

Glükokortikoid receptor gén polimorfizmusok szerepe a kortikoszteroid kezelés hatékonyságában és toxicitásában gyermekkori akut limfoid leukémiában

Doktori értekezés

Dr. Eipel Olivér

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kovács Gábor, PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Gellén Balázs, PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Fekete Andrea, PhD, egyetemi tanársegéd

Szigorlati Bizottság elnöke: Prof. Dr. Kulka Janina, PhD, egyetemi tanár
Szigorlati Bizottság tagjai: Prof. Dr. Demeter Judit, PhD, egyetemi tanár
Prof. Dr. Masszi Tamás, PhD, egyetemi tanár

Budapest

2016

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|---|----|
| I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE..... | 5 |
| II. BEVEZETÉS | 7 |
| II.1. A gyermekkori akut limfoid leukémia (ALL) | 7 |
| II.1.1. A gyermekkori ALL incidenciája | 7 |
| II.1.2. Az ALL kialakulásában esetlegesen szerepet játszó genetikai tényezők, polimorfizmusok..... | 7 |
| II.1.3. A gyermekkori ALL túlélési adatai | 8 |
| II.1.4. A gyermekkori ALL diagnosztikájának alapjai | 9 |
| II.1.5. Rizikóbesorolás, fontos prognosztikai tényezők..... | 9 |
| II.2.1. A különböző szervrendszereket érintő toxicitások | 11 |
| II.2.2. Nephrotoxicitás | 11 |
| II.2.3. Hepatotoxicitás | 12 |
| II.2.4. Gastrointestinalis rendszer | 13 |
| II.2.5. Myelotoxicitás | 13 |
| II.2.6. Idegrendszer..... | 13 |
| II.2.7. Kardiotoxicitás..... | 14 |
| II.2.8. Endokrin rendszert érintő toxicitások..... | 14 |
| II.2.10. Szekunder malignitások (SMN)..... | 15 |
| II.3. A gyermekkori ALL terápiája során alkalmazott citosztatikumok kapcsán fellépő leggyakoribb toxicitások | 17 |
| II.3.1. Aszparagináz okozta toxicitások..... | 17 |
| II.3.2. Vincristine (VCR)..... | 17 |
| II.3.3. Methotrexate (MTX)..... | 18 |

| | |
|---|----|
| II.3.4. Cyclophosphamide/ifosfamide okozta toxicitások | 20 |
| II.3.5. Cytosin- arabinosid toxicitásai..... | 21 |
| II.3.6. Anthracyclinek (Daunorubicine, Doxorubicine) | 21 |
| II.4. A glükokortikoidok..... | 24 |
| II.4.1. A glükokortikoidok szintézise és a HPA (hipotalamusz-hipofízis- mellékvesekéreg)-tengely | 24 |
| II.4.2. A glükokortikoidok szerepe a szervezet homeosztázisában és a medicinában | 27 |
| II.5. A glükokortikoid receptor (GR)..... | 35 |
| II.5.1. A glükokortikoid receptor (GR) felépítése | 35 |
| II.5.3. A glükokortikoid receptor különböző izoformái és azok klinikai jelentősége | 39 |
| II.5.4. GR gén polimorfizmusok..... | 41 |
| III. CÉLKITŰZÉSEK..... | 52 |
| IV. MÓDSZEREK | 53 |
| IV.1. Vizsgált betegek | 53 |
| IV.2. Genetikai módszerek | 54 |
| IV.2.1 N363S polimorfizmus | 54 |
| IV.3. Klinikai adatok | 62 |
| IV.4. Statisztika | 65 |
| IV.4. Etikai engedély | 66 |
| V. EREDMÉNYEK..... | 67 |
| V.1. N363S polimorfizmus..... | 67 |
| V.2. ER22/23EK polimorfizmus | 75 |
| V.3. BCL1 polimorfizmus | 82 |
| VI. MEGBESZÉLÉS..... | 92 |
| VI.1 A vizsgált toxicitások és polimorfizmusok kapcsolata | 92 |

| | |
|--|-----|
| VI.2. N363S, ER22/23EK, a BCL1 glükokortikoid receptor polimorfizmusok és a 8. napi prednisolon válasz | 100 |
| VI.3. N363S, ER22/23EK és a BCL1 polimorfizmusok, valamint az 5 éves EFS és OS | 102 |
| VII. KÖVETKEZTETÉSEK | 104 |
| VIII.1 ÖSSZEFOGLALÁS | 105 |
| VIII.2 SUMMARY | 107 |
| IX. IRODALOMJEGYZÉK | 108 |
| X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE | 130 |
| XI. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS | 132 |

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| | | | |
|-----------------------------------|--|--------------|-------------------------------------|
| 11β - HSD | 11-béta-hidroxi-szteroid-dehidrogenáz1 | HW | Hardy Weinberg |
| 6-MP | 6-mercaptopurine | IFO | ifoszfamid |
| 6-TG | 6-thioguanine | IGF | insuline-like growth factor |
| ABC | ATP-binding-cassette | IR | intermediate risk |
| ACTH | corticotrop-hormone | L-asp | L-aszparagináz |
| ALL | akut limfoblasztos leukémia | LBD | ligandkötő szakasz |
| ARA-C | citozin-arabinozid | LDL | low density lipoprotein |
| ASA-PCR | allél specifikus-PCR | MAPK | mitogén-aktivált protein-kináz |
| ATA | American Thyroid Association | MC-R | melanocortin-receptor |
| ATP | adenozin-trifoszfát | mesna | 2-mercapto-ethán-szulfonát |
| BFM | Berlin-Frankfurt-Münster | MRD | minimal residual disease |
| BMI | body mass-index | MTHFR | metilén-tetrahydro-folát reduktáz |
| CAA | kloro-acetaldehyd | MTX | methotrexat |
| CAD | coronary artery disease | NTD | N-terminális transzaktivációs domén |
| CAH | congenital adrenal hyperplasia | OR | Odds ratio |
| cAMP | ciklikus adenzin-monofoszfát | OS | overall survival |
| CBP | kortikoszteroidot kötő fehérje | PCR | polimerase chain reaction |
| CI | konfidencia intervallum | PI3K | foszfatadil-inozitol-3-kináz |

| | | | |
|--------------------|--|------------------|--|
| CLL | krónikus limfocitás leukémia | pm | polimorfizmus |
| CRH | corticotropin-releasing-hormone | POMC | pro-opiomelanocortin |
| DBD | DNS-kötő szakasz | PTSD | poszttraumatikus stressz betegség |
| DHFR | dihidro-folát-reduktáz | RA | rheumatoidi arthritis |
| DRZ | dexrazoxane | RFLP | restriction fragment length polymorphism |
| dTMP | dezoxi-timidin-monofoszfát | SAM | S-adenozil-methionin |
| d-UMP | dezoxi-uracil-monofoszfát | SCN | nucleus suprachiasmaticus |
| EFS | event free survival | Sebi | szérum bilirubin |
| GC | glükokortikoid | SMN | szekunder malignitás |
| GOT | glutamát-oxálacetát-transzamináz | SNP | single nucleotide polymorphism |
| GPT | glutamát-piruvát transzamináz | SR | standard risk |
| GR | glükokortikoid receptor | Src-kináz | szarkóma-kináz |
| GRE | glükokortikoidra válaszoló elem | TGN | thioguanin típusú nukleotidok |
| HDL | high density lipoprotein | THF | tetra-hidro-folát |
| HPA-tengely | hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg-tengely | TPMT | thiopurine-S-methytransferase |
| HR | high risk | TS | timidilát-szintáz |
| hsp | hősokk fehéré | VCR | vincristine |

II. BEVEZETÉS

II.1. A gyermekkori akut limfoid leukémia (ALL)

II.1.1. A gyermekkori ALL incidenciája

Az ALL nemzetközi viszonylatokban is a leggyakoribb gyermekkori malignus megbetegedés (1). Az összes gyerekkorban előforduló rosszindulatú malignitás kb. negyedét teszi ki. Hazánkban 100 ezer gyermekre kb. 30-35 eset jut ALL (2). A betegség előfordulása életkoronként változik. Az első és legnagyobb csúcsát az 1-6 éves korosztályban éri el, majd a 10-16 évesek körében tetőzik ismét egy kevésbé kedvező prognózissal (3).

II.1.2. Az ALL kialakulásában esetlegesen szerepet játszó genetikai tényezők, polimorfizmusok

Az irodalomban számos tényező, környezeti hatás, vagy genetikai megbetegedés jelenleg is vita tárgyát képezi, mint lehetséges oki tényezők az ALL kialakulásában. Ilyenek többek közt a magzati életben diagnosztikus céllal alkalmazott rtg-sugárzás (4), a terhesség alatt elszenvedett elektromágneses sugárzás, vagy az átlagosnál nagyobb születéskori testsúly (5). Az adatok azonban igen ellentmondásosak, egyértelmű bizonyítást még nem nyert egyik tényező sem.

Ismerünk azonban olyan genetikai (pl.: Down-szindróma), illetve veleszületett immundeficiencia szindrómákat (Wiskott-Aldrich szindróma, ataxia teleangiectasia), melyek bizonyítottan hajlamosíthatnak az ALL kialakulására (6).

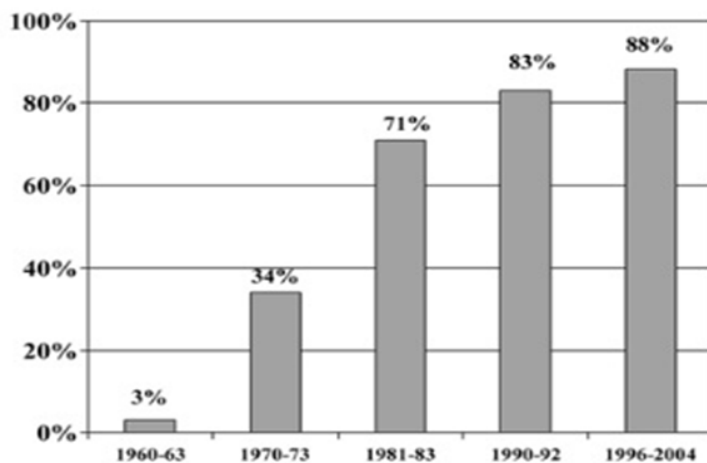
Vannak azonban olyan genetikai eltérések, génpolimorfizmusok is, melyek esetében épphogy úgy tűnik, hogy a fenti faktorokkal ellentétben az ALL kialakulásának esélye csökken. Ezen polimorfizmusok egy része a folát-ciklusban fontos szerepet játszó enzimek génjeiben jönnek létre. Ilyenek polimorfizmus például a metilén-tetrahidrofolát-reduktáz gén (MTHFR) 2 polimorfizmusa, az *MTHFR* 677C>T és a *MTHFR* 1298A>C (7;8), valamint a hidroxymetil-transzferáz (*SHMT1*) génjének 1420T és a timidilát szintáz gén (*TS*) 3R variánsa (9).

Más polimorfizmusok ugyanakkor hajlamosítanak a gyermekkori ALL kialakulására. Ilyenek polimorfizmusok például az *ARID5B*, *IKZF1*, *CEBPE*, és *CDKN2A* polimorfizmusok (10).

II.1.3. A gyermekkori ALL túlélési adatai

A gyermekkori akut limfoid leukémia túlélése hála az új kemoterápiás protokolloknak, a nemzetközi nagy randomizált multicentrikus vizsgálatoknak, illetve a folyamatosan fejlődő szupportív terápiás lehetőségeknek, mára már 80% felett van (11) (1.ábra). A túlélés jellemzésére az ún. overall survival rate-et (OS), illetve az event-free survival rate-et szoktuk megadni általában 5 évre. Ennek értelmében az 5 éves OS a diagnózistól kezdve eltelet 5 évet jelenti, mely alatt pusztán csak azt adjuk meg, hogy a betegek élnek-e még vagy sem. Ezzel szemben az 5 éves EFS azt is megmutatja, hogy a betegeknek ezen időszak alatt volt-e esetleg relapszusa (12).

Az 1 év alattiak körében az ALL gyógyulási esélyei igen rosszak, az 5 éves EFS pusztán 30-45% között mozog (13;14). A csecsemőkori ALL kezelési sémája ennek megfelelően el is tér a későbbi korosztály kemoterápiás protokolljaitól, attól jóval intenzívebb (13).



1. ábra.: a gyermekkori ALL túlélési adatainak javulása.

Teljes túlélés (OS) feltüntetve. SEER Cancer Statistics Review.

II.1.4. A gyermekkori ALL diagnosztikájának alapjai

A vérlemezék illetve a vörösvértestek előalakjait a limfoblastok kontrollálatlan osztódásuk folytán a csontvelőből kiszorítják. A periférián ezért a legtöbbször thrombocytopenia és anémia mutatkozik. Az ALL bevezető tünetei lehetnek így az elhúzódó, antibiotikumra nem reagáló lázas állapotok, a thrombocytopenia okozta bevérzések, az anémia okozta fáradtság, tachycardia, nyirokcsomó megnagyobbodás, hepatosplenomegália stb. lehetnek. A fehérvérsejtszám az emelkedettől az igen alacsonyig bármilyen lehet. A diagnózishoz a perifériás vérkenet minőségi és mennyiségi elemzése, valamint a csontvelő vizsgálat elengedhetetlen. A csontvelőből aspirációs és biopsziás mintavétel történik, melyeket ma már nemcsak morfológiailag és immunfenotípus szerint, hanem az emelkedő jelentőségű és prognosztikailag meghatározó molekuláris genetikai szempontok alapján is elemzünk (15).

II.1.5. Rizikóbesorolás, fontos prognosztikai tényezők

Az ALL terápiája nemzetközi protokollok alapján zajlik. A nemzetközi protokollok részletes kritériumrendszert állítanak fel a diagnózis, a rizikó besorolás, a kezelés, a szupportív terápia, illetve a betegség követése szempontjából. A kezelés alapja a kombinált kemoterápia. Koponyabesugárzás a magas rizikójú betegeknél (lásd később), illetve a központi idegrendszeri érintettséggel rendelkezőknél jön csak szóba. Hereérintettség esetén szintén elvégezzük a terület irradiációját. Magas rizikó csoportba tartozás, illetve recidíva esetén jön csak szóba az őssejt átültetés. Magyarországon jelenleg az ALL IC-2009-es protokoll használatos, de a vizsgált betegeink még az ALL BFM 90/95-ös protokollal kezelték. A két protokoll között összességében véve lényegi különbség nincs, a PhD dolgozat szempontjából döntő glükokortikoid dózisok, és kezelési időtartamok pedig teljesen megegyeznek.

Az elmúlt évtizedekben világossá vált, hogy egyes ALL-es gyermekek intenzívebb kemoterápiában részesültek, mint amennyi gyógyulásukhoz szükséges lett volna, ugyanakkor mások alacsonyabb citosztatikus dózisokat kaptak, pedig prognózisuk

rosszabb lett volna. Ezekből a megfigyelésekből született meg az az elv, mely a gyermekeket rizikóbecslés alapján osztja különböző csoportokba.

A rizikó-besorolásnál a legfontosabb tényezők: kezdeti fehérvérsejtszám, az életkor, a daganatos sejtekre jellemző genetikai eltérések, a korai kemoterápiára adott válasz (8. napi prednisolon válasz) és az ún. minimális reziduális betegség (MRD). Ezek szerint a szempontok szerint a betegeket: alacsony (standard risk: SR), közepes (intermediate risk: IR) és magas rizikójú (high risk: HR) csoportokba osztjuk (16).

Bizonyos kromoszóma eltéréseknek már önmagukban is prognosztikai jelentőségük vannak (17). Ilyen például a kedvező kórjóslatot jelentő hyperdiploiditás (18), vagy a kromoszóma transzlokációk közül a t(12;21) ETV6-RUNX1, valamint a t(1;19) (19). HR csoportba kerülnek viszont azok a betegek, akiknek t(9;22) (Philadelphia kromoszóma) BCR/ABL, vagy t(4;11) transzlokációik, vagy MLL-génátrendeződéseik vannak. Szintén HR-betegséget jelent minden más tényezőtől függetlenül, ha a leukémiás sejteik hipodiploidak, azaz sejtenként kevesebb, mint 44 kromoszóma található (20).

További kritérium az ún. minimális reziduális betegségen (MRD) alapuló besorolás, valamint a 8. napi prednisolon válasz értékelése, melyeknek a kórjóslat szempontjából kiemelt jelentőségük van (21). Az MRD vizsgálat során a már kezelt betegektől vett 15., illetve 33. napi csontvelői aspirátumban flow-citometriai módszerrel megvizsgáljuk, hogy mennyi reziduális blaszt maradt meg. Ezen eredmény alapján a betegek enyhébb rizikócsoportba már nem, csak magasabba kerülhetnek.

A 8. napi prednisolon válasz az egyik legfontosabb kórjósító tényező a terápia eredményessége szempontjából. A betegek rendelkezhetnek jó (1 G/l alatti blaszt szám) vagy rossz (1 G/l feletti blaszt szám) prednisolon válasszal. Ezt a vizsgálatot perifériás vérből végezzük a kemoterápia 8. napján. A terápia ezen napjáig a betegek 1 intrathecalis (ith) methotrexate-on (MTX) kívül csak prednisolon terápiában részesülnek (22).

II.2. A gyermekkori ALL terápiája során előforduló leggyakoribb toxicitások

PhD munkám elsősorban a gyermekkori ALL terápiája során fellépő toxicitásokra fókuszál. Már említésre került, milyen nagyszerű sikereket értünk el az elmúlt évtizedekben az ALL túlélése tekintetében. A beteg gyermekek, szüleik és az egészségügyi dolgozók számára azonban távol sem mindegy az, hogy a túléléshez vezető út mennyire rögös. Az életminőség javítása a terápia alatt a következő lépcső kell, hogy legyen egy olyan malignus betegség kapcsán, ami már 80% feletti túlélési arányokat mutat.

A kemoterápiának számos akut és krónikus mellékhatásai van. A cél egyrészt, az akut toxicitás kivédése és kezelése, másrészt a késői károsító hatások megelőzése.

II.2.1. A különböző szervrendszereket érintő toxicitások

II.2.2. Nephrotoxicitás

A gyógyszerek többsége a vesén keresztül metabolizálódik, ürül ki a szervezetből. Akut GFR csökkenés és tubuláris károsodás az esetek 25-30%-ában fordul elő. Krónikus GFR csökkenéssel a betegek 5 %-ában, tartós tubuláris károsodással az esetek kb. 25%-ában kell számolnunk (23).

A **methotrexate** (MTX), ami egy kulcsfontosságú citosztatikum az ALL kezelésében, nagy dózisban alkalmazva (több grammos adagban) szintén vesekárosító lehet. Akut tubuláris károsodást okozhat oly módon, hogy kicsapódik a tubulusokban és elzárja azokat (24). Proteinuria megjelenése szintén előfordul a kezelt gyermekek kb. 25-30 %-ában. Ugyanakkor a MTX krónikus proteinuriához és tubulopathiához is vezethet, ami maradandó károsodás képében az esetek kb. 55%-ában mutatkozik. A MTX toxicitásának kivédésében itt is szerepet kap a hidrálás, a vizelet lúgosítása, valamint a **Ca-folinát** adása, amely - lévén egy teljesen redukált folsav - felfüggeszti a MTX hatását.

Szintén vesekárosító vegyület az **ifosfamid (IFO)**, mely az ALL-es betegek egy részénél szintén alkalmazásra kerül. Toxikus metabolitja a (kloroacetaldehid, CAA), dózis-dependens módon jelentős tubuláris károsodáshoz vezethet, különösen akkor, ha vele egy időben egyéb potenciálisan nefrotoxikus gyógyszert is alkalmazunk. Hajlamosító tényezőnek számít a fiatalabb életkor, a nagy összdózisok alkalmazása, illetve az antioxidáns védelemben szerepet játszó glutation alacsony intracelluláris szintje (25). A CAA egy oxidatív stresszt okozó vegyület, mely a vesében reperfüziós szindróma kialakulását idézheti elő az IFO-kezelés során. Toxicitása in vitro jól kivédhető **mesnával** (2-mercapto-ethán-szulfonát) és **amifostinnal** (26).

II.2.3. Hepatotoxicitás

A citosztatikumok metabolizációjában a máj központi szerepet játszik, így az akut májkárosodás igen gyakran fellépő probléma a kezelésekk alatt. A citosztatikumok közül késői károsodással főleg a **cytosin-arabinozid (ARA-C)**, a **6-mercaptopurin (6-MP)** (27) és a **MTX** (28) esetében kell számolni. Ezen szerek májsejtnekrózist, májfunkciós enzimemelkedést (GPT, GOT, ritkábban gamma-GT), fibrózist és cirrózist okozhatnak. Az egyszeri - akár még nagy adagú- szerek májkárosító hatása általában reverzibilis. Ezzel szemben a hónapokon, esetleg éveken át adagolt - akár kis dózisban - citosztatikus kezelésekk krónikus májléziót eredményezhetnek. Az előfordulási gyakoriság - tartós adagolás esetén - 15-30% (23).

Ezen toxikus hatás kivédése érdekében több szerrel is próbálkoznak. Ilyen például a **silibinin**, ami enyhébb tumor ellenes hatása mellett, kiemelkedő szerepet tölt be az antioxidáns védelemben. A legújabb kutatások azt bizonyítják, hogy oxidált származékának, a **2,3-dehydrosilybinnek** hatásai még kedvezőbbek a májsejtnekrózis megakadályozásában, mert már kisebb dózisban is gátolja a terápia során keletkező hidrogénperoxid és galaktóz-amin ilyen káros hatásait (29). Az **N-acetil-cisztein** számos klinikai vizsgálat szerint szintén jó fegyvernek bizonyult a MTX okozta oxidatív hepatotoxicitás kivédésében (30).

A májkárosodás kialakulásában szintén oki tényezők lehetnek a gravis anémiás epizódok miatt alkalmazott transzfúziók. A gyakori vérátömlesztések vasterhelést

okozhatnak. A vas felhalmozódik a RES-ben, így a májban is, és ezzel lipidperoxidációt, hemochromatosiszt, májsejtnecrosist és cirrhosist okozhat. A vas eltávolítására vaskötő kelátokat alkalmaznak, melyek a vérben levő szabad vasat megkötik (31).

II.2.4. Gastrointestinalis rendszer

Az akut károsodások a gyorsan osztódó hámsejtek, nyálkahártyasejtek pusztulása miatt jönnek létre: hányinger, hányás, mucositisek (32). Ezek gyakoriak, de gyakorlatilag már a kezelésekként nagyobb részt rendezhetőek 5-HT₃-antagonistákkal (pl.: ondansetron) és/vagy motilitás fokozókkal (methoclopramid, domperidon) (33).

Ennél nagyobb kihívást jelenthet a krónikus felszívódási zavar, ill. a krónikus enteritis, melyek főleg antraciklin és nagy dózisú cytozinarabinozid kezelés után léphetnek fel az esetek 20-30%-ában (23).

II.2.5. Myelotoxicitás

A csontvelő működését, ill. az immunkompetens sejtek károsítását akutan szinte valamennyi kemoterápiás szer előidézi (34-36). Az intenzív kemoterápiás- és a nagy dózisú sugárkezelések tartósan is károsítják az immunrendszert. A restitúció általában kb. egy évvel a terápia befejezése után már megfelelő. Leukémiás betegeknél később, szolid tumoros betegeknél általában korábban rendeződik az immunrendszer működése. Csontvelő-átültetés után viszont a védekezőrendszer teljes helyreállításához több évre (4-5) van szükség.

II.2.6. Idegrendszer

A gyermekkori leukémiák kezelése során adott MTX neurotoxicitása igen széles spektrumot ölel fel az aszimptomás esetektől egészen a súlyos demyelinizációig (37).

ALL-terápia folyamán **cytarabin-** és **polietilén-glikol-aszparagináz** kezelés mellékhatásaiként leírtak magatartásváltozást, apháziát, incontinenciát, vizuális hallucinációkat, melyek az említett két szer elhagyása után megszűntek (38).

II.2.7. Kardiotoxicitás

Mivel ez gyakorlatilag az anthracyclinekhez köthető csak, ezért a doxorubicin és daunorubicin okozta toxicitások alatt kerül tárgyalásra.

II.2.8. Endokrin rendszert érintő toxicitások

II.2.8.1. Növekedés és a csontrendszer

Koponya- és gerincvelő besugárzás után - dóziszfüggő módon – kell számolnunk növekedési zavarral, mely így elsősorban a HR betegeket érinti (39). Ritkán (a betegek néhány százaléka) még növekedési hormon (GH) szubsztitúcióra is szükség lehet (40). A gyermekkori ALL terápiaja kapcsán elsősorban a glükokortikoidok és/vagy a besugárzások következtében, de akár a 6-mercaptopurin vagy methotrexate hatásaként osteopénia alakulhat ki (41). A csontanyagcsere szempontjából legfontosabb hatással a glükokortikoidok bírnak. Az ALL BFM 90/95-ös protokollban a protokoll I fázis 1, illetve a protokoll II fázis 2-ben alkalmazunk nagy dózisban szteroidot: prednisolon 60mg/m²/nap, illetve dexamethason 10mg/m²/nap. Leggyakoribb mellékhatásként aszeptikus csontnekrózis, illetve osteoporosis alakulhat ki. Az aszeptikus csontnekrózis leginkább indukció alatt lép fel (42), azonban az életminőséget csökkentő hatása évekig is fennállhat. A legtöbb esetben a csontot érintő elváltozások reversibilisek és idővel javulnak. Hasi besugárzás után scoliosisra lehet számítani (nagy dózisonál akár 60%-ban) (23).

II.2.8.3. Pajzsmirigy

Pajzsmirigy károsodás gyakorlatilag csak sugárkezelés (HR betegek, illetve központi idegrendszeri érintettség) után fordul elő. Önmagában a kemoterápia gyakorlatilag ilyen jellegű problémát nem okoz (43).

Kemoterápia hatására csak igen ritkán, mintegy 1%-ban jelentkezik a pajzsmirigy funkciózavara.

Számolnunk kell még a pajzsmirigy adenomák és göbök kialakulásával, melyek a betegek 8- 20%-át érintik, azonban kezelést csak ritkán igényelnek (44).

II.2.8.4. Reprodukív funkciók

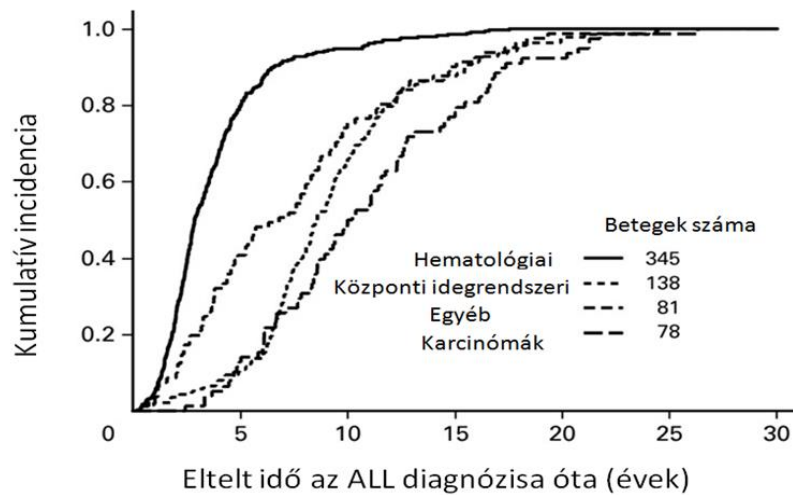
Igen fontos kései toxicitás. Termékenység zavarokkal hasi sugárkezelés és alkiláló szerek (cyclophosphamid, procarbazin) fokozott alkalmazása esetén kell számolni (45).

II.2.10. Szekunder malignitások (SMN)

A gyermekkori ALL ugyan 80% feletti sikerrátával rendelkezik, azonban a gyógyulást jelentő hajdani kemoterápiának egy később kialakuló malignitás is lehet ára. Korábban az egykori citosztatikus kezelés következtében kialakult másodlagos daganatok előfordulási arányát 1-10% közé becsülték. Ennek a nagy eltérésnek az okait a különböző kezelési stratégiákban, a nem megfelelő nyomon követésben, továbbá abban kell keresnünk, hogy az SMN-ek eredetét sok esetben nem ismerték fel (46). A másodlagos daganatok igen sok félek lehetnek. Az SMN-ek sok esetben összefüggést mutatnak az eredeti ALL altípussal (47). A szekunder malignitások egyes típusai kapcsolatban állnak bizonyos genetikai eltérésekkel, melyek olyan géneket érintenek, amik a citosztatikumok metabolizmusában fontos szerepet játszó enzimeket kódolnak (48).

A másodlagos daganatok megjelenési idejük szerint szintén különböznek egymástól (2.ábra). A hematológiai malignitások például viszonylag hamar jelentkeznek (kb. 3éven belül), míg a karcinómák vagy meningeómák viszonylag később (kb. 16 év) (49).

Az SMN-ek túlélésüket tekintve is jócskán különböznek. Míg a nem meningeóma eredetű agytumoroknak igen rossz a prognózisuk (kb. 26%-os 5 éves túlélés), addig a másodlagos agyhártya daganatok, a Hodgkin-limfóma, a pajzsmirigy karcinóma, a bazál sejtes karcinóma, és a parotisz-karcinóma 5 éves túlélése meghaladja a 90%-ot is (49).



2. ábra

Az ALL diagnózisa és a 4 leggyakoribb SMN-ek diagnózisa között eltelt időtartam Kaplan-Mayer görbén.

Schmiegelow K. et al. J Clin Oncol. 2013

II.3. A gyermekkori ALL terápia során alkalmazott citosztatikumok kapcsán fellépő leggyakoribb toxicitások

II.3.1. Aszparagináz okozta toxicitások

Az L-aszparagináz (L-asp) a gyermekkori ALL terápiájának egy kulcs citosztatikuma, melynek számos mellékhatása ismert. Minden sejtnak, így a leukémiás sejteknek is szükségük van aszparaginra növekedésükhöz. Mivel ezeknek a sejteknek azonban csak nagyon kevés aszparagin-szintáz enzimük van, mely a létfontosságú aszparagint előállítaná, ezért a sejtek kénytelenek azt kívülről felvenni. Az L-aszparagináz a szérumban található aszparagint elhasítja, ezzel akadályozva a tumorsejteket abban, hogy azt felvegyék. Az L-aszparaginázt előállíthatjuk E colival, mely nagyon hatékony, azonban igen magas a toxicitási rátája (50). A leggyakoribb szövődmény a készítményre jelentkező, akár életveszélyes allergiás reakció, mely a betegek 20-40%-ában lép fel (51). Ebben az esetben egy kémiaileg módosított szerkezetű aszparaginázra kell váltani, mely Magyarországon első körben annak pegilált származékát jelenti, az L-PEG-aszparaginázt. Az L-PEG-aszparagináz allergizáló hatása már kisebb, azonban keresztreakció miatt sajnos ez is előfordulhat. Ilyen esetben a crisantaspase adandó, mely szerkezetéből adódóan nem keresztreakál az előző 2 készítmény egyikével sem (52).

Az aszparagináz további két súlyos mellékhatása a pancreatitis (18%) és a thrombotikus epizódok (5%) (53).

II.3.2. Vincristine (VCR)

Növényi alkaloida, mely a sejtek tubulus-rendszerét (54), így a sejtosztódást és a transzport folyamatokat gátolja. Transzport folyamatok a hosszú neuroaxonokon keresztül folyamatosan zajlanak. Nem véletlen tehát, hogy a kemoterápia alatt alkalmazott vincalkaloidák idézik elő leggyakrabban a perifériás neuropátiát. Ez a toxicitás tünetileg fájdalmas érzészavarokban, hosszfüggő fájdalomérzet, hőmérséklet, propriocepció vesztesben, valamint a mély ínreflexek gyengülésében, egyensúly-,

koordinációs zavarokban, valamint disztális izomgyengeségben nyilvánul meg (55). Bizonyos gyerekeknél az ALL terápiája kapcsán alkalmazott vincristin abbahagyása után még hónapokkal, sőt évekkel később is tapasztalhatóak neuropátiára utaló mellékhatások (56).

II.3.3. Methotrexate (MTX)

A MTX a gyermekkori ALL egyik alapvető szere, melyet nemcsak vénásan, hanem a központi idegrendszer érintettségének megléte vagy annak megelőzéseként intratekálisan is alkalmazunk (57). Az MTX legismertebb mellékhatásai közé tartoznak a mucositisok, a myelosuppresszió, az akut, a kései neurotoxicitás, valamint a hepatotoxicitás és a nefrotoxicitás (58).

Számos kutatás vizsgálja azoknak az enzim-géneknek, illetve transzportfehérje géneknek a polimorfizmusait, melyek a MTX felvételében, metabolizmusában, és ürülésében fontos szerepet játszanak (59-69). Ezek megértéséhez azonban bele kell kicsit tekintenünk a MTX szerkezeten belüli útjába (3.ábra).

