17,57%-ában, az MTX2 kezelések 1,19%-ában haladta meg a MTX szintje ($p<0,0001$, 7.a ábra).



7. ábra. A szérumszint és liquor MTX szintek megoszlása a két csoportban. (a) A 24 órás szérumszintek megoszlása a két csoportban. (b) A 24 órás liquor MTX szintek megoszlása a két csoportban. (c) Liquor MTX_{24h}/szérumszint MTX_{24h} arány a két csoportban.

Megvizsgáltuk, hogy az ismételt kapott kezelések során megfigyelhető-e a MTX, 7-OH-MTX szérumszintek növekedése vagy csökkenése. Egyik csoportban sem találtunk szignifikáns különbséget a MTX és 7-OH-MTX szérumszinteket összehasonlítva az 1-4. kezelést követően. Az AUC_{MTX} és $AUC_{7-OH-MTX}$ értékek szintén változatlanok maradtak mindkét csoportban. A liquor MTX koncentráció sem változott az 1-4. kezelések után.

6.1.2 Liquor MTX koncentráció

A két csoport között megfigyelhető jelentős különbség a szérum MTX szinteket összehasonlítva, a liquor MTX szinteket is jellemezte (7. táblázat). A liquor MTX szintek az MTX5 kezeléseket követően szignifikánsan magasabbak voltak ($p < 0,0001$). Az MTX 5 csoportban a medián liquor MTX szint $1,7 \mu\text{mol/l}$ (95% CI: $1,41-2,09$; interkvartilis tartomány: $0,99-2,78 \mu\text{mol/l}$), az MTX2 csoportban $0,62 \mu\text{mol/l}$ (95% CI: $0,59-0,88$; interkvartilis tartomány: $0,48-1,04 \mu\text{mol/l}$) volt. A liquor MTX szinteket jelentős jelentős inter- és intraindividuális különbségek jellemezték. A liquor MTX szintek megoszlását tekintve az MTX2 kezeléseknél legnagyobb részében (73,33%) a liquor koncentráció nem érte el a citotoxicitás határának tekintett $1 \mu\text{mol/l}$ értéket. Az MTX5 kezeléseknél legnagyobb részében a liquor koncentráció $1-10 \mu\text{mol/l}$ közé esett (MTX5: 63,92% vs. MTX2: 22,72%, $p < 0,0001$). Az MTX5 kezeléseknél 8,25%-ában, az MTX2 kezeléseknél 3,92%-ában a liquor MTX koncentráció meghaladta a $10 \mu\text{mol/l}$ értéket (7.b ábra).

A szérumból liquorba történő penetráció aránya $1-3\%$ közé esett az MTX5 kezeléseknél 58,33%-ában és az MTX2 kezeléseknél 50,99%-ában (7.c ábra). A liquorba történő penetráció aránya nem különbözött szignifikánsan a két csoportban. A liquor MTX_{24h}/szérum MTX_{24h} hányados értéke hasonló volt a két csoportban: MTX5: 2,3% (95% CI: $1,7-2,5\%$) vs. MTX2: 2,8% (95% CI: $2,4-3\%$). A liquorba történő penetráció aránya tehát függetlennek bizonyult az alkalmazott dózistól, amelyet a MTX, 7-OH-MTX és liquor MTX szintek közötti korrelációelemzés eredménye is alátámasztott. A 24 órás szérum és liquor MTX szintek között mindkét csoportban

szignifikáns korreláció állt fent (MTX5: Spearman $r=0,36$, $p=0,0002$; MTX2: Spearman $r=0,38$, $p<0,0001$).

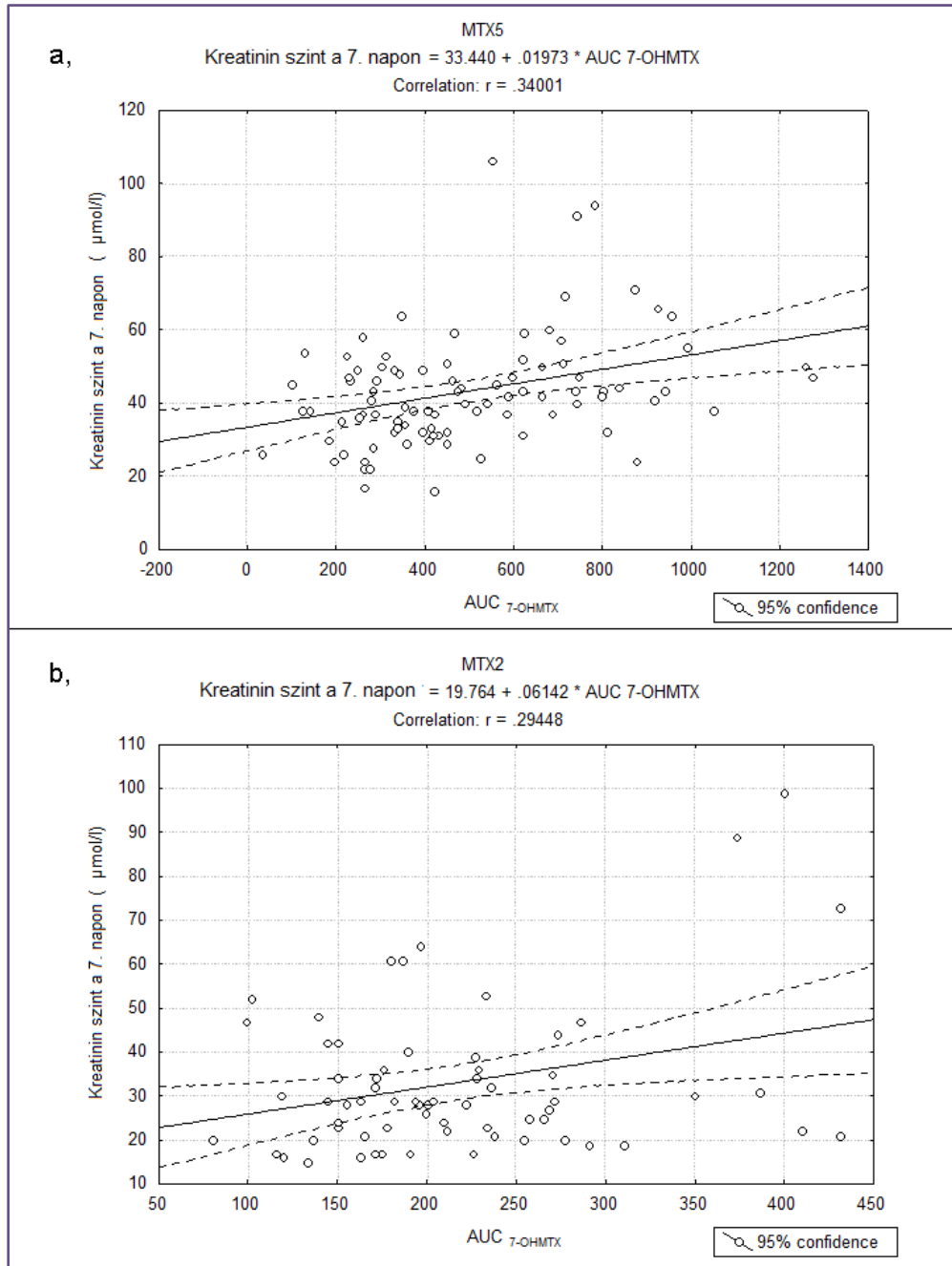
6.1.3 Toxicitás

A kezeléseket ritkán követte súlyos (\geq grade 3) toxicitás. A kezelést követő 1-7. napon az MTX5 csoportban szignifikánsan gyakrabban fordult elő hepatotoxicitás (grade 3-4, emelkedett GPT, GGT szint vagy bilirubin koncentráció): MTX5: 12,4% (22/178 kezelés) vs. MTX2: 5,3% (15/283 kezelés), $p=0,006$. A HD-MTX kezelést követő 7. napon szignifikánsan gyakrabban regisztráltunk leuko- és granulocitopéniát (grade 3-4) az MTX5 csoportban: MTX5: 36,9% (57/155 kezelés) vs. MTX2: 15,5% (41/265 kezelés), $p<0,0001$. Az 1-2. napon a szérum összfehérjeszintek csökkenését tapasztaltuk mindkét csoportban: MTX5: 49,4% (87/176 kezelés) vs. MTX2: 59,4% (165/278 kezelés), $p=0,08$. Az 1-7. napon ritkán fordult elő súlyos (grade 3-4) kreatinin szint emelkedés az MTX5 csoportban, és nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között: MTX5: 3,2% (5/155 kezelés) vs. MTX2: 1,9% (4/208 kezelés), $p=0,50$.

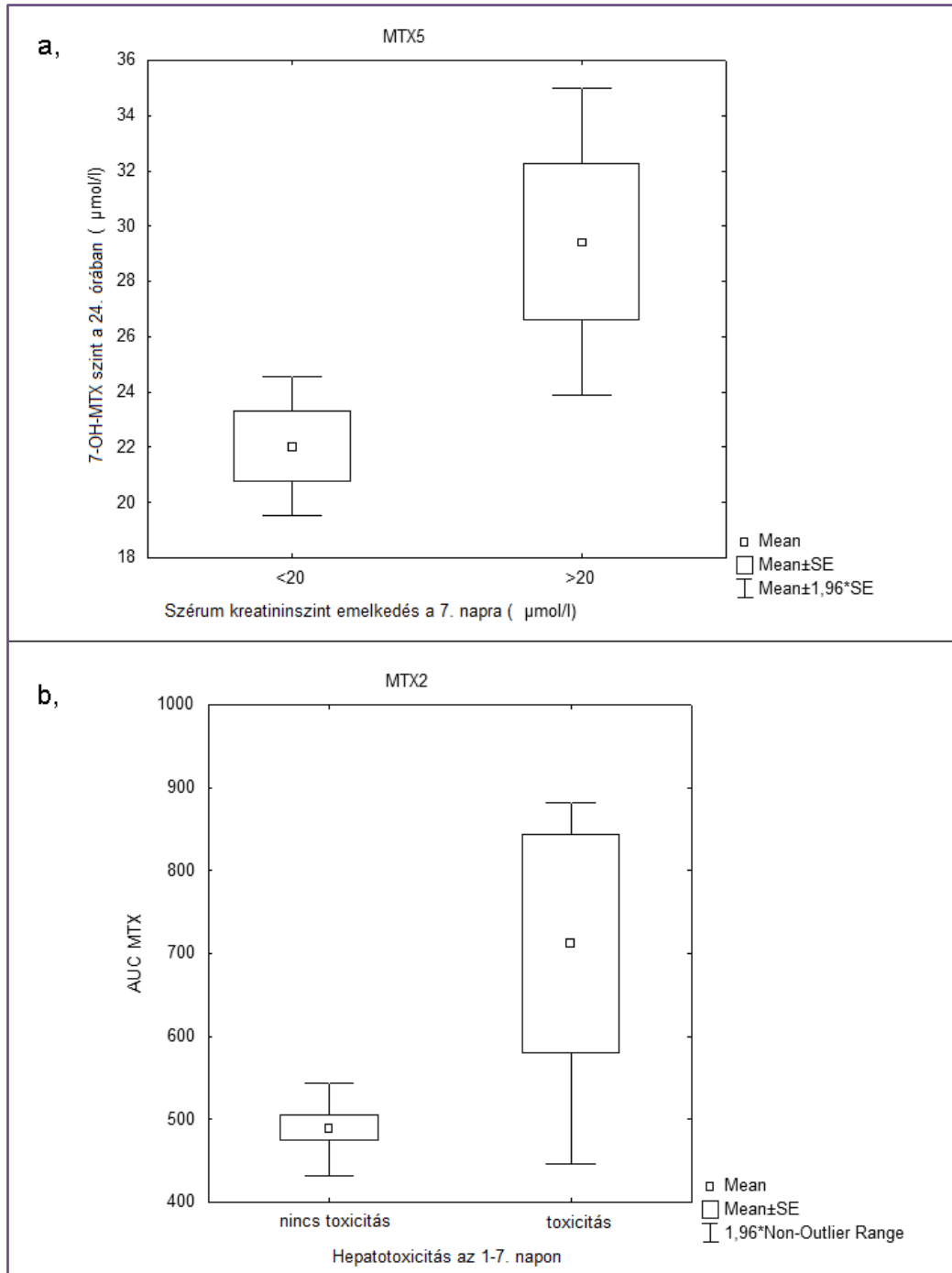
Az MTX5 csoportban a 24 órás 7-OH-MTX szintek szignifikáns korrelációt mutattak az 1-2. napon (Pearson $r=0,42$, $p<0,0001$) és 7. napon (Pearson $r=0,36$, $p<0,0001$) mért legmagasabb kreatinin értékekkel. Az $AUC_{7-OH-MTX}$ értékek korreláltak az 1-2. napon mért legmagasabb kreatinin szintekkel az MTX5 csoportban (Pearson $r=0,41$, $p<0,001$), és a 7. napi kreatinin szintekkel mindkét csoportban (MTX5: Pearson $r=0,34$, $p=0,001$; MTX2: Pearson $r=0,29$, $p=0,016$, 8.a,b ábra). Nem találtunk korrelációt a 7-OH-MTX szintek és a kialakult hepato-, mielotoxicitás között.

Azokban az esetekben, amelyekben a 7. napon mért kreatinin szintek a kiindulási értékhez képest több, mint 20 $\mu\text{mol/l}$ -rel emelkedtek, magasabb 24 órás 7-OH-MTX szinteket regisztráltunk, ennek ellenére a kreatinin szintemelkedés és a 7-OH-MTX szintek közötti összefüggés nem bizonyult szignifikánsnak ($p=0,07$, 9.a ábra).

Nem állt fent lineáris korreláció a MTX farmakokinetikai paraméterei és a kezelés után kialakult mellékhatások között. Az MTX2 csoportban azonban azokban az esetekben, amelyekben az 1-7. napon hepatotoxicitás alakult ki, szignifikánsan magasabb AUC_{MTX} értékeket regisztráltunk, mint azokban, amelyekben nem alakult ki hepatotoxicitás ($p=0,005$, 9.b ábra).



8. ábra. Korreláció az AUC_{7-OH-MTX} és a 7. napon mért szérum kreatinin szintek között. (a) Az MTX5 csoportban (p=0,001). (b) Az MTX2 csoportban (p=0,016).



9. ábra. Korreláció a MTX, 7-OH-MTX szintek és a toxicitás között. (a) A szérum 7-OH-MTX szintek összefüggést mutattak a kreatinin szintemelkedéssel (7. nap vs. 0. nap <20 $\mu\text{mol/l}$ vs. >20 $\mu\text{mol/l}$, $p=0,07$). (b) Az AUC_{MTX} szignifikánsan magasabb volt azokban az esetekben, amelyekben hepatotoxicitás alakult ki ($p=0,005$).

