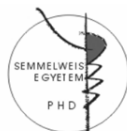


Különböző genetikai és klinikai tényezők hatása a myeloma kialakulására és a betegek túlélésére

Doktori tézisek

Dr. Varga Gergely

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Masszi Tamás, PhD, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Bödör Csaba, PhD, tudományos
főmunkatárs
Dr. Plander Márk, PhD, adjunktus

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

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Domján Gyula, PhD, egyetemi
magántanár
Dr. Szaleczky Erika, PhD, főorvos

Budapest
2015

Bevezetés

A myeloma multiplex (MM) rosszindulatú hematológiai megbetegedés, melyet malignusan átalakult, klonális plazmasejtek csontvelői burjánzása jellemez. A WHO osztályozása szerint érett (perifériás) B-sejtes neoplazma. Magyarországon évente mintegy 350–400 új myelomás beteg jelentkezésével lehet számolni, a várható túlélés az utóbbi évtizedekben megjelent számos új, potens kezelési lehetőség eredményeképpen sokat javult, a jó prognosztikai csoportban összejt-átültetéssel kezelve eléri a tíz évet.

A betegek leggyakrabban csontfájdalmakkal, a csontvelő-elégtelenség tüneteivel, az esetek 10%-ában veseelégtelenséggel fordulnak orvoshoz. Az utóbbi évtizedekben számos új gyógyszercsoport jelent meg, és ezeknek sok képviselője már a gyakorlatban is elérhető, fokozatosan kiváltva a korábbi évekre jellemző kemoterápia alapú kezelést. Ennek haszna a kezelés eredményességének növekedése és a toxicitás csökkenése. 65 éves kor alatt a 90-es évek óta standard kezelés a csontvelő-transzplantáció.

Az interleukin-6 (IL6) myelomában kiemelt fontosságú cytokin, serkenti a MM sejtek proliferációját, növeli kemorezisztenciájukat, vérszintje jól korrelál a betegség aktivitásával. Az IL6 gén kódolja. Az IL6 promotor -174G>C polimorfizmus (rs1800795) egy egy bázist érintő egy pontos nukleotid-polimorfizmus (SNP). A C allél hordozóiban az IL6 szint expresszió fokozódása elmarad lipopoliszacharid (LPS) stimuláció esetén, míg ez kifejezett a G allél hordozóiban.

Az interleukin-6 receptor (IL6R) Asp358Ala (rs2228145) szintén egy SNP. A C allél (Ala) jelenlétében megnő az IL6R szolubilis formájának szintje. Ennek magyarázata nem világos, de legvalószínűbb, hogy fokozódik az IL6R limitált proteolízis következtében való leválása a sejtfelszínről. Ennek jelentős hatása van az IL6 rendszer működésére, ugyanis a megnövekedett szolubilis IL6R fokozza a transzszignalizációt, aminek pro-inflammatorikus hatása van.

A nukleáris faktor kappa B (NFkB) rendszernek kitüntetett jelentősége van a legtöbb B-sejtes malignitásban, köztük myelomában. Aktivitása fokozza a sejtek proliferációját, rezisztenciáját, gátolja az apoptózist. Myelomában kiemeli a

jelentőségét, hogy a bortezomib legfontosabb hatásmódja épp az NFkB1 gátlása.

Az NFkB1 -94inz/delATTG (rs28362491) egy négy bázist érintő inzerció/deléción polimorfizmus az NFkB1 gén promoter régiójában. A delécións allél kevésbé aktív, promoteréhez kevésbé tudnak a transzkripciós faktorok kapcsolódni, pl. LPS stimulációra alacsonyabb NFkB válasz jelenik csak meg.

Hipotézisünk az volt, hogy az aktívabb allélok hajlamosíthatnának MM kialakulására, illetve befolyásolhatják a kezelés eredményességét.