A MTX hatását tekintve egy folát analóg, mely kompetitív módon képes gátolni a dihidrofolát-reductáz (DHFR) enzimet (59), melynek következtében a dihidrofolátból (DHF) nem tud tetrahydrofolát (THF) keletkezni. Ez pedig azért vezet citotoxicitáshoz, mert a THF-ből keletkező származékok alapvetőek a timidin (timidilát-szintáz végzi) és a purin alapú nukleotid bázisok keletkezéséhez kellenének. Ezen bázisok hiányában nem tud épülni a sejtek DNS-e, így az érintett sejt elpusztul. A DNS-be beépülésre kerülhető dezoxi-timidin-monofoszfát (dTMP) kialakulásához a timidilát-szintáz (TS) szükséges, míg a purin nukleotidok keletkezéséhez elengedhetetlen a metilén-tetrahydrofolát-reduktáz enzim (MTHFR1). A MTX poliglutamált formája (melyet a folil-polilglutamát-szintáz végez) közvetlenül is gátolja a TS-t. A MTX ezen kívül érinti a sejt homocisztein szintjét szabályzó S-adenozil-methionin (SAM)-ciklusát is, melynek eredményeként a sejt számára fontos methionin keletkezik. A ciklushoz azonban a DHFR által biztosított 5,10-metilén-THF-ből a metilén-tetrahydrofolát reduktáz enzim által keletkező 5-metil-THF kell. Mivel azonban a DHFR-t a MTX

gátolja, így a ciklus is gátolt lesz. A MTX poliglutamált formája a fentiekén kívül gátolja még a formil transzferázokat (AICART és GART) is, melyek a purin nukleotidok de novo szintéziséhez elengedhetetlenek (60). A poliglutamált MTX tovább marad a sejtben mint maga a MTX. Lebontása a gamma-glutamil-hidroláz nevű enzim segítségével történik meg (61).

A MTX metabolizmusával kapcsolatos génpolimorfizmusok

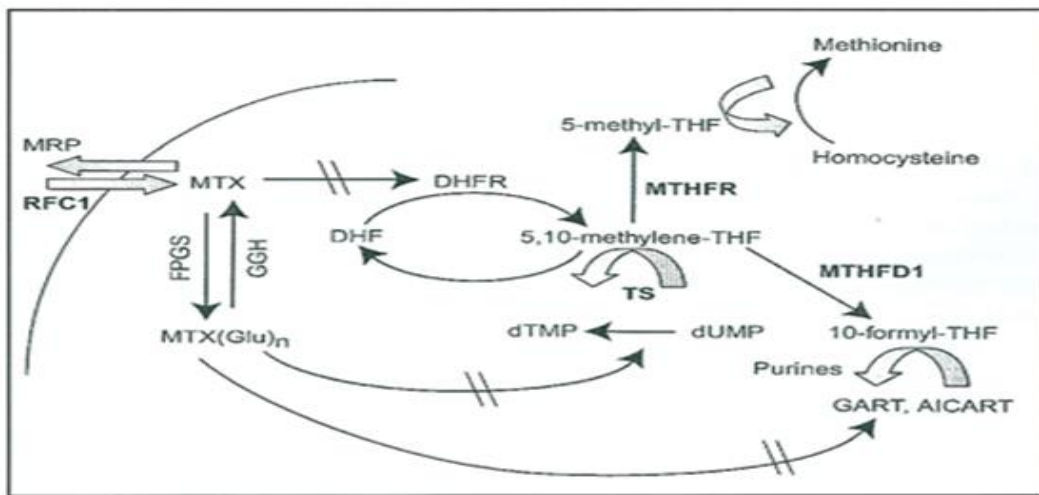
A MTX a redukált folát karrieren (SLC 19A1) keresztül szívódik fel. Ebben a folyamatban még az ún. proton-coupled-folát transzporter szerepe is szerepet játszik (SLC46A1) (62). A MTX biohasznosulását gátolják egyes ABC transzporterek is (multidrug rezisztencia proteinek), melyek egy része a bélbőlhámsejtekből pumpálják vissza a MTX-ot a bél lumenébe, míg mások a daganatos sejtekből juttatják vissza azt a szérumba. A MTX így gyakorlatilag be sem tud kerülni a sejtbe (63).

Az MTHFR polimorfizmusa közül a leggyakrabban kutatott a C677T. Ezen polimorfizmus megléte csökkenti az MTHFR működését. Ha mind az anyai, mind az apai allélon ez a genetikai eltérés található meg (TT), akkor az irodalom arról számol be, hogy a protokoll által előírt mennyiségű MTX-tal történő kezelés mellett rendkívül nagy mértékben fokozódik a MTX toxicitása a csökkent funkciójú MTHFR miatt. A fentiek értelmében felmerülhet a polimorfizmusnak a vizsgálata az ALL terápia előtt, majd ennek alapján pedig egy esetleges dóziscsökkentés (64).

Az egyes polimorfizmusok interakcióit is vizsgálták (65). Az MTHFR gén másik nagyon gyakran kutatott polimorfizmusa az A1298C. Amennyiben a betegek C677-C1298 allél kombinációkkal rendelkeznek, úgy jobb terápiás válaszra lehetett számítani, míg 667T-A1298 kombináció esetén pedig a toxicitások mértéke ismét csak növekszik (65).

A timidilát szintáz a glutamált MTX egyik célpontja. Az enzim feladata, hogy a dezoxi-uracilból a DNS-be beépülésre alkalmas dezoxi-timidint gyártson. Amikor ezt a poliglutamált MTX gátolja, akkor a dUMP-ből nem keletkezik dTMP, így uracil alapú

bázisok (dUTP) épülnek be a DNS-be, melyek kromoszóma instabilitást, azon keresztül pedig apoptozist idéznek elő (66). A TS génjének át nem íródó 5'-UTR régiójában van egy ismétlődő tandem szakasz, mely egy enhancer régióknak felel meg, ami olyan elemeket tartalmaz, ahová a transzkripciót serkentő faktorok tudnak bekötődni, ezzel pedig az expressziót tudják serkenteni (67). Minél nagyobb ismétlődési számban van tehát jelen ez a tandem szekvencia, annál fokozottabb lesz a TS mRNS-ének az expressziója, vagyis a TS mennyisége a sejtben (68). Az ismétlődés lehet 2-szeres vagy 3-szoros. Egy kanadai tanulmány azt igazolta, hogy a 3R/3R homozigóta ALL-es gyerekeknél a túlélési arányok szignifikánsan alacsonyabbak voltak (69).



AICART és GART: formil-transzferázok
 DHF: dihidrofolát
 DHFR: dihidrofolate reduktáz
 dTMP: dezoxi-timidin-monofoszfát
 dUMP: dezoxi-uracil-monofoszfát
 FPGS: folil-poliglutamát-szintáz
 GGH: gamma-glutamil-hidroláz

MTHFD1: 5,10-metenilén-tetrahydrofolát-dehidrogenáz
 MTHFR: 5,10-metilén-tetrahydrofolát-reduktáz
 MTX: methotrexat
 MTX(Glu)_n: MTX poliglutamilált formája
 RFC1: redukált folát karrier
 THF: tetrahydrofolát
 TS: timidilát-szintáz

3. ábra: A MTX metabolizmusa a sejtben

Krajinovic M, Moghrabi A.: Pharmacogenetics of methotrexate. *Pharmacogenomics. Review.* 2004;5:819-34.

II.3.4. Cyclophosphamide/ifosfamide okozta toxicitások

Ezek a vegyületek az alkiláló szerek csoportjába tartoznak, melyek alkil csoporttal a DNS-hez kötődnek kovalens módon. Sejtosztódás alkalmával itt kettős törések jönnek létre, melyek apoptózishoz vezetnek (70). A legfontosabb mellékhatásuk a

hemorrhágiás cystitis kialakulása, melyet a keletkező acrolein okoz. Megelőzésként mesna-t (2-mercaptoethane sulfonate) alkalmazunk, mely megköti az acroleint, így akadályozva a kórfolyamat kialakulását. A cylophosphamide további mellékhatása a gonadotoxicitás, mely akár meddőséget is okozhat (71). A fentiekén kívül még gastrointestinális problémák, súlyos nephotoxicitás, illetve a myelosuppresszió léphetnek fel (72).

II.3.5. Cytosin- arabinosid toxicitásai

A cytosin-arabinosid (ARA-C) szerkezetét tekintve nagyon hasonlít deoxycitidinre, mely a DNS egyik építőköve. A hasonlóság miatt szintén képes beépülni a DNS-be, azonban ezzel a DNS szintézisét gátolja, ami a leukémiás sejtek pusztulásához vezet (73).

Főleg nagy dózisban vagy intratekálisan alkalmazva (központi érintettség esetén) az ARA-C legfontosabb mellékhatásai a súlyos myelotoxicitás és neurotoxicitás. Gastrointestinális mellékhatása, mely hasmenésben, ulcerációk és mucositisek kialakulásában nyilvánul meg, szintén nem elhanyagolható. Az ARA-C toxicitásai dóziszfüggők (74). A cytosin-arabinozid keratitist is okozhat, melynek megelőzésére szteroidos szemcseppeket alkalmazunk (75).

II.3.6. Anthracyclinek (Daunorubicine, Doxorubicine)

Az anthracyclinek hatásukat oly módon fejtik ki, hogy beépülnek az osztódó sejt DNS-bázisai közé. Ez a folyamat az örökítő anyag szétdarabolódását okozza, mely a fehérjeszintézis megszűnését eredményezi (76).

Az anthracyclinek legfontosabb mellékhatása a kardiotoxicitás, mely akár életveszélyes vezetési zavarokban, illetve pangásos szívelégtelenségben nyilvánulhat meg (76).

Kardiotoxicitás sajnos évekkel a terápia után is kialakulhat, és a másodlagos malignitások, illetve a relapszusok után ez a leggyakoribb komplikációja a kemoterápiának (77).

Az anthracyclinek okozta kardiotoxicitás kivédésére, megelőzésére sokáig a dexrazoxane (DRZ) nevű vegyület került alkalmazásra, mely az anthracyclinekből származó szívizompusztulást előidéző vasiont a kelátképzés elvén megköti. A DRZ-ről a későbbiekben kiderült, hogy fokozza a másodlagos daganatok kialakulását (78), így alkalmazását a gyermekonkológiában beszüntették.

II.3.7.6. Mercaptopurine és 6-thioguanin okozta mellékhatások

Mind a 6-Mercaptopurine-t (6-MP), mind a 6-thioguanint (6-TG) egy prodrug, melyek a bélben és a májban alakulnak át thioguanin típusú nukleotidokká (TGN). A TGN-ek a DNS-be a valódi purin-nukleotidok helyett épülnek be (79). Az eredmény a DNS feldarabolódása, mely a sejt halálához vezet. Ezenkívül a 6-MP még megakadályozza a purin-nukleotidok ún. „salvage” útját, valamint a de novo purine szintézist (80)

Legjelentősebb toxicitásaik a gasztrointesztinális rendszert és a csontvelőt érintik (81).

A thiopurin-S-metiltransferáz (TPMT) nevű enzim katalizálja az aktív, már citotoxikus TGN-ek átalakulását inaktívabb formákká. Amennyiben ennek az enzimnek az aktivitása csökken, úgy nyilvánvalóan tovább maradnak meg az aktív TGN-ek, mely miatt a 6-MP és 6-TG toxicitása a hagyományoshoz képest változatlan dózis esetén is súlyosabb lesz (82). Több polimorfizmust is felfedeztek a TPMT génjében, melyek közül 3-nak van klinikai jelentősége.

A TPMT*2-es alléljának G238C polimorfizmusa az enzim aktivitását 100-ad, a TPMT*3-as alléljának G460C és A719G polimorfizmusai pedig a 200-ad részére

csökkentik. A 200-ados enzimaktivitás csökkenés már gyakorlatilag kimutathatatlan enzimtevékenységet eredményez (83).

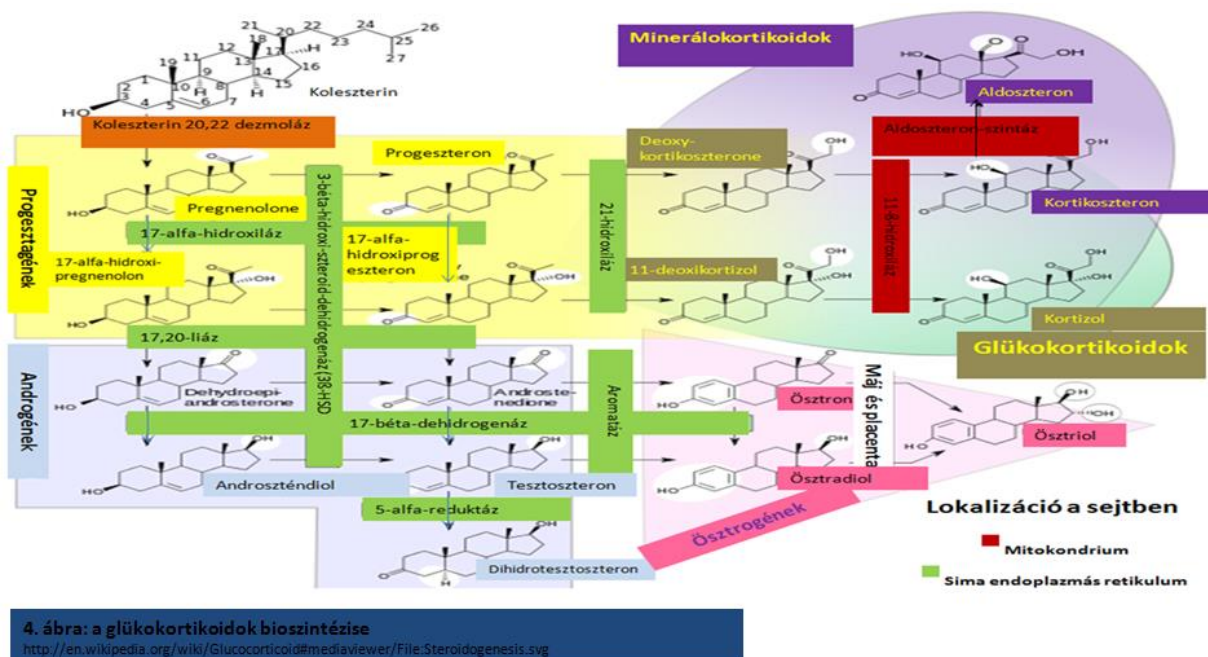
Számos tanulmány igazolta, hogy a hagyományos terápiának megfelelően adagolt 6-MP mellett, amennyiben a fenti polimorfizmusok bármelyike is homozigóta formában jelen van, akkor a 6-MP által kiváltott myelotoxicitás sokkal súlyosabb lesz (84). Az általában használt dózist még heterozigóta betegek esetében is redukálni kell (85).

II.4. A glükokortikoidok

A glükokortikoidok kulcsszerepet játszanak a gyermekkori akut limfoid leukémia terápiájában, azonban ezek a hormonok akár súlyos toxicitásokat is okozhatnak a kezelés alatt. Kutatásom azokra a genetikai eltérésekre fókuszál a glükokortikoid receptor génjében, melyek ezeket a mellékhatásokat valamilyen módon befolyásolják. Növelhetik, vagy adott esetben csökkenthetik azok erősségét.

II.4.1. A glükokortikoidok szintézise és a HPA (hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg)-tengely

A glükokortikoidok a mellékvesekéregben termelődnek a zóna fasciculátában. A glükokortikoidok mellett a mellékvesekéregben keletkeznek a mineralokortikoidok (zóna glomerulosa), valamint az androgének is (zóna reticuláris). Ezen három hormon típus szintézise egymással szoros kapcsolatban történik, melyet az 4. ábra mutat be részletesen.



A glükokortikoidok megfelelő mennyiségű és időben történő elválasztásáról egy pozitív, illetve negatív visszacsatolásokkal rendelkező szabályozó rendszer gondoskodik. Ennek az első eleme a corticotropin-releasing-hormone (CRH), amely a hypothalamusban szintetizálódik. A CRH egy 41 aminosavból álló peptid, mely az agyalapi mirigy elülső részében CRH-receptorához kötődve corticotrop-hormon (ACTH) szintézist és felszabadulást eredményez. A CRH ezen kívül részt vesz az autonóm idegi szabályozásokban, a tanulás, a memória, a táplálkozás, valamint a szaporodással kapcsolatos viselkedési folyamatokban. A CRH nemcsak az idegrendszerben (nucleus paraventriculáris) termelődik, hanem azon kívül a periférián is keletkezik (mellékvese, here, placenta, gasztrointesztinális traktus stb.) (86).

Az ACTH előanyagából a pro-opiomelanocortinból (POMC) keletkezik, mely főként a hipofízisben és a hipotalamuszban van jelen. A POMC bomlásából számos anyag keletkezik még az ACTH-n kívül (β -endorfin, β -lipotropic hormon stb.), melyeknek szintén neuroendokrin szabályozó funkciójuk van (87). Az ACTH a véráramon keresztül eljut a mellékvesekéregig, ahol annak zona fasciculátájában a parenchyma sejtek melanocortin 2-es típusú receptorához (MC2-R) kötődik. Az MC2-R cAMP aktiváció útján végül glükokortikoid hormon, kortizol felszabadulást eredményez (88).

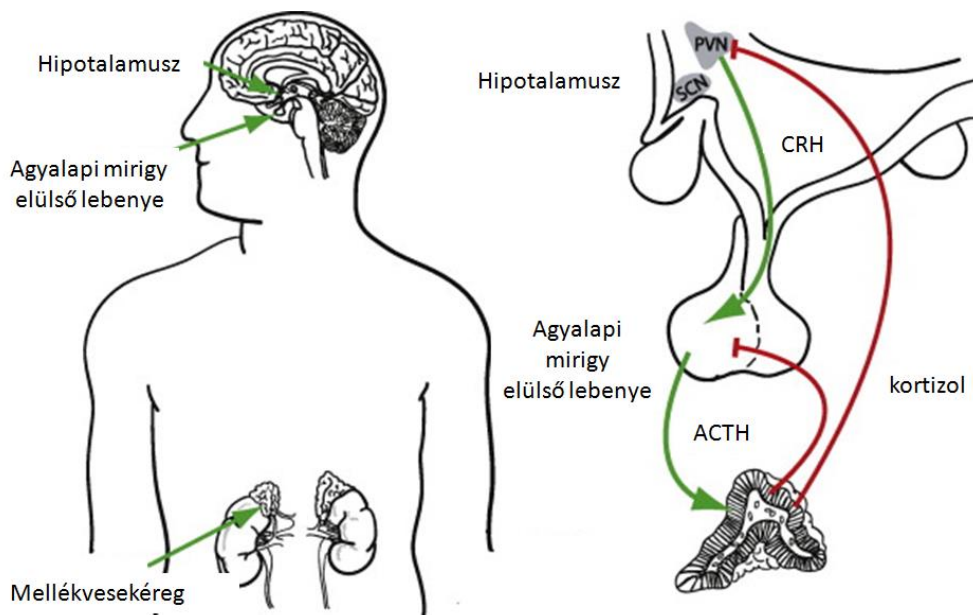
A keletkező endogén kortizol glükokortikoid receptorhoz kapcsolódva (GR) negatív visszacsatolást eredményez mind a hipotalamuszban mind a hipofízisben, így kontrollálva saját keletkezését (89). Ezt a rendszert hívjuk hypothalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengelynek (5. ábra). A rendszer visszacsatolásaival gondoskodik arról, hogy a kortizol szint ne legyen folyamatosan se túl magas, se túl alacsony.

A kortizolszint nemcsak a fenti módon szabályozott, hanem napszaki ingadozást, azaz cirkadián ritmust is mutat. Ez alapján a legalacsonyabb kortizol szintet reggel 8 és délután 2 között mérhetjük (90). Ezen kívül ACTH felszabadulás figyelhető meg a fentiekén kívül 1-3 óránként, melyet ultradián oszcillációnak nevezünk.

A napszaki ingadozásért a fentiekén kívül az ún. „clock-gének” hálózata is felelős (91). Ezek a gének főleg a nucleus suprachiasmaticusban (SCN) aktívak, de a periférián, az agyon kívül, még egyéb szervekben is mutatnak aktivitást. A rendszert erősen

befolyásolja a napfény, a testhő, az éhség, valamint olyan exogén tényezők, mint a pszichoszociális és pszichés stressz (92).

A HPA-axist és így a kortizol termelést egyéb strukturális tényezők is stimulálják, befolyásolják. Ilyenek például az agytörzs katekolaminerg központja, melyhez az agyidegek, illetve a mellkasi és a hasi zsigerekből jövő információkat összeszedő idegvégződések is szállítanak információkat. Szintén ehhez a rendszerhez futnak be idegvégződések a limbikus rendszer azon elemeiből, melyeknek a stressze adott válaszban van kiemelt szerepük (mediális prefrontál cortex, amygdala) (93). A limbikus rendszerből (hippocampus, prefrontális cortex, amygdala) szintén futnak axonok a HPA-tengely elemeihez. A zárójelben lévő struktúráknak elemi szerepük van az emóciók feldolgozásában, ezért az érzelmi stresszre adott válaszban a HPA-tengellyel való összeköttetés a stresszoroknak megfelelő mértékű kortizol elválasztás fokozása miatt elengedhetetlen (94).



5. ábra: A HPA-tengely sematikus képe.

Talpas nyilak jelölik a negatív, míg a hagyományos nyilak a pozitív visszacsatolást.

SCN: nucleus suprachiasmaticus. PVN: nucleus paraventricularis

Gudmand-Hoeyer J, Timmermann S, Ottesen JT: Patient-specific modeling of the neuroendocrine HPA-axis and its relation to depression: Ultradian and circadian oscillations. Math Biosci. 2014

II.4.2. A glükokortikoidok szerepe a szervezet homeosztázisában és a medicinában

Kevés olyan molekula ismeretes az emberi testben, mely annyi szervrendszer működését szabályozná vagy befolyásolná, mint a glükokortikoidok. Ezen vegyületek hatással vannak az embrionális fejlődésre, az idegrendszer működésére, a pszichiátriai betegségek kifejlődésére, a látásra, a cukor, zsír-anyagcserére, a májban zajló metabolikus folyamatokra, a reprodukív funkciókra, az izmok és a csontok anyagcseréjére, a kültakaró struktúrájára, valamint az immunrendszerre. Hatásuk jó részét a glükokortikoid receptoron (GR) keresztül fejtik ki, melynek több izoformája is ismeretes (lásd később részletesebben). Ezek az izoformák a szervezet szinte valamennyi szövetében megtalálhatóak (95).

A glükokortikoidoknak jól ismert az antiinflammatorikus, antiproliferatív, proapoptotikus és antiangiogenetikus hatása, ezért szintetikus formáikat (pl. prednisolon, dexamethasone, budesonide stb.) számos gyulladásos, autoimmun, malignus (p. leukémia, limfóma), allergiás eredetű megbetegedésben alkalmazzák. Az általunk vizsgált leukémiás gyermekek nagy dózisban a glükokortikoid kezelést a protokoll I fázis 1 –ben , valamint a protokoll II fázis 1-ben kapták. A protokoll I alatt a 7 napos fokozatos emelés után 60mg/m²/nap csúcsdózisban alkalmazzuk a prednisolont 21 napon át, majd 9 napi fokozatos csökkentés után elhagyjuk. A protokoll II alatt 10mg/m²/nap csúcsdózissal kezdünk (dexamethason) 21 napon keresztül, majd szintén 9 napi csökkentés után elhagyjuk.

A glükokortikoidok elválasztását és annak központi, nem perifériás szabályozását az előző fejezetben tárgyaltuk. A fenti reguláción túl jelen van még legalább 2 út, amivel a periférián ezen hormonok hatását befolyásolja a szervezet:

1. A szövetekben jelen van egy ún. „corticostreoid-binding-protein” (CBP), mely megköti a glükokortikoidokat, így módon azok biohasznosulását szabályozza.
2. Szöveti szinten expresszálódik egy enzim, a 11 β -HSD (hidroxiszteroid-dehidrogenáz), mely a glükokortikoidokat hatástalanítani tudja szerkezeti átalakítást hajtva végre rajtuk (96).

Az alábbiakban a glükokortikoidok élettani szerepét és az egyes szervrendszerekben esetlegesen előforduló toxicitásaikat tekintjük át.

II.4.2.1. Embriogenezis

Több állatkísérlet mutatta a glükokortikoidok nélkülözhetetlen szerepét az embrionális fejlődésben. Glükokortikoid receptor hiányában - állatkísérletes modellben - az újszülöttek hamar elpusztultak a tüdő fejlődési elégtelensége miatti légzési elégtelenség kapcsán (97). A glükokortikoidok elengedhetetlenek az egyedfejlődésben és a korai időszak alatti túlélésben (98).

II.4.2.2. Az idegrendszer

A gyermekkori akut limfoid leukémia kezelésében a glükokortikoidok alapvető szerek. Ezek alkalmazásakor a gyerekeknél gyakran tapasztalunk hangulati zavarokat, melyek akár pszichosisig súlyosbodhatnak. Éppen ezért kutatásunk egyik tárgya a szteroid terápia alatt esetlegesen kialakuló súlyos magatartásbeli problémák voltak.

Már régóta tudjuk, hogy a glükokortikoidok által indított szignáltranszdukciós folyamatoknak a stresszre adott válaszban kulcsszerepük van. Ezen kívül szoros összefüggést találtak bizonyos pszichiátriai kórképek pl. skizofrénia, valamint a poszt traumatikus stressz betegség (PTSD) és a hangulati élet zavarait magukban foglaló megbetegedések és az emelkedett glükokortikoid szintek között (99). Erősebben érvényesülő glükokortikoid hatásra fokozódik a kokain- vagy az alkoholfüggőség valószínűsége is (100).

II.4.2.4. A látás

A szemészetben a szteroid tartalmú gyógyszereket cseppek vagy orális adagolásra alkalmas kisserelésben széles körben alkalmazzák a szem gyulladós (conjunctivitis,

uveitis, keratitis, műtétek után stb.), és krónikus megbetegedéseiben: macula ödéma vagy macula degeneráció (101), valamint a neovaszularizációval járó kórképekben is (102).

A glükokortikoidok azonban egyes esetekben kiváló gyulladáscsökkentő hatásuk mellett nem ritkán kataraktát, vagy glaukómát okoznak (103).

II.4.2.4. Kardiovaszkuláris rendszer

Mindegy, hogy exogén vagy endogén módon növekszik meg a szérumban a kortikoszteroid szint, az azonban bizonyos, hogy ez előbb utóbb direkt vagy indirekt módon szív-érrendszeri problémákhoz vezet (104).

Az erekben a glükokortikoidok gátolják a vazodilatátor típusú mediátorok keletkezését (pl.: prosztaciklin, nitrogén-monoxid) (105). Érdekes módon a myocytákban bizonyos esetekben az igazolódott, hogy a glükokortikoidok amellet, hogy gyulladáscsökkentő hatást fejtenek ki, elősegítik az antiapoptotikus folyamatokat azáltal, hogy inhibitorai az NF-kappa-B útvonalnak, és csökkentik az annexinek keletkezését (106). A fentiek után nem meglepő, hogy dexamethasonnal való kezelés kapcsán a myocyták hipertrófiájáról, hipertrófiás cardiomyopathiára való hajlamról számol be a szakirodalom (107). Glükokortikoid hatásra fokozódik a nátrium és így a víz visszatartás, valamint fokozódik a káliumürítés (108).

A kortikoszteroidok tehát befolyásolják az apoptotikus, gyulladáscsökkentő, valamint a vazodilatációs-vazokonstriktós folyamatokat, így elemi szereppel bírnak a kardiovaszkuláris rendszer homeosztázisában. Nem véletlenül választottuk éppen ezért vizsgálataink egyik célpontjának a hipertónia előfordulásának gyakoriságát azon ALL-es gyermekek körében, akik nagyadagú szteroid terápiaiban részesülnek.

II.4.2.5. Az immunrendszer

Ha immunszuppresszió, akkor glükokortikoidok. Legközismertebb hatásuk a gyulladásgátlás, amelyet gyakorlatilag az immunrendszer összes sejtjén keresztül valósítanak meg.

Gátolják a dendritikus sejtek érését, ezen keresztül pedig azok T-sejt aktiváló erejét. A kortikoszteroidok szabályozzák továbbá ezen antigénprezentáló sejtek migrációját és programozott sejthalálát. A szabályozásban az eltérő glükokortikoid receptor izoformák változatos expressziójának kulcsszerepe jut (109). A glükokortikoidok gátolják a neutrofil granulocytákat oly módon, hogy akadályozzák azok migrációját, mivel csökkentik a sejtadhéziós molekulák kifejeződését (110).

A kortikoszteroidok gátolják a B-sejtek antitesttermelését, melyet a medicina számos autoimmun betegség terápiájában, illetve a B-sejt expanzióval járó malignus betegség kezelésében is felhasználnak. A glükokortikoidok továbbá csökkentik a B-sejtek, valamint prekurzorai proliferációját és a BCL-2 nevű antiapoptotikus hatással bíró fehérje szintjét, mely miatt a B-sejtek könnyebben válnak a programozott sejthalál áldozataivá (111).

II.4.2.6. A légző rendszer

A légzőrendszeri krónikus gyulladással járó folyamatok leggyakrabban felírt ellenszerei kétségtelenül a kortikoszteroidok, azokon belül is az inhalatív készítmények.

Az asztma esetében egy sor olyan proinflammatorikus molekula aktiválódik, amik, azon gének transzkripciós faktoraiként szolgálnak (NF-kappaB és AP1), mely gének termékei a légutak gyulladásában elemi szereppel bírnak. A glükokortikoidok gátolják az NF-kappa-béta és az AP1 szignáltranszdukciós utjait, ezáltal közvetetten megakadályozzák a légutak epitéliumában bizonyos citokinek, kemokinek, illetve adhéziós molekulák termelődését, illetve szekrécióját. Vannak azonban olyan esetek, mikor a kórkép rezisztens a kortikoszteroid terápiára. Ezt azzal magyarázzák, hogy ilyenkor

megváltozhat az interferon-gamma szint és/vagy megnövekedhet a MAPK, ERK, valamint JNK jelátviteli utak aktivitása (112).

II.4.2.7. Zsír-, glükóz metabolizmus és a máj

A cukor- és energiaháztartásban a glükokortikoidok elemi szereppel bírnak. A glükokortikoidok fokozzák a májban glikogén felhalmozódását, valamint a glükoneogenezist (113). A glükokortikoidok hiperglikémiát, hiperinzulinémiát, illetve a hasnyálmirigy béta-sejtjeinek a megemelkedett vércukorszintre adott patológiás választ idézhetik elő (114).

Tartós glükokortikoid hatásra a zsírsejtek hipertrófiássá válnak, megindult bennük a lipolízis, melynek következményeként hipertrigliceridémia alakul ki, zsírmáj jön létre (115).

Az izmokban a kortikoszteroidok fehérjebontást, zsírosodást és inzulinrezisztenciát eredményeznek (115).

Kutatásunk a szteroid kezelés alatt esetlegesen kialakuló hepatotoxicitásra is fókuszál az ALL-es gyermekek kemoterápiája kapcsán. A glükokortikoidok a glükokortikoid receptoron (GR) keresztül számos májban zajló metabolikus funkciót befolyásolnak, mint például a glükoneogenezist (116).

II.4.2.8. Csontritkulás és csontelhalás

A tartós glükokortikoid kezelés egyik hosszú távú mellékhatása a csontritkulás, mely az esetek 40%-ában alakul ki. Ez elsősorban a 60 év felettieket érinti. Egyéb érzékenyítő tényező a 24 kg/m² alatti BMI érték, bizonyos glükokortikoid receptor polimorfizmusok, krónikus gyulladásos folyamatok, bizonyos enzimdefektusok, alacsony csontdenzitásbeli értékek, pozitív családi anamnézis osteoporosisra, az alkoholizmus és a dohányzás (117). Az osteoporosis kialakulásában jelen esetben nem annyira a reszorpciós folyamatok túlsúlyba kerülése, hanem inkább az építő mechanizmusok gátlása játszik szerepet, melyek az oszteoblastok számának csökkenésével állnak kapcsolatban (118). A törések nagy része ilyen esetekben a

vertebrális szakaszokat érintik. A megelőzés a megfelelő kalcium és D-vitamin pótláson, valamint a terheléses gyakorlatok megfelelő alkalmazásán alapszik, mely utóbbi elsősorban a remodelling kialakulásában fontos (117).

Csontelhalás a glükokortikoid kezelésben részesülő betegek kb. 5-40%-ában alakulhat ki. Ez szoros összefüggést mutat az alkalmazott dózis mértékével és a terápia idejével. Legfontosabb tényező nem az összdózis, hanem a csúcs adagok mértéke. A leggyakrabban érintett régiók: csípő, térd, vállak, de előfordulhat bokában és a gerincben is (117).

II.4.2.9. Gyomor-bélrendszer

A glükokortikoid terápia hajlamosít gasztrointesztinálisan megjelenő fekélyek, eróziók kialakulására. Az arány különösen magas, ha NSAID-okkal kombináljuk őket (kb. négyszeres) (117). A terápia kapcsán történő műtéti beavatkozások (pl. centrális vénás kanül beültetés), lázas állapotok, a kemoterápia vagy infekciók kapcsán jelentkező fájdalmak miatt a non szteroid gyulladáscsökkentők alkalmazása azonban elkerülhetetlen.

II.4.2.10. Az izomzat

A kortikoszteroidok serkentik az izmokban a katabolikus folyamatokat és a fehérjebontást (119). A glükokortikoidok az insulin-like growth factor 1(IGF-1)-phosphatidyl-inozitol 3-kinase (PI3K)-Akt, a myostatin, valamint az NF-kappa-béta útvonalakon keresztül fejtik ki katabolikus és izomdegradációs hatásukat (120). A glükokortikoidok az izmok anabolikus folyamatait akadályozzák (121). A fentiekből könnyen érthető, hogy a szteroid terápia egyik fontos mellékhatása a myopathia.

