

OTKA T042500 ZÁRÓJELENTÉS (Funkcionális genomikai rendszer kidolgozása gyermekkori ALL-ben)

OTKA T042500

**FUNKCIONÁLIS GENOMIKAI RENDSZER
KIDOLGOZÁSA GYERMEKKORI AKUT LIMFOID
LEUKÉMIÁBAN;
ÚJ DIAGNOSZTIKUS MARKERGÉNEK,
PREDIKCIÓS GÉNPROFILANALÍZIS ÉS ÚJ
TERÁPIÁS CÉLPONTOK KIVÁLASZTÁSA SNP- ÉS
GÉNEXPRESSZIÓS MICROARRAY ANALÍZIS
VALAMINT AZ IMMUNFENOTIPIZÁLÁS
KOMBINÁCIÓJÁVAL**

Zárójelentés

Projektvezető: Dr. Falus András SE GSI

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS	2
2.	CÉLKITŰZÉS	2
3.	MINTA- ÉS ADATGYŰJTÉS	2
4.	LABORATÓRIUMI ÉS STATISZTIKAI MÓDSZEREK	6
5.	EREDMÉNYEK	10
6.	POTENCIÁLIS HASZNOSÍTÁSI LEHETŐSÉGEK	13
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	14
8.	IRODALOMJEGYZÉK	15

1) BEVEZETÉS

A gyermekkorban előforduló rosszindulatú daganatos betegségek között a központi idegrendszeri tumorokkal együtt a vérképzőszervi malignitások állnak a vezető helyen. Gyermekkorban dominálnak az akut leukémiák, ezen belül is az akut limfoblasztos leukémia (ALL). Összességében Magyarországon évente kb. 60-80 új megbetegedés fordul elő, ami az összes malignus tumor (kb. 240-300/év) 25-30 %-a (1).

A gyermekkori ALL összesített 5 éves túlélése a legfrissebb adatok szerint 70-80%. A betegek esélyei azonban jelentősen különböznek a klasszikus rizikófaktorok által meghatározott alcsoportok között. A jó túlélési eredmények nagyrészt éppen az egyre finomodó beosztás, és az e csoportokra adaptált különböző terápiás ágaknak köszönhető. A kedvező túlélési mutatók miatt is igen nagy a kezelési mellékhatások jelentősége. A terápia eredményeinek továbbfejlesztéséhez – a túlélés további javulásához és a mellékhatások csökkentéséhez – a várakozások szerint leginkább molekuláris vizsgálatok előrehaladása, az ilyen jellemzők alapján pontosabban individualizált kezelés és új molekuláris gyógyszer-celtek azonosítása vezethet.

2) CÉLKITŰZÉS

Olyan molekuláris markerek identifikálását céloztuk meg, melyek a gyermekkori akut limfoid leukémia

- patomechanizmusában kulcs szerepet játszanak, annak megismerésében segítenek, így esetleg a későbbiekben valamiféle prevencióban jelentőségük lehet;
- a kemoterápiára adott válasz predikcióját teszik lehetővé, vagy
- gyógyszermellékhatások vonatkozásában prediktívek, tehát e két kérdés vonatkozásban rizikófaktoroként értékelhetők, hatékonyabb és kevésbé toxikus individualizált terápiás döntéseket készítenek elő.

A fentieknek megfelelően célul tűztük ki leukémiás limfoblasztok és csíravonal minták gyűjtését, majd ezek DNS, RNS és protein szintű vizsgálatát.

3) MINTA- ÉS ADATGYŰJTÉS

A minták és a hozzájuk tartozó kórtörténeti, kezelési adatok fogadására való felkészülés, adatbázis létrehozása

Etikai engedélyt kértünk és kaptunk az ETT-TUKEB-től a projekthez (engedélyek száma: 12988-52/2003-1018-EKU és 323101/2005-1018EKU).

Felvettük a kapcsolatot a Magyar Gyermekorvosok Társasága Gyermekonkológiai Szekciójával (MGYT-GYOSZ), és felkértük őket az együttműködésre (ld. 1. táblázat). Csontvelői és perifériás vérminták küldését kértük ALL-es gyermekek diagnosztikus mintáiból, továbbá perifériás vérmintákat a korábban kezelt, felülvizsgálatokon megjelenő ALL-es gyermekektől.

1. táblázat: Akut limfoid leukémiás gyermekek kezelését az 1990-től napjainkig terjedő biztosító kórházak Magyarországon

Központ	Működés
BAZ Megyei Kórház, Gyermekegészségügyi Központ, Miskolc	jelenleg is
Debreceni Egyetem, Gyermekgyógyászati Klinika	jelenleg is
Heim Pál Kórház, Budapest	2006-ig
Madarász Utcai Gyermekkórház, Budapest	jelenleg is
Magyarországi Református Egyház Bethesda Gyermekkórház, Budapest	2004-ig
Pécsi Tudományegyetem, Gyermekgyógyászati Klinika	jelenleg is
Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika, Budapest	jelenleg is
Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekgyógyászati Klinika, Budapest	jelenleg is
Szegedi Tudományegyetem, Gyermekgyógyászati Klinika	jelenleg is
Vas Megyei Önkormányzat Kórháza, Gyermekosztály, Szombathely	jelenleg is

Megkaptuk az 1990-től hazánkban kezelt ALL-es gyermekek adatait (rizikófaktorok, túlélési adatok betegenként) az MGYT-GYOSZ Tumorregiszterétől. Ezen adatokat beépítve létrehoztunk egy csatolt Microsoft Excel táblázatokat kezelő Microsoft Access adatbázist, mely további, a kórházakban gyűjtendő részletes betegadatok rögzítését, kezelését tette lehetővé.