Célkitűzések

1. Tekintve, hogy az IL6 mennyire központi jelentőségű cytokin myelomában, és hogy az IL6 promoter -174G>C és az IL6 receptor Asp358Ala polimorfizmusnak jelentős hatása van az IL6 indukálhatóságára és sejteken kifejtett hatására, meg kívántuk vizsgálni a két polimorfizmus hatását a myeloma előfordulására.
2. Az NFkB rendszer szintén központi jelentőségű myelomában, és figyelembe véve, hogy az NFkB1 -94inz/delATTG polimorfizmus sok, többek között tumoros betegségben is klinikailag relevánsnak tűnik, úgy gondoltuk, hogy érdemes megvizsgálni a szerepét myelomában.
3. Szintén kíváncsiak voltunk, hogy az NFkB1 polimorfizmus összefüggést mutat-e a kezelés eredményességével, illetve a betegek túlélésével.
4. Valamint, hogy hogyan hat az NFkB1 polimorfizmus az egyes alcsoportokban.
5. Másrészt, mivel a feltételezések szerint a bortezomib hatásmechanizmusában az NFkB rendszer kitüntetett jelentőségű, szerettük volna megvizsgálni a különböző (bortezomib bázisú és nem bortezomib bázisú) kezelések hatását a genetikai variánsokban.
6. Mivel minden myelomával foglalkozó orvos közös tapasztalata, hogy ebben a betegségben nem ritka a hosszú várakozási idő az első tünetektől a diagnózisig, és ezzel kapcsolatos vizsgálat Magyarországon eddig nem történt, szerettük volna azt is vizsgálni, hogy a betegek milyen klinikai tünetekkel jelentkeztek, illetve mennyi idő telt el a klinikai tünetek

jelentkezésétől a diagnózisig. Szerettük volna azt is ellenőrizni, hogy a hosszabb várakozás hatással van-e a kezelés eredményességére.

Módszerek

Az IL6 vizsgálatban száz, a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika Haematológiai részlegén 2000. február és 2004. december között diagnosztizált MM beteg adatait dolgoztuk fel. A kontroll csoport a kórházban kezelt, MM-ben nem szenvedő, életkorban egyeztetett betegekből állt.

Az NFKB vizsgálatban 295, a budapesti Szent László Kórházban 2004. január és 2013. szeptember között diagnosztizált és ott elsővonalbeli kezelésben részesült MM beteg adatait vizsgáltuk, a kontroll csoport pedig 149 egészséges véradóból állt.

A várakozással kapcsolatos vizsgálatban az előző alapján 193 olyan beteget választottunk be, akiknek a kórlapja alapján tisztázható volt, hogy milyen tünetekkel fordultak először orvoshoz és mennyi idő telt el a tünetek kezdetétől a diagnózisig.

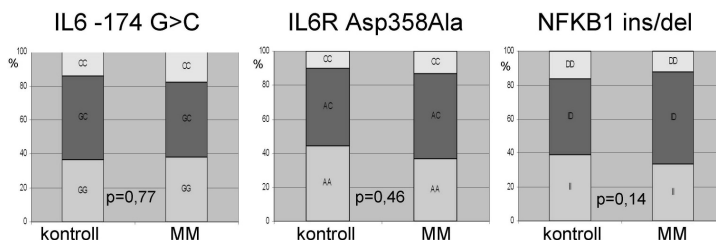
Az IL6 receptor gén Asp358Ala polimorfizmust fluoreszcens 5' nukleáz (TaqMan) módszerrel vizsgáltuk a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetének laboratóriumában. Az IL6 gén promoter -174G>C polimorfizmust a polimeráz láncreakciót követő restrikciós hosszúság polimorfizmus (PCR-RFLP) módszerrel vizsgáltuk a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában. Az NFKB1 promoter -94ins/delATTG polimorfizmust szintén RFLP módszerrel vizsgáltuk az Országos Vérellátó Szolgálat Molekuláris Diagnosztikai Laboratóriumában.

Eredmények

Populációgenetikai vizsgálat

Közel száz MM beteg esetében végeztük el az IL6 gén promoter -174G>C és az IL6 receptor gén Asp358Ala polimorfizmus vizsgálatát. Sem az allélfrekvenciák ($AF \pm 95\%CI$), sem a genotípus eloszlások nem tértek el az egészséges kontroll csoporttól. Az IL6 receptor Asp358Ala esetében 34 (37%) esetben találtunk homozigóta

AA, 46 (50%) esetben AC és 12 (13%) esetben homozigóta CC genotípust. Az IL6 promoter -174G>C esetében 37 (38,1%) esetben találtunk homozigóta GG, 43 (44,3%) esetben GC és 17 (17,5%) esetben homozigóta CC genotípust (1. ábra).