II.4.2.11. A kültakaró

Mivel a kortikoszteroidok közismerten igen kiváló gyulladásgátló, valamint antiproliferatív hatással bírnak, ezért azokat a bőrgyógyászatban igen széles körben

alkalmazzák a különböző gyulladásos, allergiás és ekzémával járó bőrbetegségek helyi kezelésében (122). Sajnos ezek tartós alkalmazása esetén igen gyakran lehet megfigyelni a sebek elhúzódó gyógyulását, a stria képződést és a bőratrófia kialakulását. A kései sebgyógyulásért a keratinocyták glükokortikoid receptoron keresztüli gátlása tehető felelőssé (123).

A legfontosabb glükokortikoid okozta mellékhatásokat az 1. táblázat foglalja össze.

| Hatás helye | Hatás |
|-----------------------------------|--|
| Metabolizmus | <i>Hiperglikémia</i> <i>Hiperinzulinémia</i> <i>Fokozott perifériás inzulinrezisztencia</i> <i>Fokozott glükoneogenezis</i> <i>Diabetogén hajlam</i> <i>Centrális elhízás</i> <i>Fokozott fehérje degradáció</i> |
| Kardiovaszkuláris rendszer | <i>Vazokonstriktió</i> <i>Fokozott hajlam az érlemeszesedésre</i> <i>Kardiomiopátia</i> <i>Magasvérnyomás</i> <i>Hiperkoleszterinémia</i> <i>Hipertrigliceridémia</i> |
| Idegrendszer | <i>Depresszió</i> <i>Diszfória</i> <i>Pszichózis</i> <i>Pszeidotumor cerebri</i> <i>Kokain- és alkoholfüggőség</i> |
| Gyomor-bélrendszer | <i>Fekélyek</i> <i>Eróziók</i> <i>Zsírmáj</i> |
| Immunrendszer | <i>Immunszupresszió</i> <i>Infekciók</i> |
| Szem | <i>Katarakta</i> <i>Glaukóma</i> <i>Exophthalmusz</i> |
| Izomrendszer | <i>Myopátia</i> <i>Fokozott proteolízis</i> <i>Zsírlerakódás</i> |
| Csontok | <i>Osteoporosis</i> <i>Aszeptikus csontnekrózis</i> |
| Reproduktív funkciók | <i>Infertilitás, virilizáció</i> |
| Bőr | <i>Atrófia</i> <i>Striák</i> <i>Elhúzódó sebgyógyulás</i> <i>Hirsuitizmus</i> |

1. táblázat: a glükokortikoidok mellékhatásai a különböző szervrendszerek/folyamatok összefüggéseiben

II.5. A glükokortikoid receptor (GR)

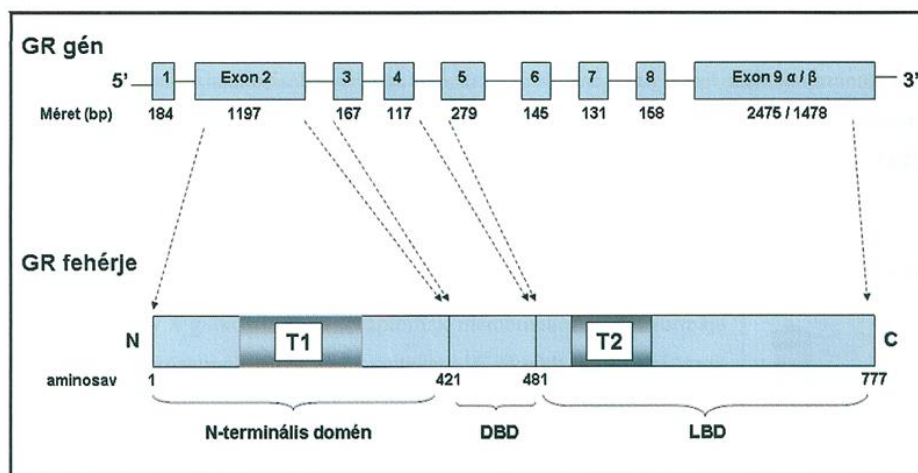
II.5.1. A glükokortikoid receptor (GR) felépítése

A glükokortikoid receptor a nukleáris hormon receptor szupercsalád tagja. Felépítése is az erre jellemző szerkezetet követi. Középső részén helyezkedik el egy 60-70 aminosavat tartalmazó DNS kötő szakasz (DBD). Karboxi-terminális végén található egy kb. 250 aminosav tartalmú ligand-kötő szakasz (LBD), míg amino-terminális részét egy nem homológ, változó méretű szakasz alkotja, ez az N-terminális domén vagy N-terminális transzaktivációs domén (NTD) (124) (6. ábra).

Az NTD óriási transzkripció aktivitással (AF1) rendelkezik, amely a különböző koregulátorok és transzkripció faktorok rendszerét szabályozza, hangolja össze.

A DBD-szakasz egy nagyon konzervatív régió a magi receptor szupercsaládon belül. Két cinkujjas motívuma van, mellyel a GR DNS target szekvenciáját ismeri fel és kötődik hozzá. Ez a szekvencia a glükokortikoidra válaszoló elem (glucocorticoid response element: GRE).

Az LBD 12 alfa-helix és 4 béta-lemez szerkezetből épül fel, mely egy hidrofób részt eredményez, ami a glükokortikoidok megkötésére alkalmas. Az NTD-hez hasonlóan az LBD a fentiekén kívül még tartalmaz egy másik nagy transzkripció aktivitással rendelkező domént (AF2). Az AF2 a ligandkötéstől függően különböző kofaktorokat szabályoz, illetve köt meg (125).



6. Ábra A glükokortikoidreceptor gén és fehérjéjének szerkezete

Dr. Majnik Zsuzsanna: Doktori értekezés.2006;p:6

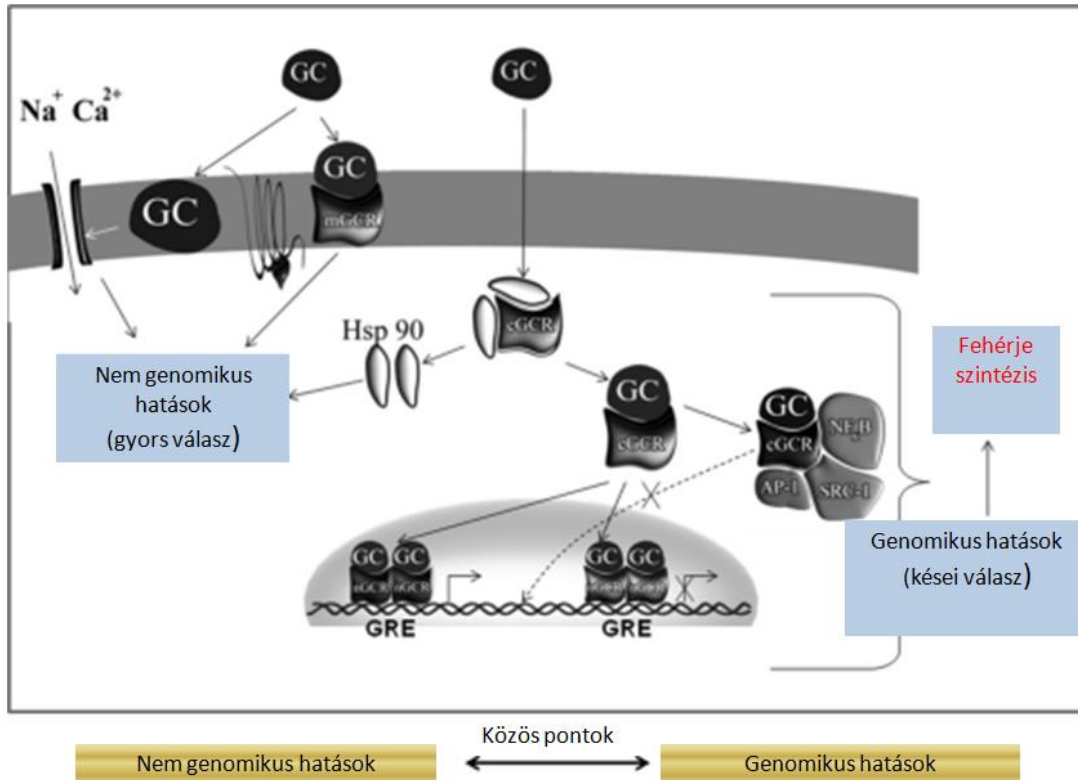
II.5.2. A GR szignáltranszdukciós útvonalai

II.5.2.1. A GR hagyományos szignáltranszdukciós útja

Ligand nélkül a GR inaktív állapotban a citoszolban helyezkedik el egy hetero-oligomer komplex részeként, amelyben hősokk-fehérjék (hsp-k) találhatóak. Ilyen például a hsp90, hsp70, hsp56, hsp40, hsp23. Ezeken kívül jelen vannak más proteinek is, többek között a kalretikulin és az immunofilinok (FKBP51 és FKBP52) (126).

A ligand – ez fiziológiai körülmények között a kortizol - kötődése után a receptor konformáció változást szenved, leválik a hősokk- proteinekről, homodimerizálódik más aktivált GR-ral, majd a sejtmag pórusain keresztül a magba vándorol, ahol a genom glükokortikoidokra válaszoló helyeivel (GRE), illetve más transzkripciós faktorokkal lép kölcsönhatásba. Az aktivált glükokortikoid receptor a GRE-hez kapcsolódva közvetlenül, vagy más faktorok kapcsolódását befolyásolva közvetett módon gátolja, vagy serkenti a target gének expresszióját (127). Érdekes adat, hogy amikor a GR bizonyos gének gátlását okozza, akkor nem a hagyományos GRE szekvenciához, hanem egy ún. negatív GRE-hez kötődik (nGRE). Az nGRE-hez nem homodimerizálódott GR-ek kötődnek be, hanem monomer formákban - nGRE-ként- 2 GR monomer. A genom egyébként tele van nGRE-vel, melyeket csak most fedezgetnek fel (128).

A glükokortikoidok hatása azért olyan variábilis szöveti szinten, ahogy azt fentebb is láttuk a toxicitások elemzésénél, mert a különböző szövetekben a kromatin szerkezete különböző. Ennek eredményeként pedig más GRE lesz hozzáférhető például a májban és más a hipotalamuszban. Ezen kívül van olyan GRE, melyhez elég, ha kevés, míg másához rengeteg aktív GR kell, hogy kötődjön, hogy az adott GRE kapcsán transzkripció kezdődjék. Ez egyébként terápiás megfontolásokat is felvethet, hiszen ilyen értelemben az alacsony dózisu glükokortikoid kezelés bizonyos szöveteket, így toxicitásokat befolyásolhat, míg másokat akár egyáltalán nem. Az aktivált GR szám egyébként még függ a szöveti kortizol szinttől, amit egyrészt a CBP, másrészt a 11- β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz1 is befolyásol (lásd I.3.2. fejezetben).



7. ábra: A glükokortikoidok hatásmechanizmusai.

A genomikus és nem genomikus utak nem egymástól függetlenül működnek.

Grzanka A, Misiólek M, Golusiński W et al.: Molecular mechanisms of glucocorticoids action: implications for treatment of rhinosinusitis and nasal polyposis. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2011

II.5.2.2. A GR nem hagyományos szignáltranszdukciós útjai

A klasszikus genomiális hatások mellett egyre több adat lát napvilágot a glükokortikoidok és receptoraik nem genomikus működéséről. A géntranszkripció befolyásolásán keresztül megvalósuló hatás kialakulásához órákra, napokra van szükség. Evidens, hogy például egy növekedő, fejlődő szervezet esetén erre nincs mindig idő, illetve akkor sem, mikor bizonyos okok miatt gyors reakcióra van szükség (pl. stressz-válasz). Ekkor kerülnek különösen előtérbe a GR nem genomikus útjai, melyek perceket vagy csak másodperceket vesznek igénybe (129) (7.ábra).

Rengeteg szignáltranszdukciós vonal létezik, mely nem a klasszikus utat jelenti. A legtöbb esetben ezekben a folyamatokban a foszfinozítid 3-kináz, a serine/threonine kinase (AKT) és mitogén-aktivált protein kinázok (MAP-kinázok) szerepelnek.

Mikor a klinikumban gyulladáso, allergiás folyamatokat akarunk gátolni a glükokortikoidokkal, akkor nagyon jól jönnek nekünk ezek a szignáltranszdukciós

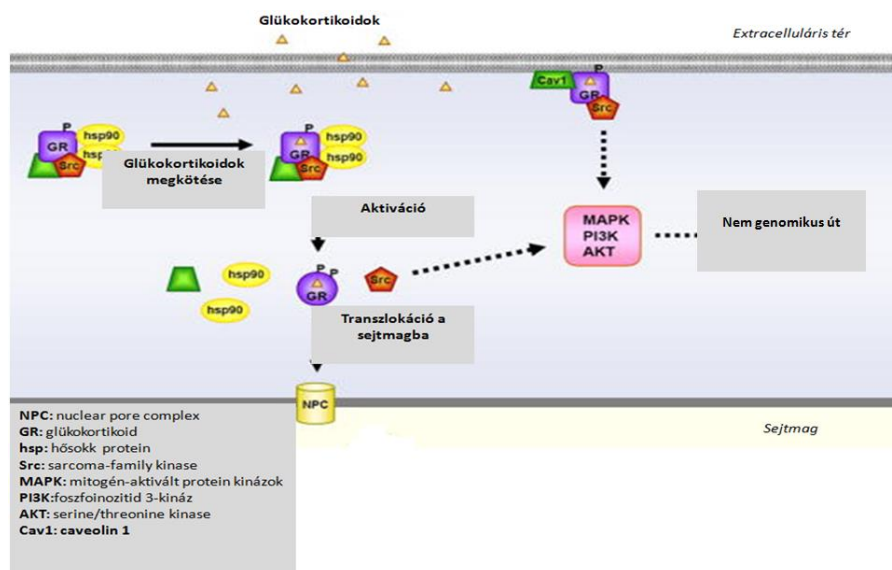
folyamatok, hiszen nincs idő mindig arra, hogy hosszú órák teljenek el a hatás jelentkezéséig (pl. Kidrolase-allergia). Ilyenkor a kortikoszteroidok nem genomiális útjait aknázzuk ki.

A GR komplex része a citoszolban a sarcoma(Src)-kináz. Mikor beköt az alkalmazott szteroid a GR-hez, akkor a GR - ahogy arról már szó is volt - kiválik a komplexből. Ezzel együtt az Src-kináz is kiválik és aktiválja az előbb felsorolt kinázokat, melyek foszforilálják - ezzel aktiválják – az annexin 1 molekulát, ami végül gátolni fogja a sejt plazmában a foszfolipáz A2-t, minek eredményeképpen bénul a gyulladási mediátorok, az arachidonsavak szintézise (130).

A glükokortikoid receptornak membránhoz kötött formája is ismeretes, mely kaveolákban helyezkedik el. Ezek a GR-ok a glükokortikoid kötés esetén az intercelluláris jelátviteli utakat (gap junction-ök) szabályozzák, valamint a szokásos src-MAPK úton keresztül a neurális progenitor sejtek proliferációját is, befolyásolva ezzel az egyedfejlődést (128).

Vannak olyan GR-ok is, melyek a sejtmembránon keresztüli kation transzportot, illetve a mitokondrium proton-áramlását is szabályozzák (131).

A GR nem genomiális útjait a 8. ábra mutatja be

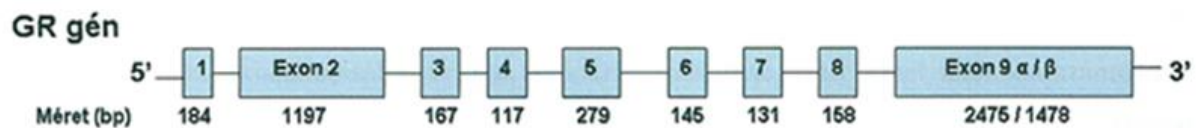


8. ábra: A glükokortikoid receptor nem genomiális útjai. (Részletek a szövegben)

Oakley RH, Cidlowski JA. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. J Allergy Clin Immunol. 2013

II.5.3. A glükokortikoid receptor különböző izoformái és azok klinikai jelentősége

A GR gén (NR3C1) az 5 kromoszóma q31-es szakaszán található (9.ábra) és kb 150kB terjedelmű. 9 exonból áll, melyből az első igen variábilis, ugyanakkor protein nem keletkezik róla, nem úgy mint a maradék 8 exonról. A 3' végen lévő 9. exon igen kiemelt jelentőségű, ugyanis 2 formája is ismeretes, melyek alapján a glükokortikoid receptornak 2 fő izoformája jön létre alternatív splicing útján: GR α és GR β (132). (11.ábra).



9.ábra: a glükokortikoid receptor (GR)génje
Dr. Majnik Zsuzsanna: Doktori értekezés.2006;p:6

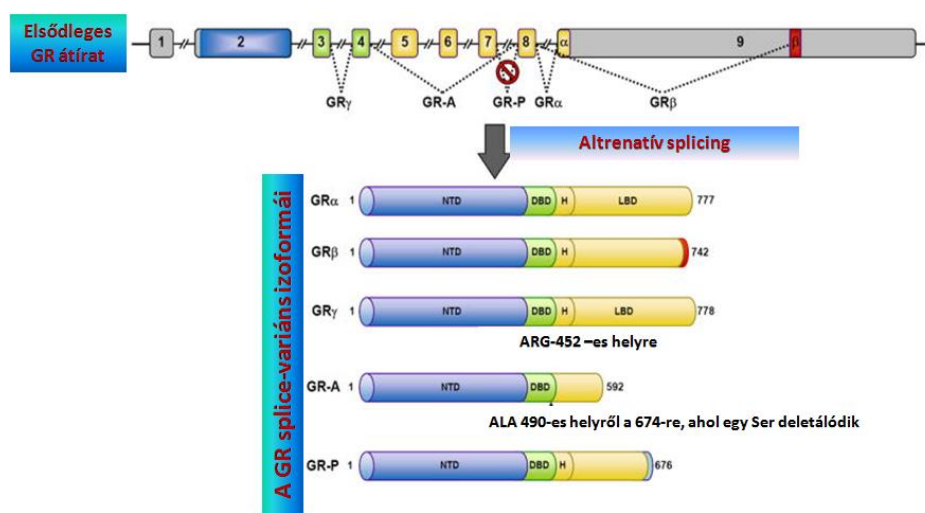
A GR α úgy keletkezik, hogy a 8-as exon vége a 9-es exon elejéhez kapcsolódik. A GR β pedig úgy, hogy szintén a 8-as vége hozzacsatlakozik a 9-es exon egy belső, lejjebbi részéhez. A két izoforma 727 aminosavjában egyezik csak.

A GR α 50 aminosavval hosszabb, mint a klasszikus GR, de hatásaiban nagyjából megegyezik vele. A GR β ezzel szemben még tartalmaz 15 nem homológ aminosav szekvenciát a karboxi-terminális végen, mely igencsak egyedivé és különbözővé teszi őt a klasszikus GR-ral vagy a GR α -val szemben. A GR β például nem köt meg semmiféle kortikoszteroid agonistát, és eleve a sejtmagban tartózkodik. A GR β ugyanakkor önmagában teljesen inaktív a GRE-en (133). Ha azonban a GR α be akarna kötődni a GRE-hez, akkor a GR β megakadályozhatja ebben, így nem jönnek létre a klasszikus glükokortikoid hatások. A GR β ilyen értelemben tehát antagonizál, és emiatt nagy számban felelős lehet a glükokortikoid-rezisztencia kialakulásában (134). Nem véletlen tehát, hogy rengetek krónikus gyulladással megbetegedésben emelkedett GR β szintet mértek: asztma, rheumatoid arthritis, colitis ulcerosa, polyposis nasalis, szisztémás

lupus erythematosus (SLE), szepszis, sőt még akut limfoblasztos leukémiában (ALL) és krónikus limfocytás leukémiában (CLL) is (135).

A 2 legfontosabb, leggyakoribb izoformán kívül azonban alternatív splicinggal még szintén létrejöhetnek egyéb GR izoformák is. Így jön létre például a GR γ , mely a 3. és a 4. exon közötti intron alternatív splicingjából keletkezik egy arginin beékelődésével (10. ábra). Ez az izoforma a GRE-hez ugyan beköt, de a glükokortikoid mediálta transzkripciós folyamatokat gátolja, éppen ezért glükokortikoid rezisztenciához vezethet egyes malignus megbetegedésekben (gyermekkori ALL, kis sejttes tüdőrák, kortikotrop adenoma) (136).

Másik 2 jelentősebb izoforma pedig az LBD-t kódoló régió alternatív splicingjából keletkezik. GR-A keletkezik akkor, amikor kivágódnak az 5,6 és 7-es exonok. Ezek kódolnák az aminoterminális végét az LBD-nek. GR-P jön létre, amikor a 8 és 9-es exonok vágódnak ki, amelyek az LBD karboxi-terminális részét kódolnák (128). Az LBD, ahogy arról szó volt, a glükokortikoidok megkötéséért felelős, valamint óriási transzkripciós aktivitással rendelkezik. Nem meglepő tehát, hogyha génjében sérülés történik, akkor a glükokortikoid érzékenység jelentősen csökkenhet. Ennek megfelelően a GR-P domináns GR izoforma a szteroidra nem reagáló malignus sejtekben (128).

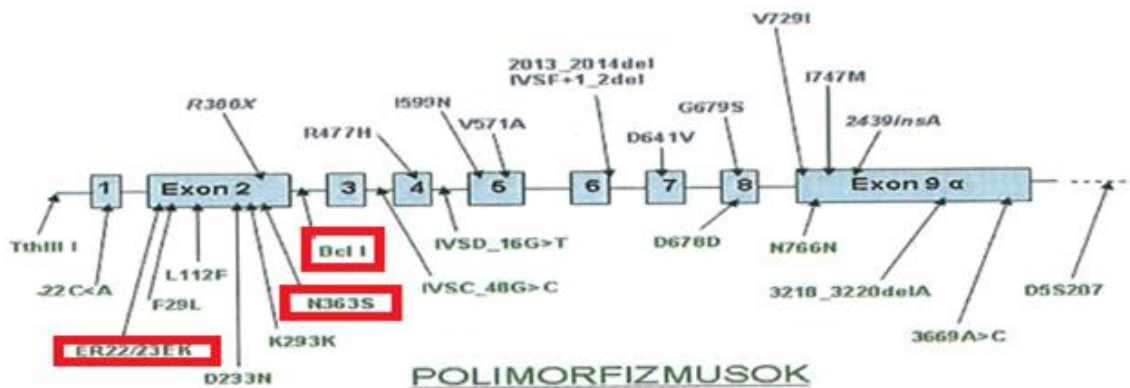


10. ábra: A GR splice variánsai
Oakley RH, Cidlowski JA.: The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. J Allergy Clin Immunol. 2013

II.5.4. GR gén polimorfizmusok

A GR génben 2008-ban még csak 500 SNP- t (single nucleotide polymorphism) azonosítottak, melyek száma napjainkban már 3016-ra növekedett. Ezeknek a polimorfizmusoknak egy része összefüggést mutat bizonyos betegségekkel vagy betegségekre hajlamosító elváltozásokkal (132). Ezen polimorfizmusok jó része intronban vagy az át nem íródó 3'UTR régióban található. A minor allél-frekvencia az esetek döntő többségében 1% alatti. A sok polimorfizmus közül azonban csak kevés kapott kiemelt figyelmet, kevésnek van csak klinikai jelentősége.

A polimorfizmusok jó része nem eredményez működésbeli különbségüket. A maradék kis résznél vagy a transzkriptum mennyisége vagy a GR érzékenysége változik meg (132).



11. ábra: a 3 általam vizsgált glükokortikoid receptor polimorfizmus lokalizációja a GR génen belül
Dr. Majnik Zsuzsanna: Doktori értekezés.2006;p:6.

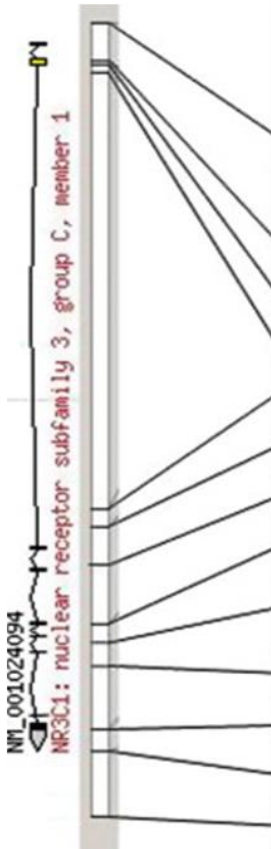
A GR gén kódoló régiójának három leggyakrabban vizsgált polimorfizmusa az N363S, az ER22/23EK és a BCL1 polimorfizmusok (11.ábra).

Az N363S (1220A>G) variáns esetében a nukleotid csere a 2. exonban, a 363-as kodonban történik (adenin cserélődik guaninra), ami egy aminosav cserét (aszparagin szerinre) okoz, mely a kutatások szerint megnövekedett glükokortikoid érzékenységet eredményez (137).

Az ER22/23EK (198G>A és 200G>A) variáns két, együtt előforduló nukleotid cserével jár szintén a 2-es exonban, a 22-es és a 23-as kodonban, melyek két aminosav cserét eredményeznek (glutaminsav argininre és glutaminsav lizinre). A polimorfizmus csökkenti a glükokortikoidokra adott választ és kedvezőbb metabolikus panelt eredményez (138).

A BCL1 polimorfizmus a 2. és 3. exonok között elhelyezkedő intron B- ben, a 2-es exontól 646 nukleotid távolságra jön létre. Egy citozin-guanin nukleotid csere történik. Ez a nukleotid csere megszünteti a Bcl I restriktációs enzim felismerési helyét, ezért kapta a polimorfizmus BCL 1 elnevezést (139). A polimorfizmus az irodalmi adatok többsége alapján megnöveli a glükokortikoidok iránti érzékenységet (140).

További GR polimorfizmusok a 12. ábrán láthatóak.



| SNP-azonosító | SNP | 5-ös kromozómán a pozíció | Nukleotid csere | Minor allél frekvencia frequency |
|---------------|------------------|---------------------------|-----------------|----------------------------------|
| rs10052957 | Tth111I | 142786710 | C>T | 0.252 |
| rs10482605 | NR3C1-1 | 142783521 | G>A | 0.125 |
| rs6189+rs6190 | ER22/23EK | 142780339/7 | G>A + G>A | 0.013 |
| rs6195 | N363S | 142779317 | A>G | 0.030 |
| rs41423247 | Bcl | 142778575 | C>G | 0.277 |
| rs33389 | Intron B | 142700499 | G>A | 0.126 |
| rs33388 | Intron B | 142697295 | T>A | 0.416 |
| rs61753484 | - | 142689824 | G>C | 0.002 |
| rs6188 | Intron D | 142680344 | G>T | 0.256 |
| rs2307674 | TTG-ins intron F | 142676190 | Insertion TTG | 0.431 |
| rs258813 | Intron G | 142674690 | A>G | 0.257 |
| rs6196 | N766N | 142661490 | A>G | 0.138 |
| rs6198 | 9β | 142657621 | A>G | 0.092 |
| rs244465 | - | 142645903 | G>A | 0.170 |

12. Ábra :A különböző SNP-k pozíciója GR génben. Koper JW, van Rossum EF, van den Akker EL.: Glucocorticoid receptor polymorphisms and haplotypes and their expression in health and disease. Steroids. 2014

A GR polimorfizmusok szerepét elsősorban különböző kóros vagy éppen kedvezőbb metabolikus állapotok esetén vizsgálták, de az esetleges glükokortikoid rezisztenciában betöltött szerepük miatt olyan malignus betegségek terápiája kapcsán is felmerült szerepük, mint az akut limfoid leukémia (141).

II.5.4.1. Az N363S glükokortikoid receptor gén polimorfizmus

Az N363S glükokortikoid receptor génpolimorfizmus megnöveli a glükokortikoidok iránti érzékenységet. A létrejövő aminosav csere miatt szerin kerül a transzkripciót aktiváló domén régiójába, ami megnövekedett foszforiláló kapacitással járhat, melynek következtében a receptor aktivitása fokozódik (143).

Ennek a polimorfizmusnak a gyakorisága az egyes populációkban eltérőnek mutatkozik (európai, angol-ausztrál és fehér amerikai) 3,23%-14,3% (144).

Kimutatták, hogy kis adag dexamethason adását követően a plazma kortizol szint csökkenésének mértéke szignifikánsan nagyobb N363S polimorfizmust hordozó egyéneknél, mint a polimorfizmust nem hordozókban (144).

Az N363S GR polimorfizmus az irodalmi adatok alapján kedvezőtlen metabolikus panelt eredményez. A 363S hordozók magasabb BMI indexszel rendelkeznek (145), hajlamosabbak az elhízásra, illetve elhízás esetén a magasabb inzulin szenzitivitás miatt még kedvezőtlenebb zsírsav profillal rendelkeznek. Az irodalomban a polimorfizmus kombinációkat is vizsgálták (146). Egyes cikkek szerint, ha az N363S polimorfizmus kombinálódik a szintén glükokortikoid érzékenységet növelő BCL1 polimorfizmussal, akkor az anyagcsere folyamatok mellett a magasvérnyomás incidenciája is fokozódik (146). Az N363S polimorfizmus jelenléte esetén a cukorbetegségben nagyobb valószínűséggel jelent meg magasvérnyomás is (147).

Mivel a glükokortikoidok nagyon fontos szerepet játszanak a szív-és az érrendszer működésében, ezért a polimorfizmus ezen hatásait is elemezték. Az irodalomban köztudott van arról, hogy a 363S hordozás esetén a koszorúerek megbetegedése (CAD =coronary

artery disease) szignifikánsan gyakrabban fordul elő a hordozók körében, még akkor is, ha ők nem elhízottak. Ezen kívül ez a tanulmány igazolta, hogy a hordozók körében szignifikánsan gyakrabban fordult elő hiperkoleszterinémia, hipetrigliceridémia, és kedvezőtlenebb összkoleszterin-HDL arány (148).

Nagyon érdekes tanulmány (Luczay A et al.) bizonyítja szintén, hogy ez a polimorfizmus növeli a glükokortikoidok iránti érzékenységet. A vizsgálatba congenitális adrenális hyperplásiás (CAH) betegeket vontak be a SOTE II.sz. Gyermekklinikájáról.

A CAH leggyakoribb formájában, a 21-hidroxiláz defektusában, a betegséget okozó mutáció típusától függően a kortizol hiánya lehet teljes vagy részleges. A betegségben az elégtelen kortizol termelés miatt megnövekvő ACTH-elválasztás androgén túltermeléshez vezet.

Kimutatták, hogy az N363S polimorfizmus gyakorisága hasonló volt (6%) a kontroll populációban talált gyakorisággal, azonban a vizsgált 33 *enyhe*, nem-klasszikus CAH beteg között egyetlen N363S polimorfizmus hordozó sem volt. Feltételezhető tehát, hogy az N363S

polimorfizmust hordozó nem klasszikus CAH betegeknél a glükokortikoidok iránti kissé nagyobb érzékenység képes a részleges kortizol hiány kompenzálására, ezért ezek a betegek - legalábbis gyermekkorban - nem kerülnek orvoshoz.

Ugyanezen tanulmány másik észrevétele volt, hogy a glükokortikoidok iránti érzékenységet növelő N363S polimorfizmust hordozó lánysecsemőkben születéskor a virilizációs tünetek jóval enyhébbek voltak, mint a 21- hidroxiláz génben azonos mutációt, de N363S polimorfizmust nem hordozó lánysecsemőkben. Ezért elképzelhetőnek tartja ez a kutatás, hogy az N363S polimorfizmust hordozó lánysecsemőkben a HPA-tengely kortizol iránti nagyobb érzékenysége részben kompenzálta a kortizol hiány hatását (149).

Szintén egy magyar tanulmány mutatta meg az N363S polimorfizmus egy kedvezőtlen hatását, mely ugyancsak a receptor érzékenység megnövekedett voltát igazolta. A fotorefraktív keratektomián átesett betegek egy része műtét után prednisonon-acetát

szemcseppet kapott. Azon betegek körében, akik 363S hordozók voltak, szignifikánsan gyakrabban fordult elő szekunder okuláris hipertenzió (150).

Mivel a glükokortikoidok a stressz válaszban is nagyon fontos szereppel bírnak, így nem meglepő, hogy pszichiátriai vonatkozásai is vannak a receptoruk polimorfizmusainak. Stressz hatásra a 363S hordozók körében a nyálban magasabb kortizol szintet mértek, mely a rendszer fokozott aktivitását igazolja (151).

Egyes tanulmányok a hordozók körében nagyobb arányban figyeltek meg depresszióra való hajlamot (152), ugyanakkor mások ezt nem igazolták (153).

Természetesen vannak kutatások, melyek nem találtak a fentiek egyikével, vagy akár több tényezővel sem összefüggést a hordozás tükrében. Egyesek nem tudtak igazolni összefüggést az N363S polimorfizmus és az emelkedett BMI (154) vagy a magasvérnyomás és a cukorbetegség kialakulása között (155).

Habár elvárható lenne a megnövekedett glükokortikoid érzékenység kapcsán, hogy az autoimmun betegségek kisebb arányban forduljanak elő, ez sok esetben nem igazolódtott be (156). Azonban volt tanulmány, mely eredménye alapján a rheumathoid arthritis (RA) kisebb arányban fordult elő a 363S hordozók körében (157). Egyes 363S hordozó, Duchanne-izomdisztrófiában szenvedő betegek körében szteroid kezelés mellett később vált szükségessé a kórházi kezelés (158).

