

A folátciklus genetikai markereinek vizsgálata  
a rákrizikó, a kezelési eredmények és  
a mellékhatások szempontjából

Doktori Értekezés

**Dr. Komlósi Lajos Viktor**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kralovánszky Judit tudományos osztályvezető, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Telekes András osztályvezető főorvos, M.D., Ph.D.  
Dr. Bácsi Krisztián klinikai orvos, M.D., Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kárpáti Sarolta egyetemi tanár, M.D., D.Sc.  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Baki Márta főorvos, M.D., Ph.D.  
Dr. Kiss András egyetemi docens, M.D., Ph.D.

Budapest

2011

# Tartalomjegyzék

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b>	<b>4</b>
<b>1. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	<b>7</b>
<b>1.1 A folátciklus biológiai jelentősége és vizsgált paramétereinek jellemzése</b>	<b>7</b>
<b>1.2 A colorectalis daganatok (CRC) előfordulása és rizikótényezői</b>	<b>10</b>
<b>1.3 A rectum- és colonrák különbözősége</b>	<b>12</b>
<b>1.4 A CRC kezelésének lehetőségei</b>	<b>12</b>
<i>1.4.1 A CRC kezelésében leggyakrabban használt gyógyszerek</i>	<b>15</b>
<i>1.4.2 A metasztatikus CRC kezelése</i>	<b>20</b>
1.4.2.1 Farmakogenetikai markerek szerepe a bevacizumab-alapú kezelésben	<b>22</b>
<b>1.5 A gyermekkori osteosarcoma és kezelése</b>	<b>23</b>
<i>1.5.1 A metotrexát kezelés jellemzése és a toxicitás farmakogenetikai vonatkozásai</i>	<b>25</b>
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK</b>	<b>27</b>
<b>3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK</b>	<b>28</b>
<b>3.1 A rákrizikó szempontjából tanulmányozott populációk</b>	<b>28</b>
<b>3.2 A FOLFIRI+bevacizumab terápiával kezelt betegek</b>	<b>29</b>
<b>3.3 A FOLFIRI+bevacizumab kezelés</b>	<b>29</b>
<b>3.4 Mintaelőkészítés a rákrizikó vizsgálatához</b>	<b>30</b>
<b>3.5 Genotipizálás</b>	<b>30</b>
<b>3.6 Biokémiai és hematológiai paraméterek meghatározása</b>	<b>31</b>
<b>3.7 Statisztikai analízis</b>	<b>31</b>
3.7.1 <i>Az eset-kontrollos tanulmány statisztikai módszerei</i>	<b>31</b>
3.7.2 <i>A FOLFIRI+bevacizumab kezeléssel tanulmány statisztikai módszerei</i>	<b>33</b>
3.7.3 <i>Az esetleíró tanulmány statisztikai módszerei</i>	<b>33</b>
<b>4. EREDMÉNYEK</b>	<b>34</b>
<b>4.1 A folátciklus génpolimorfizmusainak hatása a rákrizikóra colon- és rectumdaganatos betegek esetében</b>	<b>34</b>
4.1.1 <i>A vizsgált polimorfizmusok hatása a homocisztein szintre</i>	<b>40</b>
<b>4.2 A vizsgált polimorfizmusok hatása a FOLFIRI + bevacizumab kezelésre adott válaszra</b>	<b>42</b>
4.2.1 <i>A FOLFIRI+bevacizumab kezelésben részesült betegek jellemzői</i>	<b>42</b>

<i>4.2.2 A FOLFIRI+bevacizumab kezelés hatékonysága</i>	44
<b>4.3 A vizsgált polimorfizmusok és a kezelések mellékhatásai</b>	48
<i>4.3.1 A FOLFIRI+bevacizumab kezelés mellékhatásai</i>	48
<i>4.3.2 A toxikus metotrexát kezelés bemutatása egy osteosarcomás beteg esetében, az MTHFR C677T polimorfizmus jelentősége</i>	51
<b>5. MEGBESZÉLÉS</b>	54
<b>5.1 A rákrizikóval kapcsolatos vizsgálatok megbeszélése</b>	54
<b>5.2 A FOLFIRI+bevacizumab kezeléssel kapcsolatos megbeszélés</b>	58
<b>5.3 A toxikus metotrexát kezeléssel kapcsolatos vizsgálat megbeszélése</b>	61
<b>6. KÖVETKEZTETÉSEK</b>	63
<b>7. ÖSSZEFOGLALÓK</b>	65
<b>8. IRODALOMJEGYZÉK</b>	67
<b>9. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK</b>	85
<b>10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	87