6.1.4 Farmakokinetika és toxicitás a különböző korcsoportokban (<6 év és >14 év) és nemek szerint

Mindkét terápiás csoportban (MTX5 és MTX2) a 48 órás szérumban MTX szintek magasabbak voltak a >14 éves gyermekekben, mint a <6 évesekben (MTX5: >14 év: 0,54 $\mu\text{mol/l}$, 95% CI: 0,42-0,92 $\mu\text{mol/l}$ vs. <6 év: 0,37 $\mu\text{mol/l}$, 95% CI: 0,31-0,40 $\mu\text{mol/l}$, $p=0,0013$; MTX2: >14 év: 0,30 $\mu\text{mol/l}$, 95%CI: 0,21-0,38 $\mu\text{mol/l}$ vs. <6 év: 0,19 $\mu\text{mol/l}$, 95%CI: 0,18-0,20 $\mu\text{mol/l}$, $p=0,0021$). A 48 órás MTX koncentráció mindkét csoportban szignifikánsan gyakrabban haladta meg a 0,5 $\mu\text{mol/l}$ értéket a >14 évesekben [MTX5: >14 év: 63% (17/27 kezelés) vs. <6 év: 31,2% (39/125 kezelés), $p=0,019$; MTX2: >14 év: 21,7% (5/23 kezelés) vs. <6 év: 7,6% (17/223 kezelés), $p=0,003$].

Az MTX5 csoportban szignifikánsan gyakrabban találtunk toxikus kreatinin szinteket a >14 éves gyermekekben a kezelést követő 1-2. napon [>14 év: 12% (3/24 kezelés) vs. <6 év: 0,8% (1/120 kezelés), $p=0,019$] és a 7. napon [>14 év: 16,7% (4/24 kezelés) vs. <6 év: 2,1% (2/95 kezelés), $p=0,014$].

Az MTX2 csoportban a >14 évesek között szignifikánsan gyakrabban fordult elő hepatotoxicitás az 1-2. napon [>14 év: 8,7% (2/23 kezelés) vs. <6 év: 0,5% (1/222 kezelés), $p=0,024$].

A két csoportban (MTX5 és MTX2) külön-külön megvizsgáltuk a lányok és fiúk közötti különbséget a MTX és 7-OH-MTX farmakokinetikáját tekintve. Az MTX5 csoportban nem találtunk szignifikáns különbséget a két nem között. Az MTX2 csoportban a 24 órás MTX szintek és az AUC_{MTX} értékek szignifikánsan magasabbak voltak a lányok HD-MTX kezeléseit követően ($p=0,001$ és $p=0,002$). A 24 órás MTX medián értéke lányokban ($n=120$ kezelés) 27,79 $\mu\text{mol/l}$ (95%CI: 25,32-30,06 $\mu\text{mol/l}$) vs. fiúkban ($n=213$ kezelés) 22,62 $\mu\text{mol/l}$ (95% CI: 20,84-24,77 $\mu\text{mol/l}$) volt. Ugyanebben a csoportban az AUC_{MTX} értéke lányokban ($n=120$ kezelés) 510,24 (95% CI: 464,82-563,82) vs. fiúkban ($n=210$ kezelés) 422,43 (388,08-449,64) volt. A 48 órás MTX szinteket és az elhúzó MTX ürülést összehasonlítva azonban nem találtunk szignifikáns különbséget a két nem között.

6.2 Farmakogenetika

Az összes beteg közül 118-tól tudtunk DNS mintát gyűjteni, ezért ezen szűkebb betegpopuláción végeztük farmakogenetikai vizsgálatainkat. A 118 gyermek demográfiai tulajdonságait, MTX kezeléseinek jellemzőit a 8. táblázat szemlélteti.

8. táblázat. A farmakogenetikai vizsgálatokba bevont gyermekek és MTX kezelések jellemzői

Jellemzők		Érték	
Betegek száma		118	
Nem n (%)	Fiú	74 (62,7)	
	Lány	44 (37,3)	
Átlagéletkor		6,4 (1,1-18) év	
Protokoll n (%)	ALL-BFM 95	25 (21,2)	
	ALL IC-BFM 2002	93 (78,8)	
Rizikó csoport n (%)	SR	38 (32,2)	
	MR	60 (50,8)	
	HR	20 (17)	
Immunfenotípus n (%)	B-ALL	95 (80,5)	
	T-ALL	21 (17,8)	
	bifenotípusos	2 (1,7)	
MTX dózis n (%)	MTX5	betegek száma	48 (40,7)
		MTX kezelések száma	178 (38,4)
	MTX2	betegek száma	70 (59,3)
		MTX kezelések száma	285 (61,6)
MTX kezelések száma összesen		463	

MTX5: 5 g/m²/24 óra, MTX2: 2 g/m²/24 óra

6.2.1 MTX és 7-OH-MTX szintek

A szérumban MTX és 7-OH-MTX szintek esetén a random forest (RF) elemzést az egyes időpontokra (24, 36, 48. óra) és az AUC_{MTX} -ra, mint célváltozókra, külön-külön elvégeztük.

A RF alapján kiválasztottuk azokat a magyarázó változókat, amelyek összefüggést mutattak a szérumban MTX szintek valamelyikével (24 órás és/vagy 36 órás és/vagy 48 órás) és/vagy az AUC_{MTX} -tal. Ezek a következők voltak: az alkalmazott MTX dózis (5 vagy 2 g/m²), ALL immunfenotípus, rizikó csoport, életkor, az rs2612100, rs2236225, rs1004474, rs9967368, rs7499, rs7089424, rs10821936, rs4506592, rs1076991, rs745686, rs4948496, rs1801394, rs4363657, rs4149056 és az rs1202179.

A klasszifikációs és regressziós fák (CART) felépítése során a 24, 36 és 48. órás MTX szintek változását egyszerre, egy közös célváltozóval (MTX 24h + 36h + 48h) modelleztük. A szérumban MTX és AUC_{MTX} esetén a CART felépítéséhez az előbb felsorolt, RF alapján kiválasztott magyarázó változókat használtuk fel.

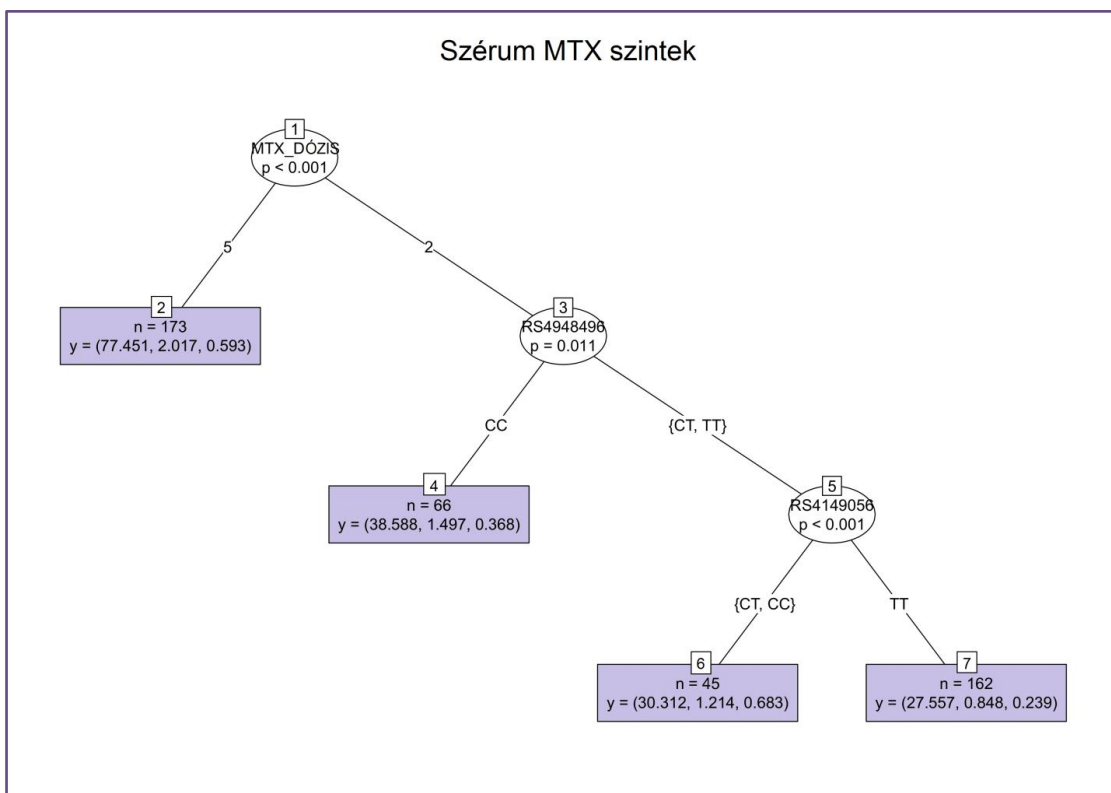
A szérumban MTX (24h + 36h + 48h) szint CART eredménye alapján az alkalmazott MTX dózis (5 vagy 2 g/m²) befolyásolta leginkább a MTX szinteket ($p < 0,001$, 10. ábra). Ez összhangban állt a korábbi, farmakokinetikai elemzések során kapott eredményünkkel, melynek során szignifikáns különbség állt fent a két különböző dózisú kezelést kapottak körében, minden egyes időpontban mért MTX koncentrációt összehasonlítva. Azokban a betegekben, akik 2 g/m² MTX-ot kaptak, az rs4948496 (*ARID5B* gén) szintén szignifikáns összefüggést mutatott a kialakult szérumszintekkel ($p = 0,011$, 11. ábra). A CC genotípussal rendelkezőkben magasabb szérumszinteket találtunk, mint a CT+TT genotípussal rendelkezőkben. Azokban a betegekben, akik 2 g/m² MTX-ot kaptak, és az rs4948496 CT+TT genotípussal rendelkeztek, egy további SNP, az rs4149056 (*SLCO1B1* gén) szintén szignifikáns összefüggést mutatott az MTX szintekkel ($p < 0,001$, 10. ábra). A TT genotípussal rendelkezőkben alacsonyabb volt a MTX szintje, mint a CT+CC genotípussal rendelkezőknek. A két SNP és a MTX szintek közötti összefüggés általános lineáris kevert modellel (GLMM) is szignifikánsnak bizonyult (rs4948496: $p = 0,039$, rs4149056: $p = 0,004$). A GLMM során az rs4948496 + rs4149056 genotípus a 24, 36 és 48 órás MTX szint interindividuális

variabilitásának [$R^2_{\text{GLMM}(m)}$] 6%, 10,7% és 9%-át magyarázta [az $R^2_{\text{GLMM}(c)}$] 25%, 37,1% és 22,7% volt a 24, 36 és 48 órás szintek esetén].

Azokban a betegekben, akik 2 g/m² MTX-ot kaptak, és az rs4948496 CC genotípusával rendelkeztek, szignifikánsan gyakrabban fordult elő a kívántnál magasabb 48 órás MTX szint (>0,25 µmol/l): CC vs. CT+TT genotípus: 61% vs. 39%, p=0,044.

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

A liquor MTX szintek RF elemzése során csak az életkor és az rs4948502 (*ARID5B*) mutatott szignifikáns összefüggést a liquor szintekkel. A CART és GLMM elemzéssel azonban egyik változóval sem tudtunk szignifikáns összefüggést kimutatni.



10. ábra. A szérum MTX szintek klasszifikációs és regressziós fája. A körök (1, 3, 5) azokat a magyarázó változókat ábrázolják, amelyek szignifikáns összefüggést mutattak a célváltozóval (24h + 36h + 48h MTX). A magyarázó változók egyes alkategóriái a vonalak mentén láthatók. A célváltozó értékeit a téglalapok (2, 4, 6, 7) ábrázolják. y=(átlag MTX szint a 24, 36, 48. órában); n=MTX kezelések száma.

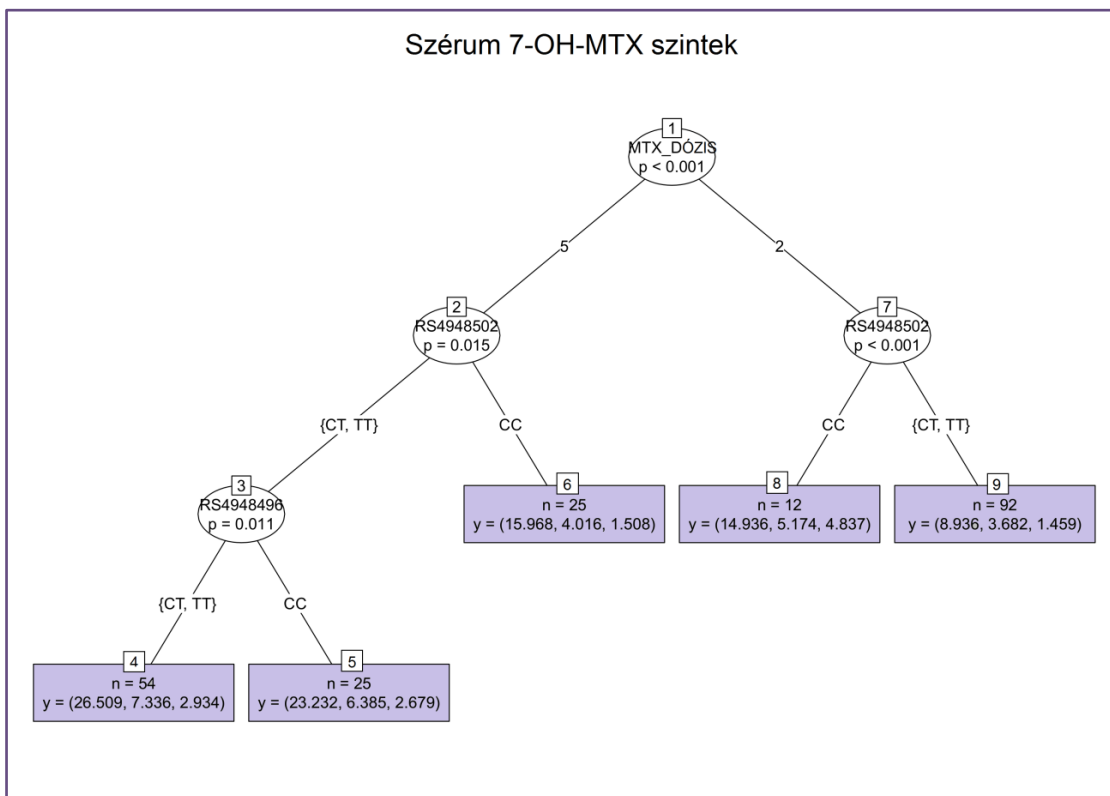
A szérumban 7-OH-MTX szintek és az $AUC_{7-OH-MTX}$ esetén a MTX szintekhez hasonlóan jártunk el a RF elemzés során. Ennek eredményeként a következő magyarázó változók mutattak összefüggést a szérumszintek valamelyikével (24 órás és/vagy 36 órás és/vagy 48 órás) és/vagy az $AUC_{7-OH-MTX}$ -tal: az alkalmazott MTX dózis, ALL immunfenotípus, életkor, az rs9967368, rs10841469, rs7499, rs2235013, rs4451422, rs1202179, rs4948487, rs4948496, rs2518463, rs4948502, rs12759827, rs10106 és az rs1801394.

A CART során a 24, 36 és 48 órás 7-OH-MTX szintek változását egyszerre, egy közös célváltozóval (7-OH-MTX 24h + 36h + 48h) modelleztük. A szérumban 7-OH-MTX és $AUC_{7-OH-MTX}$ esetén a CART felépítéséhez a RF eredménye alapján kiválasztott magyarázó változókat használtuk fel.