II.5.4.2. Az ER22/23EK glükokortikoid receptor polimorfizmus

Az ER22/23EK (198G>A és 200G>A) polimorfizmus a GR gén 2-es exonjában található és két, együtt előforduló nukleotid cserével jár a 22-es és a 23-as kodonban (GAG AGG -> GAA AAG). Ez a polimorfizmus szintén aminosav eredményez (glutaminsav argininre és glutaminsav lizinre). A polimorfizmus csökkenti a glükokortikoidokra adott választ és kedvezőbb metabolikus panelt eredményez (138). Ez a kedvezőbb panel azt jelenti, hogy a hordozókban javul a HDL/LDL koleszterin arány, valamint csökken az összkoleszterin szint és nő az inzulin érzékenység (lásd alább).

Az ER22/23EK polimorfizmus gyakorisága a kaukázusi populációban 3,57-8,9% között mozog (159; 160).

Szemben az N363S polimorfizmussal, az ER22/23EK esetén relatív glükokortikoid rezisztencia tapasztalható, a dexamethasone-szupressziós teszt esetén pedig a normálhoz képest kisebb mértékű kortizol szint csökkenés mérhető (161). Ezen polimorfizmus esetén a glükokortikoid receptor transzaktivációs kapacitása csökken (144).

Az anyagcserefolyamatokat tekintve ez a polimorfizmus kedvezőbb metabolikus panelt eredményez. Az éhomi inzulin szint alacsonyabb a hordozók körében, valamint náluk bizonyítottan magasabb az inzulinérzékenység is (162). Familiáris hiperkoleszterinémiában szenvedők körében megvizsgálták a CAD kockázatát és olyan tendenciát figyeltek meg a férfi érintettek tekintetében, mely azt mutatta, hogy a polimorfizmus megléte esetén csökken a CAD rizikója (162).

A polimorfizmus anyagcserére gyakorolt jótékony hatását igazolja az a megfigyelés is, miszerint az idősebbek körében magasabb a hordozók aránya, mint a fiatalabbaknál (163). Ebből a különbségből ugyanis arra lehet következtetni, hogy az ER22/23EK polimorfizmus a csökkent glükokortikoid érzékenység folytán segít az életkort meghosszabbítani, hiszen a vizsgálat alapján nagyobb számban haltak meg azok, akiknek ez az SNP-jük nem volt.

Más kutatások azt találták, hogy nem mindig jár együtt ez a polimorfizmus kedvező paraméterekkel. Egy kutatás azt találta, hogy a hordozók körében magasabb HbA1C szint mutatkozott (164).

Az ER22/23EK polimorfizmus kedvezőbb antropomorfiái paraméterekkel jár, ugyanis a polimorfizmus fiatalabb férfiakban nagyobb testmagasságot eredményez (159;164), valamint általában a férfi populációban nagyobb izomerőt okoz (159).

A glükokortikoidokra tapasztalt relatív érzéketlenség is ugyebár kétélű fegyver. Elég, ha csak az autoimmunbetegségekre gondolunk például, ahol a szteroidok igen fontos gyógyszereink.

Az ER22/23EK polimorfizmus esetén mind klinikailag mind MR vizsgálattal súlyosabb és destruktívabb lefolyást figyeltek meg sclerosis multiplex (SM) esetén (165).

A polimorfizmust hordozók esetében azt figyelték meg, hogy náluk 80%-kal gyakrabban fordult elő pezisztáló Staphylococcus aureus az orrütegben. Ezt azzal magyarázhatjuk, hogy a GR receptor érzéketlensége miatt relatíve magasabb a kortizol szint, ami gátolja az immunrendszer működését (166).

A glükokortikoidoknak ismert bizonyos pszichiátriai kórállapotokat előidéző mellékhatása is (lásd korábban). A relatív glükokortikoid érzéketlenség kedvező lehet ebből a szempontból.

Bizonyos egyéneknél a demencia és a fehérállományi léziók a polimorfizmus esetén ritkábban fordulnak elő. Náluk a kognitív funkciók, különösen a beszéddel kapcsolatosak, jobbnak mutatkoztak a nem hordozókkal szemben (167).

A HPA-axis megfelelő regulációjában (beleértve a limbikus rendszert és egyéb pszichológiai funkciót befolyásoló agyi területet) a relatív glükokortikoid rezisztencia egyensúlyt is bonthat, ami viszont már épphogy bizonyos pszichiátriai kórképek kialakulásának kedvezhet. Német, depresszióban szenvedő betegek körében figyelték meg azt, hogy az ER22/23EK polimorfizmus esetén nagyobb a major depressziós állapotokba való visszaesés esélye, ugyanakkor ezen betegek gyorsabban reagáltak az antidepresszáns terápiára (152).

II.5.4.3. A glükokortikoid receptor BCL1 polimorfizmusa

A BCL1 polimorfizmus a 2. és 3. exon között elhelyezkedő intron B- ben, a 2-es exontól 646 nukleotid távolságra található, és egy citozin-guanin (C->G) nukleotid cserét eredményez. Ez a nukleotid csere megszünteti a Bcl I restrikciós enzim felismerési helyét, ezért kapta a BCL 1 polimorfizmus elnevezést (139). Ez a

polimorfizmus az irodalmi adatok alapján megnöveli a glükokortikoidok iránti érzékenységet (140).

A restriktív enzim hasításának eredményeképpen egy 2,3kb és egy 4,5kb termék jön létre, ha nincs jelen a polimorfizmus. A fenti ok miatt ez az SNP restriktív enzimekkel kimutatható, és ezért, mint restriktív fragment hosszúsági polimorfizmusként (restriction fragment length polymorphism = RFLP) is van számontartva.

Míg a fenti 2 másik polimorfizmus esetén az irodalomban homozigóta eset a minor allélra nem fordul elő, addig itt ez már nem igaz, a GG haplotípus viszonylag gyakori. A BCL1 polimorfizmus gyakorisága a kaukázusi populációban 25,7-49,2%-ra tehető (144). A homozigóta nem hordozók C/C, a heterozigóták G/C, a hordozó homozigóták pedig G/G genotípusúak.

Az N363S polimorfizmushoz hasonlóan, a BCL1 polimorfizmusnál is nagyobb mértékben csökken a vér kortizol szintje a dexamethasone szuppressziós teszt folyamán a hordozókban, mint a nem hordozókban. Ez azért lehet így, mert a HPA-axis negatív visszacsatolásában szerepet játszó GR szenzitivitás érzékenyebb, és már alacsonyabb kortikoszteroid szintnél működésbe lép (163).

A BCL1 esetén is főleg negatív metabolikus hatások érvényesülnek, csakúgy mint az N363S polimorfizmus esetén a megnövekedett GR érzékenység miatt.

Fiatal egyéneknél megnövekedett BMI értékeket, valamint magasabb derék-csípő arányt mértek. Ehhez jön még hozzá, hogy náluk az abdominális elhízás is gyakrabban fordult elő (168; 169). Vannak azonban cikkek, melyek nem találtak összefüggést a polimorfizmus és az elhízás között (164; 170).

Egyes elhízott egyéneknél, akik hordozzák a BCL1 polimorfizmust magasabb inzulinszinteket mérhetünk, ami a megnövekedett glükokortikoid érzékenység mellett szól (171).

Bizonyos esetekben a polimorfizmus a magasvérnyomással szintén pozitív korrelációt mutat. (172).

Nem találtak viszont a kutatók összefüggést a polimorfizmus és bizonyos kardiovaszkuláris rizikót befolyásoló faktorok között, úgymint a totál LDL-lel, a koleszterin vagy a triglicerid szintekkel, illetve a HbA1c-vel (164). Ugyanakkor viszont azon egyéneknél, akiknél jelen van mind a BCL1 G allélja, mind az N363S polimorfizmus, náluk már emelkedett koleszterin szint mérhető (146).

Sok kutatás talált összefüggést a BCL 1 polimorfizmus és az autoimmun betegségek között. Egy tanulmány korrelációt mutatott ki ezen polimorfizmus és a Graves féle ophtalmopáthiában használatos ATA (American Thyroid Association) stádiumok súlyossága között, melyek a szemkárosodás mértékét jelzik (173). Azon egyének, akik hordozták a polimorfizmust, náluk gyakrabban jelentkezett csak ATA grade I és II stádiumú betegség, míg a nem hordozók körében gyakoribb volt az ATA grade III vagy IV. állapot. Ez valószínűleg azért van így, mert a megnövekedett glükokortikoid érzékenység kompenzálta az autoimmun folyamatokat, illetve jobban hagyta érvényesülni e téren az endogén kortikoszteroidokat.

Rheumatoid arthritis esetén több cikk nem talált összefüggést a BCL1-gyel (174), azonban egy holland betegek között végzett kutatás alacsonyabb BCL1-G gyakoriságot figyelt meg RA-ban szenvedők körében, mely szintén a megnövekedett érzékenység miatti protektivitást tanúsíthatja (157).

Számos cikk igazolta a BCL1 polimorfizmus és a major depresszió közötti kapcsolatot. Bizonyos major depresszióban szenvedők között gyakrabban fordul elő a GG homozigóta genotípus (152). Premenopausában lévő major depresszióban szenvedő nők körében GG homozigótaság szintén gyakrabban fordult elő (175).

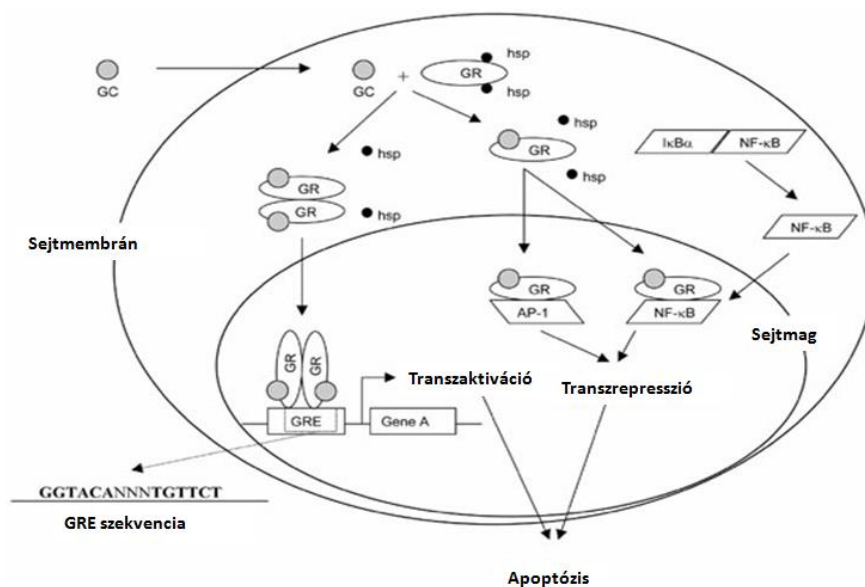
Más pszichiátriai kórképek és a BCL1 polimorfizmus között szintén találtak összefüggést, mely korreláció a BCL-1 polimorfizmus miatt megváltozott HPA-axis működésből adódhatott. Ilyen például a poszt-traumatikus stressz betegség (PTSD). Egy munkacsoport azt igazolta, hogy a BCL1-re homozigóta PTSD-s betegek esetén súlyosabb pszichés tünetek léptek fel, mint a nem hordozókban (176).

II.5.4.4. A glükokortikoid receptor polimorfizmusok és az ALL

Dolgozatom egyik sarkallatos pontja a vizsgált 3 glükokortikoid receptor gén polimorfizmus és a gyermekkori akut limfoid leukémia kapcsolata. Nemcsak a felmerülő toxicitások érdekesek önmagukban, hanem az is, hogy vajon a megváltozott receptor érzékenység eredményez-e változást a terápia sikerességében vagy sem. Ennek vizsgálatára monitorozhatjuk a 8. napi prednisolon válasz eltéréseit. A 8. napi prednisolon válasz egy igen fontos prognosztikai tényező (21). A terápiás eltéréseket jelezhetik az 5 éves eseménymentes túlélésbeli változások is.

A glükokortikoidok kétségetelnül a gyermekkori ALL kulcsgyógyszerei közé tartoznak, hiszen nagymértékű apoptózist indukálnak a leukémiás balsztokban (141). Ezt a hatást kiválthatják közvetlenül a GRE-hez kapcsolódva, illetve úgy is, hogy gátolják az NF-kappa-béta és AP1 szignáltranszdukciós utakat (lásd I.3.2.6. pontot).

Az apoptózisnak 2 útja van (13.ábra). Az egyik út a caspase-9 aktiválódásával kezdődik és citokrom-c, valamint SMAC felszabadulással jár. Ez az útvonal tűnik fontosnak a glükokortikoidok szempontjából (177). Az apoptózis másik útja a halál-receptorokhoz köthető, de ebben az útvonalban a glükokortikoidok kevésbé érintettek (178).



13. ábra: A GR receptor apoptózis indukciója

Tissing WJ, Meijerink JP, den Boer ML et al.: Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2003

Az irodalomban szinte alig van vizsgálat arra vonatkozóan, hogy az általam vizsgált, receptor érzékenységet megváltoztató glükokortikoid receptor polimorfizmusok hogyan befolyásolják a gyermekkori ALL-ben fontos prognosztikai faktorokat, illetve túlélési mutatókat. Egy iráni kutatócsoport megvizsgálta az N363S, az ER22/23EK és a BCL1 polimorfizmusok lehetséges kapcsolatát a gyermekkori ALL relapszusával, azonban semmilyen korrelációt nem talált (179). Egy kanadai tanulmány ugyanakkor azt igazolta, hogy a BCL1 GG homozigóták körében csökken az OS-arány. Az N363S és ER22/23 EK polimorfizmusok tekintetében nem talált semmilyen összefüggést, csakúgy, ahogyan az EFS és a BCL1 között sem (180). Egy másik tanulmány a BCL1 GG genotípus esetén szintén csökkent OS-t talált (181). Egy holland kutatócsoport megvizsgálva a fenti 3 glükokortikoid receptor génpolimorfizmust nem talált semmilyen összefüggést azok jelenléte, gyakorisága és a gyermekkori ALL túlélési eredményei között (182).

III. CÉLKITŰZÉSEK

1. Milyen kapcsolat áll fenn az N363S glükokortikoid receptor génpolimorfizmus és az ALL kemoterápiája kapcsán fellépő glükokortikoid indukálta mellékhatások között?
2. Milyen összefüggés figyelhető meg az ER22/23EK glükokortikoid receptor génpolimorfizmus és az ALL kemoterápiája kapcsán fellépő glükokortikoid okozta mellékhatások között?
3. Megfigyelhető-e bármilyen korreláció a BCL1 glükokortikoid receptor génpolimorfizmus és az ALL kemoterápiája kapcsán fellépő glükokortikoid okozta toxicitások között?
4. Hogyan változnak a fenti eredmények abban az esetben, ha a polimorfizmusok egymással kombinálódnak ugyanabban az egyénben?
5. Van-e összefüggés a fenti glükokortikoid receptor génpolimorfizmusok, illetve az ALL szempontjából egyik döntő fontosságú prognosztikai faktor, a 8. napi prednisolon válasz között?
6. Van-e összefüggés a vizsgált glükokortikoid receptor génpolimorfizmusok, illetve az 5 éves eseménymentes túlélés (event-free survival-EFS) között és az 5 éves teljes túlélés (overall survival-OS) között?

IV. MÓDSZEREK

IV.1. Vizsgált betegek

A PhD munkámba összesen 346 gyermeket vontunk be, akik 1989 és 2004 között kaptak kezelést akut limfoid leukémia miatt. Kezelési protokolluk az ALL BFM 90/95 alapján zajlott a Magyar Gyermekonkológia és Gyermekhematológia Társaság Központjaiban (Budapest, Debrecen, Miskolc, Pécs, Szeged, Szombathely). A gyermekek között 207 fiú és 139 lány volt. A gyermekek életkora 0,2-17,9 év közé volt tehető, a medián életkor 4,95 év volt). A vizsgálat betegek közt a rizikóbesorolás alapján 103 kezelődött SR ágon, 215 MR-ágon és 28 HR ágon. Mindegyik gyermek egységesen az ALL BFM 90/95-ös protokoll szerinti kemoterápiában részesült, és e szerint kapták egységesen a szteroid kezelést. A protokoll szerint a nagy dózisú glükokortikoid terápiát a protokoll I, fázis 1-ben (prednisolon:60mg/m²/nap), valamint a protokoll II, fázis 1-ben (dexametazon: 10mg/m²/nap) kapták. A prednisolon-kezelés a végső dózis 25%-ával kezdődik, majd a 8. napig, a maximumig folyamatosan emelkedik. A 8. nap után a 28. napig ez marad a napi dózisa, utána pedig elhagyásáig folyamatosan csökken 9 napon át. A dexametazon 1-21 napig kerül alkalmazásra maximális dózisban, majd a 22. naptól 9 napon át fokozatosan, majd leáll.

IV.2. Genetikai módszerek

IV.2.1 N363S polimorfizmus

IV.2.1.1. DNS izolálás

A DNS izolálást a remisszióba került betegek perifériás véréből végeztük a Roche High Pure PCR Template Preparation Kit segítségével, annak gyári előírása alapján. Minden PCR csőhöz adtunk 200 mikroliter perifériás vért, majd 200 mikroliter „binding buffert” és 40 mikroliter ProtK-t. Az oldatot 10 percig 72°C-on állni hagytuk. Ezután minden PCR csőhöz 100 mikroliter isopropanololt adtunk, az így kapott elegyeket pedig filteres csövekbe pipettáztuk, ahol 1 percig 8000/perces fordulatszámon centrifugáltuk. A filteren fenmaradó oldatot átpipettáztuk másik filteres gyűjtőcsbe, melyhez „500 mikroliter inhibitor removal buffer”-t adtunk még. Újra centrifugálás következett (1 percig 8000/perc fordulatszám). Ugyanezt a folyamatot megismételtük, csak most az átpipettázott felülúszóhoz 500 mikroliter „wash buffert” adtunk. Centrifugálás után (1 percig 8000/perc fordulatszám) ezen utolsó folyamatot megismételtük. Az alkoholmaradványok alapos eltávolítása miatt további centrifugálás következett 30 másodpercig 13000/perc fordulatszámon. A felülúszót ezután újabb filteres csövekbe tettük, amihez 200 mikroliter 70°C-ra előmelegített „elution buffer”-t adtunk. Ezt 1 percig szobahőn hagytuk állni, majd 1 percig 8000/perc fordulatszámon centrifugáltunk. Az így megmaradt felülúszó volt a kész izolált DNS.

IV.2.1.2.- Allél-specifikus (ASA) - PCR

Az allél specifikus PCR a pontmutációk, illetve az SNP-k kimutatásának egyik gyakran alkalmazott, kiváló módszere. Ennek segítségével identifikáltuk az N363S polimorfizmust is. A módszer lényege azon alapszik, hogy a PCR termék képződése attól függ, hogy a mutáns allél, vagy a normál allél van-e jelen a mintában. A

primereket úgy tervezték, hogy azok 3' vége pontosan az SNP helyén – jelen esetben az 1220. bázispárnál (bp.) – legyen, ahol a mi esetünkben adenin-guanin csere történt. Az egyik allél-specifikus primer a normál, a másik pedig a mutáns alléllal komplementer, DNS amplifikáció pedig csak komplement egyezés esetén fog így bekövetkezni. Ha tehát ha csak 1 termék képződik, akkor a beteg homozigóta volt valamelyik alléllra, két termék esetén pedig heterozigóta. Ezt a gélelektroforézisnél tudjuk leellenőrizni.

Az ASA lépései:

I.Primerek:

1. **Kontroll primerek:** ezeket minden esetben alkalmaztuk, hogy termékeik pozitív kontrollként szolgáljanak, bizonyítva azt, hogy a reakció feltételei megfelelőek voltak, a PCR sikeres volt.:

a) E2/4 forward primer: 5'-CCA GTA ATG TAA CAC TGC CCC-3'

b) E2/4 reverz primer: 5'-TTC GAC CAG GGA AGT TCA GA-3'

2. **Normál allélnak** megfelelő primer (1220A): 51-ATC CTT GGC ACC TAT TCC AAT-3'

3. **Mutáns allélnak** megfelelő primer (1120G): 5-ATC CTT GGC ACC TAT TCC AAC-3'

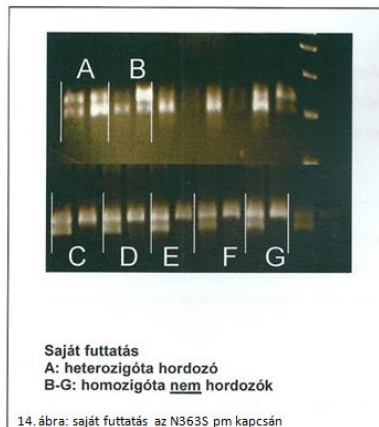
Egy beteghez 2 PCR cső tartozott. Az egyikbe a mutáns a másikba a vad primer került bele

Munkafolyamat:

A törzsoldatba (Bioline cég Immomix oldata), mely pufferekkel, magnézium-kloridot és dNTP-eket tartalmazott, beleraktuk a fenti a kontroll primereket, illetve vagy a mutáns vagy a vad allélszekvenciának megfelelő komplementer primert. Ezután beleraktuk a csövekbe a betegtől izolált DNS-t (betegként 2 DNS minta 1-1 csöbe). Ezután következett a PCR: Előinkubálás történt 95°C-on 7 percig, majd az amplifikációt végezte el a gép 34 ciklusban. Ciklusonként 1 percig 95°C denaturált, majd 63°C-ig hűtött vissza 1 percre, és 72°C-on történt meg az elongáció szintén 1 percig. A 34 ciklus után 1 utóinkubálást végeztünk 72°C-on 10 percig, majd a mintát 54°C-ra hűtöttük vissza a mintákat.

IV.2.1.3. Gélelektroforézis

A PCR után a keletkező termékeket láthatóvá kell tenni, erre használtuk a gélelektroforézist. A 14.ábrán jól látszik, hogy az „A” jelű beteg egy heterozigóta hordozó, hiszen mind a mutáns, mind a normál primer talált magának megfelelő allélszekvenciát. A többi beteg, pedig homozigóta nem hordozó.



IV.2.2. ER22/23EK polimorfizmussal kapcsolatos genetikai módszerek

IV.2.2.1. DNS izolálás

Lásd IV.2.1.1. pontot.

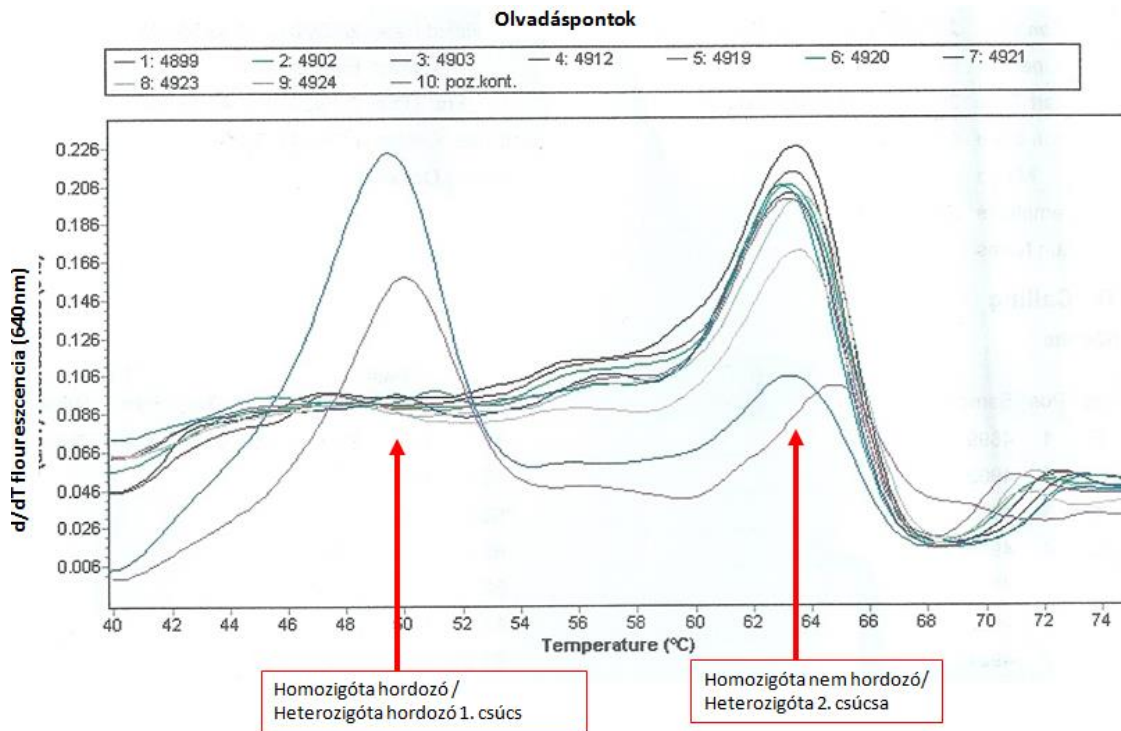
IV.2.2.1.1. Olvadáspon analízis rövid ismertetése

A módszer az SNP-t tartalmazó és nem tartalmazó DNS szálak eltérő „olvadásponjain, melting point-ján” alapszik. Itt az olvadáspon a DNS szálak között lévő hidrogénhíd kötések felbomlását jelenti a megemelkedett hőmérséklet következtében.

Az általunk használt gép (Light Cycler Software Version 4.05) folyamatos hőmérsékletemeléssel mellett detektálja a DNS szálak szétválását, így tudja azonosítani a polimorfizmus jelenlétét.

A DNS szétválását fényreakció kíséri, ezt tudja a gép detektálni. A vizsgálni kívánt DNS-szálakhoz egy ún. M-primert hibridizáltatunk, mely egy helyen, csak a vad típusnak megfelelő komplementer szekvenciát tartalmazza, így a vad típushoz erősebben kötődik, mint a mutáns szálhoz. Emiatt az M-primer magasabb hőmérsékleten válik le a vad szekvenciát tartalmazó szálról, mint a mutációt tartalmazóról. Az M-primerhez gyárilag egy festékanyag is rögzítve van. Az M primerhez szintén gyárilag egy anchor (A)-szekvencia is kötve van, melyen fluorescin található, ami képes az M-primer festékanyagát (L-red) gerjeszteni, mely így fényt emittál, amit a fenti gép detektálni tud. A gerjesztés azonban csak akkor jön létre, amikor a PCR során (előzetesen végezzük el, lásd alább) az M próba a vizsgálni kívánt DNS-szálról az A-szekvenciával együtt levált a gép folyamatos melegítésének hatására. Amikor a fényemissziót a gép ábrázolja, akkor az látszik, hogy az alacsonyabb hőmérsékleteken nincs még leválás, így nincs detektálható emisszió, majd elér egy pontot, amikor el kezdenek leválni az M primerek, és megnő a kibocsátás. Ez elér egy maximumot, majd újra semmi nem látható, hiszen minden M primer levált a szakasról. További leválás csak akkor lesz, ha az illető heterozigóta volt, mert akkor van a másik szálon még a vad típusnak megfelelő DNS szakasz, ahová az M primer a fent leírt okok

miatt erősebben volt kötve, mely miatt csak később válik le. Ekkor a gép által ábrázolt fotoemissziós görbén 2 csúcst látunk. Ez a heterozigótaság jele. Ha egy csúcs van csak alacsony hőmérsékleten, akkor az azt jelenti, hogy a vizsgált gyermek homozigóta a mutáns típusra. Ha egy csúcs van a magas hőmérsékleti tartományban, akkor az azt jelenti, hogy a gyermek homozigóta a guanint tartalmazó vad típusra (15.ábra).



Az olvadáspont analízis lépései:

1. Primerek:

a).E2F (forward) primer: 5'-GAT TCG GAG TTA ACT AAA AG

b) E2R (reverz) primer: 5'- TAC TGA GCC TTT TGG AAA AT

2. **M-primer** (LC-red-640): ACATCTCCCCTCTCCTGAGCAA-foszfát

3. **Anchor** (A-szekv.):GTAGCTCCTCCTCTTAGGGTTTTATAGAAGTCCA-fluorescein

Törzsoldatként a Bioline cég Immomix oldatát használtuk pufferekkel, magnézium-kloriddal és dNTP-vel. A törzsoldatba került ezután a PCR folyamatához szükséges reverz és forward primer, majd a fent részletezett M-primer a hozzárögzített Anchor szekvenciával. A folyamat zárásaként minden PCR csöbe minden betegől egy 5 mikroliternyi DNS minta került hozzáadásra.

Ezután következett a PCR: Előinkubálás történt 93°C-on 7 percig, majd az amplifikációt végezte el a gép 34 ciklusban. Ciklusonként 1 percig 94°C denaturált, majd 55°C-ig hűtött vissza 1 percre, és 72°C-on történt meg az elongáció szintén 1 percig. A 34 ciklus után 1 utóinkubálást végeztünk 72°C-on 10 percig, majd a mintát 54°C-ra hűtöttük vissza. A felsokszorosított mintát a Light Cycler Software Version 4.05 alapú Light Cycle gépbe raktuk, ahol a fent leírtak alapján megtörtént az olvadáspont-görbe megrajzolása és kiértékelése.

IV.2.3. A BCL1 polimorfizmussal kapcsolatos genetikai módszerek

II.2.2.3.1. DNS izolálás

Lásd IV.2.1.1. pontot.

IV.2.2.3.2. A restrikciós hossz-polimorfizmus vizsgálat (RFLP) rövid ismertetése

A BCL1 polimorfizmus a 2. és 3. exonok között elhelyezkedő intron B-ben jön létre, egy citozin-guanin nukleotid csere történik (139).

A polimorfizmus detektálására hasonlóan az N363S esetéhez, itt is allél specifikus PCR módszert használtunk Gergics P és munkatársai módszerét követve (183).

A primereket az Invitrogén Life Technologies-tól, (Glasgow,UK) rendeltük.

Az ASA lépései:

I.Primerek:

1. **Kontroll primerek:** ezeket minden esetben alkalmaztuk, hogy termékeik pozitív kontrollként szolgáljanak, bizonyítva azt, hogy a reakció feltételei megfelelőek voltak, a PCR sikeres volt.:

a) Forward primer: 5'-AGA GCC CTA TTC TTC AAA CTG

b) Reverz primer: 5'-GAG AAA TTC ACC CCT ACC AAC

2. **Normál allélnak** megfelelő primer (646 bp.-ra a GRgén 2-es exonjától: citozin):

5'-CAA TTC CTC TCT TAA AGA GAT TG

3. **Mutáns allélnak** megfelelő primer (646 bp.-ra a GRgén 2-es exonjától: guanin):

5'-GAC AAG TTA TGT CTG CTG ATG

Munkafolyamat

A törzsoldatba (Bioline cég Immomix oldata), mely pufferekkel, magnézium-kloridot és dNTP-et tartalmazott, beleraktuk a fenti a kontroll primereket, illetve jelen esetben ugyanabba a csőbe a mutáns és a vad allélszekvenciának megfelelő komplementer primert is. Ezután beleraktuk a PCR-csövekbe a betegektől izolált DNS-t. Ezután következett a PCR: Előinkubálás történt 95°C-on 7 percig, majd az amplifikációt végezte el a gép 34 ciklusban. Ciklusonként 1 percig 95°C denaturált, majd 56°C-ig hűtött vissza 1 percre, és 72°C-on történt meg az elongáció szintén 1,5 percig. A 34 ciklus után 1 utóinkubálást végeztünk 72°C-on 10 percig, majd a mintát 54°C-ra hűtöttük vissza a mintákat.

IV.2.2.3.3. Gélelektroforézis:

Hasonlóan az N363S polimorfizmushoz, itt is gélelektroforézissel tettük láthatóvá az eredményeket. A minták itt is 2%-os agaróz gélben lettek megfuttatva, majd etídium bromiddal lettek megfestve és ultraviola sugárzás alatt lettek átvilágítva, majd lefényképezve.

Itt 1 PCR csőhöz az N363S módszernél leírtakkal ellentétben mind a vad, mind a mutáns szakaszt felismerő primer hozzáadásra került, így minden csőben egy vagy 2 termék keletkezett az allélhordozástól függően. A mutációt tartalmazó DNS szakaszból (guanin) hosszabb átírat képződött, ezért azok „nem futottak olyan messzire”, mint a normál variánsból képződtek. Heterozigóta beteg esetén 2 termék keletkezett, hiszen mind a 2 primer a vizsgált személy DNS-ének valamelyik szálán talált magának megfelelő szekvenciát.

IV.3. Klinikai adatok

IV.3.1. A glükokortikoidok indukálta toxicitások

Vizsgálataim folyamán a bevont gyermekek körében a következő szteroid okozta mellékhatásokat vizsgáltam:

- Hepatotoxicitás
- Szénhidrát háztartás zavara
- Idegrendszeri és/vagy magatartásbeli zavarok
- Hipertonia

Minden toxicitást értelemszerűen azokban a fázisokban vizsgáltuk, amikor a gyermekek nagy adagú szteroid kezelésben részesültek: protokoll1, fázis1 (prednisolon: 60mg/m²/nap), protokoll 2, fázis1 (dexamethason: 10mg/m²/nap).

Összehasonlítottam a polimorfizmusokat hordozó ALL-es gyermekeket nem hordozó társaikkal a fenti toxicitások tekintetében. Saját eredményeimet a korábban leírt irodalmi adatokkal vettem össze.

IV.3.1.1. Hepatotoxicitás

Súlyos hepatotoxicitásról beszélünk akkor, amikor a szérum GGT és/vagy GPT értékek magasabbak voltak, mint a normál felső határának a tízszerese, és/vagy amikor a szérumbilirubin (Sebi) szint a normális tartomány felső értékének 5-szörösénél volt emelkedettebb.