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Ala	alanin
ALT	szérum alanin aminoszferáz
ANOVA	varianciaanalízis
AP	szérum alkalikus foszfátáz
AUC	görbe alatti terület
B	bevacizumab
BMI	testtömeg index
BSC	legjobb tüneti/támogató kezelés
BSP	csont szialoprotein
CEA	carcino-embriónális antigén
95% CI	95%-os konfidencia intervallum
(CI)FUFA	5-FU/leukovorin (folyamatos infúzió)
CR	teljes remissió
CRC	vastag- és végbélrák
dNTP	dezoxiribonukleotid trifoszfát
DPD	dihidropirimidin dehidrogenáz
dTTP	dezoxitimidin trifoszfát
eCcr	becsült szérum kreatinin klírens
ECOG	„Eastern Cooperative Oncology Group”
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
FDA	Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyezési Hivatal (USA)
FdUMP	fluorodezoxiuridin monofoszfát
FdUTP	fluorodezoxiuridin trifoszfát
FOLFIRI	5-FU/leukovorin/irinotecan
FOLFOX	5-FU/leukovorin/oxaliplatin
FPGS	folil poliglutamát-szintáz
FR	membrán folát receptorok
5-FU	5-fluorouracil
FUTP	fluorouridin trifoszfát
fvs	fehérvérsejt szám

GGT	$\gamma$ -glutamil transzpeptidáz
H <sub>2</sub> FU	dihidrofluorouracil
Hcy	homocisztein
(HD)-MTX	(nagy dózisú)-metotrexát
HPLC	nagy nyomású folyadékkromatográfia
HR,	kockázati arány
HWE	Hardy-Weinberg egyensúly
ins/del	inzerció/delécio
IRI	irinotecan
MAC	Astler-Coller által módosított Dukes (besorolás)
5-metil-THF	5-metiltetrahidrofolát
MMC	mitomycin
MS	metionin szintáz
5,10-MTHF	5,10-metiléntetrahidrofolát
MTHFR	metiléntetrahidrofolát-reduktáz
7-OH-MTX	7-hidroxi-metotrexát
OR	esélyhányados
ORR	teljes válaszarány
OS	teljes túlélés
PBMC	perifériás vér mononukleáris sejteket
PCR-RFLP	polimeráz-láncreakció - restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus
PD	progresszív betegség
PFS	progressziómentes túlélés
PR	részleges remisszió
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RFC	redukált folát szállító
SAM	S-adenozilmetionin
SD	stabil betegség
SD	standard szórás
SE	standard hiba
SHMT1	szerin hidroximetiltranszferáz 1

SN-38	7-etil-10-hidroxi-camptotecin
SNP	egy pontos nukleotid-polimorfizmus
THF	tetrahidrofolát
TNM	tumor, nyirokcsomó, metasztázis
TS	timidilát szintáz
TYMS	TS gén
UGT1A1	uridin difoszfát glükuronozil-transzferáz-1-A1
UTR	nem kódoló szakasz
Val	valin
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
VNTR	változó számú egymás utáni ismétlődések
WHO	Egészségügyi Világszervezet