A minták és adatok tárolását egy olyan biobank rendszerben építettük fel, melyben külön sorszámozás található a mintákon és külön számozás a betegek adatait tartalmazó file-okban. A klinikai adatokhoz és a sorszámozás megfeleltetéséhez csak a minták feldolgozásában résztvevő három munkatárs fér hozzá, a genotipizálást végző laboratóriumok nem.

Mintagyűjtés

Projektünk legjelentősebb problémájának a blaszt-minták gyűjtése adódott. Mivel alig kaptunk mintákat, a gyermekonkológiai központok mellett három felnőtt-hematológiai központot is bevontunk a gyűjtésbe (SE III. Belgyógyászati Klinika, OGYIK Haematológiai Intézet és a Szent László Kórház megfelelő osztályai). Mindezek ellenére is a négy év alatt összesen 52 blasztos minta érkezett. A jelenség oka a központokkal történt ismételt tárgyalások alapján az volt, hogy a gyakran súlyos állapotú, sürgős ellátást igénylő betegek mintáit eleve számos laboratóriumba (citológia, szövettan, FACS, citogenetika, FISH, molekuláris genetika, újabban minimális reziduális betegség vizsgálat) kellett a kezelő orvosnak elküldenie, és nem tudták felvállalni még nagyobb mennyiségű minta vételét, az időigényes szervezést.

Az érkezett minták minőségével is jelentős problémák voltak. Elsősorban a bomlékony mRNS szintjén történő expressziós vizsgálatok igénylik a minták nagyon gyors, egységes időben történő feldolgozását. Az eltérő központokból igen változó idő alatt érkeztek hozzánk a minták, sokszor egy, néha két nap utazás után. Ennek megfelelően nem kis részben csak viszonylag gyenge minőségű RNS-hez és csak immunfenotipizálásra alkalmas, nem viabilis, a funkcionális vizsgálatokra használhatatlan blasztsejtekhez

jutottunk. Más alkalmakkor több napos citosztatikus kezelés után vett minták érkeztek, melyek a szelekció és a gyógyszerhatás miatt nem voltak összehasonlíthatók a többi mintával. A blaszt-minták vizsgálata prognosztikai vonatkozásban volna racionális, a frissebb minták esetében azonban ilyen adatok még nem állnak rendelkezésre (általában legalább 3 éves túlélés számítása szükséges).

A fenti problémák miatt igyekeztünk a projekt fennmaradó irányvonalát jelentő, és inkább elérhető csírvonal DNS-minták vonatkozásában jelentős mintagyűjteményt előteremteni. 468 esetben frissen vett perifériás vér érkezett a központokból. Mindössze 13 betegről volt lehetőség újszülöttkori szűrőpapírba szárított vércseppet szerezni. Tíz gyermektől lefagyasztott diagnóziskori sejtszuspenziót kaptunk, míg 99 beteg esetében csontvelői és perifériás vérkeneteket (a kenetek részben diagnóziskori vagy recidivakori, nagyrészt blasztokat tartalmazó minták, részben pedig remissziós időszakban vett, genomi DNS-t tartalmazó minták). Így az átfedésekkel együtt összesen 586 ALL-es betegről kaptunk valamiféle mintát. Ez egy nemzetközi viszonylatban is kiemelkedően nagy mintabankot jelent: az irodalmat áttekintve egyetlen USA-beli központban tudták csak ennél nagyobb számú gyermekkori ALL-es beteg DNS-ét analizálni. Tekintettel azonban arra, hogy több központban nem archiváltak mintákat, és az exitált betegek régi mintáinak korlátozott bizonyult a feldolgozhatósága (ld. alább), az erőfeszítések ellenére is alulreprezentáltak maradtak az exitált betegek a minta-populációinkban. Direkt túlélési analízisre így nem volt használható a gyűjtemény. Emiatt elsősorban gyógyszer-kinetikai és -toxicitási kérdésekre koncentráltunk.

A betegek közül kiválasztottunk egy terápia szempontjából viszonylag homogén vizsgálati csoportot. Azokat az ALL-BFM (Berlin-Frankfurt-München) 90 és 95 protokollal kezelt 1-18 éves betegeket soroltuk be, akiknek nem voltak olyan, a leukémiától független, azelőtt jelentkező társbetegségei, amelyek általában a gyógyszerkinetikát, vagy a terápiás szövődmények kialakulását befolyásolhatták volna; illetve akiknél a kezelés során nem történt a terápiás protokolltól jelentős eltérés. Összesen 413 beteg került a vizsgálati populációba. A jelentésben szereplő eredmények ezen gyermekek különböző szubpopulációinak elemzésével születtek.

A mintákat kiegészítettük a részben azonos citosztatikumokkal kezelt osteosarcomás gyermekektől gyűjtött 62 DNS-mintával, melyek az ALL-eseknél megfigyelt összefüggések verifikálása céljából kecsgettettek haszonnal. Ezentúl 190 egészséges véradótól is DNS-t gyűjtöttünk a betegség patomechanizmusának (leukémia-susceptibilitással összefüggő polimorfizmusok) vizsgálata céljából.