IV.3.1.2. Szénhidrát háztartás zavarai

A bevont gyermekek kezelésének idejében használatban lévő ALL IC BFM90/95-ös protokollok értelmében a szénhidrát anyagcserével kapcsolatos vizsgálatokat a diagnózis felállításával egy időben, azaz a kemoterápia előtt végeztek el. Ekkor szérumban glükóz, HgbA1c, illetve vizeletcukor vizsgálatok történtek. Rutinszerűen a szteroid terápia alatt - ha a korábbi vizsgálatok mind negatívnak bizonyultak-, csak a vizeletcukor szintjét ellenőriztük rendszeresen. Ha ez pozitív, akkor természetesen folyamatos vércukorszint ellenőrzés történt. Kóros vércukorértékek esetén (lásd. alább) endokrinológiai konzílium is szóba került, diétás, vagy egyéb terápiás (pl.: inzulinkezelés) döntések érdekében.

A fentieket tekintetbe véve, akkor beszéltünk a szénhidrát háztartás zavaráról, ha glükózúria jelentkezett és/vagy ennek kapcsán magasabb éhomi (6mmol/L feletti) és/vagy postprandiális (8,8 mmol/l felett) vércukorszinteket mértek és/vagy emiatt inzulin terápia került beállításra szteroid okozta diabetes miatt.

IV.3.1.3. Idegrendszeri toxicitásról és/vagy magatartás zavarok

A bevezetésben, valamint a glükokortikoid receptor polimorfizmusokat bemutató fejezetekben részletesen leírásra kerültek a glükokortikoidok okozta központi idegrendszeri káros hatások, valamint a magatartásra gyakorolt befolyásuk, melyek depresszióban vagy épp agitáltságban, szorongásban ölhetnek formát. Ennek értelmében idegrendszeri toxicitásról akkor beszéltünk, ha a fenti fázisokban polineuropáthia, paresis, hyperkinezisek, epilepsziás görcsök léptek fel. Magatartás zavarnak tekintettük a szorongás, az anxiétás, a pszichosis megjelenését, melyek anxiolitikumok és/vagy antipszichotikumok adását kívánták. Az anxiétás differenciál diagnosztikája nem könnyű egy frissen kórházba került gyermeknél. A vizsgálatban akkor beszéltünk szteroid okozta anxiétásról vagy magatartásbeli eltérésről, amikor a viselkedés változás a hospitalizáció kezdeti napjai után jelentek meg (3-4 nap után) és mikor ez a szteroid terápia után ez megszűnt.

IV.3.1.4. Hipertonia

Hipertoniáról akkor beszéltünk, mikor a mért értékek tartósan az említett fázisokban az életkornak megfelelő 95 percentilis felett voltak, illetve, ahol ABPM eredmény rendelkezésre állt, ott az ott megállapított eredményt vettük alapul.

IV.3.1.5 8. napi prednisolon válasz, eseménymentes és teljes túlélés

A glükokortikoid receptor génpolimorfizmusok tekintetében igen izgalmas kérdés a terápia hatásosságára gyakorolt esetleges hatás is.

Ahogy erről már szó volt, a 8. napi prednisolon válasz az egyik legfontosabb prognosztikai faktor az ALL kezelése során a túlélés tekintetében. A kemoterápia 8. napjáig a betegek 1 intratekális MTX-on kívül csak nagy dózisú szteroid kezelést kapnak, melytől azt várjuk, hogy tekintet nélkül a kezdeti fehérvérsejt számra – mely akár százazres G/L nagyságrendű is lehet – a perifériás blasztszám 1G/L alatt lesz. Definíció szerint akkor beszélünk jó prednisolon válaszról a terápia 8. napján, amikor a perifériás vérben a limfoblasztok száma 1G/L alatt van. E feletti érték esetén rossz prednisolon válaszról van szó (22).

Az eseménymentes túlélést (EFS) a diagnózistól számítva az 5. évig vizsgáltuk, azaz 5-éves EFS-t néztünk. Akkor beszéltünk eseménymentességről, ha relapszus, vagy halál nem következett be ezen időszak alatt. Az 5 éves teljes túlélés esetén (overall survival - OS) ugyanezen időszak alatt vizsgáltuk azt, hogy halál bekövetkezett-e vagy sem.

IV.3.2. Különleges megfontolások a BCL1 polimorfizmusnál:

A BCL polimorfizmus esetén az irodalom – a másik két polimorfizmussal ellentétben – leír homozigóta előfordulást is (G/G genotípus). A másik két SNP esetén nem.

Megfelelő számú, a polimorfizmusra homozigóta beteg esetén, erre a csoportra így külön is érdemes megnézni a vizsgált toxicitásokat.

Ennek az SNP-nek a mutáns G allélja olyan nagy számban van jelen általában a populációban, hogy statisztikailag alkalmas arra, hogy megvizsgáljuk esetleges kombinálódását a másik – bár nem annyira gyakori- N363S polimorfizmussal.

Ezen polimorfizmus kapcsán tehát eleve 3 szempontot vizsgáltunk. Egyszer megnéztük a G-allélt hordozókat (hetero+homozigóta) a vad típusú homozigótákkal szemben (G/C+G/G vs. C/C), azért, hogy magára a G allélra vonhassunk le következtetéseket, másrészt ezek után külön megnéztük a G/G homozigótákat a többiekkel szemben (G/G vs G/C+C/C). Ez utóbbi azért lehet érdekes, mert feltételeztük, hogy a polimorfizmus csak homozigóta formában lehet esetleg csak releváns. A BCL1-N363S polimorfizmus kombinációjakor megjelenő esetleges szteroid mellékhatásokat, és a kombinációval kapcsolatos esetleges változásokat a 8. napi prednisolon válaszban, illetve az eseménymentes túlélésben szintén itt vizsgáltuk.

IV.4. Statisztika

Az allél frekvenciák tekintetében kritériumnak vettük azt, hogy a populáció Hardy-Weinberg egyensúlyban legyen (184).

Az allél frekvenciákat chi-négyzet teszttel vagy Fisher exact teszttel hasonlítottuk össze az elmeszámnak megfelelően. A szignifikancia szintet 5%-nál ($p=0,05$) húztuk meg.

A statisztikai analízishez az SPSS (SPSS Inc. Chicago,IL, USA) software-t használtuk. Az esélyhányados (Odds ratio=OR) konfidencia intervalluma (CI) 95% volt.

5 éves EFS és OS eredményeinek értékeléséhez a túlélés analízis (Survival Analysis) egyik nemparaméteres formáját a Kaplan-Meier elemzést, illetve Cox-reggressziót alkalmaztunk.

IV.4. Etikai engedély

A kutatást a Magyar Orvosi Kamara Országos Etikai Bizottsága engedélyzte, és az összes résztvevő aláírta a megfelelő tájékoztatási és beleegyező nyilatkozatokat.

V. EREDMÉNYEK

V.1. N363S polimorfizmus

V.1.2. Az allélgyakoriság

A 346 vizsgált ALL-es gyermekből 32 hordozta heterozigóta formában a polimorfizmust (9,24%). Homozigóta előfordulást nem találtunk. Az allélfrekvenciát megvizsgálva a populációnk Hardy-Weinberg eloszlást követett ($p=0,36 > 0,05$) (184). A vad típusú (C) allélgyakoriság: 95,38%, a mutáns típus (G) allél gyakorisága pedig 4,62% volt.

V.1.3. Hepatotoxicitás és az N363S polimorfizmus

Hepatotoxicitás szignifikánsan gyakrabban fordult elő a hordozók körében (16. ábra). A 32 hordozóból tíznél jelentkezett májkárosodás (31,3%), míg a 314 nem hordozó esetében ez az arány csak 11,2% volt. ($p=0,004$) (Odds ratio=3.6, CI:1,586273-8,276543 95%).

V.1.4. Szénhidrátanyagcsere zavar és az N363S polimorfizmus

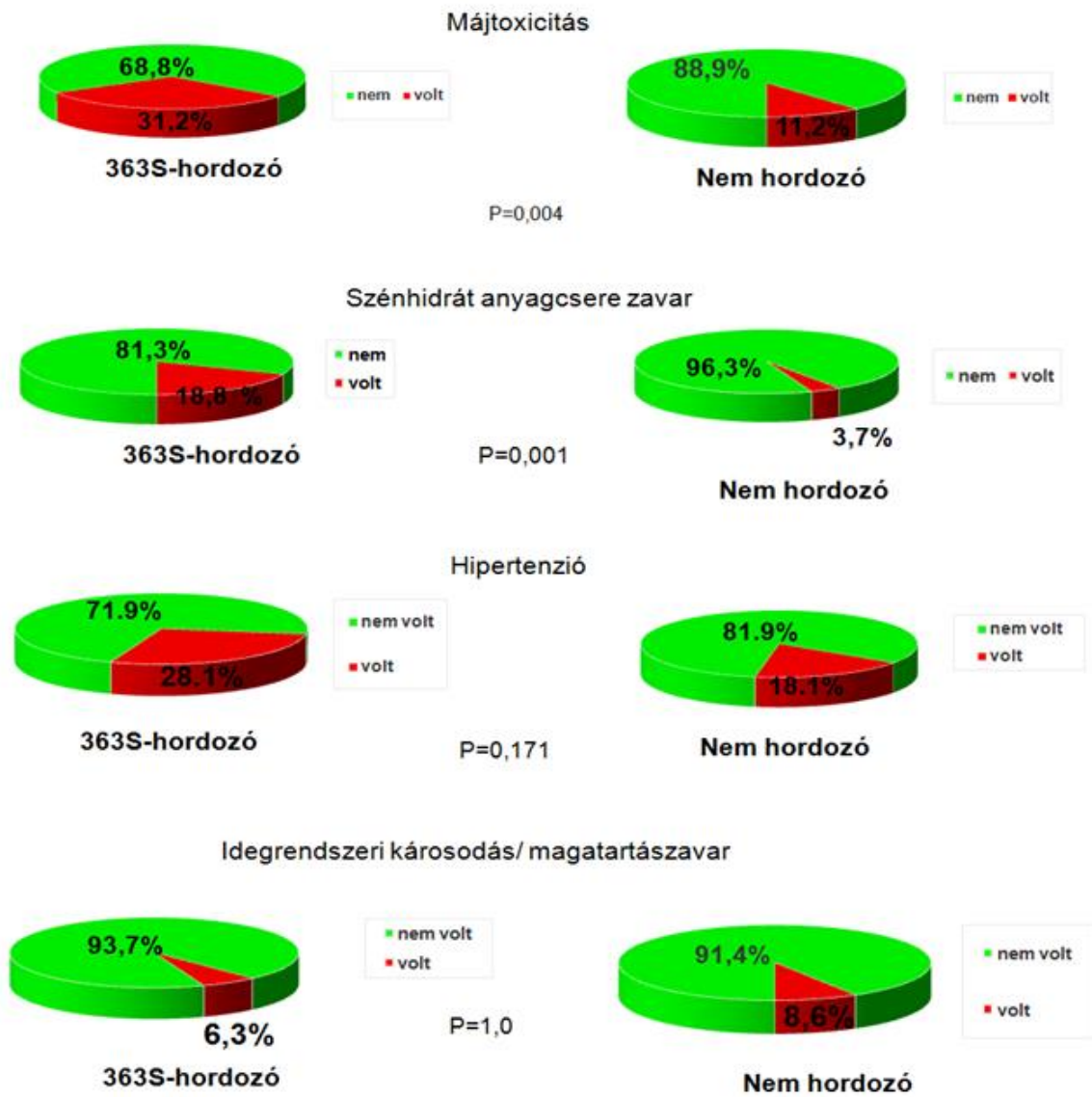
A szénhidrátanyagcserére vonatkozó adatok szintén hasonló eredményt mutattak ahhoz, amit a hepatotoxicitás esetében láhattunk (16. ábra). Ez a toxicitás szintén szignifikánsan gyakrabban fordult elő hordozók körében (6/32), mint a nem hordozók körében (8/314). 363S genotípus esetén a betegek 18,8%-ánál figyeltük meg a szénhidrátháztartás zavarát, míg ez az arány a nem hordozóknál csak 3,7% volt ($p=0,001$, Odds ratio=8.8, CI:2,846509-27,37198, 95%).

V.1.5. Hipertenzió és az N363S polimorfizmus

Bár a magasvérnyomás gyakrabban fordult elő a hordozók körében, mint a nem hordozók esetében, de ez az arány statisztikai számítással mégsem igazolódott szignifikánsnak ($p=0,171$). A hordozók 28,1%-ánál jelentkezett magasvérnyomás, míg a nem hordozóknál ez az arány csak 18,1% volt (16.ábra). A különbség azonban nem szignifikáns, így csak tendencia mutatkozott a hordozók irányába. (9/32, 28.1% vs. 57/314, 18.1%, $p=0.171$, Odds ratio=1.7, CI: 0,775252-4,015163, 95%).

V.1.6. Idegrendszeri károsodás és magatartásbeli zavarok

Ezen toxicitás esetében szintén nem mutatkozott statisztikailag jelentős összefüggés (16. ábra) a vizsgált mellékhatás és a genotípus között. A hordozók között ez a mellékhatás 8,6%-ban (2/32), a nem hordozók között pedig 6,3%-ban jelentkezett ($p=1,0$, odds ratio=0.7, CI: 0,160547-3,127887, 95%).



16 ábra N363S pm és a vizsgált toxicitások nagy dózisú szteroid terápia mellett a gyermekkori ALL terápiája során

V.1.7. Toxicitások halmozódása betegenként az N363S polimorfizmus függvényében

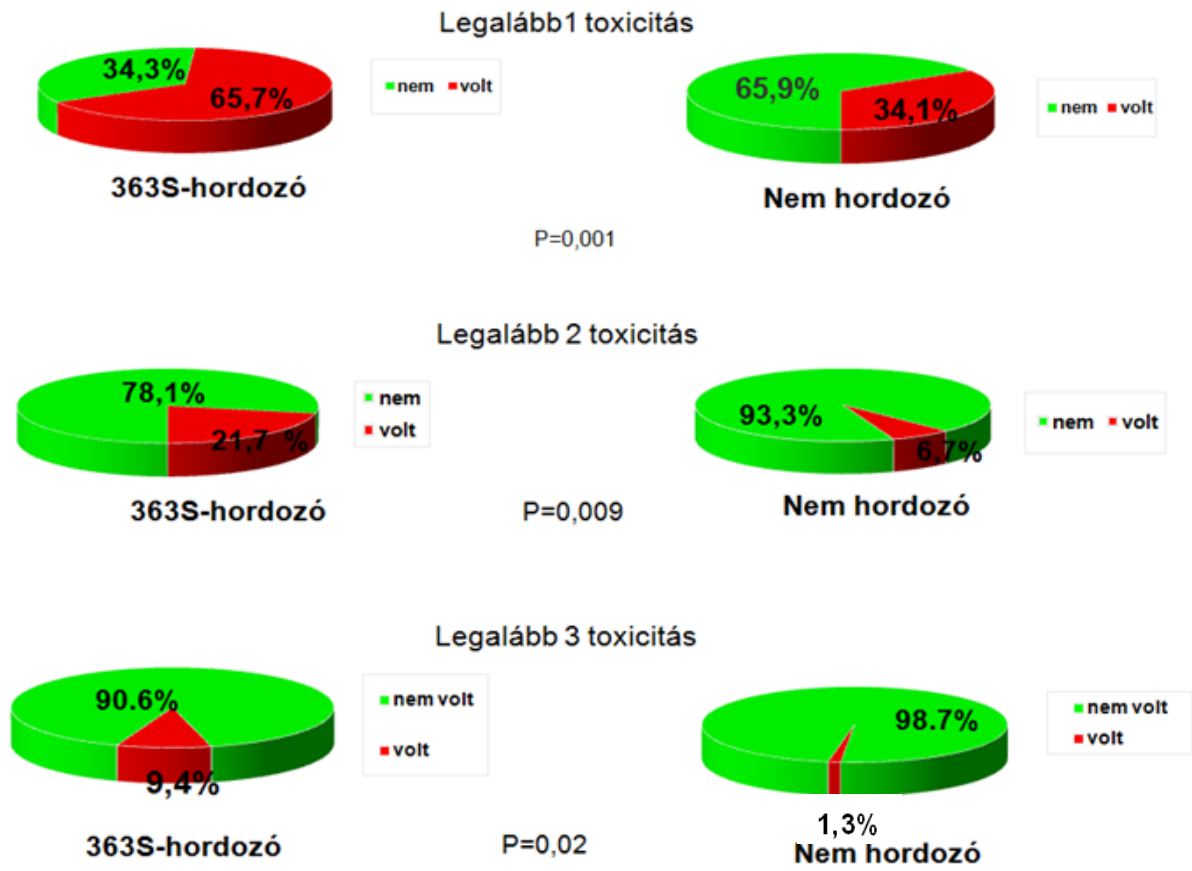
Megvizsgáltuk azt is, hogy egy betegen a polimorfizmus függvényében milyen gyakorisággal fordult elő egy, kettő, három, vagy esetleg négy mellékhatás egyszerre (17.ábra).

Eredményeink azt mutatták, hogy olyan beteg, akinek legalább egy toxicitása volt, szignifikánsan gyakrabban fordult elő a hordozók körében, mint a 363S genotípussal nem rendelkezők körében. Szignifikánsan több hordozónál jelentkezett legalább egy toxicitás (65,7% vs. 24,1%, $p=0,001$).

Hasonló eredményt találtunk akkor, amikor azt vizsgáltuk, hogy legalább két toxicitással bíró beteg milyen gyakran fordult elő a hordozók és a nem hordozók körében. Statisztikailag szignifikánsan gyakrabban fordult elő legalább két toxicitás a 363S genotípusúak körében (21,7% vs. 6,7%, $p=0,009$).

Legalább három toxicitással rendelkező betegek esetén is azt találtuk, hogy számuk az N363S polimorfizmus hordozása esetén magasabb volt. A polimorfizmust hordozók körében gyakrabban fordult elő legalább három toxicitás megjelenése (9,4% vs. 1,3%, $p=0,02$).

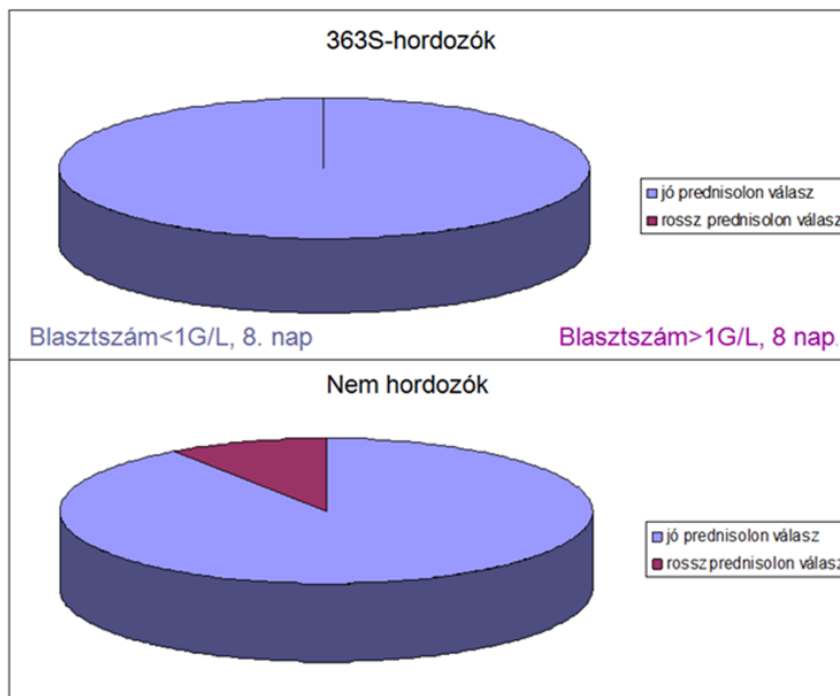
Négy toxicitás egyszerre egy vizsgált gyermekben sem alakult ki.



17. ábra: az N363S pm és a vizsgált toxicitások gyakorisága nagy dózissú szteroid terápia mellett a gyermekkori ALL terápia során

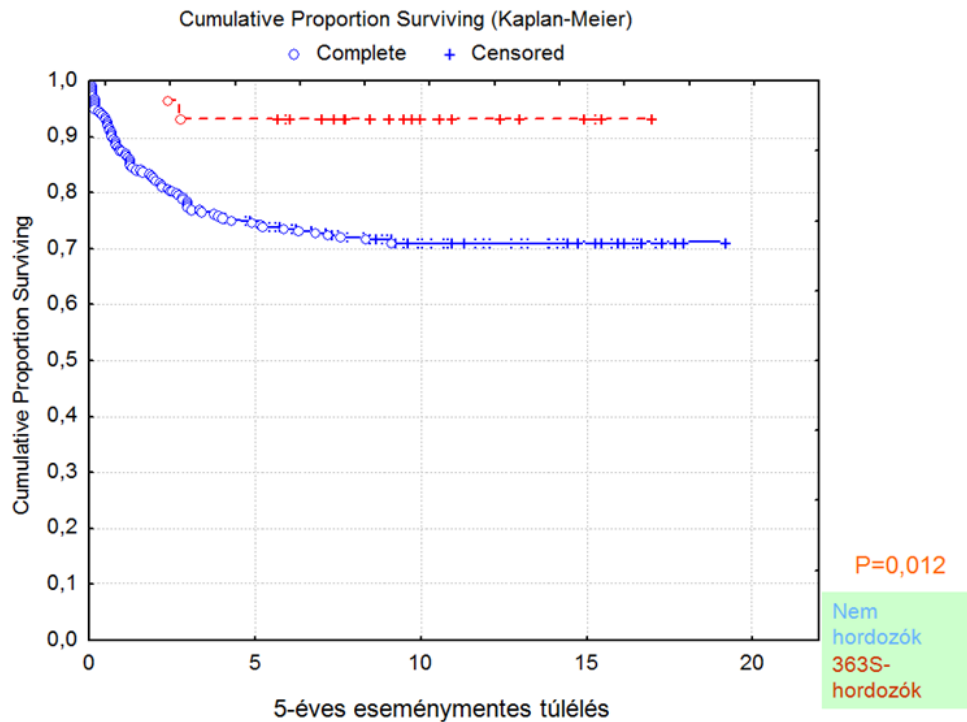
V.1.8. 8. napi prednisolon válasz és az N363S polimorfizmus

A prednisolon választ vizsgálva azt találtuk, hogy egy hordozónál sem jelentkezett rossz prednisolon válasz (0/32), míg ez az arány a nem hordozók körében 8,28% volt (26/314) (18.ábra). Mivel az elemszám nulla volt az egyik populációban, ezért p értéket nem számoltunk.



18.ábra: Az N363S polimorfizmus és a nyolcadik napi prednisolon válasz

V.1.9. 5-éves eseménymentes túlélés és az N363S polimorfizmus

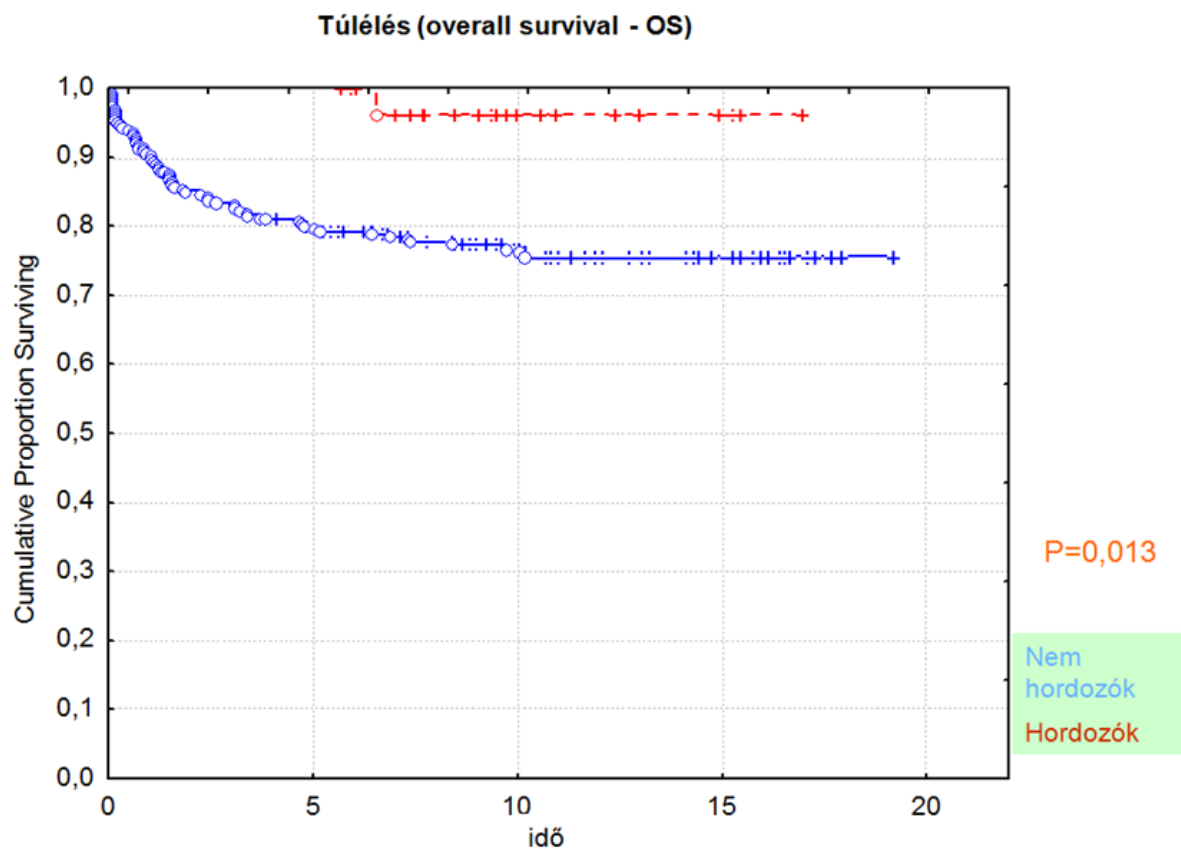


19. ábra: az N363S polimorfizmus és az 5 éves eseménymentes túlélés

Ahogy az a 19. ábrán is jól látszik, a 363S genotípussal rendelkezők körében az 5-éves eseménymentes túlélés szignifikánsan jobbnak mutatkozott ($p=0,012$) a nem hordozókhöz képest. A hordozók esetében 93,1% volt az EFS, míg a nem hordozóknál ez csak 71,86%.

V.1.10. Az 5 éves teljes túlélés (overall survival -OS) és az N363S polimorfizmus

Megvizsgáltuk az N363S és az 5 éves OS lehetséges kapcsolatát a vizsgált populációban. Az eredmények szignifikáns különbséget jeleznek. A 363S genotípusúak körében kedvezőbbek a túlélési adatok ($p=0,013$, 91,23% vs. 76,72%). (20. ábra).



20. ábra: az N363S polimorfizmus és a teljes túlélés

V.2. ER22/23EK polimorfizmus

V.2.1. Az allélgyakoriság

A 346 vizsgált ALL-es gyermekből 10 hordozta heterozigóta formában a polimorfizmust (3,46%). Homozigóta előfordulást ezen polimorfizmus esetén sem találtunk. Az allélfrekvencia követte a Hardy-Weinberg eloszlást ($p=0,7 > 0,05$) (184). G (vad típusú) allélgyakoriság: 98,6%, az A (mutációs allél) gyakorisága: 1,4% volt.

V.2.2. Hepatotoxicitás és az ER22/23EK polimorfizmus

A szteroid érzékenységet csökkentő polimorfizmus esetén az látszik, hogy a hordozók kisebb százalékának volt májkárosodása. Ez a toxicitás hordozók körében csak 10%-ban, míg a nem hordozók között 13%-ban mutatkozott. A különbség azonban nem szignifikáns, így csak egy tendencia figyelhető meg a polimorfizmus protektivitása felé ($p=0,6185$, Odds ratio:0,73734, CI=0,0912-5,9) (2.táblázat)

| | Nem hordozók | Hordozók | Összesen |
|----------|--------------|----------|----------|
| Nem volt | 292 | 9 | 301 |
| Volt | 44 | 1 | 45 |
| Összesen | 336 | 10 | 346 |

P=0.6185

2. táblázat: A hepatotoxicitás gyakorisága az ER22/23EK polimorfizmus esetén

V.2.3. Szénhidrátanyagcsere zavar és az ER22/23EK polimorfizmus

A szénhidrátanyagcsere vonatkozó adatok a glükokortikoid receptor érzékenységet csökkentő polimorfizmus esetén azt mutatták, hogy a hordozók körében ilyen toxicitás egyáltalán nem fordult elő (3.tábl). Ez az arány a nem hordozók esetében 4,1% volt. Ugyanakkor az eredmény itt sem mutatkozott statisztikailag szignifikánsnak ($p=0,510$).

| | Nem hordozók | Hordozók | Összesen |
|----------|--------------|----------|----------|
| Nem volt | 322 | 10 | 332 |
| Volt | 14 | 0 | 14 |
| Összesen | 336 | 10 | 346 |

$P=0,510$

3. táblázat: A szénhidrát anyagcsere zavarainak előfordulása az ER22/23EK pm függvényében nagy dózisu szteroid terápia mellett a gyermekkori ALL terápia során

V.2.4. Magasvérnyomás és az ER22/23EK polimorfizmus

Hasonlóan az előző toxicitáshoz, a magasvérnyomás esetén is a polimorfizmus glükokortikoid mellékhatásokkal szembeni protektivitását figyelhetjük meg. Ezen SNP esetén a hordozók körében nem akadt senki, akinél hipertenzió jelentkezett volna, ugyanakkor ez az arány a nem hordozóknál már közel 20% volt ($p=0,25$). (4.tábl). Az eredmény azonban statisztikailag itt sem volt szignifikáns.

| | Nem hordozók | Hordozók | Összesen |
|----------|--------------|----------|----------|
| Nem volt | 270 | 10 | 280 |
| Volt | 66 | 0 | 66 |
| Összesen | 336 | 10 | 346 |

P=0,25

4.táblázat: A magasvérnyomás előfordulása az ER22/23EK pm függvényében nagy dózisu szteroid terápia mellett a gyermekkori ALL terápiája során

V.2.5. Idegrendszeri károsodás és magatartásbeli zavarok az ER22/23EK pm kapcsán

Az ER22/23EK polimorfizmus esetén nem találtunk olyan ALL-es gyermeket, akinél magatartásbeli változás történt volna. Ugyanakkor a nem hordozóknál a 336-ból 29 gyerek is akadt, akiknél volt valamiféle idegrendszeri/magatartásbeli eltérés, náluk ez az arány 8,6% volt. A különbség statisztikailag nem volt szignifikáns (p=0,695) (5. táblázat.).

| | Nem hordozók | Hordozók | Összesen |
|----------|--------------|----------|----------|
| Nem volt | 307 | 10 | 301 |
| Volt | 29 | 0 | 45 |
| Összesen | 336 | 10 | 346 |

P=0,695

5. táblázat: Az idegrendszeri toxicitások/magatartás zavarok előfordulása az ER22/23EK pm függvényében nagy dózisu szteroid terápia mellett a gyermekkori ALL terápiája során

V.2.6. Toxicitások halmozódása betegenként az ER22/23EK polimorfizmus esetén

Ennél a polimorfizmusnál is megvizsgáltuk azt, hogy egy betegen a polimorfizmus függvényében milyen gyakorisággal fordul elő egy, kettő, három, vagy esetleg négy szteroid okozta mellékhatás egyszerre (6.táblázat).

Eredményeink azt mutatták, hogy nem akadt szignifikáns különbség legalább egy toxicitás megjelenése tekintetében a hordozók és a nem hordozók között ($p=0,065$). A hordozók 10%-ának volt legalább 1 toxicitása. Ez az arány a nem hordozók között 38,8% volt. Tehát tendencia van arra, hogy legalább egy toxicitás is a nem hordozók között gyakoribb, azonban ez az eredmény nem szignifikáns.

Legalább két toxicitás a fentivel ellentétben viszont már egyáltalán nem fordult elő azon ALL-es gyermekek körében, akikben jelen volt az ER22/23EK polimorfizmus. A nem hordozók körében ezzel ellentétben viszont legalább két toxicitás előfordulása 8,3% volt ($p=0,716$).

A hordozók körében nem akadt olyan beteg, akinek lett volna három toxicitása. A nem hordozók körében ez az arány 2% volt ($p=0,645$).