# 1. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

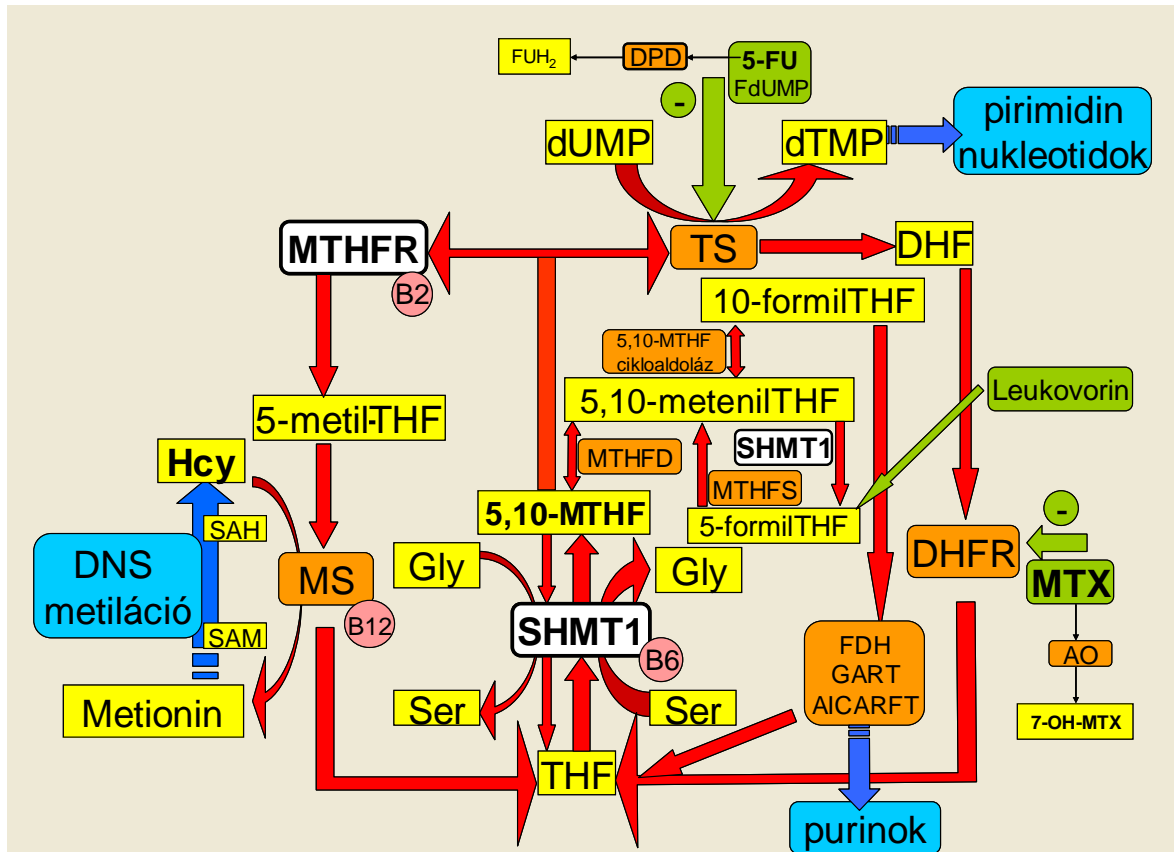
## 1.1 A folátciklus biológiai jelentősége és vizsgált paramétereinek jellemzése

A folátciklus központi szerepet játszik a sejtmetabolizmusban. Fontos szerepei között megemlítendő az egy-szénatomos egység biztosítása a metionin ciklus számára a metilációs reakciókban való felhasználáshoz, valamint a purin és pirimidin szintézishez. A foláthiányos táplálkozás vagy a folátmetabolizáló enzimek génpolimorfizmusai összefüggésbe hozhatók a megaloblastos anemia, fejlődési rendellenességek (velőcsőzáródási zavar, Down szindróma), különböző malignus megbetegedések (különösen emésztőrendszeri és leukémiák) kialakulásával. A magas homocisztein koncentráció, ami az alacsony folát státus biomarkere, összefüggésben van a szív-érrendszeri betegségekkel és az Alzheimer-kórral. A ciklus számos enzime a daganat elleni kemoterápiás gyógyszerek célpontja. Jelentősége révén a folát metabolizmus régóta a klinikai, táplálkozási és biokémiai vizsgálatok érdeklődésének középpontjában van [1]. A folát anyagcsere szerkezete meglehetősen összetett és számos egymással kapcsolatban levő ciklust tartalmaz (1. ábra), ezért csak a vizsgálatunkban szereplő részeket tárgyaljuk részletesen.

A citoszolikus szerin hidroximetil-transzferáz 1 (SHMT1) egy B6 vitamin kofaktorral működő enzim, amely katalizálja a szerin és a tetrahydrofolát (THF) glicinné és 5,10-metiléntetrahydrofoláttá (5,10-MTHF) történő reverzibilis átalakulását. Ez a reakció biztosítja az egy-szénatomos egységet az S-adenozilmetioninnak (SAM), valamint a purin és pirimidin szintézishez.

A metiléntetrahydrofolát-reduktáz (MTHFR) irreverzibilisen katalizálja B2 vitamin kofaktor jelenlétében az 5,10-MTHF 5-metiltetrahydrofoláttá (5-metil-THF) történő átalakítását. A folát metabolitoknak az 5-metil-THF a leggyakoribb formája, amely a metildonor, a homocisztein (Hcy) metioninná történő átalakításában. Az MTHFR csökkent aktivitása a Hcy gátolt katabolizmusához vezet. Két gyakori SNP van az *MTHFR* génen, melyek szoros kapcsoltságban vannak: a C677T és az A1298C. A C677T polimorfizmus a 4-es exonon egy Ala->Val cserét eredményez a 222-es kodonon. Az *MTHFR* 677C homozigotákhoz viszonyítva a CT és TT genotípusok 30 ill. 70%-kal alacsonyabb enzimaktivitást mutatnak. A 677T allél kapcsolatban van a

megemelkedett plazma Hcy szintekkel [2]. Ezzel ellentétben az A1298C polimorfizmus pontos funkcionális következménye nem jól definiált és a kapcsoltság miatt az önálló hatása eldöntetlen maradt [3,4].