Adatgyűjtés

A fent részletezett adatbázis táblázatainak segítségével kórházanként a helyszínen a teljes beteg-dokumentáció áttekintésével rögzítettünk adatokat a gyermekekről. Az adatbázisban biztosított betegenkénti 1010 lehetséges paraméterből gyermekenként átlagosan kb. 300 adatot jegyeztünk fel a betegség prezentációkori jellemzőiről, a terápia különböző szakaszaiban monitorizált laboratóriumi paramétereikről, gyógyszer-szérumszintekről, a nemzetközi viszonylatban használt CTC kritériumok szerint pontozott szövődményekről, a kezelés befejezése után vizsgált késői mellékhatásokról (ld. 1. ábra). Hasonlóan kiterjedt adatgyűjtést folytattunk az osteosarcomás gyermekek esetében is.

1. ábra: Részlet az adatbázis ALL-es adatok gyűjtésére szolgáló táblázatából

The screenshot shows a Microsoft Excel spreadsheet with a complex data table. The table has multiple columns, with the first few containing text labels and the rest containing numerical values. The data is organized into several sections, with some rows highlighted in yellow. The spreadsheet interface includes the standard Excel menu bar and toolbar at the top.

Sample ID	Date	Parameter 1	Parameter 2	Parameter 3	Parameter 4	Parameter 5	Parameter 6	Parameter 7	Parameter 8	Parameter 9	Parameter 10	Parameter 11	Parameter 12	Parameter 13	Parameter 14	Parameter 15	Parameter 16
2. Varosodi 2012	2012.01.01	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204
3. Wesselykó	2012.01.01	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204
4. Reménykó	2012.01.01	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204
5. Lóráncsi 102	2012.11.20	1993.11.21	1993.11.20	2001.02.01	1998.08.08	1993.12.17	1999.02.28	1993.04.27	1993.11.06	1998.04.26	1994.08.17	1993.12.26	1993.12.27	1993.12.27	1993.12.27	1993.12.27	1993.12.27
6. Kórház	2012.01.01	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204

4) LABORATÓRIUMI ÉS STATISZTIKAI MÓDSZEREK

DNS-, RNS- és sejtszeparálás

A fagyasztva tárolt vérmintákból a QIAamp DNA Blood Maxi/Midi kit segítségével vontunk ki jó minőségű DNS-t.

A csontvelői és perifériás vérkenetekből, továbbá a fagyasztott sejtszuszpenziókból a Roche HighPure PCR Template Preparation Kit felhasználásával jutottunk DNS-hez. Az újszülöttkori szűrőpapírba szárított vércsepp (PKU-szűrés) minták feldolgozásához Chelex-100 (BioRad) reagenst alkalmaztunk. A kenetekből és szűrőpapír mintákból rendszerint igen híg és szennyezett DNS volt csak nyerhető: 0,5-1,5 közötti 260/280 ill. 0,2-1,5 közötti 260/230 arányt mértünk fotométerrel. Ezen minták kb. harmadát egyetlen allél-diszkriminációs módszerrel sem tudtuk genotipizálni; más mintáknál a mérések sokszori ismétlésével sikerült genotipizálnunk, így is csak a vizsgált SNP-k egy részénél. Ez a jelenség valószínűleg azzal magyarázható, hogy sok esetben kemoterápia alatt lévő pancytopeniás betegek kontroll vizsgálataihoz készült sejtszegény vagy nagyon kismennyiségű vagy erőteljes fixálás/festés révén károsodott kenetekkel rendelkezünk. Kísérletet tettünk a minták DNS-tartalmának a Sigma GenomePlex® Complete WGA Kit (WGA2) kittel történő amplifikálására, de így sem tudtunk a genotipizálás sikerén javítani.

A kapott DNS-mintákat biztonsági okokból két részre osztva tároltuk el a SE Genetikai-, Sej- és Immunbiológiai Intézetében és a SE II. sz. Gyermekgyógyászati Klinikán, mindkét helyen -20 °C-on.

A blaszt-sejteket perifériás vérből vagy csontvelői aspirátumból Ficoll-grádiensen történő szeparálással nyertük. A teljes mononukleáris sejtfrakciót tároltuk DMSO-ban reszuszpendálva, -80 °C-on. Az RNS-t e sejtszuszpenziók egy frakciójának a DMSO-s tárolás előtti azonnali trizolban történő tárolása, majd később ezt követő trizolos nukleinsav-szeparálással nyertük.

Proteomikai és mRNS-expressziós vizsgálatok

Jelölési kombinációkat dolgoztunk ki a négyszínű áramlási citometriás vizsgálathoz az ALL-es blasztok osztályzására és prognosztikai besorolására:

B-ALL klasszifikáció:

1. CD45/CD14/HLA-DR; CD10/CD5/CD19; CD34/CD33/CD19; CD22/CD20; CD4/CD8/CD3; (CD3/CD16-56)
2. intracelluláris CD22; intracelluláris CD79a; intracelluláris μ ; intracelluláris TdT; κ/λ /CD19; CD21/CD23

T-ALL klasszifikáció:

1. CD45/CD14/HLA-DR; CD2/CD5/CD7; CD4/CD8/CD3; CD3/CD16-56
2. intracelluláris CD3; intracelluláris TdT; intracelluláris MPO; CD1a; α/β TCR / γ/δ TCR

Tekintettel a minták alacsony számára és gyenge minőségére, továbbá a rövid követési idő miatt hiányzó túlélési adatokra (ld. a Mintagyűjtés fejezet alatt), mRNS-szintű vizsgálatokat nem végeztünk.