1. ábra: A három vizsgált polimorfizmus variációinak eloszlása MM betegeknél és kontrollokban

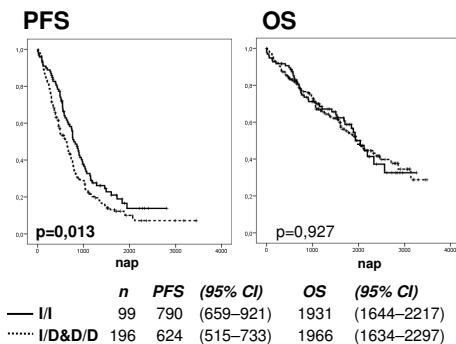
Kétszázkilencvenöt MM beteg esetében végeztük el az NFKB1 -94ins/delATTG polimorfizmus vizsgálatát. Kilencvenkilenc (33,6%) esetben találtunk homozigóta ins/ins, 161 (54,6%) esetben heterozigóta ins/del és 35 betegnél (11,9%) homozigóta del/del genotípust. Az allélfrekvenciák (AF±95%CI) sem a teljes MM betegcsoportban (39,2 ± 4,0%), sem az életkor, ISS, FISH, kezelési protokoll alapján kijelölt alcsoportokban nem különböztek az egészséges kontrolloktól (38,6 ± 5,6%). A del/del csoportot a kis elemszám miatt a további vizsgálatokban az ins/del-lel egybeolvasztva kezeltük.

Az NFKB1 polimorfizmus és a kezelés eredményessége

A kezelést követő legjobb válaszok minősége szempontjából nem volt különbség az NFKB1 -94ins/delATTG alcsoportok között: a CR-ek, VGPR-ok, PR-ok és NR/PD-ek aránya 37,5%, 16,7%, 36,5%, 9,4% volt az ins/ins csoportban, és 39,9%, 18,1%, 28,2%, 13,8% az ins/del&del/del csoportban, szignifikáns különbségek nélkül.

Amikor az NFKB1 -94ins/delATTG polimorfizmus túlélésre gyakorolt hatását vizsgáltuk, azt találtuk, hogy azok a betegek, akiknél legalább egy del allél jelen van, akár heterozigóta (ins/del), akár homozigóta (del/del) formában, az első kemoterápiás kezelést követően szignifikánsan hamarabb progrediálnak. A medián

progressziómentes túlélés (PFS) 670 nap volt a teljes csoportban, 790 az inz/inz és 624 inz/del&del/del csoportokban ($p = 0,013$). A teljes túlélés (OS) tekintetében a különbség nem volt szignifikáns (2. ábra)



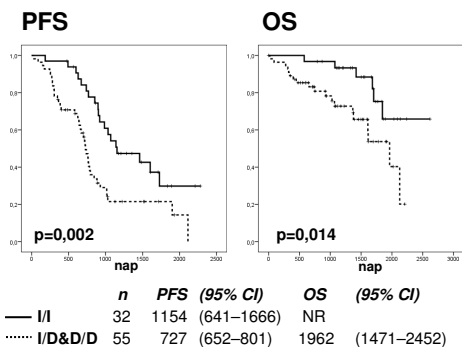
2. ábra: PFS és OS az NFkB1 genotípus függvényében

Multivariancia analízisben – az életkorral, ISS-sel, FISH-sel és bortezomib-expozícióval vizsgálva – az NFkB1 inz/del&del/del független szignifikáns rizikófaktornak bizonyult a PFS szempontjából.