**1. ábra** Az SHMT1 és az MTHFR szerepe a folát ciklusban és néhány vizsgált gyógyszer célpontja és katabolizmusa

SHMT1, szerin hidroximetiltranszferáz 1; MTHFR, metiléntetrahydrofolát reduktáz; TS, timidilát szintáz; MS, metionin szintáz; DHFR, dihydrofolát reduktáz; FDH, hangyasav dehidrogenáz; GART, glicinamid ribonukleotid formiltranszferáz; AICARFT, 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid formiltranszferáz; MTHFD, MTHF dehidrogenáz; MTHFS, MTHF szintáz; DPD, dihidropirimidin dehidrogenáz; AO, aldehyd oxidáz; MTX, metotrexát; 7-OH-MTX, 7-hidroxi-MTX; 5-FU, 5-fluorouracil; FUH<sub>2</sub>, 5-fluoro-5,6-dihidouracil; FdUMP, 5-fluoro-dUMP; THF, tetrahydrofolát; 5,10-MTHF, 5,10-metiléntetrahydrofolát; 5-metil-THF, 5-metil-tetrahydrofolát; DHF, dihydrofolát; dUMP, dezoxiuridin monofoszfát; dTMP, dezoxitimidin monofoszfát; Hcy, homocisztein; Ser, szerin; Gly, glicin; SAM, S-adenozilmetionin; SAH, adenzilhomocisztein; B2, 6, 12 vitamin



A timidilát szintáz (TS) a timidilát bioszintézis egyik kulcsenzime, a folát metabolizmushoz kapcsolódóan a dezoxinukleotid trifoszfát (dNTP) szintek fontos szabályozója. Már kis változás a dNTP szintetizáló enzimek expressziójában befolyásolja a rendelkezésre álló dNTP-ok mennyiségét [5], és a dNTP pool torzulása érinti a replikációs pontosságot [6]. A folát/metil metabolizmus befolyásolja a DNS épségét és az átíródás intenzitását a nukleotid szintézis és a DNS metilációs mechanizmus által [7]. Ezért az egyéni genetikai tényezők, melyek a folát/nukleotid metabolizmust érintik, értelemszerűen legalább két különböző útvonalon keresztül befolyásolják a genetikai stabilitást, és módosítják a molekuláris carcinogenezist [8]. Két funkcionálisan fontos TS gén (*TYMS*) polimorfizmus van jelen az mRNS-en. Az egyik egy promoter-enhancer régió hosszpolimorfizmus az 5'-UTR-on, mely általában 2 vagy 3, (ritkábban több) 28 bp egységnyi, tandem ismétlődést (2R vagy 3R) tartalmaz, és ismereteink szerint a transzkripció autoregulációs mechanizmusban van szerepe [9]. A másik, hasonlóan gyakori, 6 bp ins/del-típusú polimorfizmus, amely a 3'-UTR-on lokalizált [10].

A homocisztein egy kéntartalmú aminosav, ami főként a SAM által mediált metilációs reakcióban keletkezik. Ismert tény, hogy a totál szérum homocisztein (Hcy) szintet többek között befolyásolja a nem (magasabb a férfiakban), a kor (növekszik az életkorral), a testtömegindex (BMI) (magasabb az elhízottakban) és a vesefunkció (vesekárosodás esetén magasabb) [11,12,13]. Emellett a felhalmozódása a szérumban számos betegséggel mutathat összefüggést: érbetegségek, daganatok, velőcsőzáródási rendellenességek, stb [14]. A szabad, albuminhoz kötött, redukált és oxidált homocisztein formák kombinált keverékét tükrözi a Hcy a vérben. A homocisztein fő metabolikus útja a metionin szintáz, egy B12 vitamin dependens enzim, általi remetiláció. A Hcy szint fordítottan arányos a folát szinttel és felvetődött, mint a rák egyik rizikótényezője [15,16]. Egy tanulmány felveti a Hcy tumormarker szerepét a CRC-ben [15]. A feltételezett tumormarker szerep vezetett oda, hogy az esetleges hibák elkerülése végett, a Hcy-t kizártuk a rákrizikó analízisből.

## 1.2 A colorectalis daganatok előfordulása és rizikótényezői

A colorectalis rák (CRC) a világon a negyedik leggyakrabban előforduló rákos megbetegedés és a negyedik leggyakoribb halálok. A WHO adatai szerint évente több mint egy millió új eset kerül felismerésre, ill. 529 ezren halnak meg colorectalis carcinomában [17].

Magyarországon a CRC a második leggyakoribb a rákos megbetegedések között, mind a férfi, mind a női népesség körében, és ugyanakkor az egyik leggyakoribb ok a rákhalálozás tekintetében is. A betegek átlag életkora a CRC diagnózisakor hazánkban kb. 60 év. Az évente felismert közel 9000 új esetből hozzávetőlegesen 2800 a rectumdaganatos esetek száma [18].