SNP-k meghatározása

Összesen 11, a citosztatikus szerek farmakokinetikája szempontjából potenciálisan jelentőséggel bíró SNP-t választottunk ki genotipizálásra. Ezek felsorolását, valamint a szubsztrátjaikként ismert, a kemoterápiás protokollban szereplő szereket ld. a 2. táblázatban.

2. táblázat: Vizsgált génpolimorfizmusok és azon citosztatikumok áttekintése, melyek farmakokinetikájában az adott gén szerepet játszik.

Gén	SNP	Antra-ciklinek	Vinca alkaloidok	Glukokortikoidok	Metotrexát
ABCB1	1236C/T (silent)				
	2677G/T,A (Ala893Thr,Ser)	igen	igen	igen	
	3435T/C (silent)				
ABCC1	2012G/T (Gly671Val)	igen	igen		igen
ABCC2	1249G/A (Val417Ile)	igen	igen		igen
	3563T/A (Val1188Glu)				
ABCC3	-211C/T (promoter)				igen
ABCG2	34G/A (Val12Met)	igen	igen		igen
	421C/A (Gln141Lys)				
SLC19A1	80G/A (His27Arg)				igen
GGH	-401C/T (promoter)				igen

A három ABCB1 valamint a szintén három ABCC1-C2 polimorfizmus mérését egy-egy triplex Single Base Extension eljárással (SBE, más néven „miniszekvenálás”) határoztuk meg. Ennek elve az alábbi ábrán látható, lépései a következők:

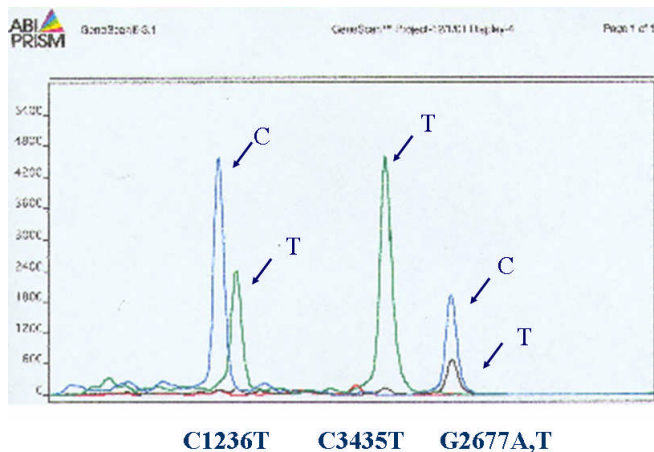
1. Előzetes PCR során létrehozuk azokat az amplikonokat, amelyek a kérdéses SNP-eket kb. középen tartalmazzák (multiplex PCR).
2. A PCR terméket megtisztítjuk és egy további reakcióba visszük, amelyben 1 darab genotipizáló primert használunk, melyet úgy tervezünk, hogy 3' vége éppen az SNP hely elé hibridizáljon be, és ekkor extenziós reakciót indítunk. A reakciómix négyféle fluoreszcens festékkel jelölt ddNTP-t tartalmaz. A reakció során az SNP-nek megfelelő komplementer bázis kapcsolódik a genotipizáló primer 3' végéhez, majd a didezoxi lánczáró nukleotid beépülése következtében a reakció leáll, terméke 1 jelölt bázissal meghosszabbodott genotipizáló primer. A bekötődött ddNTP színét a fluoreszcens detektor méri.
3. Ha a genotipizáló primer 5' végére tetszőleges hosszúságú nem hibridizáló tag-et szintetizálunk és így visszük reakcióba, akkor a keletkező SBE termék hosszát tetszőlegesen változtathatjuk, ez pedig lehetőséget teremt egy mintában több SNP egyidejű detektálására. (2. ábra)

Az ABCC3 -211C/T polimorfizmust TaqMan QPCR alléldiszkriminációs assay segítségével határoztuk meg. Ennek során egy primer-párral történő amplifikáció során az exonukleáz aktivitással rendelkező DNS-polimeráz két-két jelzett allélspecifikus próbapár degradációját végzi. Végpontanalízis alapján diszkriminálhatók a genotípus-csoportok (3. ábra).

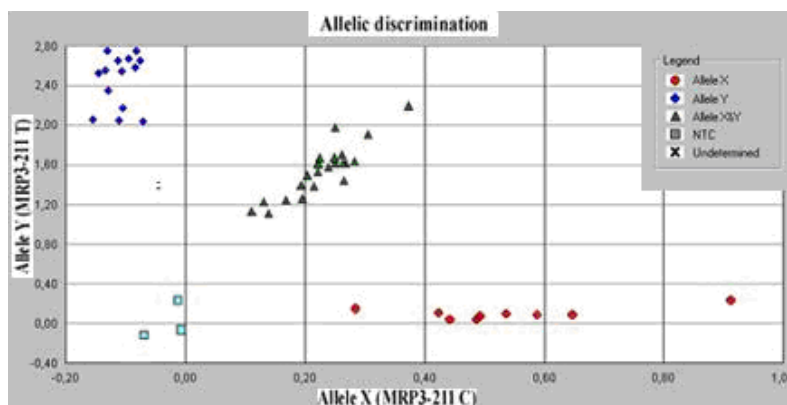
A két ABCG2 SNP mérése Roche Light Cycler segítségével történt. PCR segítségével amplifikáltunk egy-egy fragmentet a polimorf pontok környékén, majd a hozzáadott fluoreszcensen jelzett allélspecifikus próbák disszociációját vizsgáltuk olvadáspont-analízissel (4. ábra)

Az SLC19A1 és GGH polimorfizmusokat hagyományos PCR-RFLP módszerrel mértük.