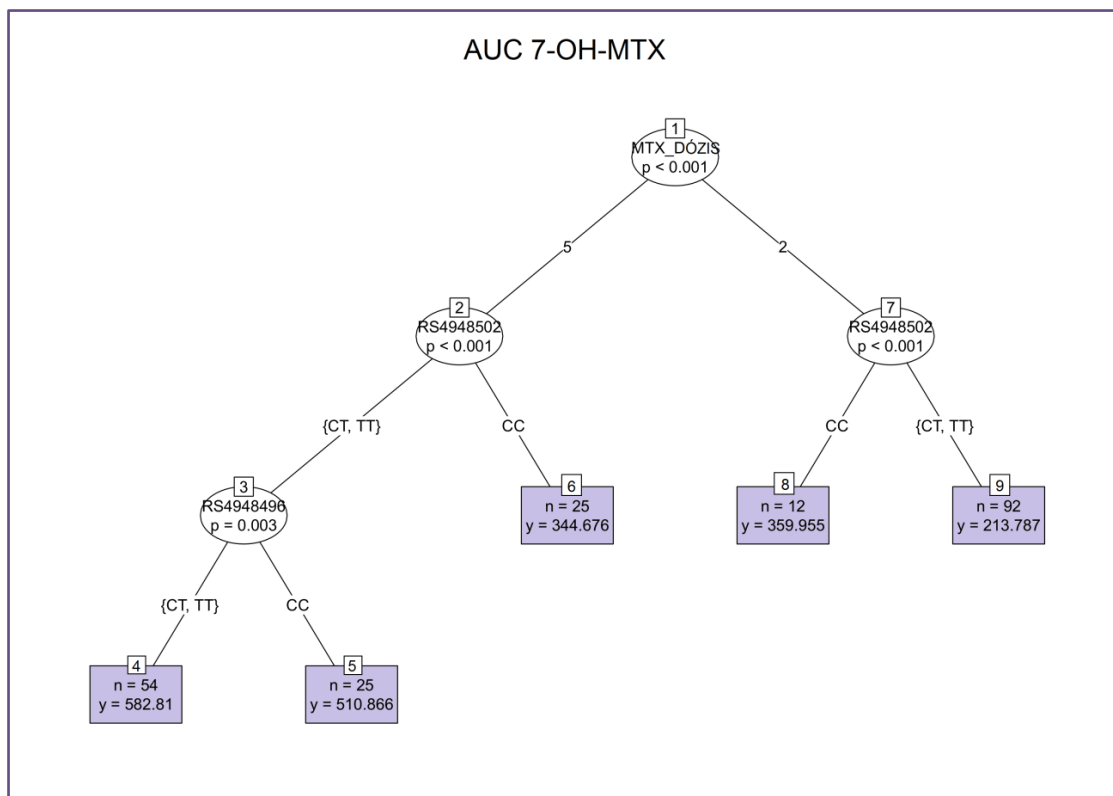
A szérumban 7-OH-MTX (24h + 36h + 48h) szint döntési fája a MTX-téhoz hasonló képet mutat (11. ábra). Az alkalmazott MTX dózis (5 vagy 2 g/m²) befolyásolta leginkább a 7-OH-MTX szinteket ($p < 0,001$), amely korábbi eredményeink alapján szintén várható volt. Mindkét csoportban az rs4948502 (*ARID5B* gén) mutatott szignifikáns összefüggést a 7-OH-MTX szintekkel (5 és 2 g/m²: $p = 0,015$ és $p < 0,001$). Mindkét csoportban a GLMM alapján is igazolódott a szignifikáns összefüggés ($p = 0,003$ és $p = 0,033$). Az 5 g/m² MTX-ot kapott betegek esetén az rs4948502 a 24, 36 és 48 órás 7-OH-MTX szintek interindividuális variabilitásának [$R^2_{GLMM(m)}$] 12,6%, 14% és 16,3%-át magyarázta [az $R^2_{GLMM(c)}$ a 24, 36 és 48 órás 7-OH-MTX szintek esetén 48,4%, 58% és 45,3% volt]. Azokban a betegekben, akik 2 g/m² MTX-ot kaptak, az rs4948502 a 24, 36 és 48 órás 7-OH-MTX szintek interindividuális variabilitásának [$R^2_{GLMM(m)}$] 15%, 9,3% és 12,9%-át magyarázta [az $R^2_{GLMM(c)}$ a 24, 36 és 48 órás 7-OH-MTX szintek esetén 56%, 61,2% és 51,7% volt].

Az rs4948502 és a 7-OH-MTX szérumszintek közötti összefüggés azonban nem egyértelmű. Azokban a betegekben, akik 2 g/m² MTX-ot kaptak, a CC genotípus magasabb 7-OH-MTX szintekkel, míg az 5 g/m²-t kapottak körében a CC genotípus alacsonyabb 7-OH-MTX szintekkel állt összefüggésben (a CT+TT genotípusú betegekkel összehasonlítva). Azokban a betegekben, akik 5 g/m² MTX-ot kaptak, és az rs4948502 CT+TT genotípussal rendelkeztek, egy további SNP, az rs4948496 (*ARID5B* gén) szintén szignifikáns összefüggést mutatott a 7-OH-MTX szintekkel a CART alapján ($p = 0,011$), de a GLMM ezt az eredményt nem erősítette meg.

Az $AUC_{7-OH-MTX}$ CART elemzése hasonló eredményt mutat, mint a szérumban 7-OH-MTX szinteké (12. ábra). Az rs4948502 (*ARID5B* gén) mindkét csoportban szignifikáns összefüggést mutatott az $AUC_{7-OH-MTX}$ -tal (5 és 2 g/m² dózist kaptak esetén is $p < 0,001$). A szignifikáns összefüggést a GLMM is megerősítette ($p < 0,001$ és $p = 0,013$). A GLMM alapján, az 5 g/m² MTX-ot kapott betegekben az rs4948502 az $AUC_{7-OH-MTX}$ interindividuális variabilitásának [$R^2_{GLMM(m)}$] 14,1%-át magyarázta [az $R^2_{GLMM(c)}$ 52% volt]. Azokban a betegekben, akik 2 g/m² MTX-ot kaptak, az rs4948502 az $AUC_{7-OH-MTX}$ szintek interindividuális variabilitásának [$R^2_{GLMM(m)}$] 18,9%-át magyarázta [az $R^2_{GLMM(c)}$ 61,5% volt]. A CART alapján az rs4948496 (*ARID5B* gén) szignifikáns összefüggést mutatott az $AUC_{7-OH-MTX}$ -tal azokban a betegekben, akik 5 g/m² MTX-ot kaptak és az rs4948502 CT+TT genotípussal rendelkeztek ($p = 0,003$).



11. ábra. A szérumban 7-OH-MTX szintek klasszifikációs és regressziós fája. A körök (1, 2, 3, 7) azokat a magyarázó változókat ábrázolják, amelyek szignifikáns összefüggést mutattak a célváltozóval (24 + 36 + 48h 7-OH-MTX). A magyarázó változók egyes alkategóriái a vonalak mentén láthatók. A célváltozó értékeit a téglalapok (4, 5, 6, 8, 9) ábrázolják. $y = (\text{átlag 7-OH-MTX szint a 24, 36, 48. órában}); n = \text{MTX kezelések száma}$.



12. ábra. Az AUC_{7-OH-MTX} klasszifikációs és regressziós fája. A körök (1, 2, 3, 7) azokat a magyarázó változókat ábrázolják, amelyek szignifikáns összefüggést mutattak a célváltozóval (AUC_{7-OH-MTX}). A magyarázó változók egyes alkategóriái a vonalak mentén láthatók. A célváltozó értékeit a téglalapok (4, 5, 6, 8, 9) ábrázolják. y =(átlag AUC_{7-OH-MTX}); n =MTX kezelések száma.

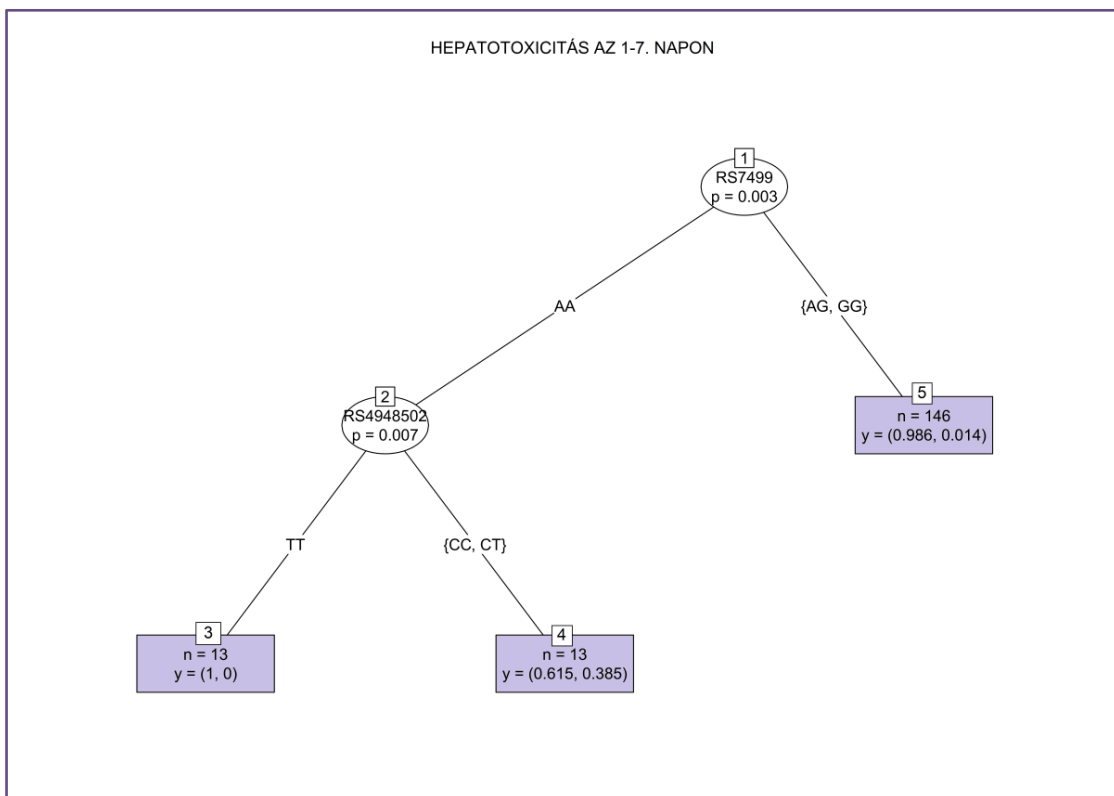
6.2.2 Toxicitás

A toxicitást jelző laboratóriumi paraméterek esetén is első lépésben RF analízissel választottuk ki azokat a magyarázó változókat, amelyekkel azután célváltozónként a CART-ot felépítettük.

Az 1-7. napon fellépő hepatotoxicitást jelző szérumbilirubin szint emelkedés [grade 3-4, MTX5: 4,1% (7/172 kezelés), MTX2: 1,8% (5/279 kezelés)] az RF analízis alapján a következő magyarázó változókkal mutatott összefüggést: alkalmazott MTX dózis (5 vagy 2 g/m²), életkor, az rs3768142, rs11045819, rs7499, rs1544105,

rs17328763, rs11045818, rs2853523, rs10106, rs4451422, rs745686, rs4948502, rs2276299 és az rs2853533.

A CART eredménye alapján az 5 g/m² MTX-ot kapott betegekben szignifikáns összefüggés mutatkozott a kialakult hepatotoxicitás és az rs7499 (*SLC19A1* gén, p=0,003) valamint az rs4948502 (*ARID5B* gén, p=0,007) között (13. ábra). Azokban az esetekben (n=13), ha a beteg az rs7499 AA és az rs4948502 TT genotípussal rendelkezett, kórosan magas bilirubin szintet nem regisztráltunk.

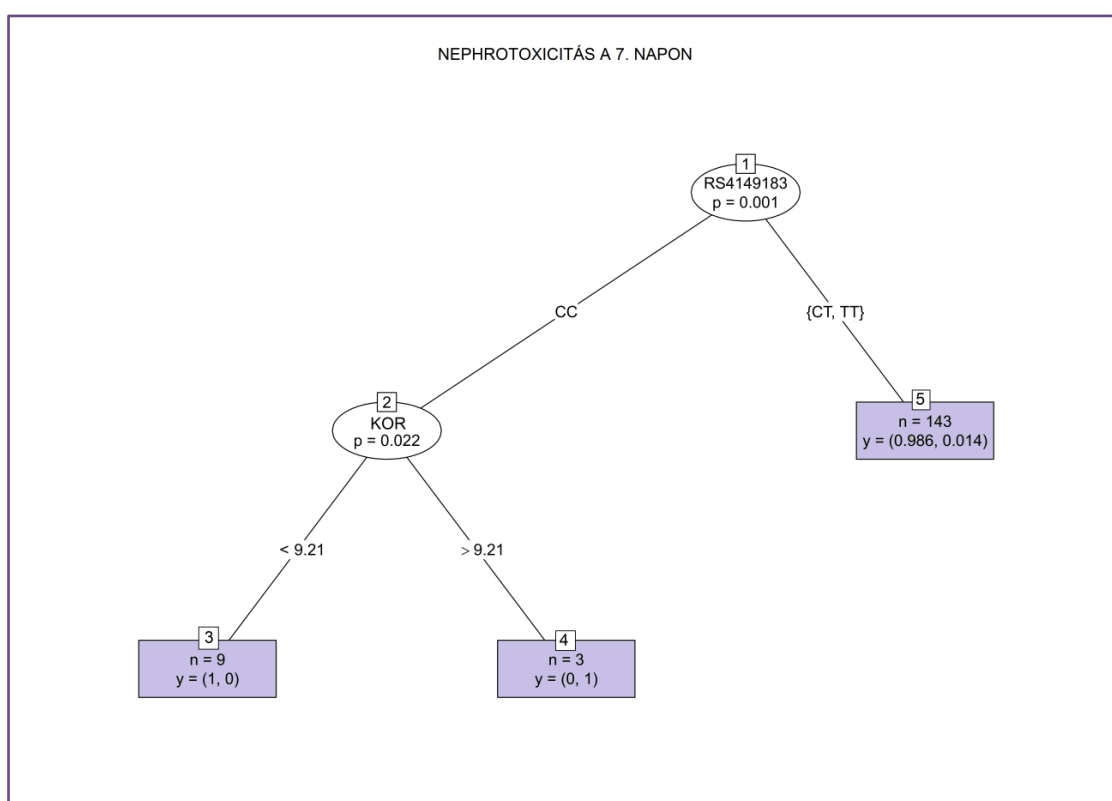


13. ábra. A hepatotoxicitás klasszifikációs és regressziós fája az MTX5 csoportban.

A körök (1, 2) azokat a magyarázó változókat ábrázolják, amelyek szignifikáns összefüggést mutattak a célváltozóval (hepatotoxicitás). A magyarázó változók egyes alcsoportjai a vonalak mentén láthatók. A célváltozó értékeit a téglalapok (3,4, 5) ábrázolják. y=(annak a gyakorisága, hogy nincs toxicitás, a toxicitás gyakorisága); n=MTX kezelések száma.