A CRC kialakulásában környezeti és genetikai faktorok egyaránt szerepet játszanak. A CRC-k 88-94%-a sporadikus és 5-10% az öröklődő forma. Amennyiben a családi anamnézisben CRC szerepel, az a sporadikus vastagbélrák kifejlődésének esélyét jelentősen növeli [19]. Legalább egy elsőfokú rokon betegsége esetén a CRC kialakulásának kockázata megduplázódik [20,21].

Számos tanulmányban vizsgálták a környezeti faktorok jelentőségét és hatását a CRC etiológiájában [22]. A táplálkozással kapcsolatban felmerült lehetséges befolyásoló tényezők: a teljes kalóriabevitel, a táplálék hús, zsír, fehérje ill. rosttartalma és az elfogyasztott gyümölcs, zöldség mennyisége. A teljes kalóriabevitel és az elhízás a vizsgálatok szerint független rizikómarkernek bizonyultak a CRC kialakulását illetően. A magasabb testtömegindex megduplázta a kockázatot. Az összefüggés kifejezettebben jelentkezik férfiaknál és erősebb összefüggést mutat a colon carcinomával [23,24].

A kalcium, az antioxidáns vitaminok (E, C, A) ill. a folsav esetleges kemopreventív hatásának eldöntése további vizsgálatok feladata lesz, mivel a jelenleg rendelkezésre álló adatok nem egyértelműek. A tartós, nagy mennyiségű dohányzás egyértelműen növeli mind az adenoma, mind a CRC előfordulási gyakoriságát [25].

A felsoroltakon kívül egyéb rizikófaktorok is szerepet játszhatnak.

A betegség kialakulásának valószínűsége az életkor előrehaladtával nő, gyakoribb férfiakban és növeli a kockázatot a megelőző cholecystectomy is. Különböző hormonális faktorok szerepét is valószínűsítik, főleg nők esetében. Ide tartoznak a korai menopausa, az első terhesség idősebb életkorban ill. a nulliparitás.

A CRC genetikai hátterét tekintve kb. 10%-ban öröklődő, és csupán 2-6 %-ban szerepel nagy penetranciájú gén a daganat kialakulásában. Az alacsony penetranciájú génkombinációk és a „nyugati-életstílus”, valamint a táplálkozás együttesen játszhatnak szerepet a sporadikus CRC patogenezisében [26].

A kémiai anyagok környezeti vagy endogén hatásra bázisvesztést, báziskicserélődést, bázisbeépülést, oxidációt, depurinálást, depirimidinálást, alkilálást, egyszálú- és kétszálú törést, stb. okozhatnak a DNS-ben. Általában minél több mutáció jön létre egy, vagy egymástól függetlenül akár több sejtben, annál valószínűbb a rák kialakulása. A mutációk kialakulásának kockázata bizonyos mértékig behatárolható. Ez attól függ, hogy az adott potenciális rákkeltő milyen mértékben metabolizálódik a szervezetben, milyen intenzitású és mennyire teljes a lebontása, kiválasztása. Ezeket a folyamatokat különböző gének kontrollálják, mégpedig egyéni és populációs szinten, a gének ún. polimorfizmusai alapján [27].

Számos eredmény gyűlt össze, amelyek a folátnak és a folát-ciklushoz kapcsolódó enzimek polimorfizmusainak a szerepét vetik fel a CRC etiológiájában. Az alacsony folátbevitel és a folát alacsony biohasznosulása, tehető felelőssé a CRC rizikójának emelkedéséért [28]. Tanulmányok bizonyítják egyes folát-ciklus enzimek genetikai polimorfizmusának jelentőségét (pl. a metiléntetrahidrofolát-reduktáz /MTHFR/ a colorectalis carcinogenesisben [29]). Az eredmények azonban alkalmanként ellentmondóak. Egyes publikációkban a folát ellentétes hatását írták le az adenoma-carcinoma szekvenciában [30]. Az *MTHFR* C677T polimorfizmus szerepe a CRC fogékonyság befolyásolásában szintén nem egységes [31,32]. Hubner és mtsai 25 tanulmány meta-analízisével kimutatták, hogy az *MTHFR* 677TT genotípus, bár mérsékelt szintű, de szignifikánsan csökkent CRC rizikót jelent [33].