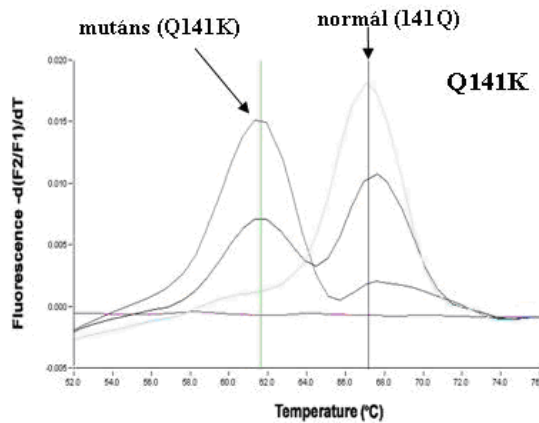
2. ábra: Kapillaris-elektroforetikus kép az ABCB1 három SNP-jének multiplex Single Base Extension reakcióban történő meghatározása során.



3. ábra: TaqMan alléldiszkriminációs assay eredménye egy mérésünk kapcsán.



4. ábra: Light Cycler olvadáspont-analízis az ABCG2 421C/A = Q141K polimorfizmus esetében. A három különböző genotípus esetén kapható görbe.



5. ábra: Gélelektroforetikus kép az SLC19A1 -401C/T polimorfizmus PCR-RFLP-vel történő meghatározásakor. A Bsl-I enzim csak a C-allél esetén hasítja a 109 bázispárnyi PCR-terméket. Jelmagyarázat: K: emésztetlen kontroll; V: variáns homozigóta (TT); H: heterozigóta (CT); N: normál homozigóta (CC).



Statisztikai módszerek

A genotípus-csoportok incidenciáját, a mintagyűjtés random voltát és részben a genotipizálás megbízhatóságát is Hardy-Weinberg teszttel vizsgáltuk. A normális eloszlású vagy ilyené transzformálható klinikai adatok genotípus-csoportok közötti összehasonlító multivariáns elemzését az ún. GLM (generalizált lineáris modell) analízis segítségével végeztük. Szabálytalan eloszlások esetén Kruskal-Wallis teszttel történt univariáns elemzés. Kategorizált jellegek multivariáns vizsgálatakor logisztikus regressziós eljárást használtunk. A számításokhoz az SPSS 13 és a Statistica 7.0 szoftvereket használtuk.

5) EREDMÉNYEK

Mind a tizenegy vizsgált polimorfizmus esetében Hardy-Weinberg egyensúlyban találtuk az allélokot. Az allélfrekvenciák mindegyik esetben igen hasonlóak voltak az irodalomban közölt, kaukázusi populációkban észlelt frekvenciákhoz.

3. táblázat: A kiválasztott SNP-ken észlelt allélfrekvencia-értékek

Gén	SNP	Homozigóta variáns %	Hetero-zigóta %	Variáns allélfrekvencia %
ABCB1	1236C/T (szinonim)	22,7	46,9	46,2
	2677G/T,A (Ala893Thr,Ser)	24,1 *	43,7 *	47,4 *
	3435T/C (szinonim)	25,1	45,8	48,0
ABCC1	2012G/T (Gly671Val)	0,3	10,3	5,4
ABCC2	1249G/A (Val417Ile)	5,3	34,1	22,4
	3563T/A (Val1188Glu)	0,3	7,5	4,0
ABCC3	-211C/T (promóter)	20,8	51,9	46,7
ABCG2	34G/A (Val12Met)	0,0	7,4	3,7
	421C/A (Gln141Lys)	0,5	19,4	10,2
SLC19A1	80G/A (His27Arg)	21,2	49,1	45,8
GGH	-401C/T (promóter)	11,8	40,7	32,1