Az 1-7. napon kialakult nefrotoxicitást jelző szérum kreatinin szintemelkedés [grade 3-4, MTX5: 3,2% (5/155 kezelés), MTX2: 1,9% (4/208 kezelés)] az RF

eredménye alapján összefüggést mutatott a 36 órás MTX szérumszintekkel, az rs4149183, rs1544105, rs1004474 és az rs3212713 változókkal. Az 5 g/m²-ert kapott betegek esetén a nefrotoxicitásra, mint célváltozóra állított CART szignifikáns összefüggést mutatott az rs4149183 (*SLC22A8* gén) és a 7. napon fellépő nephrotoxicitás között (14. ábra). A CC genotípussal rendelkező betegekben szignifikánsan gyakrabban alakult ki nefrotoxicitás, mint a CT+TT genotípussal rendelkezőkben (25% vs. 1%, p=0,001). A CART alapján azokban a betegekben, akik CC genotípussal rendelkeztek, és az életkoruk meghaladta a 9,2 évet, a nefrotoxicitás kialakulásának esélye 100% volt, szemben a 9,2 évnél fiatalabbakkal, akikben ez az arány 0% volt.

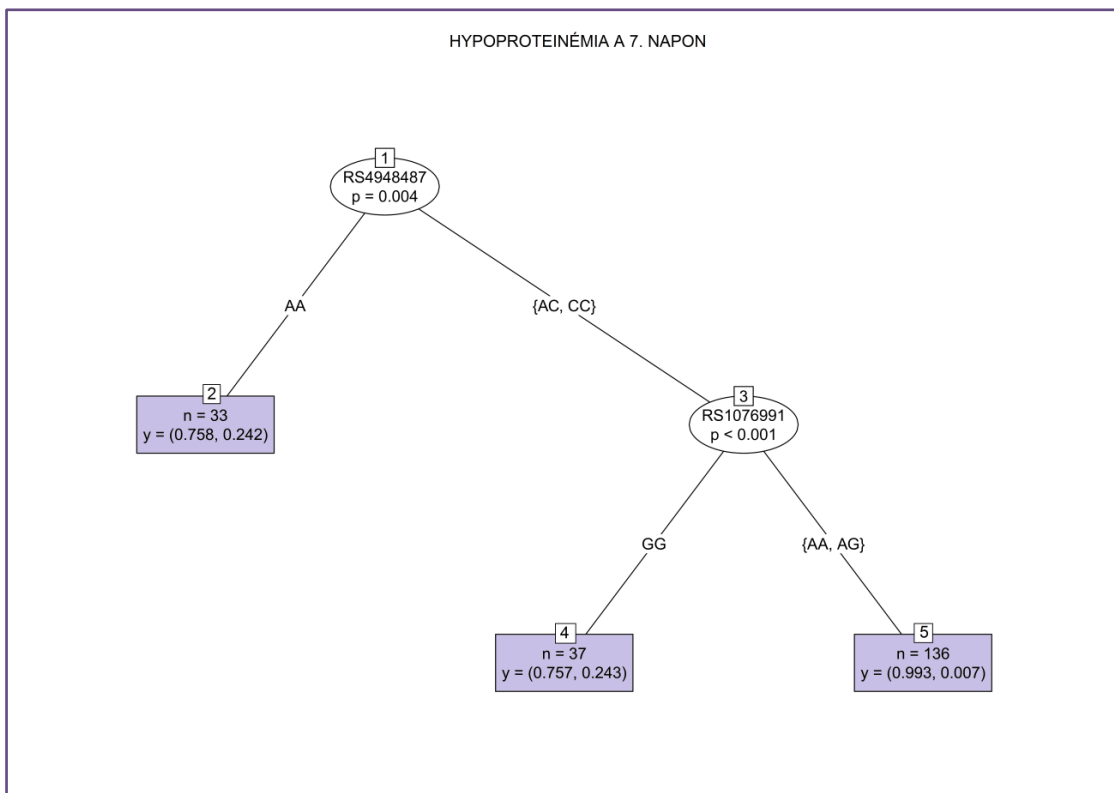


14. ábra. A nefrotoxicitás klasszifikációs és regressziós fája az MTX5 csoportban.

A körök (1, 2) azokat a magyarázó változókat ábrázolják, amelyek szignifikáns összefüggést mutattak a célváltozóval (nefrotoxicitás). A magyarázó változók egyes alcsoportjai a vonalak mentén láthatók. A célváltozó értékeit a téglalapok (3, 4, 5) ábrázolják. y =(annak a gyakorisága, hogy nincs toxicitás, a toxicitás gyakorisága); n =MTX kezelések száma.

A fent említett, súlyos (grade 3-4) hepato- és nefrotoxicitást jelző szérumbilirubin és kreatinin szintemelkedés a betegek kis százalékában következett be (<5%), ezért a kis elemszámra való tekintettel, ezekben az esetekben általánosított lineáris kevert modelleket (GzLMM) nem alkalmaztunk.

A 7. napon regisztrált hipoproteinémia [szérumbilirubin szint <60 g/dl, MTX5: 14,8% (22/149 kezelés), MTX2: 8,7% (18/206 kezelés)] a RF alapján a rizikócsoporttal (SR, IR vagy HR), az rs4948687, rs1076991 és a 36 órás 7-OH-MTX szérumszintekkel mutatott összefüggést. A CART eredményeként a 7. napon fellépő hipoproteinémia és az rs4948487 (*ARID5B* gén, $p=0,004$), valamint az rs1076991 (*MTHFD1* gén, $p<0,001$) között szignifikáns összefüggés mutatkozott azokban a betegekben, akik 2 g/m^2 dózisú HD-MTX kezelésben részesültek (15. ábra). Gyakrabban regisztráltunk hipoproteinémiát az rs4948487 AA genotípussal és az rs1076991 GG genotípussal rendelkező betegek esetén (9. táblázat). A kis esetszámra való tekintettel GzLMM-t nem alkalmaztunk.



15. ábra. A hipoproteinémia klasszifikációs és regressziós fája az MTX2 csoportban. A körök (1, 3) azokat a magyarázó változókat ábrázolják, amelyek szignifikáns összefüggést mutattak a célváltozóval (hipoproteinémia). A magyarázó

változók egyes alcsoportjai a vonalak mentén láthatók. A célváltozó értékeit a téglalapok (2, 4, 5) ábrázolják. y =(annak a gyakorisága, hogy nincs toxicitás, a toxicitás gyakorisága); n =MTX kezelések száma.

9. táblázat. A kialakult hypoproteinémia [n (%)] az rs4948497 és rs1076991 genotípusok függvényében*

Hipoproteinémia	rs4948487 (<i>ARID5B</i>)		rs1076991 (<i>MTHFD1</i>)	
	AA	AC+CC	GG	AG+AA
(<60 g/l)				
Igen	8 (24)	7 (4)	9 (23)	8 (5)
Nem	25 (76)	156 (96)	31 (77)	151 (95)

*a 2 g/m² MTX-ot kapott csoportban, n (%)= MTX kezelések száma (százalékos aránya).

Az 1-7. napon kialakult granulocitopénia [grade 3-4, MTX5: 39,2% (60/153), MTX2: 27,3% (73/267)] az RF eredménye alapján a következő magyarázó változókkal mutatott összefüggést: rizikó csoport (SR, IR vagy HR), az alkalmazott MTX dózis (5 vagy 2 g/m²), az rs1979277, rs2235013, rs9967368, rs10821936, rs4948502, rs4506592, rs7089424, rs1801394, rs1544105, rs4948496 és az rs3768142. A 2 g/m² MTX-ot kapott betegek csoportjában a CART és a GzLMM is szignifikáns összefüggést mutatott a 7. napon regisztrált granulocitopénia és az rs3768142 (*MTR* gén) között. A GG genotípusú betegekben szignifikánsan gyakrabban fordult elő a granulocitopénia: GG vs. GT+TT: 56% vs. 23%, OR: 5,92 (95% CI: 2,03-17,27), $p=0,001$. A CART és GzLMM eredménye is azt mutatta, hogy a granulocitopénia szignifikánsan gyakrabban fordult elő a 4. HD-MTX kezelést követően, mint az 1-3. kezelések után, OR: 3,48 (95% CI: 1,40-8,64), $p=0,007$.

7. Megbeszélés

Az ALL terápiája világszerte rizikócsoporthoz igazított kemoterápiás protokollokon alapul, amelyeknek köszönhetően ma egy ALL-ben szenvedő gyermek túlélési esélye (5 éves OS) 84-94% a fejlett országokban (Pui és mtsai 2011). Az ALL-t célzó kutatások ma már a terápia hatékonyságának további növelése mellett, a betegek életminőségének javítására is törekednek. A magasabb rizikócsoporthoz sorolt, relapszusra hajlamosabb betegek intenzívebb kemoterápiában részesülnek, amelyek súlyosabb mellékhatásokkal járhatnak. A HD-MTX kezelés világszerte számos ALL protokollban kulcsszerepet játszik. A HD-MTX kezelések során az egyik fő klinikai kihívás az, hogy megtaláljuk az egyensúlyt a kezelés kívánt és nem kívánt hatásai között (Faganel Kotnik és mtsai 2011, Schmiegelow 2009). Ha megbízható biomarkerekkel rendelkezünk, amelyekkel előre jelezhetnénk az alkalmazott dózis hatástalanságát, vagy azt, hogy valaki a kezelést várhatóan rosszul tolerálja majd, a HD-MTX kezelést az egyén sajátos tulajdonságaihoz igazítva alkalmazhatnánk.

Munkánk során részletes, összehasonlító elemzést készítettünk a Magyarországon alkalmazott, két különböző dózisú (5 és 2 g/m²) HD-MTX kezelést követően, a MTX és metabolitja, a 7-OH-MTX farmakokinetikáját és a kezelések toxicitását vizsgálva. Elemzésünket kiegészítettük a MTX liquorba történő penetrációjának vizsgálatával is. Ezt követően megvizsgáltuk a MTX metabolizmusával illetve a folát anyagcserével kapcsolatban álló fehérjéket kódoló gének polimorfizmusai és a farmakokinetikai paraméterek, valamint a kialakult toxicitás közötti összefüggéseket.

7.1 Farmakokinetika

A farmakokinetikai vizsgálatok elengedhetetlenek a nagy dózisban alkalmazott kemoterapeutikumok, így például a HD-MTX biztonságos alkalmazásához. A klinikai gyakorlatban alkalmazott HD-MTX infúziók során a MTX dózisa tág határok között változik a világban (2-33,6 g/m²) (Groninger és mtsai 2004). Számos ALL/NHL/oszteosarkómás betegen végzett tanulmány esetén megfigyelték, hogy még ugyanazon dózist alkalmazva is nagy inter- és intraindividuális különbségek jellemzik a

MTX farmakokinetikáját (Holmboe és mtsai 2012, Joannon és mtsai 2004, Jönsson és mtsai 2007, Schmiegelow 2009, Woessmann és mtsai 2005, Wysocki és mtsai 1992b, Xu és mtsai 2007). A különböző HD-MTX protokollok hatékonyságát (köztük a BFM protokollokét) rendszeresen vizsgálják annak érdekében, hogy az optimális MTX dózist meghatározhassák, mégis kevés a részletes, összehasonlító elemzés, amely a MTX mellett a 7-OH-MTX koncentrációt, valamint a liquor koncentrációkat is figyelembe veszi.

Munkánk során, az 5 és 2 g/m² dózisú kezeléseket összehasonlítva, az 5 g/m² dózisú kezeléseket követően a szérum MTX szintek megbízhatóbban elérték a terápiásnak tekintett tartományt, bár ezen kezeléseket után gyakrabban alakult ki reverzibilis toxicitás. A szérum MTX és 7-OH-MTX szintek minden mért időpontban szignifikánsan magasabbak voltak az 5 g/m² dózisú kezeléseket esetén, mint a 2 g/m²-eseket követően. A MTX szérumszinteket jellemző inter- és intraindividuális különbségeket mi is tapasztaltuk. Eredményeinkhez hasonlóan, a magasabb dózisú MTX kezeléseket szignifikánsan magasabb szérum MTX szinteket eredményeztek egy korábbi tanulmányban is, amelyben 0,5 g/m², 1 g/m² és 5 g/m²-es MTX kezeléseket hasonlítottak össze (Wysocki és mtsai 1992b). Az 1 g/m²-es kezeléseket után kétszer, az 5 g/m²-es kezeléseket követően tízszer magasabb MTX koncentrációkat mértek, mint a 0,5 g/m²-es kezeléseket követően. A MTX ürülésében nem találtak szignifikáns különbséget az egyes csoportok között. Máskor az 5 g/m² dózisú MTX kezeléseket magasabb szérumszinteket eredményeztek, mint a 3 g/m² dózisú kezeléseket, de megfelelő hidrálás és alkalizálás mellett egyformán biztonságosnak bizonyultak (Xu és mtsai 2007). A kezeléseket egyforma arányban követte elhúzódó MTX elimináció, és nem volt szignifikáns különbség a mellékhatásokat tekintve sem (Xu és mtsai 2007). Egy további vizsgálatban a 24 órás MTX szintek szignifikánsan magasabbak voltak a 2 g/m² dózisú kezeléseket után, mint 1 g/m² dózist követően, a 42 és 48 órás koncentrációkat összehasonlítva azonban nem volt szignifikáns különbség (Joannon és mtsai 2004).

Jelen munkánk során kórosan magas 48 órás MTX szérumszinteket az 5 g/m² dózisú kezeléseket esetén gyakrabban regisztráltunk. Azon betegek esetén, akiknél a szérumszintek magasabbak, nagyobb a rizikó a toxikus hatások kialakulására (Schmiegelow 2009), ezért a MTX koncentráció küszöbérték alá való csökkenéséig

intenzívebb folinsav rescue kezelést igényelnek (Plard és mtsai 2007). Az elhúzódó MTX ürülés és a következményesen elhúzódó rescue kezelés a hospitalizáció idejét is megnöveli, amely különösen gyermekek esetén nem elhanyagolható szempont a terápia során. Evans és mtsai (1986) által vizsgált ALL-es gyermekekben a MTX ürülése az alkalmazott dózistól függőnek mutatkozott. Az alacsonyabb, $0,5 \text{ g/m}^2$ -es dózisú kezelést követően a MTX szignifikánsan gyorsabban ürült ki a szervezetből, mint $3\text{-}33,6 \text{ g/m}^2$ dózisú kezeléseket követően. A dóziszfüggő elimináció egyik magyarázata a HD-MTX kezelések esetén a vesében történő tubuláris szekréció telítettsége lehet, amely megmagyarázná a csökkent renális ürülést magasabb dózisú kezelések esetén (Groninger és mtsai 2004).