Egy másik, kevésbé tanulmányozott folát/egy-szénatomos metabolikus enzim, a citoszolikus szerin hidroximetil-transzferáz (*SHMT1*), rendelkezik egy gyakori, de működését tekintve kevésbé jellemzett, Leu->Phe polimorfizmussal (C1420T SNP variáns). Ennek a polimorfizmusnak a rizikócsökkentő hatását bizonyították akut limfoid leukémia [34] és a malignus limfóma [35] esetén is, de nem találtak összefüggést a colorectalis adenomák kialakulásával [36]. Egy másik tanulmány, amelyben az *SHMT1* hatását vizsgálták CRC-s betegeken és kontrollokon, nem talált összefüggést sem a polimorfizmus és a rizikó, sem a polimorfizmus és a homocisztein

vagy folát szintek között. Ennek a tanulmánynak az eredményeit ugyanakkor érdemes fenntartással kezelni, mivel a prospektív vizsgálat alanyai aszpirint és  $\beta$ -karotint fogyasztottak egy kettősvak klinikai vizsgálat keretében. Mindkét hatóanyag befolyásolhatta a CRC kialakulás frekvenciáját [37]. Az *SHMT1* C1420T polimorfizmus módosító hatása a CRC rizikóra eddig eldöntetlen maradt [38,39].

### **1.3 A rectum- és colonrák különbözősége**

A rectum- és colonráknak különbözik az etiológiája, hisztológiája, radioszenzitivitása és a prognózisa is [40]. A rectumrák kezelése sok esetben magába foglalja a preoperatív radioterápiát, míg a colonrák nem sugárérzékeny. Mindkét ráktípusnak vannak hasonló és eltérő rizikófaktoraik. A több inaktivitással töltött idő (ülő életmód) csak a colonrák kialakulásával mutatott összefüggést [41,42]. Az alacsony folát és/vagy a túlzott alkoholfogyasztás mindkét megbetegedés rizikófaktora, de a testmozgásnak különböző hatása van a rizikókra [41]. Egy nagy, prospektív, amerikai kohort-tanulmányban a BMI csak a colonrák kialakulásával volt kapcsolatba, a rectumrákkal nem [43]. Kevés az olyan tanulmány, amely külön vizsgálja a genetikai rizikótényezőket a colon- és rectumrák esetén, és tényleges különbségeket mutat ki a két daganattípus között [44,45,46]. A korábbi tanulmányok, amelyek a CRC-ban vizsgálták a polimorfizmusokat, nem adtak egységes eredményt. Ez könnyen adódhat abból a tényből, hogy a különböző vizsgálati mintákban különböző arányban szerepeltek a colon- és rectumrákos esetek.

### **1.4 A CRC kezelésének lehetőségei**

A CRC szakszerű kezelése számos orvosi szakma szoros együttműködését igényli, tehát multidiszciplináris feladat. Leghatékonyabban olyan onkológiai központokban történik, ahol valamennyi érintett társszakma magas szinten képviselve van, együttműködésük lehetősége adott, és nagyszámú beteg ellátása révén a kellő tapasztalat is rendelkezésre áll. Az egyes betegek kezelési tervére minden esetben a Multidiszciplináris Onkológiai

Bizottságnak kell javaslatot tennie. Ebben diagnosztikus képalkotó szakember, patológus, sebész, sugárterapeuta és klinikai-onkológus vesz részt. Konzultációjukra a patológiai diagnózis és a stádium felmérő teljes kivizsgálás birtokában kerüljön sor, mielőtt bármilyen kezelés elkezdődne. Különösen fontos ez a rectumrák neoadjuváns kezelésének az indikációjakor.

A CRC kezelése az utolsó másfél évtized alatt rohamosan fejlődött. Az adjuváns kemoterápia CRC-ban, a multidiszciplináris terápia részeként, mindössze 15 éve vált a bizonyítékokon alapuló orvoslás elvei szerint általánosan elfogadottá [47]. Az azóta tapasztalható gyorsütemű fejlődés eredményeként, a CRC a kevésbé kemoszenzitív daganatok közül a közepesen kemoszenzitív rákok közé került, és a kemoterápia – az új évezredben a biológiai célzott terápiával kiegészítve – a komplex kezelés egyre jelentősebb összetevőjévé vált. Mindazonáltal a CRC multidiszciplináris kezelésének a legfontosabb eleme ma is a daganat sebészi eltávolítása. Ez a rectum- és colonszakaszok területén különböző technikákkal történhet. A sebészi kezelés részleteinek ismertetése nem tárgya az értekezésnek.

A sugárterápia a rectumrák komplex kezelésének a fontos része, amely a helyi kiújulás megelőzését vagy a tumor megkisebbitését szolgálja. Alkalmazható műtét előtt önmagában (preoperatív, neoadjuváns radioterápia) vagy kemoterápiával kombinálva (neoadjuváns kemo-radioterápia), illetve műtét után kemoterápiával együtt (posztoperatív adjuváns radio- vagy kemo-radioterápia), amennyiben preoperatív sugárkezelésre nem kerül sor.