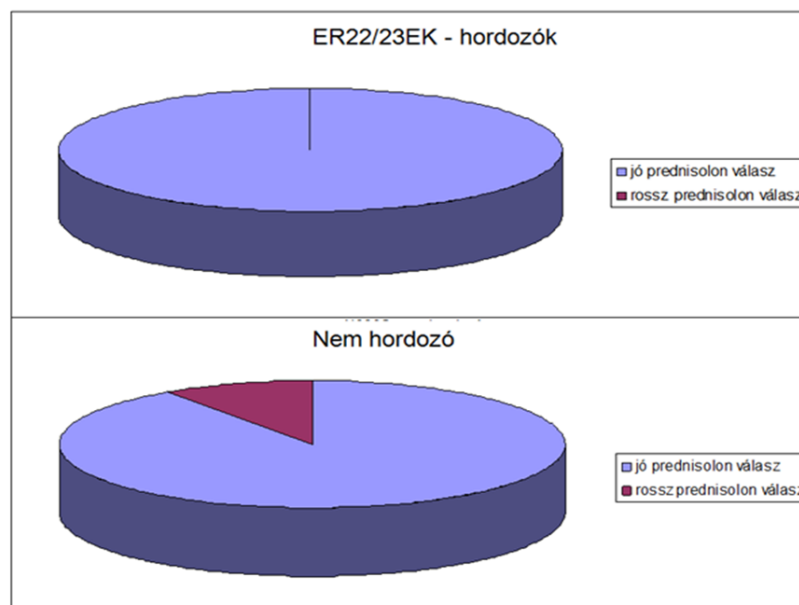
Négy toxicitás egyszerre egy vizsgált gyermekben sem alakult ki.

| Toxicitások gyakorisága betegenként | | | |
|-------------------------------------|-------------------|-----------------------|----------------|
| Előfordult toxicitás: | ER22/23EK pm volt | ER22/23EK pm nem volt | Szignifikancia |
| Legalább egy | 1 | 127 | P=0,065 |
| Egy sem | 9 | 209 | |
| Legalább kettő | 0 | 28 | P=0,716 |
| Kettőnél kevesebb | 10 | 308 | |
| Legalább három | 0 | 7 | P=0,645 |
| Háromnál kevesebb | 10 | 329 | |

1. táblázat: Az ER22/23EK polimorfizmus és a vizsgált toxicitások gyakorisága nagy dózisú szteroid terápia mellett a gyermekkori ALL terápiája során

V.2.7. 8. napi prednisolon válasz és az ER22/23EK polimorfizmus

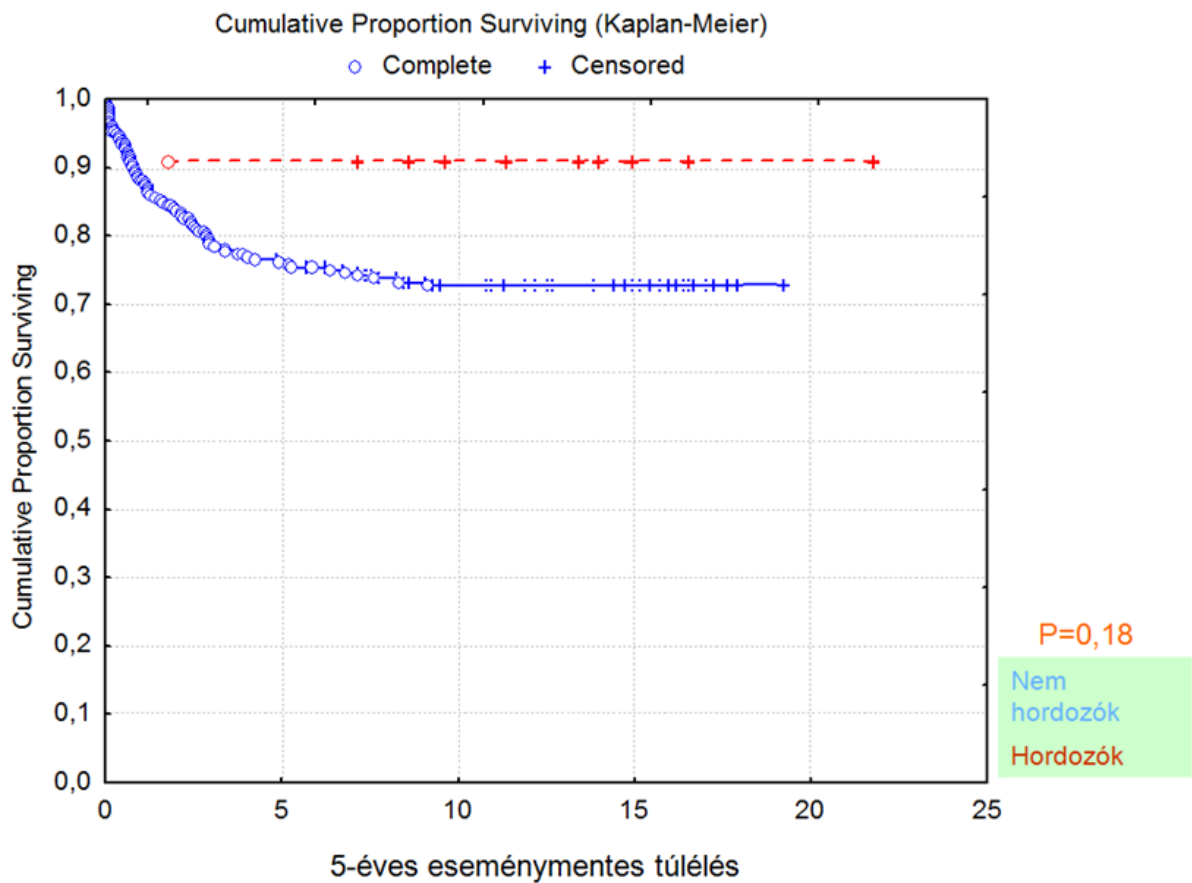
A 8. napi prednisolon válasz esetén azonban elmondható, hogy egy hordozónál sem jelentkezett rossz prednisolon válasz (0/10), ugyanakkor a nem hordozók körében 7,74%-os volt a rossz prednisolon válasz aránya (26/336) (21.ábra).



21.ábra: Az ER22/23EK polimorfizmus és a nyolcadik napi prednisolon válasz

V.2.8. 5-éves eseménymentes túlélés és az ER22/23EK polimorfizmus

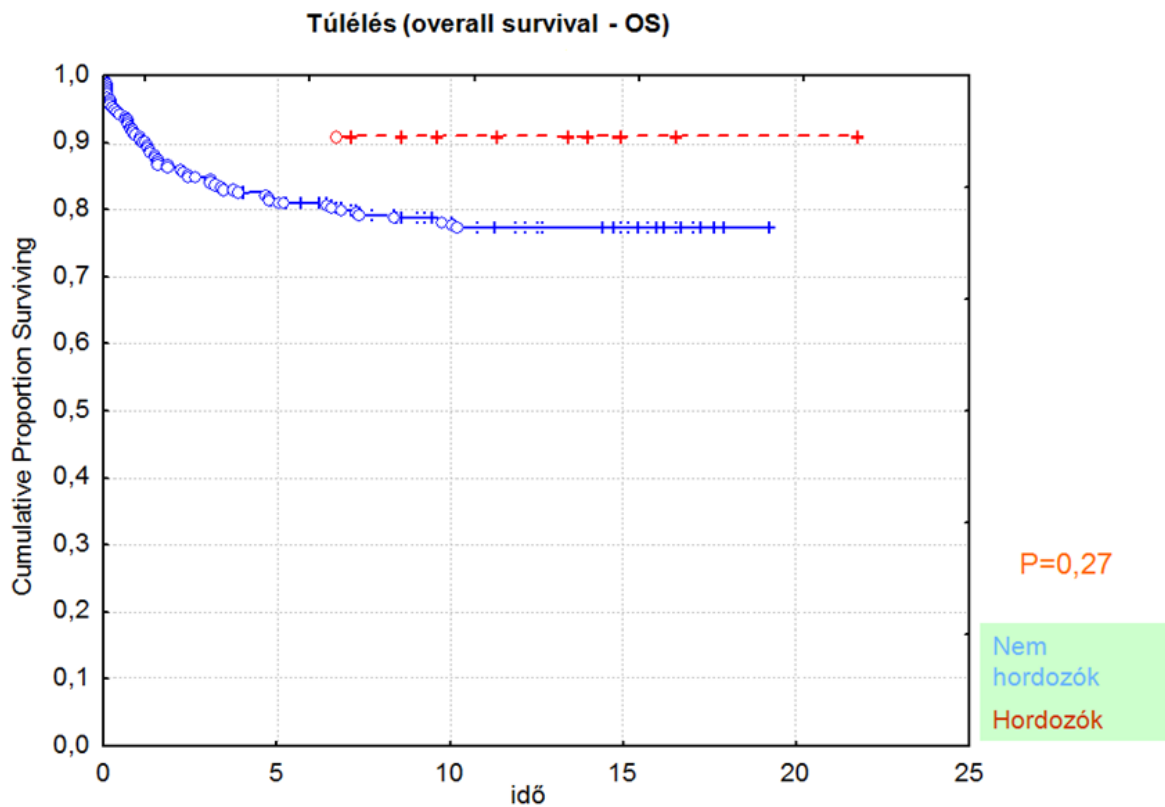
Az ER22/23EK polimorfizmus esetén nem volt különbség a hordozók és a nem hordozók között. A két csoportban nem különbözött szignifikánsan az 5-éves EFS (22.ábra).



22. ábra: az ER22/23EK polimorfizmus és az 5 éves eseménymentes túlélés

V.2.9. Az 5 éves teljes túlélés (overall survival-OS) és az ER22/23EK polimorfizmus

Elemeztük a vizsgált ALL-es gyermekek körében az ER22/23EK polimorfizmus, illetve az 5 éves teljes túlélés viszonyát is. Eredményként azt találtuk, hogy csakúgy, mint az EFS esetén, itt sem mutatkozott statisztikailag jelentős különbség a hordozók és a nem hordozók között ($p=0,27$) (23.ábra).



23. ábra: az ER22/23EK polimorfizmus és a teljes túlélés

V.3. BCL1 polimorfizmus

V.3.1. Az allélgyakoriság

A BCL polimorfizmus esetén a 346 vizsgált ALL-es gyermekből 257-nél sikerült csak technikai okok miatt (DNS elfogyott, túl nagy hígítást kellett már e kis mennyiségek miatt alkalmazni) a polimorfizmus jelenlétét vagy hiányát kimutatni. A 257 betegből 140 fiú és 117 lány volt. Az allél frekvencia a Hardy-Weinberg eloszlást követte ($p=0,33 > 0,05$) (184).

- C (vad típus) allél frekvencia: 67.29%
- G (mutáns típus) allél frekvencia: 32.71%
- Homozigóta vad típusúak (C/C) száma: 122/257 (47,47%)
- Heterozigóták (C/G): 105/257 (40,86%)
- Homozigóta mutáns típusúak (G/G) száma: 30/257 (11,67%) (184.)

Ahogy az fent is látszik BCL1 polimorfizmus esetében megfelelő elemszám mutatkozott az N363S polimorfizmussal való kombináció vizsgálatára is.

9 gyermek volt a 257-ből volt egyszerre C/G (BCL1) és 1220G (N363S) genotípusú.

V.3.2. A glükokortikoidok indukálta toxicitások a BCL1 polimorfizmus kapcsán:*Hepatotoxicitást és a BCL1 polimorfizmus*

| Hepatotoxicitás | | | |
|-----------------------------------|------|----------|----------------|
| Genotípus | Volt | Nem volt | Szignifikancia |
| G/G+G/C | 27 | 108 | P=0,455 |
| CC | 20 | 102 | |
| G/G | 10 | 20 | P=0,23 |
| C/C+G/C | 37 | 190 | |
| N363S+BCL1 | 2 | 7 | P=0,671 |
| Nincs N363S+BCL1 kombináció | 45 | 203 | |

7. táblázat: A BCL1 polimorfizmus G alléljának hetero és/vagy homozigóta formában való összefüggése a májkárosodással. A táblázat továbbá bemutatja a G-allél ugyanezen toxicitással való összefüggését abban az esetben, amikor az az N363S polimorfizmus mutáns típusával kombinálódik.

A hepatotoxicitás tekintetében megvizsgáltuk a polimorfizmust egyáltalán nem hordozókat a hordozó alléllal (innenről: G-allél) szemben. Ereményeink azt mutatták, hogy nem jelentkezett szignifikáns különbség a két csoport között ($p=0,455$). Szintén nem találtunk különbséget akkor sem, amikor a homozigótákat (G/G) viszonyítottuk az egész populációhoz. Tendencia megfigyelhető volt azonban, mely azt mutatta, hogy a G/G esetén nagyobb arányban jelentkezett hepatotoxicitás, de a különbség nem volt szignifikáns (30% vs.16%, $p=0,23$). Kombináció esetén nem volt különbség a kombinációval rendelkezők és nem rendelkezők között ($p=0,671$). A hepatotoxicitás nem jelentkezett statisztikailag gyakrabban a kombináció esetén.

Szénhidrát anyagcserezavarok és a BCL1 polimorfizmus

| Szénhidrát anyagcsere zavar | | | |
|-----------------------------------|------|----------|----------------|
| Genotípus | Volt | Nem volt | Szignifikancia |
| G/G+G/C | 7 | 128 | P=0,332 |
| CC | 10 | 112 | |
| G/G | 1 | 29 | P=0,7 |
| C/C+G/C | 16 | 211 | |
| N363S+BCL1 | 2 | 7 | P=0,113 |
| Nincs N363S+BCL1 kombináció | 15 | 233 | |

8. táblázat: ábra: A BCL1 polimorfizmus G alléljának hetero és/vagy homozigóta formában való összefüggése a szénhidrát anyagcserezavarral. A táblázat továbbá bemutatja a G-allél ugyanezen toxicitással való összefüggését abban az esetben, amikor az az N363S polimorfizmus mutáns típusával kombinálódik.

A szénhidrátanyagcserezavar esetén is kerestük ezen toxicitás és a 3 vizsgált csoport közötti összefüggést. Nem találtunk szignifikáns különbséget a G-allél és a vad homozigóta csoport között ($p=0,332$). Szintén nem jelentkezett különbség akkor sem, amikor a homozigóta G/G genotípust hasonlítottuk az egész populációhoz ($p=0,7$). Kombináció esetén sem volt differencia a vizsgált két csoport között ($p=0,113$). Ugyanakkor itt találtunk tendenciát, mely azt mutatja, hogy a kombináció esetén nagyobb a valószínűsége a szénhidrátháztartás zavarának, azonban ez nem volt szignifikáns (22,22% vs. 6,1%)

Központi idegrendszeri eltérések/magatartás zavarok és a BCL1 polimorfizmus

| Idegrendszeri károsodás/ magatartás zavar | | | |
|--|------|----------|----------------|
| Genotípus | Volt | Nem volt | Szignifikancia |
| G/G+G/C | 18 | 117 | P=0,785 |
| CC | 15 | 108 | |
| G/G | 6 | 24 | P=0,209 |
| C/C+G/C | 27 | 201 | |
| N363S+BCL1 | 1 | 8 | P=1,00 |
| Nincs N363S+BCL1 kombináció | 32 | 217 | |

9. táblázat: A BCL1 polimorfizmus G alléljának hetero és/vagy homozigóta formában való összefüggése a központi idegrendszeri károsodással/magatartás zavarokkal. A táblázat továbbá bemutatja a G-allél ugyanezen toxicitásokkal való összefüggését abban az esetben, amikor az az N363S polimorfizmus mutáns típusával kombinálódik.

Központi idegrendszeri eltérések és a fenti 3 csoport közötti összefüggés tekintetében a következőket találtuk:

Nem mutatkozott szignifikáns különbség a G-allél és a vad homozigóta csoport között ($p=0,785$). Szintén nem találtunk statisztikailag jelentős korrelációt a G/G homozigóták és a populáció többi tagja között ($p=0,209$), egyik csoportban sem fordult elő nagyobb különbséggel központi idegrendszeri tünet vagy magatartászavar. Tendencia mutatkozott a homozigóták irányába (20% vs 11,8%), de ez nem volt szignifikáns.

Az N363S-BCL1 kombináció esetén szintén nem volt különbség a két SNP-vel egyszerre rendelkezők és csak az egyik polimorfizmussal rendelkező csoport között ($p=1,00$).

Hipertónia és a BCL1 polimorfizmus

| Magasvérnyomás | | | |
|-----------------------------------|------|----------|----------------|
| Genotípus | Volt | Nem volt | Szignifikancia |
| G/G+G/C | 33 | 102 | P=0,167 |
| CC | 39 | 82 | |
| G/G | 7 | 23 | P=0,534 |
| C/C+G/C | 65 | 161 | |
| N363S+BCL1 | 3 | 6 | P=0,714 |
| Nincs N363S+BCL1 kombináció | 69 | 178 | |

10. táblázat: A BCL1 polimorfizmus G alléljának hetero és/vagy homozigóta formában való összefüggése a hipertóniával. A táblázat továbbá bemutatja a G-allél ugyanezen toxicitással való összefüggését abban az esetben, amikor az az N363S polimorfizmussal kombinálódik.

A magasvérnyomást szintén vizsgáltuk a fenti 3 csoportban a BCL1 polimorfizmus esetén. Eredményeink azt mutatták, hogy nem jelentkezett szignifikáns különbség a homozigóta vad csoport és a G-allélt hordozó csoport között csoport (p=0,455). Szintén nem találtunk különbséget akkor sem, amikor a homozigótákat (G/G) viszonyítottuk az egész populációhoz (p=0,534).

Kombináció esetén nem volt különbség a kombinációval rendelkezők és nem rendelkezők között (p=0,714). A hipertónia nem jelentkezett statisztikailag gyakrabban a kombináció esetén.

V.3.3. A toxicitások halmozódása a BCL1 polimorfizmus esetén:

| Toxicitások gyakorisága betegenként – BCL1 | | | | | | |
|--|----------------------|-------------------|----------------------|---------------------|----------------------|-------------------|
| | Legalább 1 toxicitás | Egy toxicitás sem | Legalább 2 toxicitás | Nincs két toxicitás | Legalább 3 toxicitás | Nincs 3 toxicitás |
| G/G+G/C | 64 | 71 | 16 | 119 | 130 | 5 |
| CC | 69 | 54 | 11 | 112 | 119 | 4 |
| G/G | 18 | 12 | 6 | 24 | 0 | 30 |
| C/C+G/C | 115 | 113 | 21 | 207 | 9 | 219 |
| N363S + BCL1 | 4 | 5 | 2 | 7 | 2 | 7 |
| Nincs N363S+ BCL1 kombináció | 129 | 120 | 25 | 224 | 7 | 242 |

11. táblázat: A BCL1, különböző allél kombinációinak, illetve a BCL1-N363S kombináció összefüggése abetegenként fellépő toxicitások számával

| Toxicitások gyakorisága betegenként – BCL1- szignifikanciák | | | |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Legalább 1 toxicitás | Legalább 2 toxicitás | Legalább 3 toxicitás |
| G/G+G/C | P=0,163 | P=0,543 | P=1,000 |
| CC | | | |
| G/G | P=0,325 | P=0,104 | P=0,563 |
| C/C+G/C | | | |
| N363S + BCL1 | P=0,743 | P=0,24 | P=0,34 |
| Nincs N363S+ BCL1 kombináció | | | |

12. táblázat: 11. táblázathoz tartozó szignifikancia értékek (11-12.tábl).

A BCL1 polimorfizmus esetén is megvizsgáltuk a toxicitások halmozódásának gyakoriságát személyenként. Legalább egy toxicitás előfordulásának vizsgálatakor nem találtunk szignifikáns különbséget a vad típusú homozigóták, illetve a G-allélt valamilyen formában hordozók esetén ($p=0,163$).

Ugyanezen populációban legalább két toxicitás előfordulása szintén nem különbözött ($p=0,543$). A G-allél jelenléte nem hajlamosított a toxicitás ilyen fokú halmozódására.

A fentiekkel egyező eredményt kaptunk abban az esetben, mikor legalább három toxicitás egyszerre való megjelenését vizsgáltuk. A G-allél itt sem jelentett statisztikailag nagyobb fokú rizikót ($p=1,000$) a mellékhatások halmozódása szempontjából.

Szintén megvizsgáltuk külön a G/G homozigótákat a toxicitások gyakorisága szempontjából is a populáció többi tagjával szemben. Eredményeink azt mutatták, hogy a homozigóta forma esetén legalább egy toxicitás nem fordul elő gyakrabban nagy dózisú szteroid terápia alatt a mi populációnkban ($p=0,325$). Hasonló eredmény jött ki, amikor legalább két toxicitás esetét vizsgáltuk ezen két csoportban. A G/G homozigóták esetén nem jelentkezett statisztikailag jelentősebb arányban egyik csoportban sem legalább két toxicitás ($p=0,104$).

Legalább három toxicitás előfordulásának vizsgálatakor azonban azt figyelhettük meg, hogy a G/G homozigóták körében nem volt egyáltalán olyan beteg, akinek három mellékhatása egyszerre jelentkezett volna, míg ez az arány a CC+GC genotípusúak körében 4% volt. Az eredmény ugyanakkor statisztikailag itt sem szignifikáns ($p=0,563$).

A BCL1-N363S polimorfizmusok kombinációja és a toxicitások halmozódása esetén a következő eredményeket kaptuk. Legalább 1 toxicitás előfordulása betegenként nem tért el szignifikánsan a kombináció megléte és annak hiánya esetén ($p=0,743$).

Hasonló eredmény adódott legalább két toxicitás megfigyelése esetén. Ez a fokú halmozódás statisztikailag nem függött a kombinációktól, ugyanis a két csoport között nem volt szignifikáns eltérés ($p=0,24$).

Nem találtunk továbbá kapcsolatot a polimorfizmusok kombinációja és legalább 3 toxicitás előfordulása között. A kombinációval rendelkezők körében nem lépett fel gyakrabban legalább három szteroid okozta mellékhatás ($p=0,34$) (11. és 12. táblázat).

V.3.4. Nyolcadik napi prednisolon válasz a BCL1 polimorfizmusnál

A nyolcadik napi prednisolon választ szintén megvizsgáltuk a fentebb részletezett csoportokban.

A G allél nem jelentett kedvezőbb hatást a nyolcadik napi prednisolon válasz tekintetében. A hordozók között nem volt statisztikailag magasabb a jó prednisolon válaszadók aránya a nem hordozóékhöz képest ($p=0,559$).

A G/G genotípus esetén viszont azt találtuk, hogy ezen homozigóta egyének egyike sem volt rossz prednisolon válaszadó, míg a másik csoportban a kedvezőtlen prednisolon válasz aránya 5% volt. Az eredmény nem szignifikáns ($p=0,198$)

Az BCL1-N363S kombináció esetén szintén fordult elő rossz prednisolon válasz, míg azok között, akiknek nem volt meg ez a két SNP-jük egyszerre, náluk 3,6% volt az 1G/L feletti periféris blasztszám a nyolcadik napon. Az eredmény nem szignifikáns ($p=0,500$) (13.táblázat.).

| 8. Napi prednisolon válasz BCL1 | | | |
|---------------------------------|-----|-------|----------------|
| Genotípus | jó | rossz | Szignifikancia |
| G/G+G/C | 130 | 5 | P=0,559 |
| CC | 116 | 7 | |
| G/G | 30 | 0 | P=0,198 |
| C/C+G/C | 216 | 12 | |
| N363S+BCL1 | 12 | 0 | P=0,500 |
| Nincs N363S+BCL1 kombináció | 237 | 9 | |

13. táblázat: a BCL1 polimorfizmus G alléljának hetero és/vagy homozigóta formában való összefüggése a nyolcadik napi prednisolon válaszzal. A táblázat továbbá bemutatja a G-allél – N363S polimorfizmus kombinációkor észlelt nyolcadik napi prednisolon választ.

V.3.5. 5 éves eseménymentes túlélés (EFS) és a BCL1 polimorfizmusnál

Nem találtunk szignifikáns különbséget a vad homozigóták és a G-allél jelenléte között a vizsgált nagy dózisu szteroid terápiát kapó ALL-es gyermekek körében az 5 éves EFS tekintetében. A G-allél jelenléte nem befolyásolta az eseménymentes túlélést a vizsgált populációban. Az eredmények alapján a G-allél hordozása esetén ugyan tendencia mutatkozik a kedvezőtlenebb 5-éves EFS-re, de ez a különbség nem szignifikáns ($p=0,535$).

Szintén összehasonlítottuk a homozigóta mutáns típusúakat (G/G) a populáció többi részével (C/C+G/C). Az eredmények alapján nem találtunk szignifikáns összefüggést az 5 éves EFS tekintetében a két csoport között ($p=0,445$).

Végül megvizsgáltuk az 5 éves EFS tekintetében is, hogy az eredmények hogy változnak akkor, ha a BCL1 kombinálódik az N363S genotípussal. Hasonlóan a többi esethez, itt sem találtunk szignifikáns összefüggést az 5 éves EFS tekintetében a vizsgált két csoport között ($p=0,3$).

V.3.6. Az 5 éves teljes túlélés és a BCL1 polimorfizmus

Megvizsgáltuk a BCL1 polimorfizmus kapcsán is az 5-éves teljes túlélést is. Nem találtunk a vizsgált populációban semmilyen összefüggést a G-allél, illetve a túlélési adatok között ($p=0,816$).

Szintén megnéztük, hogy a GG homozigóta genotípus jelent-e plusz rizikót, vagy kedvező feltételt a teljes túlélésre vonatkozóan a populáció többi tagjával szemben. Vizsgálatunkban nem találtunk korrelációt a GG homozigótaság és az 5 éves teljes túlélés tekintetében, hiszen a GG, illetve a G/C+CC csoport túlélése nem különbözött szignifikánsan ($p=0,849$).

Végezetül megvizsgáltuk a BCL1-N363S kombináció esetében is az 5 éves OS alakulását. Eredményeink nem találtak szignifikáns összefüggést a vizsgált populációban a két SNP együttes jelenléte és a teljes túlélés között ($p=0,681$).

VI. MEGBESZÉLÉS

VI.1 A vizsgált toxicitások és polimorfizmusok kapcsolata

Az általunk vizsgált 346 ALL-ban szenvedő gyermek a kemoterápiát az ALL IC BFM 90/95-ös protokollok alapján kapták. Ebben a protokollban a gyermekek a protokoll I fázis 1, illetve a protokoll II, fázis 1 idején kaptak nagy dózisban glükokortikoid kezelést (prednisolon:60mg/m²/nap, max. dózis: 21 napig, illetve dexamethasone:10mg/m²/nap, maximális dózis: 21 napig).

A nagy dózisú glükokortikoid kezelés időszakában gyakran jelentkeznek a szteroidok okozta mellékhatások, melyek időnként akár gyógyszeres beavatkozást is igényelnek (inzulin, anxiolitikumok, hepatoprotektív gyógyszerek stb.). Az ALL igen kiemelkedően jó túlélése mellett mára már feladattá vált az is, hogy a kemoterápia alatt egyúttal csökkentsük azokat a mellékhatásokat, melyek a gyermekek mindennapi életét a kezelés alatt nehezíti. Ilyen mellékhatások lehetnek az általunk vizsgált szteroid okozta károsodások is, mint a hepatotoxicitás, szénhidrát anyagcserezavarok, központi idegrendszeri károsodás/magatartás zavar, hipertenzó.

Az általunk elemzett 3 glükokortikoid receptor polimorfizmus csökkenti vagy növeli a szteroidokkal szemben a szervezet érzékenységét. Ennek megfelelően célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy ezen SNP-k esetén a fent felsorolt szteroid által előidézett toxicitások hogyan változnak megjelenésük erejében, gyakoriságában a kemoterápia alatt.

VI.1.1. N363S polimorfizmus

A 346 vizsgált ALL-es gyermek közül 32 hordozta az SNP-t jelentő 363S genotípust (1220A). Ez az érintettek 9,24%-át jelenti, mely az irodalmi adatok alapján megfelel a világ többi országában megtalálható aránynak, ami nagyjából 3,23%-14,3% között mozog (144). Statisztikailag megvizsgálva a populációt, az Hardy-Weinberg eloszlást mutatott, tehát a vizsgált betegek heterogén populációt alkottak.

Ahogy az irodalomban senki, úgy mi sem találtunk a mutációt jelentő 363S genotípusra homozigóta beteget. Ez valószínűleg a polimorfizmus viszonylag alacsony előfordulási arányával magyarázható.

Irodalmi adatok sora támasztja alá, hogy ez a polimorfizmus azáltal, hogy megnöveli a receptor transzaktivációs kapacitását (143) a glükokortikoidok iránti érzékenységet is emeli (145-147). Számunkra ez azért lehet érdekes, mert így hordozás esetén felmerülhet az ALL terápiája során alkalmazott glükokortikoidok okozta toxicitások gyakoribb, vagy súlyosabb volta, melynek akár terápiás következménye is lehet a szupportációt tekintve.

Az elemzett populációinkban először megvizsgáltuk az N363S polimorfizmus, illetve a hepatotoxicitás közti kapcsolatot. Ilyen kapcsolatot eddig az irodalmi adatok alapján csak mi vizsgáltunk (185). A szteroidok azáltal, hogy fokozzák a lipolízist, emelik a vér zsírsavszintjét és így zsírmájat, hepatotoxicitást idézhetnek elő (115). A glükokortikoidok, ahogy fentebb is láttuk egyéb területen is – pl. cukorháztartás-befolyásolják a máj metabolikus folyamatait, így érthető, hogy azok nagydózisú alkalmazása esetén szintén májkárosodással lehet számolni. Eredményeink ezt a gondolatot alá is támasztják. Vizsgálatunk során a szteroidok iránti érzékenységet növelő polimorfizmus hordozása esetén szignifikánsan nagyobb valószínűséggel fordult elő a májkárosodás (31% vs. 11,2%, $p=0,04$). A hordozók körében gyakrabban láttunk grade 3 vagy 4 hepatotoxicitásra utaló bilirubin, és vagy GPT/gammaGT értékeket. Ez idáig nem történtek hasonló vizsgálatok, melyek a mi megfigyeléseinket megerősíthetnék vagy cáfolhatnák e téren.

A szteroidok igen ismert mellékhatása a szénhidrátanyagcserében bekövetkező kóros állapotok, úgy, mint megnövekedett éhomi vércukorszint, hiperinzulinémia, cukorbetegség kialakulása (114). Ezeket a mellékhatásokat a gyermekkori ALL terápiája során viszonylag gyakran látjuk. A gyermekek egy része inzulinkezelést is igényelhet. A cukoranyagcsere zavar a kemoterápia alatt azonban nagyrészt csak átmeneti állapotot jelent.

A fentiekből adódóan a glükokortikoid érzékenységet növelő N363S polimorfizmus kapcsán fontosnak tartottuk megvizsgálni, annak esetlegesen a szénhidrátanyagcserére gyakorolt hatását.

Eredményeink azt mutatták, hogy ez a mellékhatás a mutációt jelentő 363S genotípus esetén szignifikánsan gyakrabban fordult elő, mely megfelel az SNP érzékenység fokozódást okozó hatásának (18,8% vs. 3,7%, $p=0,001$). A hordozók körében gyakrabban jelentkezett magasabb éhomi vércukorszint, glükózúria vagy inzulinterápiát igénylő diabétesz.

Az irodalmi adatok egy része alátámasztja megfigyeléseinket. Számos kutatás igazolja a polimorfizmus okozta kifejezettebb glükokortikoid hatásokat (147-151). Több kutatócsoport is kedvezőtlen metabolikus profil kialakulásáról számol be a polimorfizmus esetén (145; 147;148). Más kutatások ezt nem igazolták (155).

A glükokortikoidok kardiovaszkuláris rendszerre gyakorolt negatív hatása közismert a medicinában (104). Használatukkor gyakrabban jelentkezhet hipertrigliceridémia vagy léphetnek fel arteriosclerosissal kapcsolatos komplikációk a (105). A szteroidok fokozzák a nátrium és a vízvisszatartást, ezért alkalmazásukkor gyakran alakulhat ki hipertenzió is, melyet mi magunk is sokszor mérhetünk a szteroid terápia alatt ALL-es betegeink körében.

A fentiek miatt az érzékenységet növelő N363S polimorfizmus kapcsán a PhD munkám során megvizsgáltuk a magasvérnyomás kialakulásának valószínűségét. Eredményeink nem mutattak szignifikáns kapcsolatot, azonban olyan tendencia mutatkozott, mely a 363S genotípus esetén nagyobb kockázatot valószínűsít a hipertenzó kialakulása szempontjából, ugyanis a hordozók körében a hipertónia, 28,1%-ban míg a nem hordozók körében csak 18,1%-ban fordult elő. Az irodalmi adatok igen ellentmondásosak e téren. Egyes cikkek találtak összefüggést a magasvérnyomás, a szív-érrendszeri károsodások és az N363S polimorfizmus között (148), míg mások ezt az összefüggést nem igazolták (155).

A glükokortikoidok HPA-axisra, és így a stressz reakciókra gyakorolt hatása jól ismert probléma a pszichiátriában (89; 93; 99). Nagy dózisú szteroidterápia mellett a hematológiai osztályokon is nem ritka megfigyelés az, hogy a gyermekek hangulati élete így vagy úgy megváltozik. Egyesek szorongóbbá válnak, többet sírnak, mások viszont agresszívebbek lehetnek, mely ritkán pszichotikus állapotig is fokozódhat. PhD munkám során megvizsgáltuk az érzékenységet fokozó N363S polimorfizmus, illetve a

központi idegrendszeri eltérések és/vagy magatartásbeli kóros állapotok közti lehetséges összefüggéseket is.

Eredményeink bár azt mutatták, hogy a neuropátiák, a hangulati élet zavarai, az anxiolitikumok használata valamivel gyakoribb volt a hordozók körében nagy dózisú szteroid terápia alatt, ez a korreláció azonban nem volt szignifikáns. Az egyes kutatócsoportok eredményei megoszlanak erről a kérdéstről. Egyes kutatások a 363S genotípus esetén gyakrabban találtak depresszióra utaló magatartásbeli változásokat (152), azonban mások ilyen megfigyeléseket nem közöltek (153).

A kutatás során kíváncsiak voltunk arra is, hogy egy beteg a polimorfizmus hordozása esetén milyen valószínűséggel számíthat egy vagy több toxicitás egyszerre való megjelenésére a terápia alatt. Ennek megfelelően megnéztük a polimorfizmus megléte és hiánya esetén azt, hogy legalább egy, legalább 2, illetve legalább 3 toxicitás milyen gyakran fordult elő egy vizsgált betegben. Eredményeink igazolták a polimorfizmus megnövekedett glükokortikoid érzékenységet növelő hatását. Mind a 3 esetben azt találtuk, hogy azok a betegek, akik 363S genotípusúak voltak, náluk szignifikánsan gyakrabban halmozódtak a toxicitások.