Eredményeink alapján a MTX, 7-OH-MTX szérumszintek és az AUC értékek az ismételt kezelések során nem változtak szignifikánsan. Leukémiás betegeken végzett korábbi tanulmányok eredményei megegyeznek az általunk tapasztaltakkal (Borsi és mtsai 1990, Sterba és mtsai 2006). Oszteoszarkómás betegek esetén azonban a 7-OH-MTX szérumszintek az első kezeléstől az utolsóig szignifikáns csökkenést (Erttmann és mtsai 1985), illetve az első kezeléstől a negyedik kezelésig növekvő, majd az ötödik kezeléstől kezdve csökkenő tendenciát mutattak más vizsgálatokban (Holmboe és mtsai 2012). A különbség egyik magyarázata lehet, hogy az oszteoszarkómás betegek kétszer-háromszor magasabb MTX dózist kapnak kezelésük során, amely a máj metabolizációs képességének csökkenéséhez vezethet. További magyarázata az lehet, hogy a vesében és májban található ABC-transzporterek aktivitása fokozódik, és ezáltal fokozódik a 7-OH-MTX eliminációja (Holmboe és mtsai 2012).

Az 5 g/m^2 -es kezeléseket követően szignifikánsan magasabb liquor MTX szinteket regisztráltunk, mint a 2 g/m^2 dózisú kezelések után. A szérumszintekhez hasonlóan a liquor MTX szintek is nagy egyéni és egyének közötti változatosságot mutattak. Egy korábbi tanulmányban a 8 g/m^2 dózisú kezeléseket szignifikánsan magasabb liquor MTX szintek követték, mint az 5 g/m^2 dózisúakat (Jönsson és mtsai 2007). Az általunk vizsgált 5 g/m^2 dózisú kezeléseket esetén a citotoxicitás határának tekintett $1 \mu\text{mol/l}$ koncentrációt a liquor MTX szint a kezelések legnagyobb részében ($72,12\%$) elérte, ezzel szemben a 2 g/m^2 dózisú kezeléseket több mint kétharmadában ($73,33\%$) ennél alacsonyabb maradt. Egy korábbi, $0,5 \text{ g/m}^2$, 1 g/m^2

és 5 g/m² dózisú MTX kezelést összehasonlító vizsgálatban a liquor MTX szint a 0,5-1 g/m² dózisú kezelések felében, valamint az összes 5 g/m² dózisú kezelés esetén meghaladta az 1 µmol/l értéket (Wysocki és mtsai 1992a).

Munkánk során a 24 órás szérum és liquor MTX szintek szignifikáns korrelációt mutattak. Egy korábbi, 5 g/m² és 8 g/m² dózisú kezelést összehasonlító vizsgálatban a liquor MTX szintek szintén korrelációt mutattak a 24 órás szérumszintekkel és az AUC_{MTX} értékével (Jönsson és mtsai 2007). Más esetben magasabb dózisú kezeléseket összehasonlítva (6 g/m² és 8 g/m²) is gyenge, de szignifikáns korreláció állt fent a szérum és liquor MTX szintek között (Seidel és mtsai 2000). A liquor és szérum MTX szintek közötti korrelációt korábban szélesebb dózistartományban (0,5-33,6 g/m²) is megerősítették (Borsi és Moe 1987). Léteznek ezzel szemben olyan tanulmányok, amelyek nem támasztják alá ezt az összefüggést (Lippens és Winograd 1988, Milano és mtsai 1990).

Korábbi vizsgálatok alapján, a szérumból liquorba történő MTX penetráció aránya körülbelül 1-3% (Jönsson és mtsai 2007, Milano és mtsai 1990, Seidel és mtsai 2000). Saját eredményeink szintén alátámasztották a nemzetközi adatokat. Munkánk során arra is kerestük a választ, hogy a penetráció aránya függ-e az alkalmazott MTX dózistól. Az általunk vizsgált két csoportban (5 g/m² vs. 2 g/m²) ez az arány megegyezett (2,3% vs. 2,8%), tehát az alkalmazott dózistól függetlennek bizonyult. Egy korábbi tanulmányban a liquorba történő penetráció aránya az 5 g/m² dózisú kezeléseket követően 2,9% volt (Milano és mtsai 1990), míg máshol ez az arány, az alkalmazott mérési módszertől függően, 1,5% vagy 1,6% volt (Seidel és mtsai 2000). Egy 5-8 g/m² kezeléseket összehasonlító vizsgálatban 1,8%-os átlagos penetrációs arányt írtak le (Jönsson és mtsai 2007).

Figyelembe véve a regisztrált liquor MTX szinteket, a szérumból liquorba történő penetráció arányát és a 24 órás szérum és liquor MTX szintek között fennálló korrelációt, eredményeink azt sugallják, hogy a 2 g/m² dózisú kezelésekkal nem lehet minden esetben megbízhatóan biztosítani a citotoxikus liquor koncentrációt.

A hepato- és nefrotoxicitás két gyakori mellékhatás a HD-MTX kezeléseket követően. Munkánk során mind a két csoportban megfigyelhető volt a transzamináz enzimek aktivitásának fokozódása, amely jól ismert következménye a HD-MTX

kezelésnek (Holmboe és mtsai 2012, Wiela-Hojenska és mtsai 2001). A hepatotoxicitás általában enyhe és reverzibilis, szinte sosem vezet fibrózishoz, cirrózishoz (Schmiegelow 2009). Wiela-Hojenska és mtsai ALL-es gyermekeken végzett vizsgálata során kimutatta, hogy a kemoterápia csökkentette a máj metabolizációs képességét azáltal, hogy a HD-MTX gátolta a kevert funkciójú oxidáz rendszer működését. Ez hozzájárulhat azon, a MTX-tal egyidőben alkalmazott gyógyszerek toxikus hatásainak fokozódásához, amelyeknek metabolizációjukhoz ezekre az enzimekre van szükségük (Wiela-Hojenska és mtsai 2001). Korábbi tanulmányok – beleértve munkacsoportunk oszteosarkómásokon végzett vizsgálatát – kimutatták, hogy szignifikáns összefüggés állt fent az emelkedett májenzim értékek és a csökkent MTX clearance, valamint az emelkedett szérum MTX szintek között (Hegyi és mtsai 2012, Holmboe és mtsai 2012). Jelen vizsgálatunkban a hepatotoxicitás szignifikáns asszociációt mutatott az emelkedett AUC_{MTX} értékével a 2 g/m^2 MTX-ot kapott betegek között.

A leukémiásoknál magasabb MTX dózist kapó, oszteosarkómás betegekben az ismételt HD-MTX kezelések májtoxikus hatását a 7-OH-MTX alacsonyabb szérumszintje jelezte, amely a máj metabolizációs képességének csökkenése következtében alakult ki (Erttmann és mtsai 1985). Ugyanezt ALL-sok ismételt kezelése során viszont nem figyelték meg (Borsi és mtsai 1990). Saját vizsgálatunk során mi sem tapasztaltunk összefüggést az ismételt HD-MTX kezelések és a kialakult hepatotoxicitás között.

Munkánk során szignifikáns összefüggéseket találtunk a szérum 7-OH-MTX, az $AUC_{7-OH-MTX}$ és a kezelést követő kreatinin szintemelkedés között, amely azt sugallja, hogy szoros kapcsolat állhat fent a MTX metabolitja és a kialakuló nefrotoxicitás között. Nem találtunk összefüggést a MTX farmakokinetikai paraméterei és a kreatinin szintek között. A 7-OH-MTX szintek monitorozása ezért talán pontosabb előrejelzője lehet a toxicitás kialakulásának. Munkánk során a veseműködés jellemzésére kizárólag a szérum kreatinin szinteket használtuk, amely a leggyakrabban használt módszer a GFR jellemzésére. Nem szabad azonban figyelmen kívül hagynunk, hogy más markerek mérése is javasolt annak érdekében, hogy a veseműködést teljes részletességében jellemezni tudjuk (Skarby és mtsai 2003). Egy $5-8 \text{ g/m}^2$ dózisú kezeléseket összehasonlító vizsgálatban a HD-MTX kezelések a szérum kreatinin szintek szignifikáns emelkedéséhez vezettek, de a kreatinin szintek 7-OH-MTX-tal való

korrelációját nem vizsgálták (Skarby és mtsai 2003). Ezzel szemben Joannon és mtsai nem talált szignifikáns összefüggést az 1 és 2 g/m²-es MTX infúziókat követően mért 24, 42 és 48 órás MTX szintek és a számított kreatinin clearance között (Joannon és mtsai 2004). Oszteoszarkómás betegekben a 7-OH-MTX szintek szignifikáns összefüggést mutattak az emelkedett GPT enzim értékekkel, de a kreatinin szintekkel nem (Holmboe és mtsai 2012).

Az elhúzódozó MTX ürülésben a vese kiválasztó képessége beszűkülésének is szerepe lehet. A korábban említett svéd tanulmány (Skarby és mtsai 2003) során a kreatinin szintemelkedés korrelált az elhúzódozó MTX ürüléssel. Az elhúzódozó MTX elimináció glomeruláris károsodáshoz kapcsolódott (Skarby és mtsai 2003). Hempel és mtsai (2003) 220 HD-MTX kezelés (1 g/m², 5 g/m² és 12 g/m²) vesetoxikus hatását vizsgálta. Vizsgálták a glomeruláris és tubuláris funkciókat, a toxicitás dózisfüggő hatását, illetve, hogy a káros mellékhatások kialakulása összefügg-e a MTX 7-OH-MTX-tá történő átalakulásával. Vizsgálatuk eredményeként a HD-MTX kezelésnek nem volt direkt tubulotoxikus hatása. A glomeruláris funkciózavar dózisfüggően alakult ki, a GFR csökkenésével és a proteinuria mértékének fokozódásával járt. Minden mellékhatás teljesen reverzibilis volt és nem korrelált a MTX 7-OH-MTX-tá történő metabolizációjával. Az ismételt MTX kezelések nem eredményeztek súlyosabb nefrotoxicitást (Hempel és mtsai 2003). Saját vizsgálatunk során mi sem tapasztaltunk összefüggést az ismétlődő MTX kezelések és a nefrotoxicitás kialakulása között.

Mindkét csoportban a szérum összfehérjesszintek jelentős csökkenése követte a HD-MTX kezeléseket, és nem volt szignifikáns különbség a két csoport között. A szervezet fehérje összetételének változása (pl. szérum albumin csökkenés) alapvetően megváltoztathatja a kemoterápiás és egyes gyógyszerek farmakokinetikáját, ami a terápiás hatás és a toxikus mellékhatások szempontjából is döntő jelentőséggel bírhat. Például az alacsony szérum összfehérjesszint csökkenti a MTX kötődését, rontja a kiürülést, és így elhúzódozó MTX hatáshoz és a toxikus hatások fokozódásához vezethet. Lényeges továbbá, hogy minden olyan gyógyszer, amely kötődik a szérum albuminhoz, kompetitív módon gátolja a különböző citosztatikumok, köztük a MTX fehérje kötődését, és így fokozhatja a toxikus mellékhatásokat. Azokban a betegekben, akiknél szérum összfehérjesszint csökkenést tapasztaltunk, a 24 órás átlagos MTX koncentráció a toxikusnak tartott határérték közelében mozgott, és nagy egyéni különbségeket

mutatott. Az általunk tapasztalt szérumszint csökkenés és a MTX hatása, valamint toxicitása közötti összefüggés felderítése ezért további vizsgálatokat igényel. Az esetlegesen létrejövő gyógyszerinterakciók elkerülése végett, lehetőség szerint, törekedni kell arra, hogy a citosztatikus kezelések mellett más gyógyszerelésben ne részesüljön a beteg, illetve minden esetben egyedileg kell értékelni a mégis kialakuló kölcsönhatásokat. Szóba jön esetleges albuminopótlás az elhúzó MTX ürülést mutató esetekben.

Vizsgálataink alapján a >14 éves korosztályban szignifikánsan magasabb szérumszintű MTX szintekre és gyakoribb mellékhatásokra lehet számítani, mint a <6 éves gyermekekben. Korábbi vizsgálatok során, a 0,5-33,6 g/m² dózisú MTX kezeléseket követően a <4 éves gyermekekben szintén alacsonyabb szérumszintű és liquor MTX koncentrációt és gyorsabb MTX clearance-t mértek, mint az idősebbekben (Borsi és Moe 1987, Plard és mtsai 2007). Az évek számának növekedésével egyre lassabb MTX elimináció volt megfigyelhető ALL-es és oszteosarkómás gyermekekben, továbbá felnőttekben is (Groninger és mtsai 2004). Az életkor meghatározta a MTX 7-OH-MTX-tá történő metabolizációjának arányát is: minél fiatalabb volt a beteg, annál magasabb 7-OH-MTX koncentrációt mértek (Borsi és mtsai 1990). Vizsgálataink során a >14 évesek között gyakrabban fordult elő hepatotoxicitás és nefrotoxicitás. Oszteosarkómás betegekben viszont az emelkedett GPT értékek a fiatalabb életkorral (<15 év) mutattak összefüggést (Holmboe és mtsai 2012).

A 2 g/m² dózisú kezeléseket követően magasabb 24 órás MTX szinteket és AUC_{MTX} értékeket regisztráltunk lányokban, mint fiúkban. A későbbi szérumszinteket, elhúzó MTX eliminációt valamint az 5 g/m² dózisú kezeléseket követően kapott eredményeket összehasonlítva azonban nem találtunk különbséget a nemek között. Ramsey és mtsai (2013) szintén lányokban figyelt meg lassabb MTX clearance-t, más tanulmányok azonban nem találtak nemek közötti különbséget a MTX farmakokinetikáját vizsgálva (Plard és mtsai 2007).

7.2 Farmakogenetika

Farmakogenetikai vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy léteznek-e olyan, a folát - MTX anyagcserét, transzporter molekulákat, transzkripciós faktorokat érintő genetikai variánsok, amelyek kapcsolatban állhatnak a MTX és a 7-OH-MTX farmakokinetikájával, toxicitásával. A demográfiai és prognosztikai tényezőkön túl 14 gén 63 polimorfizmusát vizsgáltuk meg.

Az elemzésekhez random forest és CART módszerrel végeztünk változó szelekciót, amelyek új, elsősorban microarray vizsgálatok, DNS szekvenálással kapcsolatos vagy más génasszociációs vizsgálatok során végzett változó szelekcióhoz ajánlott módszerek (Strobl és mtsai 2008). Alkalmazásukkal lehetővé válik kis elemszámú mintán is nagyszámú magyarázó változó tesztelése. Előnye továbbá, hogy míg az olyan egyszerűbb modellek esetén, amelyek az összes változót egyszerre vizsgálják, a nagyobb hatású változók elnyomhatják a kisebb hatásúak szerepét, a RF és CART analízis minden változó szerepét önmagában és más változókkal interakcióban is figyelembe veszi. Mivel ezek új, jelenleg még kevésbé elterjedt statisztikai módszerek, eredményeinket hagyományos statisztikai módszerekkel, lineáris kevert modellekkel ellenőriztük.