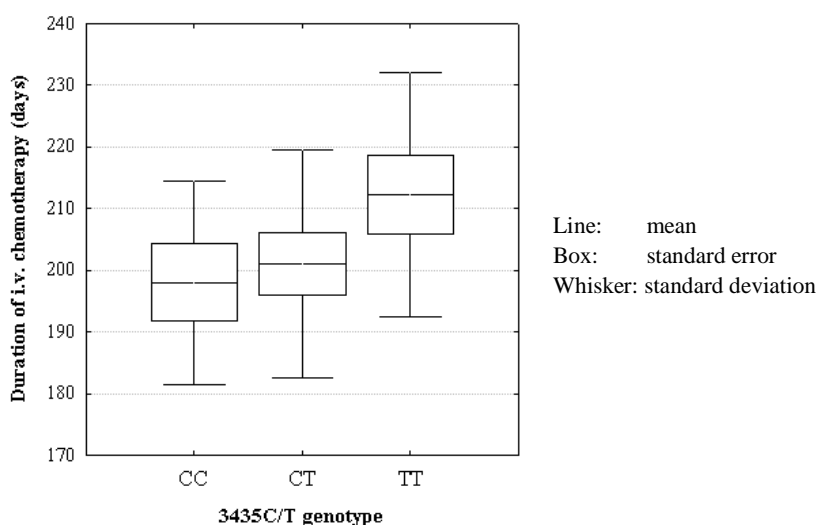
* T-allélra vonatkozó értékek

Az ABCB1 a legjelentősebb mennyiségben expresszáldó xenobiotikum-transzporter a szervezet védőbarrierjein (bélhám, máj és vese). A szöveti őssejtek, köztük a hemopoetikus őssejtek plazmamembránján viszont az ABCG2 található a legnagyobb mennyiségben. Feltételeztük, hogy a karcinogén kémiai hatásokkal szembeni védekezésben jelentős szerepet játszhatnak e gének funkcionális polimorfizmusai. Összehasonlítottuk tehát az ABCB1 2677G/T, 3435T/C és az ABCG2 34G/A, 421C/A allélok eloszlását az egészséges véradók és az ALL-es gyermekek között. Nem találtunk szignifikáns különbséget sem a két teljes populáció összehasonlításában, sem az ALL-es blasztok genetikai és immunfenotípus jellemzők alapján alkotott klasszikus alcsoportok vizsgálatával. Az SNP-k kombinációjával kapott haplotípusok előfordulási gyakorisága bizonyos esetekben eltért a csoportok között: az ABCB1 2677GT-3435TT és a 2677GG-3435CT genotípus gyakoribbnak mutatkozott ALL-esekben mint egészségesekben (OR = 2.9, p=0.02 illetve OR = 2.9, p=0.04) a között, a 2677TT-3435CT kombináció ellenben ritkábban fordult elő (OR = 0.25, p=0.002). Bár e legutóbbi eltérés szignifikáns marad a többszörös összehasonlítás miatt végzendő korrekció esetén is, a különbség biológiai magyarázata mégis igen nehézkes. Eredményeink adalékul szolgálnak a szakirodalomban az ABCB1-polimorfizmusok ALL-re való hajlamosításáról folytatott vitához (2). Az ABCG2 polimorfizmusok szerepének vizsgálatát elsőként végeztük el.

Megvizsgáltuk az ABCB1 és ABCG2 polimorfizmusoknak a kemoterápia kapcsán jelentkező szövődményekben játszott szerepét. Azt tapasztaltuk, hogy az ABCB1 3435TT

csoportban a fél éves intravénás kemoterápia alatt lényegesen több volt a szövődmények miatti halasztás, mint a 3435CC+CT csoportban ($p=0.04$). Ld. 6. ábra. Ezt az irodalom szerint alacsonyabb génextpresszióval asszociált T allél okozta (3) lassabb gyógyszer-eliminációval, emiatt fokozott toxicitással magyarázzuk. Az ABCB1 3435T/C genotípus prediktív értéke jobb volt a három ABCB1 SNP-n alapuló haplotípus prediktív értékénél. Az ABCG2 polimorfizmusok és a halasztási idők között nem találtunk összefüggést.

6. ábra: Az intenzív kemoterápiás szakasz teljes időtartama az ALL-BFM 95 protokoll alacsony és közepes rizikójú ágán kezelt betegek között.

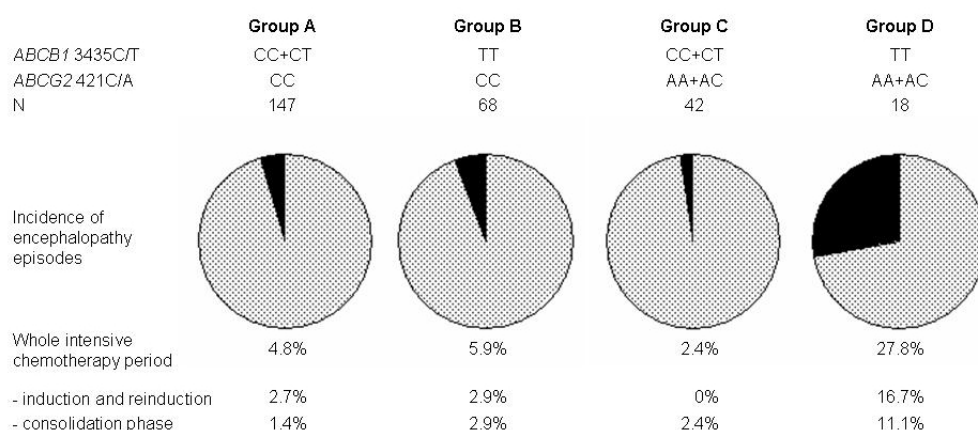


Tovább vizsgáltuk konkrét szövődmények szerepét a fenti, kissé általános összefüggés hátterének tisztázása céljából. Először a kezelés alatt kialakuló mieloszuppresszió és immunszuppresszió kérdését vizsgáltuk. Ezek a leggyakoribb, a terápia halasztásához vezető szövődmények, a kérdésfeltevést továbbá ugyanaz a megfontolás indokolta, ami a leukémiára való hajlam kérdését is inspirálta. Az ABCB1 3435TT genotípusú betegek lényegesen hosszabban szorultak intravénás antimikrobiális kezelésre, mint társaik ($p=0.03$). Az ABCB1 3435T/C genotípus itt is jobb prediktornak mutatkozott, mint az ABCB1-haplotípus, és az ABCG2 genotípusok között itt sem találtunk szignifikáns különbséget. Az immunszuppresszió okaként elsősorban felelőssé tett súlyos granulocytopenia előfordulása érdekes módon nem különbözött az ABCB1 3435T/C genotípus csoportok között a vincristint, doxorubicint és dexametason is kombinációban tartalmazó ún. reindukciós fázis alatt. Ezeket a jelenségeket az ABCB1-szubsztrát szerek részben ellentétes hatásával (a vincristin és doxorubicin gátolja a fehérvérsejt-prekursorok osztódását, a dexametazon elsősorban a limfocitákra gyakorolt hatása miatt immunszuppresszív, viszont mobilizálja a granulocytákat a pool-okból).