A CRC klinikai-onkológiai kezelése a kemoterápiát, a célzott biológiai terápiát és a szupportív kezelést foglalja magába. CRC-ban a kemoterápia neoadjuváns, adjuváns és palliatív formában alkalmazható.

Neoadjuváns kemoterápián a műtét előtt adott kezelést értünk. Klasszikus értelemben ezt rectumcarcinomában alkalmazzuk, a kemo- és a sugárterápiát kombinálva (kemo-radioterápia). Célja irresecabilis esetben a műthetőség lehetővé tétele, resecabilis esetben pedig a tumor és a környéki nyirokcsomóáttétek megkisebbitése az ún. „down-staging”. Ezzel olyankor is lehetővé tehető az analis sphincter megőrzése, amikor ez, előzetes gyógyszeres és sugárkezelés nélkül nem lenne lehetséges. Újabban a neoadjuváns kemoterápia fogalmát kiterjesztették azokra az esetekre is, amikor az

eredetileg irresecabilis máj- vagy tüdőáttéteket korszerű kemoterápiás kombinációk alkalmazásával műthetővé teszik.

Az adjuváns kemoterápia célja az elsődleges sebészi rezekciót követően a hagyományos diagnosztikai módszerekkel ki nem mutatható, alvó daganatsejtek vagy mikrometasztázisok kiiktatása. Az adjuváns kemoterápia III. stádiumú betegségben általánosan javallt, második stádiumban pedig akkor érdemes adni, ha a kiújulás kockázata nagy.

Palliatív kemoterápiáról akkor beszélünk, ha a gyógyszeres kezelést nem kuratív céllal adjuk, hanem előrehaladott, vagy távoli áttétes esetekben a túlélés meghosszabbítása, a progresszió későbbre halasztása, a tünetek, panaszok csökkentése és az életminőség javítása/megőrzése a cél. Az utóbbi másfél évtized a palliatív kemoterápia terén is jelentős javulást hozott, a legjobb tüneti/támogató kezeléshez (best supportive care - BSC) képest a IV. stádiumú betegek átlagos túlélését (OS) jelentősen megnövelte (6 hónapról 24 hónapra).

Számos tényezőt azonosítottak, amelyek befolyásolhatják a daganatos betegség recidíváját, illetve a betegek túlélését, de továbbra is a klinikai stádium meghatározása a legpontosabb prognosztikai előrejelző.

A CRC stádium besorolása a TNM (tumor, nyirokcsomó, metasztázis) klasszifikáció, illetve a Dukes vagy az Astler-Coller által módosított Dukes (MAC) besorolás szerint történik (1. táblázat).

**1. táblázat** A CRC stádiumbeosztása

<b>Stádium</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>Dukes</b>	<b>MAC</b>
0	Tis	N0	M0	–	–
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1–T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3–T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2–T3	N2a	M0	C	C1/C2
	T1–T2	N2b	M0	C	C1
IIIC	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3–T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1–N2	M0	C	C3
IVA	bármely T	bármely N	M1a	D	D
IVB	bármely T	bármely N	M1b	D	D

Megjegyzés: a cTNM a klinikai, a pTNM a patológiai besorolás. Az y-t a neoadjuváns kezelés utáni besoroláskor (ypTNM), az r-t a tünetmentes időszak után visszaeső betegeknél (rTNM) használják. MAC az Astler-Coller által módosított Dukes beosztás.

#### ***1.4.1 A CRC kezelésében leggyakrabban használt gyógyszerek***

##### 5-fluorouracil (5-FU)

Évtizedek óta az 5-FU számít a CRC esetében a kezelés gerincének. Metasztatikus CRC-ban az 5-FU+leukovorin kombinációval a betegek kb. 20-27 %-ában érhető el objektív válasz. Az 5-FU, az 5-fluoropirimidinek legszélesebb körben alkalmazott tagja önmagában inaktív vegyület, metabolikus aktiválás szükséges ahhoz, hogy hatását kifejthesse. Az 5-FU metabolikus aktiválása során keletkező aktív nukleotidjai (FdUMP, FUTP, FdUTP) három főbb ponton fejtik ki hatásukat: (i) a timidin szintézis „de novo” útjáért felelős timidilát szintáz gátlása az FdUMP által, (ii) az 5-fluorouridin-