Az *ARID5B* gén polimorfizmusai közül három (rs4948502, rs4948496 és rs4948487) szignifikáns összefüggést mutatott a szérumban MTX (azokban a betegekben, akik 2 g/m^2 MTX-ot kaptak) és 7-OH-MTX szintekkel és a kialakult hipoproteinémiával. Az rs4948496 CC genotípussal rendelkezőkben magasabb MTX szinteket regisztráltunk. Az rs4948502 CC genotípusa és a 7-OH-MTX szintek közötti összefüggés azonban nem volt ennyire egyértelmű. A 2 g/m^2 -t kapott betegekben a CC genotípus a magasabb 7-OH-MTX szintekkel, míg az 5 g/m^2 -t kapottakban a CC genotípus az alacsonyabb 7-OH-MTX szintekkel mutatott összefüggést. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az *ARID5B* gén polimorfizmusai kapcsolatba hozhatók az ALL-re és annak B-hiperdiploid altípusára való hajlammal, valamint hozzájárulhatnak az ALL incidenciáját jellemző rasszbeli különbségekhez is (Trevino és mtsai 2009b, Xu és mtsai 2012). Az *ARID5B* gén ugyanazon genetikai variánsai (rs10821936, rs10994982), amelyek a B-hiperdiploid ALL kialakulásával mutattak összefüggést, szintén összefüggést mutattak a magasabb MTXPG akkumulációval azokban a betegekben,

akik az említett altípusba tartoztak (Trevino és mtsai 2009b). A B-hiperdiploid ALL ismertén jobban reagál a MTX kezelésre (Trevino és mtsai 2009b). Mindez felvetette annak a lehetőségét, hogy a leukémia kialakulása és a leukémia ellenes gyógyszerekre adott válasz útvonalak egymással összefüggésben állhatnak (Xu és mtsai 2012). Munkacsoportunk egy korábbi vizsgálata során, saját populációnkon igazolni tudtuk az *ARID5B* gén polimorfizmusai (rs10821936, rs7089424, rs4506592) és az ALL hajlam közötti összefüggést (Lautner-Csorba és mtsai 2012). Jelen munkánk során, e három SNP mindegyike a változó szelekciók során összefüggést mutatott a MTX vagy 7-OH-MTX szintekkel, szignifikáns kapcsolatot azonban sem döntési fákkal, sem lineáris modellel igazolni nem tudtunk. Az rs4948502, rs4948496 és rs4948487 polimorfizmusok MTX farmakokinetikával mutatott összefüggését azonban az irodalomban elsőként igazoltuk, amely a fent említett hipotézist alátámaszthatja.

Az *SLCO1B1* gén rs4149056 polimorfizmusa vizsgálataink során összefüggést mutatott a szérum MTX szintekkel azokban a betegekben, akik 2 g/m^2 MTX-ot kaptak. A TT genotípussal rendelkező betegekben alacsonyabb MTX szinteket találtunk, mint a CT+CC genotípussal rendelkezőkben, amely azt sugallhatja, hogy a C alléllal rendelkezőkben lassabban ürült ki a MTX a szervezetből. Mindez egybehangzó Trevino és mtsai (2009a) és Ramsey és mtsai (2013) által végzett GWAS vizsgálatok eredményeivel, melyek során a C allél jelenléte lassabb MTX clearance-szel mutatott összefüggést. Az rs4149056 és a MTX clearance közötti összefüggést Radtke és mtsai (2013) is alátámasztotta. Korábban kimutatták az SNP gasztrointesztinális toxicitás kialakulásával való összefüggését is (Trevino és mtsai 2009a). Az *SLCO1B1* gén további polimorfizmusai, az rs11045879, rs4149081 és a magasabb szérum MTX szintek között is találtak összefüggést (Lopez-Lopez és mtsai 2013, Lopez-Lopez és mtsai 2011). Munkánk során az rs4149056 a kialakult mellékhatásokkal nem állt szignifikáns kapcsolatban, azonban eredményeink alátámasztják azon korábbi megfigyeléseket, amelyek szerint az *SLCO1B1* gén rs4149056 polimorfizmusa a MTX ürülésének prediktora lehet.

A HD-MTX kezeléseket követő mellékhatások és a folát illetve MTX anyagcserében szerepet játszó gének polimorfizmusai közötti irodalmi összefüggések ellentmondóak.

Eredményeink alapján a kialakult hepatotoxicitás az *SLC19A1* gén rs7499 polimorfizmusával állt szignifikáns kapcsolatban. Ez az első olyan vizsgálat, amely a gén említett polimorfizmusa és a HD-MTX kezelést követő mellékhatás között szignifikáns összefüggést talált. Az *SLC19A1* gén leggyakrabban vizsgált rs1051266 polimorfizmusát szintén bevontuk az elemzésbe, azonban sem a MTX vagy 7-OH-MTX szintekkel, sem a mellékhatások kialakulásával nem mutatott összefüggést. Az *SLC19A1* gén különböző genetikai variánsainak MTX szintekkel való összefüggését egyes korábbi tanulmányok bizonyítják (Laverdiere és mtsai 2002, Lopez-Lopez és mtsai 2013). Az rs1051266 gasztrointesztinális, máj-, és csontvelői toxicitással is összefüggést mutatott (Gregers és mtsai 2010, Kishi és mtsai 2007, Yee és mtsai 2010). Létezik azonban olyan vizsgálat is, melynek során az rs1051266 csökkent leukopénia rizikóval mutatott összefüggést leukémiás és malignus limfómás betegekben (Faganel Kotnik és mtsai 2011). Másrészt viszont léteznek olyan vizsgálatok, amelyek cáfolják az *SLC19A1* gén polimorfizmusai és a HD-MTX kezelések toxicitása közötti összefüggéseket (Faganel Kotnik és mtsai 2010, Huang és mtsai 2008, Kishi és mtsai 2003).

A CART analízis során szignifikáns összefüggést találtunk a nefrotoxicitás és az *SLC22A8* gén rs4149183 polimorfizmusa között azokban a betegekben, akik 5 g/m^2 MTX-ot kaptak. Minden egyes betegben, aki CC genotípussal rendelkezett és életkora meghaladta a 9,2 évet, kialakult a mellékhatás. Mindez összefüggésben áll saját farmakokinetikai és más munkacsoportok eredményeivel is, amelyek szerint az idősebb gyermekekben lassabb a MTX ürülésének sebessége és gyakrabban fordulnak elő mellékhatások (Groninger és mtsai 2004, Plard és mtsai 2007). Az *SLC22A8* genetikai variánsainak MTX clearance-szel való összefüggését egy korábbi vizsgálat is megerősítette (Lopez-Lopez és mtsai 2013).

A HD-MTX kezelést követő granulocitopénia jelen vizsgálataink alapján szignifikáns összefüggést mutatott a *MTR* gén rs3768142 polimorfizmusával azokban a betegekben, akik 2 g/m^2 MTX-ot kaptak. Ez az első olyan tanulmány, amely összefüggést talált a *MTR* gén említett genetikai variánsa és a HD-MTX kezelést követő mellékhatás kialakulása között. A *MTR* gén polimorfizmusai kevésbé tanulmányozottak, de az rs1805087 SNP korábban összefüggést mutatott HD-MTX kezelést követő gasztrointesztinális és hematológiai toxicitás kialakulásával

oszteoszarkómás betegekben (Patino-Garcia és mtsai 2009). Ezzel ellent mond azonban az a vizsgálat, amelynek során ALL-es betegekben ugyanez az SNP nem mutatott összefüggést a HD-MTX kezeléseket követő mellékhatások kialakulásával (Faganel Kotnik és mtsai 2011).

Munkánk során az *ARID5B* gén polimorfizmusa mellett a *MTHFD1* gén rs1076991 polimorfizmusa is összefüggést mutatott a hipoproteinémia kialakulásával a 2 g/m² MTX-ot kapott betegek esetén. A *MTHFD1* gén gyakrabban vizsgált rs2236225 polimorfizmusa korábbi tanulmányokban összefüggést mutatott a hepatotoxicitás csökkent rizikójával, de kimutatták összefüggését a kezelést követő anémia kialakulásával is ALL/oszteoszarkómás betegekben (Erculj és mtsai 2012, Windsor és mtsai 2012). Az rs1076991 velőcső záródási rendellenességgel való kapcsolatát kimutatták (Greene és mtsai 2009), azonban HD-MTX kezelést követő mellékhatásokkal való összefüggései ez idáig nem ismertek.

Farmakogenetikai elemzéseink során igyekeztünk minden lehetséges, releváns kovariánst és faktort figyelembe venni. Nem került be vizsgálatunkba azonban a *MTHFR* és *GGH* gén, habár egyes tanulmányok szerint összefüggés állhat fent a gének különböző SNP-i és a MTX farmakokinetika, toxicitás között (Faganel Kotnik és mtsai 2011, Panetta és mtsai 2010).

A retrospektív adatgyűjtés és a betegek rizikó csoportok szerinti (nem randomizált) MTX kezelése következtetéseinket behatárolja. Eredményeinket elsősorban iránymutatónak, gondolat ébresztőnek tekintjük, az egyénre szabott gyógyszeres kezelés irányába tett globális tendenciához és erőfeszítésekhez szeretnénk volna hozzájárulni.

A MTX-tal kapcsolatban álló metabolizáló, transzporter, transzkripció fehérjéket kódoló gének variánsait folyamatosan, széleskörben tanulmányozzák. Ha alaposabb betekintést nyernénk a MTX rezisztenciát és a nagy egyéni farmakokinetikai különbségeket kialakító genetikai eltérésekbe, nem csak képesek lennénk előre megjósolni és megelőzni a súlyos mellékhatások kialakulását vagy a HD-MTX terápia esetleges hatástalanságát, de új terápiás stratégiákat is létrehozhatnánk (Cheok és mtsai 2009).

Az egy-egy génből kiinduló megközelítések helyett egyre elterjedtebbek a teljes genomot érintő asszociációs vizsgálatok, amelyek során új, eddig ismeretlen gének,

genetikai variánsok szerepére derülhet fény. A jövőben a nagy teljesítményű, alacsony költségű, egyszerre több száz vagy ezer SNP szűrésére alkalmas genetikai tesztek segítségével megvalósulhat az egyéni, SNP alapú „rizikó profil” megállapítása, amely segítségével a gyógyszeres terápia az egyénhez igazítható (Davidsen és mtsai 2008). Fontos hozzátenni azonban, hogy egy gyógyszerre adott válaszreakciót a genomszintű eltéréseken túl számos egyéb tényező (például epigenetikai, poszttranszlációs, biokémiai folyamat) befolyásolhat.

Mindaddig, amíg nem rendelkezünk olyan megbízható farmakogenetikai teszttel, amely a klinikai gyakorlatban értékelhető információval szolgál, a terápiás gyógyszeres szint monitorozás, a farmakokinetikai paraméterek ismerete elengedhetetlen a MTX biztonságos alkalmazásához (Gervasini és mtsai 2010).

8. Következtetések

Vizsgálataink alapján a terápiás szérum és liquor MTX szintek az 5 g/m² dózisú kezelésekkel megbízhatóbban elérhetők azzal együtt, hogy a reverzibilis mellékhatások kialakulása valamivel gyakoribb a magasabb dózisú kezeléseket követően. Eredményeink megegyeznek a nemzetközi, ALL-sok HD-MTX kezeléseit célzó vizsgálatok eredményeivel, amelyek szerint az ismételt HD-MTX kezelések hasonló MTX és 7-OH-MTX szinteket eredményeznek, és nem járnak nagyobb toxicitással. A saját és korábbi tanulmányok eredményei alapján idősebb (>14 éves) gyermekek HD-MTX kezelése során magasabb szérum MTX szintekre és gyakoribb mellékhatásokra lehet számítani, mint a fiatalabb (<6 éves) gyermekekben.

A szérum és liquor MTX szintek az 5 g/m² és 2 g/m² dózisú kezelést követően is nagy inter- és intraindividuális különbséget mutatnak. Az irodalomban a szérum és liquor MTX szintek közötti kapcsolat ellentmondásos. Munkánk során választ kerestünk arra, hogy van-e összefüggés az alkalmazott HD-MTX dózis és a MTX szérumból liquorba történő penetrációjának aránya között. A penetráció arányát összehasonlítva, a két különböző dózisú csoport között nem volt különbség, a liquorba történő penetráció aránya tehát dózis függetlennek bizonyult. Ezt támasztotta alá a 24 órás szérum és liquor MTX szintek között tapasztalt szignifikáns korreláció is.

A 7-OH-MTX szintek mindkét HD-MTX kezelés esetén szoros összefüggést mutattak a kialakult nefrotoxicitással. További kutatásokat igényel tehát annak lehetősége, hogy a 7-OH-MTX szorosabb összefüggést mutat a kialakult mellékhatásokkal, ezért monitorozása előnyösebb lehet a MTX-nál.

Farmakogenetikai elemzéseink során olyan új, többváltozós statisztikai módszereket alkalmaztunk, amellyel lehetőségünk volt a nagyszámú magyarázó változó egyidejű figyelembe vételére, feltárva az esetleges interakciókat is.

Elsőként igazoltunk összefüggést az *ARID5B* gén polimorfizmusai és a MTX, 7-OH-MTX szérumszintek között. A gén pontos szerepe a szérumszintek kialakításában azonban további vizsgálatokat igényel.

Eredményeink megerősítik az *SLCO1B1* gén szerepét, mint a MTX ürülésének lehetséges genetikai prediktorát.

Összefüggéseket azonosítottunk a kezeléseket követően fellépett akut toxicitás és az *SLC19A1*, *SLC22A8*, *MTR* és *MTHFD1* gének új, eddig kevésbé vizsgált genetikai variánsai között.

További vizsgálatok és nagyobb elemszámú, nemzetközi populáción történő validálás után az általunk igazolt polimorfizmusok segítségével, valamint farmakokinetikai vizsgálataink eredményeinek felhasználásával megvalósulhatna az egyénhez igazított gyógyszeradagolás.

9. Összefoglalás

A MTX széles körben alkalmazott kemoterápiás szer, különböző ALL protokollok kulcseleme. Az optimális dózis azonban máig nem egyértelműen definiált. Sokféle protokoll létezik, de kevés az olyan vizsgálat, amely különböző dózisú HD-MTX kezeléseket hasonlít össze.

Munkánk során részletes, összehasonlító elemzést készítettünk az ALL-BFM 95 és ALL IC-BFM 2002 protokoll ajánlása szerint alkalmazott 5 és 2 g/m²/24 óra dózisú HD-MTX kezeléseket követően a MTX farmakokinetikájáról és a kezelések toxicitásáról. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a folát anyagcserében szerepet játszó, transzporter molekulákat és transzkripciós fehérjéket kódoló gének polimorfizmusai összefüggésbe hozhatók-e a farmakokinetikai paraméterekkel és a kialakult toxicitással.

Összesen 153 gyermek 583 HD-MTX kezelését elemeztük retrospektív módon. Vizsgáltuk a kezeléseket követő máj-, vese- és csontvelői toxicitás kialakulását. Tizennégy gén 63 polimorfizmusát genotipizáltuk. A statisztikai elemzés során a magyarázó változók célváltozónkénti szelekcióját és az esetleges interakciók feltárását random forest és regressziós fák segítségével végeztük, azután lineáris kevert modelleket illesztettünk, hogy megerősítsük az így kapott eredményeket.

Eredményeink alapján a terápiás szérum és liquor MTX szintek az 5 g/m² dózisú kezelésekkal megbízhatóbban elérhetők voltak. A liquorba történő MTX penetráció aránya nem mutatott összefüggést az alkalmazott MTX dózissal. A 24. órában mért liquor és szérum MTX szintek között szignifikáns korreláció állt fent. Az 5 g/m²-es kezeléseket követően gyakrabban alakultak ki reverzibilis mellékhatások. Az *ARID5B* gén polimorfizmusai szoros összefüggést mutattak a MTX és 7-OH-MTX szérumszintekkel, bár a gén pontos szerepe a szérumszintek kialakításában további vizsgálatokat igényel. Munkánk során megerősítettük azokat a korábbi eredményeket, melyek alapján az *SLCO1B1* gén polimorfizmusa a MTX elimináció prediktora lehet. A folát anyagcserében szerepet játszó gének olyan új polimorfizmusait azonosítottuk, amelyek összefüggést mutathatnak a kialakuló toxicitással.