Jelentős géninterakcióra derült fény az ABCB1 és ABCG2 polimorfizmusai között, amikor a kemoterápia alatt jelentkező toxikus encefalopátia előfordulását vizsgáltuk. Eredményeink szerint az ABCB1 3435TT genotípus önmagában is hajlamosít a toxikus idegrendszeri szövődményekre ($p=0.03$), az ABCG2 421A allél hordozása esetén pedig hasonló tendenciát ($p=0.2$) figyeltünk meg. A két polimorfizmus együttes vizsgálatakor

azonban óriási különbség mutatkozott (Ld. 7. ábra, OR=10.7, p=0.002 a D és A csoport között), adataink arra utalnak, hogy a két polimorfizmus izolált hatása szinte teljesen az interakciójuknak tulajdonítható (az interakció multiplikatív jelleg számítása esetén is szignifikáns!). A vér-agy gáton és más barriereken egymásra épülő gyógyszer-koncentráció grádiens létrehozó, átfedő szubsztrát-spektrummal rendelkező két transzporter együttes funkciócsökkenése teremtené tehát csak lehetőséget a gyógyszerek súlyos neurotoxikus hatásának érvényesüléséhez.

7. ábra: Toxikus enkefalopátia előfordulása az ALL-BFM 90 és 95 protokollok alacsony és közepes rizikójú ágán kezelt betegek között.

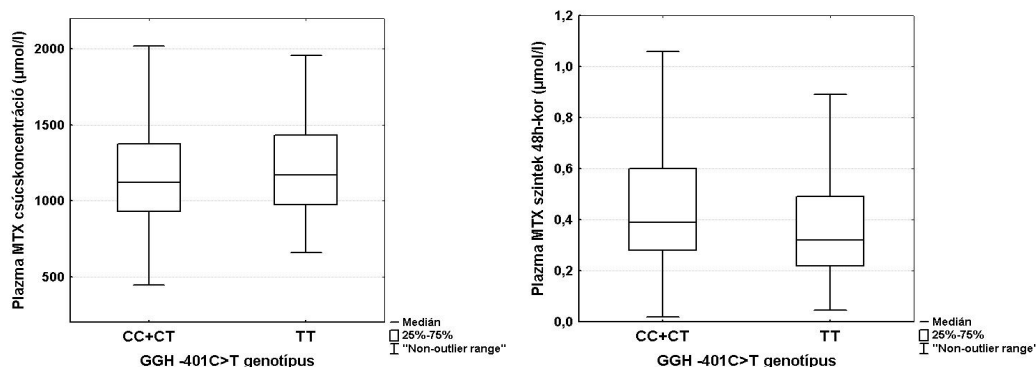


A metotrexát-kinetikával kapcsolatban a legmeggyőzőbb különbségeket a GGH -401C/T polimorfizmus kapcsán kaptuk. Ez az enzim egy lizozómális hidroláz, mely a sejtben akumulálódott poliglutamált metotrexát molekulákról lehasítja a glutamát-csoportokat, és így az ABC-transzporterek által eliminálhatóvá teszi a gyógyszert. Korábbi tanulmányok szerint a -401T allél fokozott génexpresszióval jár (4). A leukémiás gyermekek az általunk vizsgált protokollokban 5g/m² metotrexát adagokat kaptak 24 órás egyenletes infúzióban, míg az osteosarcomás gyermekek 12g/m²-t 4 órás infúzióban. A gyermekeknél rutinszerű gyógyszer-szint-monitorizálás történik (kórháztól függően 2-4 időpontban). Mindkét betegcsoportban azt tapasztaltuk, hogy az infúzió végén mért metotrexát plazma csúcskoncentrációk nem különböztek a GGH-genotípus alapján alkotott csoportokban, ezzel szemben a késői metotrexát-szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a GGH -401TT csoportban, mint a vad allélt hordozók között (8. ábra). Ennek megfelelően alakultak az akut gyógyszer-toxicitási mutatók is a metotrexát-blokkokat követően. Osteosarcomások között a -401TT csoportban szignifikánsan gyakrabban alakult ki grade-4 súlyosságú májkárosodás (p=0.02), ezt a paramétert a leukémiások között nem lehetett vizsgálni, mivel az 5g/m²/24 órás dózizás mellett nagyon ritka volt a súlyos hepatotoxicitás. Nem volt különbség az infekciós epizódok előfordulásában a metotrexát blokkokat követően a GGH genotípus csoportok között.

A többi, metotrexát-kinetikával összefüggésbe hozható polimorfizmus közül az ABCC3 -211C/T, az ABCC2 3563T/A és az ABCG2 34G/A esetében figyeltünk meg mérsékeltbb különbségeket a metotrexát-kinetika vonatkozásában. Ezek azonban nem

voltak konzekvensek a különböző mérési időpontokban illetve a két betegcsoport között, és nem kísérté őket párhuzamos eltérés a gyógyszer-mellékhatások terén.

8. ábra: Osteosarcomás gyermekek metotrexát plazma koncentráció értékei 6 órával és 48 órával az infúzió kezdete után. N=308 metotrexát-blokk; p=0.5 illetve p=0.01 a 6 ill. 48 órás időpontokban.