Összességében tehát azt láthattuk, hogy ez a polimorfizmus a megnövekedett glükokortikoid érzékenység miatt a toxicitások egy részére negatív hatással volt, hiszen azok szignifikánsan gyakrabban fordultak elő a hordozók körében. A toxicitások száma szintén magasabb volt a polimorfizmust hordozó egyéneknél.

VI.1.2. ER22/23EK polimorfizmus

Az ER22/23EK GR polimorfizmus a 2-es exonban jön létre, egyszerre 2 bázis, és egyben 2 aminosav cseréjével jár. Ez az SNP csökkent transzaktivációs kapacitást eredményez a glükokortikoid receptorban, mely a szervezet szteroidok iránti érzékenységének csökkenését eredményezi (144).

A polimorfizmust PCR reakció és olvadáspont analízis segítségével mutattuk ki. Az allélfrekvencia itt is Hardy-Weinberg egyensúlyban volt, a vizsgált populációnk kellően heterogénnek mutatkozott.

Homozigóta beteget a polimorfizmusra nem találtunk jelen esetben sem, hiszen az általunk vizsgált populációban a mutációs allél gyakorisága csupán 1,4% volt. A heterozigóták aránya pedig 3,46%. 10 a 346 vizsgált betegből hordozta az SNP-t. Ez az arány megfelel a nemzetközi irodalomban leírtaknak (159; 144).

Ennek a receptor génpolimorfizmusnak az esetén is megvizsgáltuk a szénhidrátanyagcsere zavar gyakoriságát. Mivel ez a polimorfizmus az irodalmi adatok alapján csökkent szteroid érzékenységgel jár, ezért a szteroid okozta mellékhatások ritkább előfordulását és/vagy kevésbé súlyos voltát vártuk.

Eredményeink azt mutatták, hogy a vizsgált gyermekek között a hordozók esetében cukor anyagcsere zavarra utaló laborparaméter nem mutatkozott, illetve ezen populáció egy tagja sem igényelt emiatt a mellékhatás miatt külön kezelést (pl. inzulin).

Az irodalmi adatok jó része koherens a mi megfigyeléseinkkel. A kutatócsoportok többsége azt találta, hogy a hordozók esetében alacsonyabb éhomi inzulinszintre és magasabb inzulin érzékenységre lehet számítani (161), amik egyértelműen egy kedvezőbb metabolikus panelt és csökkent szteroid érzékenységet valószínűsítenek (163; 159). Természetesen születtek olyan eredmények is, bár kisebb számban, melyek bizonyos paraméterekre ezt a tendenciát nem találták (159), sőt akadnak olyanok is, melyek éppen ellenkező korrelációt mutattak ki. A relatív szteroid érzéketlenséggel viszont a legtöbb cikk egyet ért (159;161;165).

Az egyik igen gyakori szteroid okozta mellékhatás, a magasvérnyomás tekintetében is hasonló eredményeket találtunk, noha az eredmény itt sem volt szignifikáns. A polimorfizmust hordozók körében nem találtunk 95 percentil feletti vérnyomás értékeket, míg ez az arány a nem hordozók körében 20% volt. Az irodalom nagy hangsúlyt fektetett az ER22/23EK polimorfizmus és a metabolikus paraméterek vizsgálatára, melyek alapvetően befolyásolják a hipertóniát. A polimorfizmus kedvezőbb testösszetétellel (159;163;164) és csökkent CAD-tendenciával jár (162). Eredményeink e tekintetben bár nem szignifikánsak, de az általuk mutatott tendencia megfelel az irodalomban közöltekével, vagyis a kedvező metabolikus hatással.

Az irodalom ezen SNP kapcsán is foglalkozik idegrendszeri és magatartásbeli problémákkal, ugyanis a nagy dózisú glükokortikoid terápia a HPA-axis befolyásolásán keresztül különböző pszichiátriai kórállapotokat előidézhet elő (89; 99).

Vizsgálataink tendenciaszerűen azt mutatták, hogy az SNP-re heterozigóta gyermekek körében a nagy dózisú szteroid terápia mellett nem fordult elő neuropátia, szorongás, pszichózis, illetve egyéb magatartásbeli probléma vagy más idegrendszeri kórkép. A különbség, valószínűleg az alacsony elemszám miatt itt sem volt szignifikáns. A mutatkozó tendencia összhangban van olyan irodalmi közlésekkel, mely a polimorfizmus kedvező idegrendszeri, pszichés hatásait hangsúlyozza (pl. jobb kognitív funkciók, 167).

A hepatotoxicitás és az ER22/23EK polimorfizmus kapcsolatáról nem szólnak irodalmi adatok. Mi a 346 beteg esetén nem találtunk szignifikáns különbséget e tekintetben, pusztán csak tendenciabelit, mely az ER22/23EK polimorfizmus protektív hatása felé mutat.

A toxicitások halmozódásának vizsgálatok az egy toxicitás előfordulása tekintetében nem mutatkozott statisztikailag jelentős összefüggés, ahogy a kettő vagy három toxicitás esetén sem, de ez utóbbi két esetben az eredmények azt mutatták, hogy az ER22/23EK polimorfizmus esetében egyszerre kettő vagy három mellékhatás egy betegben egyáltalán nem fordult elő.

Összességében tehát elmondhatjuk, hogy bár e polimorfizmus esetében - valószínűleg az alacsony hordozási arány miatt- szignifikáns különbségek nem jöttek ki, mégis tendenciaszerűen az ER22/23EK polimorfizmus protektív lehet a glükokortikoidok okozta mellékhatásokkal szemben. Az elemszám bővítése a jövőben esetleg bizonyos toxicitások tekintetében szignifikancia megjelenését eredményezheti.

VI.1.3. A BCL1 polimorfizmus

Ahogy a másik két polimorfizmus esetén, úgy a BCL1 polimorfizmusnál is elvégeztem mind a 346 gyermek genetikai vizsgálatát. Jelen esetben ez allél specifikus PCR-t, majd gélelektroforézist jelentette. A DNS-ek kis mennyisége és a már magas hígítási arányok miatt sokszori ismétlés mellett is a 346 gyermek esetében 257-nél sikerült csak értékelhető eredményt kapni, így ezen SNP esetén ennyi gyermek lett bevonva a BCL1 polimorfizmussal kapcsolatos vizsgálatokba.

A bevont gyermekek esetén az allélfrekvenciára érvényes volt a Hardy-Weinberg egyensúly, tehát a populáció megfelelően heterogén maradt ($p=0,33 > 0,05$).

A BCL1 polimorfizmus esetén az a külön érdekesség, hogy ennek a gyakorisága az irodalmi adatok alapján viszonylag magas: 25,7%- 49,2% (144). Mi is hasonlóan emelkedett arányokat találtunk. Még a homozigóták száma is megfelelően magas volt (11,67%) ahhoz, hogy velük külön statisztikai számításokat végezzünk. A heterozigóták százalékos része 40,86% volt.

A fenti eredmények miatt a toxicitások, illetve a többi eredmény pontosabb értékelése érdekében külön számításokat végeztünk a mutációt jelentő G-allélra homozigóta (G/G) egyéneknél. Ennek értelmében a kapott eredményeket minden esetben úgy hasonlítottuk össze, hogy egyszer a két vizsgált csoport a C/C és GC+G/G (BCL1 domináns), másodszor pedig a CC+G/C és G/G (BCL1 recesszív) voltak. Előbbi esetben a G allélt hordozók álltak a G allélt egyáltalán nem hordozó vad típusú homozigótákkal szemben, míg utóbbi esetben csak a BCL1-re homozigótákat vizsgáltuk az egész populációhoz viszonyítva.

A BCL1 polimorfizmus esetén olyan nagy volt a G-allél gyakorisága, hogy így akadtak olyan betegek is, akik nemcsak, hogy hordozták a BCL1 G-allélját, de ugyanakkor az N363S polimorfizmusra is pozitívak voltak. Tehát SNP kombinációt is volt lehetőségünk elemezni.

Az irodalmi adatok alapján a BCL1 polimorfizmus megnövekedett glükokortikoid érzékenységgel jár. Ennek oka nem ismert, ráadásul a polimorfizmus intronikus régióban van, így befolyásoló szerepének pontos oka még inkább kérdéses (163). Kutatások egy része arról számol be, hogy a G-allél megnövekedett BMI értékekkel jár és obesitasra hajlamosít (169). Egyes kutatások pozitív összefüggést találtak a magasvérnyomás (172), a magasabb inzulin szint és a G-allél között.

Kutatásunk során mi nem találtunk szignifikáns összefüggést sem a homozigóták, sem a heterozigóták esetében a hipertóniával vagy a szénhidrátanyagcsere zavarral. Az irodalomban születtek cikkek, melyek szintén nem igazolták a fenti összefüggéseket (164; 170). Vizsgálataink alkalmával szintúgy nem jelentkezett szignifikáns pozitív korreláció a magatartásbeli zavarok, a hepatotoxicitás és a G-allél között. Ugyanakkor - habár az összefüggés nem volt szignifikáns- olyan tendenciát figyeltünk meg, mely azt jelezi, hogy a G/G homozigóta betegek esetén nagyobb valószínűséggel fordul elő hepatotoxicitás mint a nem homozigótákban (30% vs. 16%, $p=0,23$). Központi idegrendszeri/magatartás zavarok esetén a G/G homozigótnál tendenciaszerűen szintén meg lehetett figyelni nagyobb gyakoriságot ezen mellékhatás előfordulásában, de az eredmény statisztikailag nem volt szignifikáns (20% vs. 11,8%, $p=0,209$).

Szintén nem mutatkozott szignifikánsan pozitív összefüggés az N363S - BCL polimorfizmus kombinációja és a fenti toxicitások esetén, ugyanakkor az előzőekhez hasonlóan tendenciát itt is megfigyelhettünk, amely nem szignifikánsan ugyan, de azt sugallja, hogy a kombinációval rendelkező, nagy dózisu szteroidot kapó betegek esetén nagyobb a valószínűsége a szénhidrát anyagcserezavarnak (22,22% vs. 6,1%, $p=0,113$).

A toxicitások halmozódásának vizsgálatakor egyik csoport esetén sem figyeltünk meg korrelációt a BCL1 polimorfizmussal. A G-allél nem mutatkozott hajlamosító tényezőnek a szteroid okozta mellékhatások többszörös fellépésében sem, sőt GG genotípus esetén nem fordult elő 3 toxicitás fellépése együttesen, noha ez az eredmény nem volt szignifikáns ($p=0.563$).

Az N363S polimorfizmussal való kombináció esetén szintén nem volt ilyen tendencia megfigyelhető.

A BCL1 polimorfizmussal kapcsolatban tehát összességében elmondhatjuk azt, hogy bár az irodalmi adatok egy része megnövekedett glükokortikoid érzékenységről számol be, mi magunk ezt a korrelációt 257 nagy dózisu szteroid terápiaiban részesülő betegnél nem figyeltük meg.

VI.2. N363S, ER22/23EK, a BCL1 glükokortikoid receptor polimorfizmusok és a 8. napi prednisolon válasz

A toxicitások elemzése azok megelőzése érdekében kiemelt feladatnak számít. Azonban a terápia eredményességének vizsgálata szintén alapvető. PhD munkám során olyan összefüggéseket is kerestünk a fenti glükokortikoid receptor polimorfizmusokkal kapcsolatban, melyek esetleg a gyermekkori ALL prognózisát befolyásolhatják.

Tekintettel arra a tényre, hogy a 8. napi prednisolon válasz az ALL gyógyulása szempontjából az egyik legfontosabb prognosztikai faktor (21), ezért fontosnak tartottuk annak a vizsgálatát is a polimorfizmusok tükrében. Definíció szerint akkor tekintjük a 8. napi prednisolon választ megfelelőnek – és így beszélhetünk „jó prednisolon válaszról” –, amennyiben az ezen a napon vett perifériás vérben a limfoblasztok száma 1G/L alatt van (22).

Az irodalomban eddig még nem jelent meg olyan közlemény, mely összefüggést talált volna ezen faktor és bármely általunk vizsgált glükokortikoid receptor polimorfizmus között.

Ha meggondoljuk, hogy az N363S polimorfizmus megnöveli a glükokortikoid iránti érzékenységet, akkor érthetővé válik, hogy a fent bemutatott toxicitások jó része miért mutatott vele pozitív korrelációt. Ugyanakkor a megnövekedett szteroid szenzitivitás miatt a prednisolon válasz esetén pedig épphogy kedvezőbb eredményre számíthatnánk. Ez így is történt az N363S polimorfizmus esetén, ugyanis a 32 hordozó közül senki sem mutatkozott rossz prednisolon válaszádnak. Ezzel szemben a nem hordozóknál az 1G/L feletti blaszt szám arány 8,3% volt. Úgy tűnik tehát, hogy a megnövekedett érzékenység a terápia szempontjából egy kedvező faktort jelenthet.

Épp ellenkező eredményt várhatnánk az ER22/23EK polimorfizmus kapcsán, mely csökkenti a glükokortikoidokkal szembeni érzékenységet. Ugyanakkor, mint láthattuk ez az SNP a toxicitásokkal szemben protektívnek bizonyult.

Az ER22/23EK polimorfizmus esetén sem jelentkezett egyik hordozónál sem rossz prednisolon válasz. Valószínűleg ez az eredmény a polimorfizmus szakirodalomban is megfigyelt alacsony előfordulása miatt jöhetett ki. A hordozók száma mindössze 10 volt a 346-ból. Az esetszám további növelésével esetleg megváltozhatna a fenti eredmény.

A BCL1 polimorfizmus esetén érdekes megfigyelés volt, hogy a polimorfizmusra heterozigóta betegek (C/G) körében igen, de homozigóta esetben (G/G) –noha az eredmény nem volt szignifikáns ($p=0,198$) - már nem jelentkezett rossz prednisolon válasz. Ez azt valószínűsíti - ahogy az N363S polimorfizmusnál is -, hogy megnövekedett glükokortikoid érzékenységgel jár a polimorfizmus. Az irodalomban egyébként szintén a BCL1 homozigóta előfordulás esetén figyeltek meg – de ott kedvezőtlen – összefüggést az overall survival aránnyal (180).

A BCL1-N363S kombináció esetén nem jelentkezett rossz prednisolon válasz, ami nem is meglepő, hiszen mind a két polimorfizmus növeli a glükokortikoidok iránti érzékenységet. Ugyanakkor eredményünk jelen esetben sem volt szignifikáns ($p=0,500$).

Az irodalomban ezidáig nagyon kevés cikk foglalkozott az általunk vizsgált polimorfizmusok és az ALL kimenetelében fontos prognosztikai faktorokkal (179-181). Közülük egyik sem talált egy prognosztikai faktortal sem összefüggést.

VI.3. N363S, ER22/23EK és a BCL1 polimorfizmusok, valamint az 5 éves EFS és OS

Az ALL-ből való gyógyulás a terápia alatti legfőbb cél. Azonban ennek tartóssága szintén alapvető fontossággal bír.

Az 5-éves eseménymentes túlélés a diagnózis kezdetétől azt az eltelt 5 évet jelenti, melyben nem fordul elő relapszus vagy halál (12). Az 5 éves teljes túlélés ugyanezen időszak alatt csak az esetlegesen bekövetkező halálozást értékeli.

A fenti polimorfizmusok a megváltozott glükokortikoid érzékenység miatt esetleg terápiás konzekvenciával is bírhatnak, mely akár túlélésekre is kihathat. A glükokortikoid receptor polimorfizmusok hatását tulajdonképpen úgy is elképzelhetnénk, mintha a szteroidokkal kapcsolatban dózismódosítást végeztünk volna egy nem hordozó egyénen. Dózismódosításnál pedig nyilvánvalóan érdemes vizsgálni a túlélésekben esetlegesen bekövetkező változásokat. Kutatásunk ily módon célul tűzte ki az 5 éves EFS és OS vizsgálatát is. Ezzel az ötlettel természetesen nem voltunk egyedül, ugyanis, ha nem is nagy számban, de az irodalomban korábban szintén megjelentek hasonló összefüggést kereső kutatások (179-182).

Az N363S polimorfizmus tekintetében a hordozók körében, akiknél megnövekedett a glükokortikoid okozta érzékenység, szignifikánsan jobb 5 éves túlélési eredmények mutatkoztak mind az EFS ($p=0,012$), mind az OS ($p=0,013$) tekintetében, mely egy relatíve megemelt glükokortikoid hatásként fogható fel.

A glükokortikoid hatást csökkentő ER22/23EK polimorfizmus esetében nem találtuk szignifikáns összefüggést sem az 5 éves EFS, sem az 5 éves OS tekintetében, azonban olyan tendencia mutatkozott, mely a hordozók esetén jelzett kedvezőtlenebb alakulást, mely egy relatív glükokortikoid rezisztenciát is jelezhet.

Szintén nem találtunk korrelációt az 5 éves EFS vagy OS és a BCL1 G-allélja között. Az 5 éves EFS nem különbözött szignifikánsan a G-allélt hordozók körében. A

homozigóta GG genotípusúak tekintetében sem jött ki szignifikáns eredmény sem az eseménymentes, sem pedig a teljes túlélésre.

Az irodalomban, ahogy azt már említettem, csak nagyon kevés kutatás foglalkozott eddig a vizsgált polimorfizmusok, illetve az ALL szempontjából fontos prognosztikai faktorok, illetve az overall survival (OS) és az EFS kapcsolatával (179-182). Ezek közül Fleury és munkatársain kívül egyik kutatás sem talált semmilyen összefüggést a fenti 2 tényezővel. Az említett munkacsoport is csak a G/G genotípus esetén figyelt meg negatív hatást OS-re (180). Mi ezt nem találtuk; a G/G genotípus vs. GC+CC genotípusú csoportok között az OS tekintetében nem volt szignifikáns összefüggés ($p=0,849$).

Eredményeink az 5 éves túlélés tekintetében megegyeznek tehát a nemzetközi statisztikákkal azt leszámítva, hogy mi az N363S tekintetében szignifikáns és kedvező összefüggést találtunk mind az 5 éves EFS-lal, mind pedig az OS-lal kapcsolatban ($p=0,012$ és $0,013$) (19. és 20. ábra).

A vizsgálatot természetesen limitálja az, hogy az 5 évre mutató adatokat nagyon nehéz értelmezni csak a szteroidok függvényében, hiszen addigra a leukémiás gyermekek már számtalan nagy dózisú citosztatikus kezelésen vannak túl, melyek nyilvánvalóan szintén alapvetően meghatározzák az 5 éves EFS-t.

VII. KÖVETKEZTETÉSEK

1. PhD munkám során az N363S polimorfizmus kapcsán a hepatotoxicitás, a szénhidrát anyagcserezavar tekintetében az ALL-es nagy dózisú szteroid terápiában részesülő gyermekek körében azt találtuk, hogy ez az SNP növeli a glükokortikoidok iránti érzékenységet. Szintén növekedett érzékenységet bizonyított az is, hogy a prednisolon válasz „cserébe a sok toxicitásért” minden hordozó esetén kedvező volt, illetve, hogy a 363S genotípus esetén statisztikailag nagyobb arányban mutatkozott kedvezőbb 5 éves EFS és 5 éves OS is.
2. Eredményeink jó része a toxicitások alacsonyabb előfordulási gyakoriságát, illetve a az ER22/23EK polimorfizmus relatív protektivitását húzzák alá a nagy dózisú szteroid terápia okozta mellékhatások tekintetében. Az ER22/23EK polimorfizmus esetében - az N363S polimorfizmussal ellentétben- nem különbözött a hordozók és a nem hordozók között szignifikánsan sem az 5-éves EFS sem pedig az 5 éves OS. Ezen SNP esetén nem találtunk rossz prednisolon válaszdót a hordozók körében. Az ER22/23EK polimorfizmus az eredményeink alapján tendenciaszerűen csökkenteni látszik a szervezet szteroidokra mutatott érzékenységét, noha szignifikanciát nem találtunk.
3. A BCL1 polimorfizmus esetén a polimorfizmusra homozigóta egyénekben (G/G) nem fordult elő rossz prednisolon válasz, ami a megnövekedett glükokortikoid érzékenység mellett szól. Ugyanakkor ezen genotípus esetén nem fordult elő 3 toxicitás fellépése együttesen sem az ALL-es gyermekek körében. A BCL1-N363S hordozók között szintén nem volt rossz prednisolon válasz, ami megfelelhet annak a ténynek, hogy mind a két polimorfizmus növeli a glükokortikoid érzékenységet. Eredményeink szerint ugyanakkor a különbségek nem voltak szignifikánsak.

4. Az irodalomban eddig még nem került leírásra olyan pozitív korreláció, mely a prednisolon válasz és valamelyik fenti SNP között születt volna meg. A mi eredményeink felvetik az N363S és a BCL1 G/G genotípus esetén a polimorfizmusok kedvező hatását a blasztok eliminálása szempontjából egy megnövekedett glükokortikoid érzékenység talaján, hiszen – bár szignifikancia nem, csak tendencia látszódott- egyik csoportban sem volt rossz prednisolon válaszadó.

5. Az 5 éves EFS-t és OS-t 6 cikk vizsgálta eddig az irodalomban. Egy talált közülük negatív korrelációt a BCL1 GG genotípusa esetén az teljes túléléssel. Mi a receptor érzékenységet növelő N363S polimorfizmus kapcsán pozitív korrelációt találtunk az 5 éves EFS és OS tekintetében, ami összeegyeztethető a kedvezőbb 8. napi prednisolon válasszal ugyanezen polimorfizmus kapcsán.

Jelen kutatási eredmények a jövőbeliekkel kiegészítve felvethetik egy, a glükokortikoid terápiára magasabb rizikójú betegcsoport jelenlétét, akiknél egy szorosabb monitorozás, vagy akár egyénileg meghatározott glükokortikoid gyógyszeradagolás jöhet szóba.

Amennyiben a mi vizsgálati eredményeinket a jövőben több polimorfizmus és azok kombinációinak vizsgálataival kiegészítjük, valamint, ha a betegszámot tovább növeljük, akkor talán lehetőség nyílik majd az ALL szempontjából fontos prognosztikai faktorok és túlélési mutatók jóslására.

VIII.1 ÖSSZEFOGLALÁS

A gyermekkori akut lymphoid leukémia (ALL) terápiája során a glükokortikoidok az egyik legnagyobb antileukémiás hatással rendelkező szereknek. Ezeknek a

vegyületeknek azonban számos toxikus hatása ismert. PhD munkám során vizsgáltam, hogy az ALL kemoterápiája során alkalmazott nagy dózisú glükokortikoid kezelés kapcsán a három, az irodalomban leginkább kutatott glükokortikoid receptor polimorfizmus (N363S, BCL1, ER22/23EK), hogyan befolyásolja a legfontosabb szteroid okozta mellékhatásokat (hepatotoxicitás, szénhidrát anyagcserezavar, magatartási zavarok/idegrendszeri károsodások, magasvérnyomás), valamint az ALL kimenetele szempontából alapvető fontosságú 8. napi prednisolon választ, továbbá az 5 éves eseménymentes (event-free survival-EFS), és teljes túlélést (overall survival-OS). Az N363S polimorfizmus esetén szignifikánsan gyakrabban fordult elő májkárosodás, szénhidrát anyagcserezavar. Ezen polimorfizmus esetén egyszerre több toxicitás statisztikailag magasabb arányban fordult elő ugyanazon beteg esetében. A 363S genotípus esetén nem volt rossz prednisolon válasszal rendelkező gyermek. Az N363S polimorfizmus szignifikánsan jobb 5-éves EFS-lal és 5 éves OS-lal járt együtt. Az ER22/23EK polimorfizmus esetén nem volt olyan beteg, akinél cukorháztartás zavar, magasvérnyomás, vagy magatartásbeli zavarok fordultak volna elő. Az ER22/23EK polimorfizmust hordozók körében egynél több toxicitás nem jelentkezett betegenként, valamint náluk nem találtunk rossz prednisolon válasszal rendelkező beteget. A BCL1 G/G genotípusa esetén szintén nem akadt rossz prednisolon válaszadó, ahogy a BCL1-N363S kombináció esetén sem. A 363S genotípusú egyének bár sok toxicitásra számíthatnak, mégis náluk az 5 éves EFS és 5 éves OS szignifikánsan jobb volt. A relativ szteroid rezisztenciát okozó ER22/23EK polimorfizmus protektívnek bizonyult a toxicitások egy részével szemben tendenciaszerűen, noha szignifikanciát nem találtunk. A BCL1 homozigóta hordozók körében szintén nem akadt rossz prednisolon válaszadó, mely a receptor polimorfizmus miatti megnövekedett szteroid érzékenységet igazolhatja. A két receptor érzékenységet növelő polimorfizmus kombinációja esetén (BCL1-N363S) esetén szintúgy nem találtunk rossz prednisolon válaszadót. Az eredmények alapján a vizsgált elemszám kiterjesztésével egyéni gyógyszeradagolás, illetve egy szorosabb monitorozás szükségessége is felmerülhet a jövőben.

VIII.2 SUMMARY

Glucocorticoids are key drugs in the therapy of paediatric acute lymphoblastic leukemia, however, they have several well known side effects. The most investigated glucocorticoid receptor gene polymorphisms in the literature are the N363S, ER22/23EK and BclII single nucleotide polymorphisms (SNPs). Our aim was to investigate whether these SNPs may have any influence either on the development of the most important glucocorticoid induced toxicities (hepatotoxicity, carbohydrate metabolism abnormalities, behavioral changes, neurological changes, hypertension) or on the day 8. prednisolone response or on the 5-year event-free survival rate (EFS) or on the 5-year overall survival rate (OS) among 346 children with ALL.

Hepatotoxicity occurred more often in the 363S carriers but not in the case of the ER22/23EK SNP. Carbohydrate metabolism abnormalities occurred more often by the N363S polymorphism while no one with the ER22/23EK polymorphism had this toxicity. No patient with hypertension nor with behavior changings nor with neuropathy was observed in the group of the ER22/23EK carriers. The combinaton of the toxicities in one patient occurred significantly more often in the 363S carriers. No patient with two or three glucocorticoid toxicities occurred in the case of the ER22/23EK polymorphism. None of the 363S and ER22/23EK SNP caused poor prednisone response. Both the 5-year EFS and 5-year OS were more favorable in the 363S carriers than in the non carriers. Patients with N363S polymorphism could expect to more severe toxicities but more favorable prednisone response, 5-year event free and 5-year overall survival rate. The carriers of the ER22/23EK polymorphism had less severe or frequent toxicities –however it is not significant - but their 5-year EFS and 5-year OS were not significantly better. In the case of the BCL1 SNP in the G/G homoizigous patients no one had poor prednisolone response. In patients with GG genotype no one had 3 toxicities at the same time. We didn't find neither poor prednisone responder in the case of the combination of the BCL1-N363S SNPs.

Based on our results with the extension of the number of the investigated patients an individual dosing of glucocorticoids and/or the importance of more alertness of the glucocorticoid toxicities can be raised up in the future

IX. IRODALOMJEGYZÉK

1. Wang H, Ouyang H, Lai L, Petrovic-Dovat L, Stankov K, Bogdanovic G, Dovat S. (2014) Pathogenesis and regulation of cellular proliferation in acute lymphoblastic leukemia - the role of Ikaros. *J BUON*, 19:22-8.
2. Tulassay Zsolt, Matolcsy András (szerk). *Az onkológia Tankönyve*, Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió, Budapest, 2011: 546.
3. Howlander N, Noone AM, Krapcho M. *SEER (2013) Cancer Statistics Review, 1975-2010*. Bethesda, Md: National Cancer Institute, based on November 2012 SEER data submission, posted to the SEER web site. Section 28.
4. Wakeford R. (2008) Childhood leukaemia following medical diagnostic exposure to ionizing radiation in utero or after birth. *Radiat Prot Dosimetry*, 132:166–174.
5. Linet MS, Ries LA, Smith MA, Tarone RE, Devesa SS. (1999) Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. *J Natl Cancer Inst*, 91:1051–1058.
6. Margolin JF, Steuber CP, Poplack DG (szerk) *Acute lymphoblastic leukemia in Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa, USA, 4th edition. 2002: 489–544
7. Krajcinovic M1, Lamothe S, Labuda D, Lemieux-Blanchard E, Theoret Y, Moghrabi A, Sinnott D. (2004) Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia, *103:252-257*.
8. Robien K, Ulrich CM. (2003) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGE minireview. *Am J Epidemiol*, 157:571-582.
9. Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, Shane B, Roberts AC, Law GR, Rollinson S, Roman E, Cartwright RA, Morgan GJ. (2002) Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood*, 99:3786-3791.

10. Treviño 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. (2009) Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, 41:1001-1005.
11. Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, Reaman GH, Carroll WL. (2012) Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia from 1990-2005: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*, 30:1663-1669.
12. Koka A, Saygin C, Uzunaslan D, Ozdemir N, Apak H, Celkan T. (2014) A 17-year experience with ALL-BFM protocol in acute lymphoblastic leukemia: prognostic predictors and interruptions during protocol. *Leuk Res*, 38:699-705.
13. Biondi A1, Rizzari C, Valsecchi MG, De Lorenzo P, Aricò M, Basso G, Locatelli F, Lo Nigro L, De Rossi G, Masera G. (2006) Role of treatment intensification in infants with acute lymphoblastic leukemia: results of two consecutive AIEOP studies; *Haematologica*, 91: 534–53.
14. Pieters R, Schrappe M, De Lorenzo P, Hann I, De Rossi G, Felice M, Hovi L, LeBlanc T, Szczepanski T, Ferster A, Janka G, Rubnitz J, Silverman L, Stary J, Campbell M, Li CK, Mann G, Suppiah R, Biondi A, Vora A, Valsecchi MG. (2007) A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet*, 370:240-50.
15. Armstrong SA, Look AT. (2005) Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 23:6306–6315.
16. Seibel NL. (2008) Treatment of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: peaks and pitfalls. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 15:374-80.
17. Harrison CJ. (2009) Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 144:147–56.

18. Carroll WL. (2013) Safety in numbers: hyperdiploidy and prognosis. , 121:2374-6.
19. El Gendi HM, Abdelmaksoud AA, Eissa DG, Abusikkien SA. (2014) Impact of TCF3 Rearrangement on CNS Relapse in Egyptian Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*, 31:638-46.
20. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, Carroll AJ, Heerema NA, Rubnitz JE, Loh ML, Raetz EA, Winick NJ, Hunger SP, Carroll WL, Gaynon PS, Camitta BM. (2007) Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acutelymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognosticmarkers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood*, 109:926-935.
21. Martin S, Martin S. (2009) Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*, 46:52-63.
22. Lauten M, Matthias T, Stanulla M.: Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms within the tumour necrosis factor and the interleukin-10 genes. (2002) *Leukemia*, 16:1437-42.
23. Kovács G., Nagy K. (szerk), A daganatellenes kezelések késői mellékhatásai. *Klinikai onkológia a gyakorlatban*, Medicina, Budapest, 2005: 61-8.
24. Isoda T, Ito S, Kajiwara M, Nagasawa M. (2007) Successful high-dose methotrexate chemotherapy in a patient with acute lymphocytic leukemia who developed acute renal failure during the initial treatment. *Pediatr Int*, 49:1018-9.
25. Stöhr W1, Paulides M, Bielack S, Jürgens H, Treuner J, Rossi R, Langer T, Beck JD. (2007) Ifosfamide-induced nephrotoxicity in 593 sarcoma patients: a report from the Late Effects Surveillance System. *Pediatr Blood Cancer*, 48:447-52.
26. Yaseen Z, Michoudet C, Baverel G, Dubourg L. (2008) In vivo mesna and amifostine do not prevent chloroacetaldehyde nephrotoxicity in vitro. *Pediatr Nephrol*, 3:611-8.

27. Petit E, Langouet S, Akhdar H, Nicolas-Nicolaz C, Guillouzo A, Morel F. (2008) Differential toxic effects of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine on human hepatocytes. *Toxicol In Vitro*, 22:632-42.
28. Uraz S, Tahan V, Aygun C. (2008) Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci*, 53:1071-7.
29. Thongphasuk P, Stremmel W, Chamulitrat W. (2008) Potent direct or TNF-alpha-promoted anticancer effects of 2,3-dehydrosilybin: comparison study with silybin. *Chemotherapy*, 54:23-30.
30. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B. (2006) N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit*, 12:274-8.
31. Mahesh S, Ginzburg Y, Verma A. (2008) Iron overload in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*, 49:427-38.
32. Sonis ST. (1998) Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol*, 34:39-43.
33. Abali H, Celik I. (2007) Tropisetron, ondansetron, and granisetron for control of chemotherapy-induced emesis in Turkish cancer patients: a comparison of efficacy, side-effect profile, and cost. *Cancer Invest*, 25:135-9.
34. Gonzalez-Ibarra F, Eivaz-Mohammadi S, Surapaneni S. (2014) Methotrexate induced pancytopenia. *Case Rep Rheumatol*, 14:679-580.
35. Schmiegelow K, Heyman M, Gustafsson G. (2010) The degree of myelosuppression during maintenance therapy of adolescents with B-lineage intermediate risk acute lymphoblastic leukemia predicts risk of relapse. *Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology (NOPHO). Leukemia*, 24:715-20.
36. Merryman R, Stevenson KE, Gostic WJ, Neuberg D, O'Brien J, Sallan SE, Silverman LB. (2012) Asparaginase-associated myelosuppression and effects on dosing of other chemotherapeutic agents in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 59:925-7.