Az alsocsoport analízisek eredményeit azzal lehet röviden összefoglalni, hogy az NFkB1 inz/inz betegek PFS-e jobbnak bizonyult a del allél hordozóknál a jobb prognosztikai alcsoportokban, míg ez a különbség nem volt látható a rossz prognosztikai csoportokban. Tehát szignifikánsan jobb volt a PFS az ISS I+II, a FISH szerinti standard rizikójú és a bortezomibbal kezelt betegeknél, ha az inz/inz genotípust hordozták, míg az ISS III, FISH szerinti nagy rizikójú és bortezomib nélkül kezelt csoportban mindegy volt, hogy melyik genotípusba tartozott a beteg. A másik oldalról vizsgálva a kérdést elmondhatjuk, hogy az inz/inz betegeknél szignifikáns különbség volt a jó és a rossz ISS csoport és a bortezomibbal vagy anélkül kezelték között, míg a del allélt hordozóknál nem találtunk szignifikáns különbséget.

A legnagyobb csoport a bortezomib, thalidomid, dexamethason (VTD) kombinációval kezelt betegeké volt ($n = 88$; 78 esetben ASCT is történt), itt a PFS 1154 nap volt az inz/inz és 727 nap az inz/del&del/del csoportokban ($p = 0,002$), és a medián OS

tekintetében is szignifikáns különbség volt kimutatható: az inz/inz csoport nem érte el a medián túlélését, mely 2617 nap után 65,8% volt, míg az inz/del&del/del csoportban az OS 1962 nap volt ($p = 0,014$) (3. ábra).



3. ábra: A VTD-vel kezelt betegek progressziómentes túlélése (PFS) és teljes túlélése (OS) az NFKB1 genotípus függvényében

A tünetek jelentkezésétől a diagnózisig eltelt idő vizsgálata

Az átlagos és medián várakozás a tünetek kezdetétől a diagnózisig 6,3 és 4,1 hónap, az első kezelésig eltelt idő átlagosan 7,4 hónap, a medián 5,2 hónap volt. A legtöbb beteg csontfájdalommal fordult orvoshoz, náluk a medián várakozási idő 4,5 hónap volt, ennél kevesebbet vártak az anaemiával és veseelégtelenséggel jelentkező betegek (medián 2,5, illetve 3,0 hónap).

Sem a PFS, sem az OS tekintetében nem volt szignifikáns különbség a 3 hónapnál többet, illetve kevesebbet várakozó csoportok között (PFS $p = 0,399$, OS $p = 0,666$), bár a medián OS hosszabbnak tűnt a kevesebbet várakozók esetében (64,4 és 51,5 hónap), különösen a jó prognosztikai csoportban, ez - talán a rövid (30 hónapos) követési idő miatt - nem érte el a szignifikancia határt.

Következtetések

1. Vizsgálatainkból kitűnik, hogy sem az IL6 promoter -174G>C (rs1800795), sem pedig az IL6 receptor Asp358Ala (rs2228145) polimorfizmus nem hajlamosít myeloma multiplexre.
2. Hasonlóképpen, az NFKB1 -94inz/delATTG (rs28362491) polimorfizmus sem hajlamosít myeloma multiplexre.
3. Kétszázkilencvenöt myelomás betegünk adataiból kitűnik, hogy az NFKB1 -94inz/delATTG polimorfizmus homozigóta inzerciós (vad) típusának hordozóinál a progressziómentes túlélés szignifikánsan hosszabb volt, mint a deléció allél hordozóinál.
4. Ez a PFS előny még jobban megmutatkozott a kedvezőbb prognosztikai csoportokban (ISS 1+2, FISH standard rizikó) és azokban a betegekben, akik bortezomib bázisú kezelést kaptak. Itt a del allél hordozóinak prognózisa szignifikánsan rosszabb volt. Ez utóbbi tény hangsúlyozza az NFKB1 polimorfizmus fontosságát a prognosztika szempontjából, hiszen a jelenleg elfogadott módszerrel mérve jó prognózisú betegekről mutatja ki, hogy ha a del allélt hordozzák, akkor még agresszív, bortezomib bázisú kezeléssel sem fog jól alakulni a sorsuk.
5. Adataink alapján a homozigóta inzerciós csoport profital leginkább abból, ha VTD és ASCT kombinációval kezelik első vonalban, míg a deléció csoport esetében a kimenetel még bortezomib bázisú kezelés mellett is rossz volt. Ez egyrészt felhívja a figyelmet arra, hogy az előbbi csoport esetében mindenképpen érdemes erőltetni a drága, két „új szer” tartalmazó kombinációt, másrészt vizsgálataink alapján a deléció csoportban ez is kevésnek tűnik: itt jelenleg csak klinikai vizsgálatokban való részvétel jelenthet megoldást. Ennek alapján, amennyiben megfigyeléseinket egy független kohorszon is sikerül validálni, eredményeinknek még jelentős gyakorlati következménye lehet.
6. A várakozással kapcsolatos elemzés fő tanulsága, hogy Magyarországon is, hasonlóan más országokhoz, a myelomás betegek sokszor túlságosan sokat várnak, míg végül kiderül a diagnózis. Ez részben a betegségnek és tüneteinek jellegéből, részben viszont az ellátórendszer gyengeségeiből fakad. Mivel a betegek legtöbbször a háziiorvosi praxisban álltak gondozás alatt