További vizsgálatok, nagyobb elemszámú populáción történő validálás után, farmakokinetikai és farmakogenetikai vizsgálataink az egyénhez igazított gyógyszeradagolás létrejöttéhez járulhatnak hozzá.

10. Summary

HD-MTX is a widely used anticancer agent. It is an important component of many chemotherapeutic regimens of childhood ALL, however the exact dose has not been clearly defined. Various numbers of protocols exist but there are only few studies comparing the different dose treatments.

We performed a detailed comparative study of the pharmacokinetics and toxicity of MTX and 7-OH-MTX after 5 and 2 g/m²/24 hours HD-MTX treatments administered according to the ALL-BFM 95 and ALL IC-BFM 2002 protocols. We also investigated the influence of common and rare polymorphisms in genes of the folate metabolic pathway, transporter molecules and transcription proteins on pharmacokinetics and toxicity.

Overall, 583 HD-MTX treatments of 153 children were analyzed retrospectively. Hematological, hepatic and renal toxicities, estimated by routine laboratory parameters were evaluated. 63 SNPs of 14 genes were genotyped. Random forest and regression trees were used for variable selection. Linear mixed models were established to prove the significance of the selected variables and to estimate effect sizes.

According to our results therapeutic serum and CSF MTX concentrations could be achieved more reliably with the 5 g/m²/24h treatments. The penetration rate of MTX from the serum into the CSF was dose independent. The CSF and serum MTX concentrations at 24 hours showed a significant correlation. Slightly more but reversible side effects were seen after the 5 g/m² dose treatments. Polymorphisms of the *ARID5B* gene were significantly associated with the serum levels and toxicity of MTX and its metabolite, 7-OH-MTX. However, the exact role of this gene on MTX levels needs further investigations. We confirmed the possible role of the *SLCO1B1* gene as a pharmacogenetic predictor for MTX pharmacokinetics. Novel genetic variants of genes that play roles in the folate metabolism were shown to be associated with the development of acute toxicity after HD-MTX treatment.

After further investigations and validation in a larger cohort, our pharmacokinetic and pharmacogenetic results might contribute to the individual dose adjustment.

12. Irodalomjegyzék

- Agresti A . Categorical Data Analysis. John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ, 2002.
- ALL IC-BFM Trial Steering Committee. A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia. Final Version of Therapy Protocol from May 3, 2002. ALL IC-BFM Trial Steering Committee, Hannover, 2002.
- ALL IC-BFM Trial Steering Committee. A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia. Final Version of Therapy Protocol from August 14, 2009. ALL IC-BFM Trial Steering Committee, Hannover, 2009.
- Al-Shakfa F, Dulucq S, Brukner I, Milacic I, Ansari M, Beaulieu P, Moghrabi A, Laverdiere C, Sallan SE, Silverman LB, Neuberg D, Kutok JL, Sinnett D, Krajinovic M. (2009) DNA variants in region for noncoding interfering transcript of dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*, 15: 6931-6938.
- Assaraf YG. (2007) Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev*, 26: 153-181.
- Bates D, Maechler M, Bolker B. (2012) lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes. R package version 0.999999-0. <http://cran.r-project.org/package=lme4>.
- Bezabeh S, Mackey AC, Kluetz P, Jappar D, Korvick J. (2012) Accumulating evidence for a drug-drug interaction between methotrexate and proton pump inhibitors. *Oncologist*, 17: 550-554.
- Bleyer WA. (1978) The clinical pharmacology of methotrexate: new applications of an old drug. *Cancer*, 41: 36-51.
- Bore P, Lena N, Imbert AM, Favre R, Cano JP, Meyer G, Carcassonne Y. (1986) Methotrexate-vindesine association in head and neck cancer: modification of methotrexate's hydroxylation in presence of vindesine. *Cancer Chemother Pharmacol*, 17: 171-176.
- Borsi JD, Moe PJ. (1987) A comparative study on the pharmacokinetics of methotrexate in a dose range of 0.5 g to 33.6 g/m² in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 60: 5-13.

- Borsi JD, Sagen E, Romslo I, Moe PJ. (1990) Comparative study on the pharmacokinetics of 7-hydroxy-methotrexate after administration of methotrexate in the dose range of 0.5-33.6 g/m² to children with acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol*, 18: 217-224.
- Cario H, Smith DE, Blom H, Blau N, Bode H, Holzmann K, Pannicke U, Hopfner KP, Rump EM, Ayric Z, Kohne E, Debatin KM, Smulders Y, Schwarz K. (2011) Dihydrofolate reductase deficiency due to a homozygous DHFR mutation causes megaloblastic anemia and cerebral folate deficiency leading to severe neurologic disease. *Am J Hum Genet*, 88: 226-231.
- Cascorbi I. (2006) Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther*, 112: 457-473.
- Castaldo P, Magi S, Nasti AA, Arcangeli S, Lariccia V, Alesi N, Tocchini M, Amoroso S. (2011) Clinical pharmacogenetics of methotrexate. *Curr Drug Metab*, 12: 278-286.
- Cheok MH, Pottier N, Kager L, Evans WE. (2009) Pharmacogenetics in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*, 46: 39-51.
- Costea I, Moghrabi A, Laverdiere C, Graziani A, Krajcinovic M. (2006) Folate cycle gene variants and chemotherapy toxicity in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 91: 1113-1116.
- Davidson ML, Dalhoff K, Schmiegelow K. (2008) Pharmacogenetics influence treatment efficacy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*, 30: 831-849.
- de Jonge R, Hooijberg JH, van Zelst BD, Jansen G, van Zantwijk CH, Kaspers GJ, Peters GJ, Ravindranath Y, Pieters R, Lindemans J. (2005) Effect of polymorphisms in folate-related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 106: 717-720.
- de Moraes AC, Maranhão CK, Rauber GS, Santos-Silva MC. (2013) Importance of detecting multidrug resistance proteins in acute leukemia prognosis and therapy. *J Clin Lab Anal*, 27: 62-71.
- Dean M. (2009) ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 14: 3-9.

- 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: 733-739.
- Erculj N, Kotnik BF, Debeljak M, Jazbec J, Dolzan V. (2012) Influence of folate pathway polymorphisms on high-dose methotrexate-related toxicity and survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 53: 1096-1104.
- Erttmann R, Bielack S, Landbeck G. (1985) Kinetics of 7-hydroxy-methotrexate after high-dose methotrexate therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 15: 101-104.
- Evans WE, Christensen ML. (1985) Drug interactions with methotrexate. *J Rheumatol Suppl*, 12: 15-20.
- Evans WE, Crom WR, Abromowitch M, Dodge R, Look AT, Bowman WP, George SL, Pui CH. (1986) Clinical pharmacodynamics of high-dose methotrexate in acute lymphocytic leukemia. Identification of a relation between concentration and effect. *N Engl J Med*, 314: 471-477.
- Faganel Kotnik B, Dolzan V, Grabnar I, Jazbec J. (2010) Relationship of the reduced folate carrier gene polymorphism G80A to methotrexate plasma concentration, toxicity, and disease outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 51: 724-726.
- Faganel Kotnik B, Grabnar I, Bohanec Grabar P, Dolzan V, Jazbec J. (2011) Association of genetic polymorphism in the folate metabolic pathway with methotrexate pharmacokinetics and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia and malignant lymphoma. *Eur J Clin Pharmacol*, 67: 993-1006.
- Falus A, Erdélyi D. Bevezetés a farmakogenomikába. In: Gyire K, Füst Z (szerk.), *Farmakológia, Medicina.*, Budapest, 2007: 87-94.
- Farber S, Diamond LK. (1948) Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med*, 238: 787-793.
- 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: 353-358.
- Gahályi B, Lakner G. A farmakogenetikai sajátosságok klinikai jelentősége, terápiás gyógyszer szintkövetés. In: Kerpel-Fronius S (szerk.), *Farmakoterápia, Medicina*, Budapest, 2008: 99-104.
- Galeczki A, Burzykovszki, T. (2013) Datasets and utility functions enhancing functionality of nlme package. Package version 0.70-3. <http://cran.r-project.org/web/packages/nlmeU/index.html>.
- Gervasini G, Benitez J, Carrillo JA. (2010) Pharmacogenetic testing and therapeutic drug monitoring are complementary tools for optimal individualization of drug therapy. *Eur J Clin Pharmacol*, 66: 755-774.
- Gewirtz DA, Holt SA. (1985) Protein binding as a component of drug interaction in cellular pharmacokinetic studies. Effects of probenecid on transport and accumulation of methotrexate in Ehrlich ascites tumor cells in vitro. *Biochem Pharmacol*, 34: 747-754.
- Giverhaug T, Loennechen T, Aarbakke J. (1999) The interaction of 6-mercaptopurine (6-MP) and methotrexate (MTX). *Gen Pharmacol*, 33: 341-346.
- Greene ND, Stanier P, Copp AJ. (2009) Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet*, 18: R113-R129.
- 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: 4671-4677.
- Groninger E, Proost JH, de Graaf SS. (2004) Pharmacokinetic studies in children with cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 52: 173-197.
- Gronroos M, Chen M, Jahnukainen T, Capitanio A, Aizman RI, Celsi G. (2006) Methotrexate induces cell swelling and necrosis in renal tubular cells. *Pediatr Blood Cancer*, 46: 624-629.
- Gronroos MH, Jahnukainen T, Mottonen M, Perkkio M, Irjala K, Salmi TT. (2008) Long-term follow-up of renal function after high-dose methotrexate treatment in children. *Pediatr Blood Cancer*, 51: 535-539.

- Hansen HH, Selawry OS, Holland JF, McCall CB. (1971) The variability of individual tolerance to methotrexate in cancer patients. *Bri J Cancer*, 25: 298-305.
- Hardy-Weinberg equilibrium calculator: <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>.
- Healy J, Richer C, Bourgey M, Kritikou EA, Sinnett D. (2010) Replication analysis confirms the association of ARID5B with childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 95: 1608-1611.
- Hegy M, Gulacsi A, Csagoly E, Csordas K, Eipel OT, Erdelyi DJ, Muller J, Nemes K, Lautner-Csorba O, Kovacs GT. (2012) Clinical relations of methotrexate pharmacokinetics in the treatment for pediatric osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 138: 1697-1702.
- Hempel L, Misselwitz J, Fleck C, Kentouche K, Leder C, Appenroth D, Rost M, Zintl F. (2003) Influence of high-dose methotrexate therapy (HD-MTX) on glomerular and tubular kidney function. *Med Pediatr Oncol*, 40: 348-354.
- Holmboe L, Andersen AM, Morkrid L, Slordal L, Hall KS. (2012) High dose methotrexate chemotherapy: pharmacokinetics, folate and toxicity in osteosarcoma patients. *Br J Clin Pharmacol*, 73: 106-114.
- Hon YY, Evans WE. (1998) Making TDM work to optimize cancer chemotherapy: a multidisciplinary team approach. *Clin Chem*, 44: 388-400.
- Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. (1995) Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct*, 20: 191-197.
- Hothorn T, Hornik, K., Zeileis, A. (2006) Unbiased recursive partitioning: A conditional inference framework. *J Comput Graph Stat*, 15: 651-674.
- Hothorn T, Hornik K, Strobl C, Zeileis A. (2013) party: A laboratory for recursive part(y)itioning. Package version 1.0-6. <http://cran.r-project.org/web/packages/party/index.html>.
- Huang L, Tissing WJ, de Jonge R, van Zelst BD, Pieters R. (2008) Polymorphisms in folate-related genes: association with side effects of high-dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 22: 1798-1800.

- Imokawa S, Colby TV, Leslie KO, Helmers RA. (2000) Methotrexate pneumonitis: review of the literature and histopathological findings in nine patients. *Eur Respir J*, 15: 373-381.
- Jeney A, Kralovánszky J. Citotoxikus gyógyszerek. In: Gyire K, Füst Z (szerk.), *Farmakológia, Medicina*, Budapest, 2007: 952-953.
- Joannon P, Oviedo I, Campbell M, Tordecilla J. (2004) High-dose methotrexate therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia: lack of relation between serum methotrexate concentration and creatinine clearance. *Pediatr Blood Cancer*, 43: 17-22.
- Jönsson P, Höglund P, Wiebe T, Schröder H, Seidel H, Skärby T. (2007) Methotrexate concentrations in cerebrospinal fluid and serum, and the risk of central nervous system relapse in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Anticancer Drugs*, 18: 941-948.
- 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: 4151-4157.
- Kishi S, Griener J, Cheng C, Das S, Cook EH, Pei D, Hudson M, Rubnitz J, Sandlund JT, Pui CH, Relling MV. (2003) Homocysteine, pharmacogenetics, and neurotoxicity in children with leukemia. *J Clin Oncol*, 21: 3084-3091.
- Kiss C. A vérképzőrendszer betegségei gyermekkorban. In: Maródi L (szerk.), *Gyermekgyógyászat, Medicina*, Budapest, 2006: 513-519.
- Konig J, Muller F, Fromm MF. (2013) Transporters and drug-drug interactions: important determinants of drug disposition and effects. *Pharmacol Rev*, 65: 944-966.
- Krajinovic M, Lemieux-Blanchard E, Chiasson S, Primeau M, Costea I, Moghrabi A. (2004) Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*, 4: 66-72.
- Lautner-Csorba O, Gezsi A, Semsei AF, Antal P, Erdelyi DJ, Schermann G, Kutszegi N, Csordas K, Hegyi M, Kovacs 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.