37. Linnebank M, Malessa S, Moskau S, Semmler A, Pels H, Klockgether T, Schlegel U. (2007) Acute methotrexate-induced encephalopathy--causal relation to homozygous allelic state for MTR c.2756A>G (D919G)? *J Chemother*, 19:455-7.
38. Pound CM, Keene DL, Udjus K (2007) Acute encephalopathy and cerebral vasospasm after multiagent chemotherapy including PEG-asparaginase and intrathecal cytarabine for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*, 29:183-6.
39. Adan L, Trivin C, Sainte-Rose C, Zucker JM, Hartmann O, Brauner R. (2001) GH deficiency caused by cranial irradiation during childhood: Factors and markers in young adults. *J Clin Endocrinol Metab*, 86:5245–5251.
40. Haddy TB, Mosher RB, Nunez SB, Reaman GH. (2006) Growth hormone deficiency after chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children who have not received cranial radiation *Pediatr Blood Cancer*, 46:258-61.
41. Athanassiadou F, Tragiannidis A, Rousso I, Katsos G, Sidi V, Papageorgiou T, Papastergiou C, Tsituridis I, Kolioukas D. (2006) Bone mineral density in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Turk J Pediatr*, 48:101-4.
42. Domenech C, Suciú S, De Moerloose B, Mazingue F, Plat G, Ferster A, Uyttebroeck A, Sirvent N, Lutz P, Yakouben K, Munzer M, Röhrlich P, Plantaz D, Millot F, Philippet P, Dastugue N, Girard S, Cavé H, Benoit Y, Bertrandfor Y. (2014) Children's Leukemia Group (CLG) of European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC): Dexamethasone (6 mg/m²/day) and prednisolone (60 mg/m²/day) were equally effective as induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia in the EORTC CLG 58951 randomized trial. *Children's Leukemia Group (CLG) of European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Haematologica*, 99:1220-7.
43. Çağlar AA, Oğuz A, Pınarlı FG, Karadeniz C, Okur A, Bideci A, Koçak Ü, Bora H. (2014) Thyroid abnormalities in survivors of childhood cancer. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 6:144-51.

44. Bhandare N, Kennedy L, Malyapa RS, Morris CG, Mendenhall WM. (2007) Primary and central hypothyroidism after radiotherapy for head-and-neck tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 68:1131-9.
45. Park MC, Park YB, Jung SY, Chung IH, Choi KH, Lee SK. (2004) Risk of ovarian failure and pregnancy outcome in patients with lupus nephritis treated with intravenous cyclophosphamide pulse therapy. *Lupus*, 13:569-74.
46. Hijjiya N, Hudson MM, Lensing S, Zacher M, Onciu M, Behm FG, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Sandlund JT, Rivera GK, Evans WE, Relling MV, Pui CH. (2007) Cumulative incidence of secondary neoplasms as a first event after childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA*, 297:1207–1215.
47. Szczepanski T, van der Velden VH, Waanders E, Kuiper RP, Van Vlierberghe P, Gruhn B, Eckert C, Panzer-Grümayer R, Basso G, Cavé H, Stadt UZ, Campana D, Schrauder A, Sutton R, van Wering E, Meijerink JP, van Dongen JJ. (2011) Late recurrence of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia frequently represents a second leukemia rather than a relapse: First evidence for genetic predisposition. *J Clin Oncol*, 29:1643–1649.
48. Hartford C, Yang W, Cheng C, Fan Y, Liu W, Treviño L, Pounds S, Neale G, Raimondi SC, Bogni A, Dolan ME, Pui CH, Relling MV. (2007) Genome scan implicates adhesion biological pathways in secondary leukemia. *Leukemia*, 21:2128–2136.
49. Schmiegelow K, Levinsen MF, Attarbaschi A, Baruchel A, Devidas M, Escherich G, Gibson B, Heydrich C, Horibe K, Ishida Y, Liang DC, Locatelli F, Michel G, Pieters R, Piette C, Pui CH, Raimondi S, Silverman L, Stanulla M, Stark B, Winick N, Valsecchi MG. (2013) Second malignant neoplasms after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 31:2469-76.
50. Silverman LB, Stevenson KE, O'Brien JE, Asselin BL, Barr RD, Clavell L, Cole PD, Kelly KM, Laverdiere C, Michon B, Schorin MA, Schwartz CL, O'Holleran EW, Neuberg DS, Cohen HJ, Sallan SE. (2010) Long-term results of Dana-Farber Cancer

Institute ALL Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1985-2000). *Leukemia*, 24:320-34.

51. Ben Tanfous M, Sharif-Askari B, Ceppi F, Laaribi H, Gagné V, Rousseau J, Labuda M, Silverman LB, Sallan SE, Neuberg D, Kutok JL, Sinnott D, Laverdière C, Krajinovic M. (2014) Polymorphisms of asparaginase pathway and asparaginase-related complications in children with acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*, 21:329-34

52. Rizzari C, Conter V, Starý J, Colombini A, Moericke A, Schrappe M. (2013) Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Oncol*, 25:1-9.

53. Kearney SL, Dahlberg SE, Levy DE, Voss SD, Sallan SE, Silverman LB. (2009) Clinical course and outcome in children with acute lymphoblastic leukemia and asparaginase-associated pancreatitis. *Pediatr Blood Cancer*, 53:162-7.

54. Groninger E, Meeuwse-De Boer GJ, De Graaf SS. (2002) Vincristine induced apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells: a mitochondrial controlled pathway regulated by reactive oxygen species? *Int J Oncol*, 21:1339-45.

55. Windebank AJ, Grisold W. (2008) Chemotherapy-induced neuropathy. *J Peripher Nerv Syst*, 13:27-46.

56. Wright MJ, Galea V, Barr RD. (2005) Proficiency of balance in children and youth who have had acute lymphoblastic leukemia. *Phys Ther*, 85:782-790.

57. Bhojwani D, Sabin ND, Pei D, Yang JJ, Khan RB, Panetta JC, Krull KR, Inaba H, Rubnitz JE, Metzger ML, Howard SC, Ribeiro RC, Cheng C, Reddick WE, Jeha S, Sandlund JT, Evans WE, Pui CH, Relling MV. (2014) Methotrexate-induced neurotoxicity and leukoencephalopathy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 32:949-59.

58. Ibrahim MA, El-Sheikh AA, Khalaf HM. (2014) Protective effect of peroxisome proliferator activator receptor (PPAR)- α and γ ligands against methotrexate-induced nephrotoxicity. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 36:130-7.

59. Gorlick R, Goker E, Trippett T. (2014) Protective effect of peroxisome proliferator activator receptor (PPAR)- α and - γ ligands against methotrexate-induced nephrotoxicity. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 36:130-7.
60. 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*, 21:679-86.
61. Cheng Q, Wu B, Kager L. (2004) A substrate specific functional polymorphism of human [gamma]-glutamyl hydrolase alters catalytic activity and methotrexate polyglutamate accumulation in acute lymphoblastic leukaemia cells. *Pharmacogenet Genomics*, 14:557-67.
62. Qiu A, Jansen M, Sakaris A. (2008) Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*. 2006;127:917–928.
63. Gradhand U, Kim RB.: Pharmacogenomics of MRP transporters (ABCC1-5) and BCRP (ABCG2) *Drug Metab Rev*, 40:317–354.
64. Chiusolo P, Reddiconto G, Casorelli I, Laurenti L, Sorà F, Mele L, Annino L, Leone G, Sica S. (2002) Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate. *Ann Oncol*, 13:1915-8.
65. Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H. (2002) Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics*, 12:183-90.
66. Van Triest B, Pinedo HM, Giaccone G. (2000) Downstream molecular determinants of response to 5-fluorouracil and antifolate thymidylate synthase inhibitors. *Ann Oncol*, 11:385-91.

67. Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM. (1991) Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res*, 51:828-35.
68. 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*, 20:191-7.
69. Krajcinovic M, Costea I, Chiasson S. (2002) Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 359:1033-4.
70. Kondo N, Takahashi A, Ono K, Ohnishi T. (2010) DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *J Nucleic Acids*, 543531.
71. Manger K, Wildt L, Kalden JR, Manger B. (2006) Prevention of gonadal toxicity and preservation of gonadal function and fertility in young women with systemic lupus erythematosus treated by cyclophosphamide: the PREGO-Study. *Autoimmun Rev*, 5:269-72.
72. Rehman MU1, Tahir M, Ali F, Qamar W, Lateef A, Khan R, Quaiyoom A, Oday-O-Hamiza, Sultana S. (2012) Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity, and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino mice: the protective effect of Ellagic acid. *Mol Cell Biochem*, 365:119-27.
73. Kim KI, Huh IS, Kim IW, Park T, Ahn KS, Yoon SS, Yoon JH, Oh JM. (2013) Combined interaction of multi-locus genetic polymorphisms in cytarabine arabinoside metabolic pathway on clinical outcomes in adult acute myeloid leukaemia (AML) patients. *Eur J Cancer*, 49:403-10.
74. Stentoft J. (1990) The toxicity of cytarabine. *Drug Saf*, 5:7-27.
75. Lochhead J, Salmon J F, Bron AJ. (2003) Letter to the Journal. Cytarabine-induced corneal toxicity. *Eye*, 17, 677–678.
76. Amoozgar H, Zareifar S, Borzoie M, Qasem F. (2014) Heart repolarization changes after anthracycline therapy in the children with cancer. *Iran J Ped Hematol Oncol*, 4:103-8.

77. Floyd JD, Nguyen DT, Lobins RL, Bashir Q, Doll DC, Perry MC. (2005) Cardiotoxicity of cancer therapy. *J Clin Oncol*, 23:7685–96.
78. Tebbi CK, London WB, Friedman D, Villaluna D, De Alarcon PA, Constine LS, Mendenhall NP, Sposto R, Chauvenet A, Schwartz CL. (2007) Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*, 25:493-500.
79. Nelson JA. (1992) Mechanism of actions of thiopurines used in curative therapy for childhood leukemias. *Cancer Bull*, 44: 470–473.
80. Vora A, Mitchell CD, Lennard L, Eden TO, Kinsey SE, Lilleyman J, Richards SM. (2006) Medical Research Council; National Cancer Research Network Childhood Leukaemia Working Party: Toxicity and efficacy of 6-thioguanine versus 6-mercaptopurine in childhood lymphoblastic leukaemia: a randomised trial. *Medical Research Council; National Cancer Research Network Childhood Leukaemia Working Party. Lancet*, 368:1339-48.
81. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnott D, Théorêt Y, Seidman EG (2000) disease. *Gastroenterology*, 118:705.
82. Chabner BA, Longo DL. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practise*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001, 75-78.
83. Weinshilboum RM, Sladek SL. (1980) Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet*, 32:651-62.
84. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, Relling MV, Evans WE. (1997) Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Annals of Internal Med*, 126:608-14.
85. McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV, Evans WE. (2000) Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 14:567-72.

86. Smith SM, Vale WW. (2006) The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci*, 8:383-95.
87. Raffin-Sanson ML, de Keyzer Y, Bertagna X. (2003) Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions. *Eur J Endocrinol*, 149:79–90.
88. Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland H, Boston B, Chen W, Orth DN, Pouton C, Kesterson RA. (1996) The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res*, 51:287–317.
89. Stratakis CA. (2012) Cushing Syndrome in Pediatrics. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 41: 793–803.
90. Jelić S, Čupić Ž, Kolar-Anić L. (2005) Mathematical modeling of the hypothalamic–pituitary–adrenal system activity. *Math. Biosci*, 197: 173–187.
91. Nader N, Chrousos G, Kino T (2009) Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA-axis. *Trends Endocrinol. Metab*, 21:277–286.
92. Foster R, Hankins M. (2007) Circadian vision. *Curr. Biol*, 17 :746–751.
93. Schwaber JS, Kapp BS, Higgins GA, Rapp PR. (1982) Amygdaloid and basal forebrain direct connections with the nucleus of the solitary tract and the dorsal motor nucleus. *J Neurosci*, 2:1424–1438.
94. Forray MI, Gysling K. (2004) Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Res Brain Res Rev*, 47:145–160.
95. Oakley RH, Cidlowski JA. (2011) Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem*, 286:3177–3184.
96. Clark AR, Belvisi MG. (2012) Maps and legends: the quest for dissociated ligands of the glucocorticoid receptor. *Pharmacol Ther*, 134:54–67.

97. Harris A, Seckl J (2011) Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm Behav*, 59:279–289.
98. Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Krieglstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K, Schütz G. (1995) Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev*, 9:1608–1621.
99. Silverman MN, Sternberg EM. (2012) Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*, 1261:55–63.
100. Ambroggi F, Turiault M, Milet A, Deroche-Gamonet V, Parnaudeau S, Balado E, Barik J, van der Veen R, Maroteaux G, Lemberger T, Schütz G, Lazar M, Marinelli M, Piazza PV, Tronche F. (2009) Stress and addiction: glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons facilitates cocaine seeking. *Nat Neurosci*, 12:247–249.
101. Chourbaji S, Gass P. (2008) Glucocorticoid receptor transgenic mice as models for depression. *Brain Res Rev*, 57:554–560.
102. Edelman JL. (2010) Differentiating intraocular glucocorticoids. *Ophthalmologica*, 224:25–30.
103. Kiernan DF, Mieler WF. (2009) The use of intraocular corticosteroids. *Expert Opin Pharmacother*, 10:2511–2525.
104. Pimenta E, Wolley M, Stowasser M. (2012) Adverse cardiovascular outcomes of corticosteroid excess. *Endocrinology*, 153:5137–5142.
105. Lee SR, Kim HK, Youm JB, Dizon LA, Song IS, Jeong SH, Seo DY, Ko KS, Rhee BD, Kim N, Han J. (2012) Non-genomic effect of glucocorticoids on cardiovascular system. *Pflugers Arch*, 464:549–559.
106. Nussinovitch U, de Carvalho JF, Pereira RM. (2010) Glucocorticoids and the cardiovascular system: state of the art. *Curr Pharm Des*, 16:3574–3585.

107. Ren R, Oakley RH, Cruz-Topete D, Cidlowski JA. (2012) Dual role for glucocorticoids in cardiomyocyte hypertrophy and apoptosis. *Endocrinology*, 153:5346–5360.
108. Tsai WS, Wu CP, Hsu YJ, Lin SH. (2004) Life-threatening hypokalemia in an asthmatic patient treated with high-dose hydrocortisone. *Am J Med Sci*, 327:152-5.
109. Cao Y, Bender IK, Konstantinidis AK, Shin SC, Jewell CM, Cidlowski JA, Schleimer RP, Lu NZ. (2013) Glucocorticoid receptor translational isoforms underlie maturational stage-specific glucocorticoid sensitivities of dendritic cells in mice and humans. *Blood*, 121:1553-62.
110. Busillo JM, Cidlowski JA. (2013) The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends Endocrinol Metab*, 24:109-19.
111. Zen M, Canova M, Campana C, Bettio S, Nalotto L, Rampudda M, Ramonda R, Iaccarino L, Doria A. (2011) The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmun Rev*, 10:305–31.
112. Kaur M, Smyth LJ, Cadden P, Grundy S, Ray D, Plumb J, Singh D. (2012) T lymphocyte insensitivity to corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*, 13:20.
113. Opherck C, Tronche F, Kellendonk C, Kohlmüller D, Schulze A, Schmid W, Schütz G. (2004) Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mol Endocrinol*, 18:1346-53.
114. Anil TM, Dandu A, Harsha K, Singh J, Shree N, Kumar VS, Lakshmi MN, Sunil V, Harish C, Balamurali GV, Naveen Kumar BS, Gopala AS, Pratibha S, Sadasivuni M, Anup MO, Moolemath Y, Venkataranganna MV, Jagannath MR1, Somesh BP. (2014) A novel 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type1 inhibitor CNX-010-49 improves hyperglycemia, lipid profile and reduces body weight in diet induced obese C57B6/J mice with a potential to provide cardio protective benefits. *BMC Pharmacol Toxicol*, 15:43.

115. Shpilberg Y, Beaudry JL, D'Souza A, Campbell JE, Peckett A, Riddell MC. (2012) A rodent model of rapid-onset diabetes induced by glucocorticoids and high-fat feeding. *Dis Model Mech*, 5:671–680.
116. Mueller KM, Themanns M, Friedbichler K, Kornfeld JW, Esterbauer H, Tuckermann JP, Moriggl R. (2012) Hepatic growth hormone and glucocorticoid receptor signaling in body growth, steatosis and metabolic liver cancer development. *Mol Cell Endocrinol*, 361:1–11.
117. Lianne S. Gensler, MD. (2013) Glucocorticoids. Complications to Anticipate and Prevent. *The Neurohospitalist*, 3: 92-97.
118. Saag KG, Shan E, Boonen S. (2007) Teraparatide or alendronate in glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med*, 357:2028–2039.
119. Hanaoka BY, Peterson CA, Crofford LJ. (2012) Glucocorticoid effects on skeletal muscle: benefit and risk in patients with autoimmune inflammatory rheumatoid diseases. *Expert Rev Clin Immunol*, 8:695–697.
120. Menconi M, Fareed M, O'Neal P, Poylin V, Wei W, Hasselgren PO. (2007) Role of glucocorticoids in the molecular regulation of muscle wasting. *Crit Care Med*, 35:602–608.
- 121 Hanaoka BY, Peterson CA, Horbinski C, Crofford LJ. (2012) Implications of glucocorticoid therapy in idiopathic inflammatory myopathies. *Nat Rev Rheumatol*. 8:448–457.
122. Coenraads PJ. (2012) Hand eczema. *N Engl J Med*, 367:1829–1837.
123. Sanchis A, Alba L, Latorre V, Sevilla LM, Pérez P. (2012) Keratinocyte-targeted overexpression of the glucocorticoid receptor delays cutaneous wound healing. *PLoS One*, 7:29701.
124. Yudit MR, Cidlowski JA. (2002) The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol*, 16:1719-26.

125. Kadmiel M, Cidlowski JA. (2013) Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci*, 34:518-30.
126. Grad I, Picard D. (2007) The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol*, 275:2–12.
127. van Rossum EF, Roks PH, de Jong FH, Brinkmann AO, Pols HA, Koper JW, Lamberts SW. (2004) Characterization of a promoter polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and its relationship to three other polymorphisms. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 61:573-81.
128. Oakley RH, Cidlowski JA. (2013) The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*, 132:1033-44.
129. Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joëls M. (2012) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol*, 350:299–309.
130. Solito E1, Mulla A, Morris JF, Christian HC, Flower RJ, Buckingham JC. (2003) Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology*, 144:1164–74.
131. Buttgereit F, Brand MD, Burmester GR. (1999) Equivalent doses and relative drug potencies for non-genomic glucocorticoid effects: a novel glucocorticoid hierarchy. *Biochem Pharmacol*, 58:363-8.
132. Koper JW, van Rossum EF, van den Akker EL. (2014) Glucocorticoid receptor polymorphisms and haplotypes and their expression in health and disease. *Steroids*, 92:62-73.
133. Kino T, Su YA, Chrousos GP. (2009) Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci*, 66:3435–48.

134. Webster JC, Oakley RH, Jewell CM, Cidlowski JA. (2001) Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:6865–70.
135. Lewis-Tuffin LJ, Cidlowski JA. (2006) The physiology of human glucocorticoid receptor beta(hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann NY Acad Sci*, 1069:1–9.
136. Beger C, Gerdes K, Lauten M, Tissing WJ, Fernandez-Munoz I, Schrappe M, Welte K. (2003) Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in human leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach. *Br J Haematol*, 122:245–52.
137. Cercato C, Halpern A, Frazzatto ES, Guazzelli IC, Villares SM. (2009) The N363S polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: effects on visceral fat assessed by abdominal computed tomography. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 53:288-92.
138. van Rossum EF, Lamberts SW. (2004) Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res*, 59:333-57.
139. Srivastava N, Prakash J, Lakhan R, Agarwal CG, Pant DC, Mittal B. (2011) Influence of Bcl-1 Gene Polymorphism of Glucocorticoid Receptor Gene (NR3C1, rs41423247) on Blood Pressure, Glucose in Northern Indians. *Indian J Clin Biochem*, 26:125-30.
140. van Rossum EF, Koper JW, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Arp P, Ester W, Janssen JA, Brinkmann AO, de Jong FH, Grobbee DE, Pols HA, Lamberts SW. (2003) Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 59:585–592.
141. Tissing WJ, Meijerink JP, den Boer ML, Pieters R. (2003) Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 17:17-25.

142. Helmberg A, Auphan N, Caelles C, Karin M. (1995) Glucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor. *EMBO J*, 14:452-60.
143. Jewell CM, Cidlowski JA. (2007) Molecular evidence for a link between the N363S glucocorticoid receptor polymorphism and altered gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*, 92:3268-77.
144. Russcher H, Smit P, van den Akker EL, van Rossum EF, Brinkmann AO, de Jong FH, Lamberts SW, Koper JW. (2005) Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*, 90:5804-10.
145. Cellini E, Castellini G, Ricca V, Bagnoli S, Tedde A, Rotella CM, Faravelli C, Sorbi S, Nacmias B. (2010) Glucocorticoid receptor gene polymorphisms in Italian patients with eating disorders and obesity. *Psychiatric Genet*, 20:282–288.
146. Di Blasio AM, van Rossum EF, Maestrini S, Berselli ME, Tagliaferri M, Podestà F, Koper JW, Liuzzi A, Lamberts SW. (2003) The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients. *Clin Endocrinol*, 59:68–74.
147. Roussel R, Reis AF, Dubois-Laforgue D, Bellanné-Chantelot C, Timsit J, Velho G. (2003) The N363S polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is associated with overweight in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 59:237-41.
148. Lin RC, Wang XL, Morris BJ. (2003) Association of coronary artery disease with glucocorticoid receptor N363S variant. *Hypertension*, 41:404-7.
149. Luczay A1, Török D, Ferenczi A, Majnik J, Sólyom J, Fekete G. (2006) Potential advantage of N363S glucocorticoid receptor polymorphism in 21-hydroxylase deficiency. *Eur J Endocrinol*, 154:859-64.
150. Majnik J, Patócs A, Balogh K, Luczay A, Török D, Szabó V, Borgulya G, Gergics P, Szappanos Á, Bertalan R, Boyle B, Tőke J, Sereg M, Nagy Z Zs, Sólyom J, Tóth M, Gláz E, Rácz K, Németh J, Fekete Gy, Tulassay Zs. (2006) A

glükokortikoidreceptor gén szekvenciavariánsai és jelentőségük a glükokortikoid iránti érzékenység meghatározásában. *Orvosi Hetilap*, 44:2107-15.

151. Wüst S, Van Rossum EF, Federenko IS, Koper JW, Kumsta R, Hellhammer DH. (2004) Common polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene are associated with adrenocortical responses to psychosocial stress. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89:565–573.

152. van Rossum EF, Binder EB, Majer M, Koper JW, Ising M, Modell S, Salyakina D, Lamberts SW, Holsboer F. (2006) Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and major depression. *Biol Psychiatry*, 59:681–688.

153. Szczepankiewicz A, Leszczyńska-Rodziewicz A, Pawlak J, Rajewska-Rager A, Dmitrzak-Weglarz M, Wilkosc M, Skibinska M, Hauser J. (2011) Glucocorticoid receptor polymorphism is associated with major depression and predominance of depression in the course of bipolar disorder. *J Affect Disord*, 134:138–144.

154. Echwald SM, Sørensen TI, Andersen T, Pedersen O. (2001) The Asn363Ser variant of the glucocorticoid receptor gene is not associated with obesity or weight gain in Danish men. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*, 25:1563–1565.

155. Lin RC1, Wang XL, Dalziel B, Caterson ID, Morris BJ. (2003) Association of obesity, but not diabetes or hypertension, with glucocorticoid receptor N363S variant. *Obes. Res*, 11:802–808.

156. van Winsen LM, Hooper-van Veen T, van Rossum EF, Koper JW, Barkhof F, Polman CH, Uitdehaag BM. (2007) Glucocorticoid receptor gene polymorphisms associated with more aggressive disease phenotype in MS. *J. Neuroimmunol*, 186:150–155.

157. van Oosten MJ, Dolhain RJ, Koper JW, van Rossum EF, Emonts M, Han KH, Wouters JM, Hazes JM, Lamberts SW, Feelders RA. (2007) Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene which modulate glucocorticoid sensitivity are associated with rheumatoid arthritis. Abstract Annual European Congress of Rheumatology (EULAR), Barcelona 2007.

158. Bonifati DM, Witchel SF, Ermani M, Hoffman EP, Angelini C, Pegoraro E. (2006) The glucocorticoid receptor N363S polymorphism and steroid response in Duchenne dystrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 77:1177–1179.
159. van Rossum EF, Voorhoeve PG, te Velde SJ, Koper JW, Delemarre-van de Waal HA, Kemper HC, Lamberts SW. (2004) The ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is associated with a beneficial body composition and muscle strength in young adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 89:4004–4009.
160. Wüst S, Van Rossum EF, Federenko IS, Koper JW, Kumsta R, Hellhammer DH. (2004) Common polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene are associated with adrenocortical responses to psychosocial stress. *J Clin Endocrinol Metab*, 89:565-73.
161. van Rossum EF, Koper JW, Huizenga NA, Uitterlinden AG, Janssen JA, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, van Duyn CM, Pols HA, Lamberts SW. (2002) A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes*, 51: 3128–3134.
162. Koeijvoets KC, van Rossum EF, Dallinga-Thie GM, Steyerberg EW, Defesche JC, Kastelein JJ, Lamberts SW, Sijbrands EJ. (2006) A functional polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and its relation to cardiovascular disease risk in familial hypercholesterolemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 91: 4131–4136.
163. Manenschijn L, van den Akker EL, Lamberts SW, van Rossum EF. (2009) Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms. An overview. *Ann N Y Acad Sci*, 1179:179-98.
164. Kuningas M, Mooijaart SP, Slagboom PE, Westendorp RG, van Heemst D. (2006) Genetic variants in the glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and cardiovascular disease risk. The Leiden 85-plus Study. *Biogerontology*, 7: 231–238.
165. van Winsen LM, Hooper-van Veen T, van Rossum EF, Koper JW, Barkhof F, Polman CH, Uitdehaag BM. (2007) Glucocorticoid receptor gene polymorphisms associated with more aggressive disease phenotype in MS. *J. Neuroimmunol*, 186: 150–155.

166. van den Akker EL, Nouwen JL, Melles DC, van Rossum EF, Koper JW, Uitterlinden AG, Hofman A, Verbrugh HA, Pols HA, Lamberts SW, van Belkum A. (2006) Staphylococcus aureus nasal carriage is associated with glucocorticoid receptor gene polymorphisms. *J. Infect. Dis*, 194: 814–818.
167. van Rossum EF, de Jong FJ, Koper JW, Uitterlinden AG, Prins ND, van Dijk EJ, Koudstaal PJ, Hofman A, de Jong FH, Lamberts SW, Breteler MM. (2008) Glucocorticoid receptor variant and risk of dementia and white matter lesions. *Neurobiol. Aging*, 29: 716–723.
168. Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, Chagnon M, Pérusse L, Lindell K, Carlsson B, Bouchard C, Björntorp P. (2000) A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Obes. Res*, 8: 211–218.
169. Tremblay A, Bouchard L, Bouchard C, Després JP, Drapeau V, Pérusse L. (2003) Long-term adiposity changes are related to a glucocorticoid receptor polymorphism in young females. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 88: 3141–3145.
170. Clément K, Philippi A, Jury C, Pividal R, Hager J, Demenais F, Basdevant A, Guy-Grand B, Froguel P. (1996) Candidate gene approach of familial morbid obesity: linkage analysis of the glucocorticoid receptor gene. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*, 20: 507–512.
171. Weaver JU, Hitman GA, Kopelman PG (1992) An association between a BcII restriction fragment length polymorphism of the glucocorticoid receptor locus and hyperinsulinaemia in obese women. *J. Mol. Endocrinol*, 9: 295–300.
172. Watt GC, Harrap SB, Foy CJ, Holton DW, Edwards HV, Davidson HR, Connor JM, Lever AF, Fraser R. (1992) Abnormalities of glucocorticoid metabolism and the renin-angiotensin system: a four-corners approach to the identification of genetic determinants of blood pressure. *J. Hypertens*, 10: 473–48.
173. Werner, S.C. (1977) Modification of the classification of the eye changes of Graves' disease: recommendations of the Ad Hoc Committee of the American Thyroid Association. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 44: 203–204.

174. Lee EB, Kim JY, Lee YJ, Song YW. (2005) Glucocorticoid receptor polymorphisms in Korean patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis*, 64: 503–504.
175. Krishnamurthy P, Romagni P, Torvik S, Gold PW, Charney DS, Detera-Wadleigh S, Cizza G. (2008) P.O.W.E.R. (Premenopausal, Osteoporosis Women, Alendronate, Depression) Study Group: Glucocorticoid receptor gene polymorphisms in premenopausal women with major depression. *Horm. Metab. Res*, 40: 194–198.
176. Bachmann AW, Sedgley TL, Jackson RV, Gibson JN, Young RM, Torpy DJ. (2005) Glucocorticoid receptor polymorphisms and post-traumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology*, 30: 297–306.
177. Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM, Mak TW. (1998) Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*, 94: 339–352.
178. Kofler R. (2000) The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells. *Histochem Cell Biol*, 114:1–7.
179. Namazi S, Zareifar S, Monabati A, Ansari S, Karimzadeh I. (2011) Evaluating the effect of 3 glucocorticoid receptor gene polymorphisms on risk of relapse in 100 Iranian children with acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Clin Ther*, 33:280-90.
180. Fleury I, Primeau M, Doreau A, Costea I, Moghrabi A, Sinnett D, Krajcinovic M. (2004) Polymorphisms in genes involved in the corticosteroid response and the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia *Am J Pharmacogenomics*, 4:331–341.
181. Labuda M, Gahier A, Gagné V, Moghrabi A, Sinnett D, Krajcinovic M. (2010) Polymorphisms in glucocorticoid receptor gene and the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leuk Res*, 34:492–497.
182. Tissing WJ, Meijerink JP, den Boer ML, Brinkhof B, van Rossum EF, van Wering ER, Koper JW, Sonneveld P, Pieters R. (2005) Genetic variations in the glucocorticoid

receptor gene are not related to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*, 11:6050–6056.

183. Gergics P, Patocs A, Majnik J, Balogh K, Szappanos A, Toth M, Racz K. (2006) Detection of the Bcl I polymorphism of the glucocorticoid receptor gene by single-tube allele-specific polymerase chain reaction. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 100:161-6.

184. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. (2009) Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol*, 169:505-14.

185. Eipel OT, Németh K, Török D, Csordás K, Hegyi M, Panyi A, Ferenczy A, Erdélyi DJ, Csóka M, Kovács 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*, 97:216-22.

X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Saját témában megjelent közlemények:

Eipel OT, Nemeth K, Torok D, Csordas K, Hegyi M, Ponyi A, Ferenczy A, Erdelyi DJ, Csoka M, Kovacs GT. (2013) The glucocorticoid receptor gene polymorphism N363S predisposes to more severe toxic side effects during pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) therapy. *International Journal of Hematology*, 97:216-222. IF: 1.679

Eipel OT, Hegyi M, Csordas K, Németh K, Luczay A, Török D, Csóka M, Erdélyi D, Kovács GT (2016): Some GCR Polymorphisms (N363S, ER22/23EK, and Bcl-1) May Influence Steroid-induced Toxicities and Survival Rates in Children With ALL. *Journal of Pediatric Hematology and Oncology*. [Epub ahead of print] IF: 0.956

Egyéb témában megjelent 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. *British Journal of Hematology*, 166:410-420. (2014) IF:4,959

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. *Anti-Cancer Drugs*, 24:189-197. IF: 1.891

Hegyi M , Gulácsi A , Cságoly E , Csordás K , Eipel OT , Erdélyi DJ , Müller J , Nemes K , Lautner-Csorba O , Kovács GT. (2012) Clinical relations of methotrexate pharmacokinetics in the treatment for pediatric osteosarcoma. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 138:1697-1702. IF=2.914

Csordas K , Eipel O , Hegyi M , Csoka M , Pap E , Kovacs G. (2011) Nagy dózisú methotrexatkezelések farmakokinetikai vizsgálata gyermekkori hematológiai malignitásokban. Orvosi Hetilap, 152:1609-1617.

XI. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

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

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

Köszönöm **Dr. Németh Krisztinának** és **Staub Krisztinának** a laborban nyújtott rengeteg segítséget!

Köszönöm **Dr. Csordás Katalinnak** és **Dr. Hegyi Mártának** a statisztikai elemzésekben nyújtott segítséget, illetve azt, hogy kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk a kutatásom alatt. Köszönöm a sok önzetlen segítséget.

Köszönöm **Félné Dr. Semsei Áginak** a statisztikai kiértékelésekben nyújtott igen sok segítséget.

Köszönöm **Dr. Ponyi Andreának** a statisztikai elemzésekben nyújtott segítséget.

Köszönöm **Dr. Török Dórának** a megjelent cikkemben való nyelvi és szakmai alapos segítséget.

Köszönöm **Dr. Cságoly Editnek** és **Dr. Erdélyi Dánielnek** a klinikai adatgyűjtésben nyújtott segítségét.

Külön szeretnék köszönetet mondani **Dr. Csóka Monikának**, aki a rövid idő ellenére habozás nélkül vállalta el a PhD értekezésem átnézését, és az opponensi munkát!