ebben az időszakban, a megoldás is ezen a szinten keresendő, elsősorban a házi orvosok képzésével, guideline-ok elérhetővé tételével.

Publikációk jegyzéke

A dolgozat alapjául szolgáló saját publikációk

- Varga G**, Mikala G, Andrikovics H, Koszarska M, Balassa K, Ádám E, Kozma A, Tordai A, Masszi T. (2015) NFKB1 - 94inz/delATTG polymorphism is a novel prognostic marker in first line-treated multiple myeloma. *Br J Haematol*, 168: 679-688. (IF 4,959)
- Varga G**, Mikala G, Andrikovics H, Masszi T. (2014) Mennyit vár ma Magyarországon egy myelomás beteg a diagnózisig? *Orv Hetil*, 155: 1538-1543.
- Aladzsity I, Kovács M, Semsei A, Falus A, Szilágyi A, Karádi I, **Varga G**, Füst G, Várkonyi J. (2009) Comparative analysis of IL6 promoter and receptor polymorphisms in myelodysplasia and multiple myeloma. *Leuk Res*, 33: 1570-1573. (IF: 2,358)

A tézisekhez kapcsolódó egyéb saját publikációk

- Várkonyi J, Benedek Sz, Farkas P, Horváth L, Kádár K, Kollai G, Masszi A, Szombath G, **Varga G**, Karádi I. (2014) How do we consider multiple myeloma? One institute, 20 years of experience. *J Hematol Transfus*, 2: 1027-1030.
- Varga G**. (2010) Paraproteinaemiák a háziiorvosi gyakorlatban. *Magyar Családorvosok Lapja*, 9: 12-16.

A tézisekhez közvetlenül nem kapcsolódó saját publikációk

- Eszes N, Tamasi L, Csekeo A, Csomor J, Szepesi A, **Varga G**, Balazs G, Losonczy G, Muller V. (2014) Unicentric mixed variant castleman disease associated with intrabronchial plasmacytoma. *Diagn Pathol*, 9: 64. (IF: 2,411)
- Reiger Z, **Varga G**, Tóth B, Maródi L, Erdős M. (2010) Dyskeratosis congenita: molekuláris diagnosztika és terápiás lehetőségek. *Orv Hetil*, 151: 285-292.
- Reiger Z, **Varga G**, Tóth B, Maródi L, Erdős M. (2010) Felnőttkorban diagnosztizált dyskeratosis congenita. *Gyermekgyógyászat*, 61: 66-70.

- Varga G.** (2010) Az anaemiák kórisméje és kezelése. Magyar Belorv Arch, 63: 5-8. (2010)
- Varga G.** (2008) Anaemiák. Magyar Csaláorvosok Lapja, 4: 21-26.
- Varga G,** Kiss J, Várkonyi J, Vas V, Farkas P, Pálóczi K, Uher F. (2007) Inappropriate Notch activity and limited mesenchymal stem cell plasticity in the bone marrow of patients with myelodysplasia syndromes. Pathol Oncol Res, 13: 311-319. (IF: 1,272)
- Varga G,** Uher F. (2004) A myelodysplasiás szindróma biológiája. Orv Hetil, 145: 1163-1170.