Az ALL-esek és osteosarcomások kezelésében is kulcs fontosságú antraciklinek dózis-limitáló mellékhatása a késői kardiotoxicitás. Összegyűjtöttük a gyógyult betegek balkamra-funkciós paramétereit (medián követési idő 6.4 év). A három ABCB1 és két ABCG2 polimorfizmus alkotta genotípus csoportokban nem találtunk különbséget az ejekciós-frakció értékekben. Mivel a gyermekonkológiai központok jelentős részében nem történtek rutin szívultrahang vizsgálatok a 90-es években kezelt gyermekek követése során, a ritka ABCC1 és ABCC2 allélok szerepe nem volt vizsgálható.

6) POTENCIÁLIS HASZNOSÍTÁSI LEHETŐSÉGEK

Gyűlnek a bizonyítékok a szakirodalomban, melyek az ABCB1 3435T/C SNP prognosztikai jelentőségét támasztják alá leukémiásokban (5,6). Ezen eredmények és az általunk észlelt toxicitásbeli különbségek alapján a jobb transzporter-funkcióval jellemzett 3435C allélt hordozó betegek enyhébb mellékhatásokat élnek át a kezelés során, de nagyobb arányban esnek vissza, hosszú távú gyógyulási esélyeik rosszabbak, míg a 3435TT genotípusúak fordítva. Felvetődik tehát a genotípus alapján történő individualizált gyógyszeradagolás lehetősége, mely a gyógyszerhatás és a mellékhatások egy ideális egyensúlyát célozná minden csoportban. Így elméletileg a túlélési eredmények további javulása, a súlyos mellékhatások ritkább jelentkezése volna várható. Hosszas munka van azonban hátra e cél eléréséhez, mivel fontos volna az összefüggések alátámasztása más központokban történt megfigyelésekkel, az ideális gyógyszerdozálás meghatározásához pedig kinetikai vizsgálatokat szükséges szervezni gyógyszerenként.

Az ABCG2 és GGH polimorfizmusok vonatkozásában egyelőre nincsenek prognosztikai adatok, a terápia kapcsán kialakuló toxicitás genetikai vonatkozásait pedig mindeddig igen kevésbé vizsgálták világszerte. Vizsgálataink jelentősége tehát csak a

potenciálisan jelentős génpolimorfizmusok azonosításában, a figyelem felkeltésében nyugszik egyelőre.

A létrehozott DNS-bankban nagymennyiségű mintát tárolunk betegenként, a minták rendelkezésre állnak további polimorfizmusok vizsgálata, az MGYT-GYOSZ-hoz tartozó vagy más kutató csoportokkal való együttműködés számára is.

7) ÖSSZEFOGLALÁS

Az eredeti célkitűzésektől való eltérésre kényszerültünk: a blaszt-minták gyűjtése kapcsán jelentkező akadályok miatt projektünkben lényegesen nagyobb hangsúlyt kapott a csíravonal-génpolimorfizmusok vizsgálata és ezeknek a citosztatikus kezelés mellékhatásaiban játszott szerepének vizsgálata. A munkát továbbá egészséges véradók és osteosarcomás gyermekek genomi DNS-ének vizsgálatával egészítettük ki.

Munkánk leglényegesebb eredményei és új megállapításai:

- Létrehoztunk egy nemzetközi viszonylatban is kimagaslóan nagy mintát magába foglaló gyermek-ALL-es genomi DNS-bankot.
- Eredményeink szerint az ABCB1 és ABCG2 vizsgált polimorfizmusai nem játszanak jelentős szerepet az ALL kialakulásában.
- Megállapítottuk, hogy az ABCB1 3435T/C genotípus prediktív értékkel bír a vizsgált kemoterápiás protokoll kapcsán kialakuló immunszuppresszió vonatkozásában.
- Szinergisztikus géninterakciót fedeztünk fel két vér-agy gát transzporter, az ABCB1 és az ABCG2 polimorfizmusai között, melyek a citosztatikus szerek központi idegrendszeri mellékhatásaitól védnek vagy azok kialakulására hajlamosítanak.
- Két betegcsoportban, két különböző adagolási séma esetében is igazoltuk a GGH -401C/T polimorfizmus klinikai jelentőségét. A -401TT genotípusú betegeknél csökkent gyorsabb metotrexát-eliminációt és a szövődmények ritkább előfordulását észleltük.
- Karakterizáltuk további, a metotrexát farmakokinetikájában szerepet játszó gének szerepét.

REFERENCES

1. Torok S, Borgulya G, Schuler D. [Changes of the incidence and survival in pediatric malignant tumors between 1988-1997, according to the data of the Hungarian Pediatric Cancer Registry]. *Orv Hetil* 2001; **142**: 1211-1215.
2. Jamroziak K, Mlynarski W, Balcerczak E, Mistygacz M, Trelinska J, Mirowski M et al. Functional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol* 2004; **72**: 314-321.
3. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007; **315**: 525-528.
4. Chave KJ, Ryan TJ, Chmura SE, Galivan J. Identification of single nucleotide polymorphisms in the human gamma-glutamyl hydrolase gene and characterization of promoter polymorphisms. *Gene* 2003; **319**: 167-175.
5. Kim DH, Park JY, Sohn SK, Lee NY, Baek JH, Jeon SB et al. Multidrug resistance-1 gene polymorphisms associated with treatment outcomes in de novo acute myeloid leukemia. *Int J Cancer* 2006; **118**: 2195-2201.
6. Stanulla M, Schaffeler E, Arens S, Rathmann A, Schrauder A, Welte K et al. GSTP1 and MDR1 genotypes and central nervous system relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol* 2005; **81**: 39-44.