- Laverdiere C, Chiasson S, Costea I, Moghrabi A, Krajinovic M. (2002) Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 100: 3832-3834.
- Lennard L. (1999) Therapeutic drug monitoring of antimetabolic cytotoxic drugs. *Br J Clin Pharmacol*, 47: 131-143.
- Liegler DG, Henderson ES, Hahn MA, Oliverio VT. (1969) The effect of organic acids on renal clearance of methotrexate in man. *Clin Pharmacol Ther*, 10: 849-857.
- Lippens RJ, Winograd B. (1988) Methotrexate concentration levels in the cerebrospinal fluid during high-dose methotrexate infusions: an unreliable prediction. *Pediatr Hematol Oncol*, 5: 115-124.
- Lo Nigro L. (2013) Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*, 35: 245-252.
- Lopez-Lopez E, Ballesteros J, Pinan MA, Sanchez de Toledo J, Garcia de Andoin N, Garcia-Miguel P, Navajas A, Garcia-Orad A. (2013) Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics*, 23: 53-61.
- Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I, Ballesteros J, Pinan MA, Garcia-Miguel P, Navajas A, Garcia-Orad A. (2011) Polymorphisms of the SLC01B1 gene predict methotrexate-related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 57: 612-619.
- Markász L. In vitro gyógyszerérzékenységi vizsgálat az individualizált ganatellenes kemotrapiában. Doktori értekezés, Debreceni Egyetem, Témavezető: Dr. Oláh Éva egyetemi tanár, 2007.
- McMahon G, O'Connor R. (2009) Therapeutic drug monitoring in oncology: does it have a future? *Bioanalysis*, 1: 507-511.
- Messmann AR, Allegra CJ. Antifolates. In: Chabner BA, Longo DL (szerk.), *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*, 2nd Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1996: 84-106.
- Mikkelsen TS, Thorn CF, Yang JJ, Ulrich CM, French D, Zaza G, Dunnenberger HM, Marsh S, McLeod HL, Giacomini K, Becker ML, Gaedigk R, Leeder JS, Kager

- L, Relling MV, Evans W, Klein TE, Altman RB. (2011) PharmGKB summary: methotrexate pathway. *Pharmacogenet Genomics*, 21: 679-686.
- Milano G, Thyss A, Serre Debeauvais F, Laureys G, Benoit Y, Deville A, Dutour C, Robert A, Otten J, Behar C, Frappaz D. (1990) CSF drug levels for children with acute lymphoblastic leukemia treated by 5 g/m² methotrexate. A study from the EORTC Children's Leukemia Cooperative Group. *Eur J Cancer*, 26: 492-495.
- Miller DR. (2006) A tribute to Sidney Farber - the father of modern chemotherapy. *Br J Haematol*, 134: 20-26.
- Moricke A, Reiter A, Zimmermann M, Gadner H, Stanulla M, Dordelmann M, Loning L, Beier R, Ludwig WD, Ratei R, Harbott J, Boos J, Mann G, Niggli F, Feldges A, Henze G, Welte K, Beck JD, Klingebiel T, Niemeyer C, Zintl F, Bode U, Urban C, Wehinger H, Niethammer D, Riehm H, Schrappe M. (2008) Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood*, 111: 4477-4489.
- Nakagawa S, Schielzeth, H. (2013) A general and simple method for obtaining R² from generalized linear mixed-effects models. *Methods Ecol Evol*, 4: 133-142.
- National Cancer Institute (2010) Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0 scoring system. http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf.
- Nersting J, Schmiegelow K. (2009) Pharmacogenomics of methotrexate: moving towards individualized therapy. *Pharmacogenomics*, 10: 1887-1889.
- Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ. (2011) Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. *Pharmacol Rev*, 63: 157-181.
- Owen SA, Hider SL, Martin P, Bruce IN, Barton A, Thomson W. (2013) Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics J*, 13: 227-234.
- Panetta JC, Sparreboom A, Pui CH, Relling MV, Evans WE. (2010) Modeling mechanisms of in vivo variability in methotrexate accumulation and folate pathway inhibition in acute lymphoblastic leukemia cells. *PLoS Comput Biol*, 6: e1001019.

- Patino-Garcia A, Zalacain M, Marrodan L, San-Julian M, Sierrasesumaga L. (2009) Methotrexate in pediatric osteosarcoma: response and toxicity in relation to genetic polymorphisms and dihydrofolate reductase and reduced folate carrier 1 expression. *J Pediatr*, 154: 688-693.
- Paxton JW. (1984) Interaction of probenecid with the protein binding of methotrexate. *Pharmacology*, 28: 86-89.
- Pico JL, Avila-Garavito A, Naccache P. (1998) Mucositis: Its Occurrence, Consequences, and Treatment in the Oncology Setting. *Oncologist*, 3: 446-451.
- Pinheiro J, Bates D. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. 1st edn. Springer-Verlag, New York, NY, 2000.
- Plard C, Bressolle F, Fakhoury M, Zhang D, Yacouben K, Rieutord A, Jacqz-Aigrain E. (2007) A limited sampling strategy to estimate individual pharmacokinetic parameters of methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol*, 60: 609-620.
- Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. (2011) Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol*, 29: 551-565.
- Radtke S, Zolk O, Renner B, Paulides M, Zimmermann M, Moricke A, Stanulla M, Schrappe M, Langer T. (2013) Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 121: 5145-5153.
- Ramsey LB, Panetta JC, Smith C, Yang W, Fan Y, Winick NJ, Martin PL, Cheng C, Devidas M, Pui CH, Evans WE, Hunger SP, Loh M, Relling MV. (2013) Genome-wide study of methotrexate clearance replicates SLCO1B1. *Blood*, 121: 898-904.
- Relling MV, Pui CH, Sandlund JT, Rivera GK, Hancock ML, Boyett JM, Schuetz EG, Evans WE. (2000) Adverse effect of anticonvulsants on efficacy of chemotherapy for acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 356: 285-290.
- R Development Core Team (2010) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://r-project.org>

- Rizwan AN, Burckhardt G. (2007) Organic anion transporters of the SLC22 family: biopharmaceutical, physiological, and pathological roles. *Pharm Res*, 24: 450-470.
- Robey RW, Polgar O, Deeken J, To KW, Bates SE. (2007) ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis Rev*, 26: 39-57.
- 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: 1176-1181.
- Schmiegelow K. (2009) Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review. *Br J Haematol*, 146: 489-503.
- Seidel H, Andersen A, Kvaloy JT, Nygaard R, Moe PJ, Jacobsen G, Lindqvist B, Slordal L. (2000) Variability in methotrexate serum and cerebrospinal fluid pharmacokinetics in children with acute lymphocytic leukemia: relation to assay methodology and physiological variables. *Leuk Res*, 24: 193-199.
- Seidemann K, Book M, Zimmermann M, Meyer U, Welte K, Stanulla M, Reiter A. (2006) MTHFR 677 (C-->T) polymorphism is not relevant for prognosis or therapy-associated toxicity in pediatric NHL: results from 484 patients of multicenter trial NHL-BFM 95. *Ann Hematol*, 85: 291-300.
- Shinozaki T, Watanabe H, Tomidokoro R, Yamamoto K, Horiuchi R, Takagishi K. (2000) Successful rescue by oral cholestyramine of a patient with methotrexate nephrotoxicity: nonrenal excretion of serum methotrexate. *Med Pediatr Oncol*, 34: 226-228.
- Skarby T, Jonsson P, Hjorth L, Behrentz M, Bjork O, Forestier E, Jarfelt M, Lonnerholm G, Hoglund P. (2003) High-dose methotrexate: on the relationship of methotrexate elimination time vs renal function and serum methotrexate levels in 1164 courses in 264 Swedish children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Cancer Chemother Pharmacol*, 51: 311-320.
- Sterba J, Dusek L, Demlova R, Valik D. (2006) Pretreatment plasma folate modulates the pharmacodynamic effect of high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: "folate overrescue" concept revisited. *Clin Chem*, 52: 692-700.

- Stover PJ. (2009) One-carbon metabolism-genome interactions in folate-associated pathologies. *J Nutr*, 139: 2402-2405.
- Strobl C, Boulesteix AL, Kneib T, Augustin T, Zeileis A. (2008) Conditional variable importance for random forests. *BMC Bioinformatics*, 9: 307.
- Strobl C, Malley J, Tutz G. (2009) An introduction to recursive partitioning: rationale, application, and characteristics of classification and regression trees, bagging, and random forests. *Psychol Methods*, 14: 323-348.
- Strolin Benedetti M, Baltes EL. (2003) Drug metabolism and disposition in children. *Fundam Clin Pharmacol*, 17: 281-299.
- Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Hosoyamada M, Cha SH, Sekine T, Endou H. (2002) Characterization of methotrexate transport and its drug interactions with human organic anion transporters. *J Pharmacol Exp Ther*, 302: 666-671.
- Taub JW, Matherly LH, Ravindranath Y, Kaspers GJ, Rots MG, Zantwijk CH. (2002) Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methotrexate sensitivity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 16: 764-765.
- Tompa A. (2011) Daganatos betegségek előfordulása. *Magyar Tudomány*, II: 1333-1345.
- Treon SP, Chabner BA. (1996) Concepts in use of high-dose methotrexate therapy. *Clin Chem*, 42: 1322-1329.
- Trevino LR, Shimasaki N, Yang W, Panetta JC, Cheng C, Pei D, Chan D, Sparreboom A, Giacomini KM, Pui CH, Evans WE, Relling MV. (2009a) Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *J Clin Oncol*, 27: 5972-5978.
- Trevino LR, Yang W, French D, Hunger SP, Carroll WL, Devidas M, Willman C, Neale G, Downing J, Raimondi SC, Pui CH, Evans WE, Relling MV. (2009b) Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, 41: 1001-1005.
- Walling J. (2006) From methotrexate to pemetrexed and beyond. A review of the pharmacodynamic and clinical properties of antifolates. *Invest New Drugs*, 24: 37-77.

- Widemann BC, Adamson PC. (2006) Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist*, 11: 694-703.
- Wiela-Hojenska A, Gorczyńska E, Orzechowska-Juzwenko K, Golebiowski W, Hurkacz M, Bogusławska-Jaworska J. (2001) Metabolic functions of the liver during chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 39: 246-250.
- Windsor RE, Strauss SJ, Kallis C, Wood NE, Whelan JS. (2012) Germline genetic polymorphisms may influence chemotherapy response and disease outcome in osteosarcoma: a pilot study. *Cancer*, 118: 1856-1867.
- Woessmann W, Seidemann K, Mann G, Zimmermann M, Burkhardt B, Oschlies I, Ludwig WD, Klingebiel T, Graf N, Gruhn B, Juergens H, Niggli F, Parwaresch R, Gadner H, Riehm H, Schrappe M, Reiter A. (2005) The impact of the methotrexate administration schedule and dose in the treatment of children and adolescents with B-cell neoplasms: a report of the BFM Group Study NHL-BFM95. *Blood*, 105: 948-958.
- Wysocki M, Balcar-Boron A, Krzyzanowski M, Szadujkis-Szadurski L, Ozynski T, Nowaczyk-Michalak A. (1992a) [Cerebrospinal fluid methotrexate level in children treated with medium-high and high doses of the drug]. *Acta Haematol Pol*, 23: 185-190.
- Wysocki M, Krzyzanowski M, Ozynski T, Pilecki O, Balcar-Boron A, Szadujkis-Szadurski L. (1992b) [Studies of methotrexate pharmacokinetics in children with neoplasms of the hematopoietic system after administration of different doses of the drug]. *Acta Haematol Pol*, 23: 179-183.
- Xia CQ, Smith PG. (2012) Drug efflux transporters and multidrug resistance in acute leukemia: therapeutic impact and novel approaches to mediation. *Mol Pharmacol*, 82: 1008-1021.
- Xu H, Cheng C, Devidas M, Pei D, Fan Y, Yang W, Neale G, Scheet P, Burchard EG, Torgerson DG, Eng C, Dean M, Antillon F, Winick NJ, Martin PL, Willman CL, Camitta BM, Reaman GH, Carroll WL, Loh M, Evans WE, Pui CH, Hunger SP, Relling MV, Yang JJ. (2012) ARID5B genetic polymorphisms contribute to racial disparities in the incidence and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 30: 751-757.

- Xu W, Tang Y, Song H, Shi S, Yang S. (2007) Retrospective study on elimination delay of methotrexate in high-dose therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia in China. *J Pediatr Hematol Oncol*, 29: 688-693.
- Yee SW, Gong L, Badagnani I, Giacomini KM, Klein TE, Altman RB. (2010) SLC19A1 pharmacogenomics summary. *Pharmacogenet Genomics*, 20: 708-715.

13. Saját publikációk jegyzéke

13.1. Az értekezésben összefoglalt közlemények

Csordas K, Lautner-Csorba O, Semsei AF, Harnos A, Hegyi M, Erdelyi DJ, Eipel OT, Szalai C, Kovacs GT. (2014) Associations of novel genetic variations in the folate-related and ARID5B genes with the pharmacokinetics and toxicity of high-dose methotrexate in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Brit J Haematol*, doi: 10.1111/bjh.12886.

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.

Hegyi M, Gulacsi A, Csagoly E, Csordas K, Eipel OT, Erdelyi DJ, Muller J, Nemes K, Lautner-Csorba O, Kovacs GT. (2012) Clinical relations of methotrexate pharmacokinetics in the treatment for pediatric osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 138: 1697-1702.

Lautner-Csorba O, Gezsi A, Semsei A, Antal P, Erdelyi DJ, Schermann G, Kutszegi N, Csordas K, Hegyi M, Kovacs 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.

13.2. Egyéb témában megjelent közlemények

Gezsi A, Lautner-Csorba O, Erdelyi DJ, Hullam G, Antal P, Semsei AF, Kutszegi N, Hegyi M, Csordas K, Kovacs G, Szalai C. (2014) In interaction with gender a common CYP3A4 polymorphism may influence the survival rate of chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. Paper doi:10.1038/tpj.2014.60.

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.

14. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Kovács Gábornak, a bizalmat és bátorítást, hogy elindított a doktori képzés útján, és mindvégig segítette kutatásaimat. Köszönöm, hogy biztosította a munkám előrehaladásához szükséges feltételeket.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Fekete Györgynek és Prof. Dr. Szabó Andrásnak, a II. sz. Gyermekgyógyászati Klinika volt és jelenlegi vezetőinek, hogy lehetőséget kaptam arra, hogy tudományos munkámat kezdetben TDK, majd PhD hallgatóként az intézetben végezzem.

Köszönöm Prof. Dr. Falus Andrásnak és Prof. Dr. Szalai Csabának, hogy lehetőséget kaptam arra, hogy a farmakogenetikai vizsgálatokhoz szükséges méréseket a Genetikai-, Sejt- és Immunbiológiai intézetben végezzem. Köszönöm Dr. Félné Semsei Ágnesnek, Dr. Csorba Orsolyának és Sándorné Vángor Mónikának, hogy PhD munkám kezdetén megismertették a DNS minták kezelését és a különböző genotipizálási módszereket. Köszönöm szépen a munkám közben nyújtott szakmai segítségüket, és hogy farmakogenetikai kérdésekkel bármikor fordulhattam hozzájuk.

Köszönöm Dr. Erdélyi Dánielnek, hogy PhD munkája során a farmakogenetikai vizsgálatokhoz szükséges biobankot létrehozta, és én azt munkám során további mintákkal bővíthettem. Köszönöm, hogy az ALL munkacsoport vezetőjeként munkámat figyelemmel kísérte.

Szeretném megköszönni Dr. Harnos Andreának, a Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Biomatematikai és Informatikai Tanszék docensének, hogy tőle biostatistikát tanulhattam, és segítséget nyújtott a statisztikai elemzésekhez.

Köszönöm Dr. Hegyi Mártának és Dr. Eipel Olivérnek, hogy hasonló kutatómunkát végző kollégákként kérdéseimet megbeszélhettem velük, és hogy így hárman egy csapatot alkothattunk.

Köszönöm mentoromnak, Prof. Dr. Kellermayer Miklósnak, a Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet vezetőjének, az útmutatását, példamutatását, és hogy bármikor, bármilyen kéréssel – kérdéssel fordulhattam hozzá.

Mindenekelőtt pedig nagyon hálás vagyok a Férjemnek, Szüleimnek és Testvéremnek, hogy mindvégig mellettem álltak, bátorítottak, támogattak munkámban és egész eddigi életem során.

Köszönöm a munka elvégzéséhez nyújtott támogatást az NKTH (Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal) TECH_08-A1/2-2008-0120 által támogatott Genagrid konzorciumnak.