5'-trifoszfát (FUTP) beépülése a RNS-be; (iii) az 5-fluoro-2'-dezoxiuridin-trifoszfát (FdUTP) beépülése a DNS-be. Az antiproliferatív hatásért elsősorban a TS gátlását tartják felelősnek. Az 5-FU metabolitja, az FdUMP kötődik a TS fehérje nukleotid kötőhelyéhez, és a redukált foláttal együtt egy stabil hármass komplexet képez, ezáltal megakadályozva a dTMP szintézisét. A TS gátlást követő molekuláris események nem teljesen tisztázottak, valószínű azonban, hogy a dTTP hiánya a többi nukleotid szintjét is befolyásolja és a nukleotidok között egyensúlyi zavar lép fel, amely a DNS szintézist és javítást befolyásolja, és letális DNS-károsodást eredményezhet. A stabil hármass komplex kialakulásához kívülről adagolt redukált folát (leukovorin) biztosítása szükséges. A TS gátlása „timinhiányos” állapotot hoz létre, mely a legtöbb aktívan osztódó sejt számára letális. Az RNS irányú hatást az 5-FU citotoxicitásának kialakulásában az a felismerés támasztotta alá, miszerint a FUTP mindhárom típusú RNS-be (riboszomális, messenger, transzfer) is beépül.

Az aktiválás mellett, az 5-FU több mint 80%-a lebomlik. A lebontás első, sebesség-meghatározó enzime a dihidropirimidin-dehidrogenáz (DPD), amely az 5-FU-t dihidrofluorouracillá (H<sub>2</sub>FU) alakítja át. Aktivitása legnagyobb a májban és a perifériás mononukleáris sejtekben. A DPD hiánya vagy csökkent aktivitása súlyos, néhány esetben halálos kimenetelű toxicitást okozott 5-FU-val kezelt betegekben [48].

Az 5-FU kezelés leggyakoribb mellékhatásai a hasmenés, hányinger, szájfekély, csökkent étvágy, a szemek fényérzékenysége, fémes ízérzés a szájban, mieloszuppresszió.

Az 5-FU kezelések több változata ismert (pl. Mayo sémák, deGramont sémák, ciFU, FLV, stb), melyek az adagolás módjában (bólus vagy folyamatos infúzió ill. ezek kombinációja), az 5-FU összdózisában, a leukovrin alkalmazásában és dózisában, stb. térnek el egymástól.

A leukovorin (folinsav vagy kalcium folinát) egy redukált folsav készítmény, mely d,l-leukovorin racém elegyet vagy egyes országokban tisztán l-leukovorint (levoleukovorin) tartalmaz és melyet kombinációban alkalmaznak az 5-FU-alapú kezelések hatásosságának növelésére, valamint a MTX kezelések esetén a túlzott toxicitás csökkentésére. Természetesen a d,l-leukovorint az l-leukovorinnál kétszer nagyobb dózisban kell alkalmazni, ugyanis csak a levo forma hasznosul a szervezetben.



### Capecitabin (Xeloda)

A capecitabin az első racionálisan tervezett, orális 5-FU prodrug. A kémiai szerkezete biztosítja, hogy orális adagolás után a vegyület változatlan formában szívódják fel. A májban a capecitabin a karboxil-észteráz hatására 5'-dezoxi-5-fluorcitidinné, majd a citidin-deamináz hatására 5'-dezoxi-5-fluoruridinné alakul át. Ezek a vegyületek a májból átkerülnek a tumorsejtekbe, ahol az átalakulás utolsó lépése – az 5-FU keletkezése az 5'-dezoxi-fluoruridinből a timidin-foszforiláz hatására – megtörténik. A továbbiakban a capecitabin az 5-FU hatásmechanizmusa szerint fejti ki citotoxikus hatását.

A capecitabin szelektív intratumorális aktiválódását elősegíti az a tény, hogy a timidin-foszforiláz a legtöbb rosszindulatú daganatban igen magas expressziót mutat a környező szövetekhez képest. A szelektivitás alapjául szolgáló elképzelést a preklinikai vizsgálatok igazolták. Fontos megjegyezni, hogy a tumorszövet timidin-foszforiláz- és DPD-aktivitásának hányadosa szignifikáns, pozitív összefüggést mutat a capecitabinterápiára adott válasszal. A capecitabint metasztatikus CRC-ban napi 2-szer 1250 mg/m<sup>2</sup> dózisban adva a bolus 5-FU és a leukovorin kombinált kezeléssel (Mayo-séma), azonos betegségmentes és teljes túlélést eredményezett.

1493 betegen hasonlították össze a bolus 5-FU/leukovorin és a capecitabinkezelés mellékhatásprofilját. Capecitabinkezelés esetén szignifikánsan kevesebb hányinger, stomatitis, diarrhoea, alopecia, lázas neutropenia vagy sepsis fordult elő. Ugyanakkor a kéz-láb szindróma előfordulásának szignifikánsan nagyobb az aránya, amely leggyakrabban a dózis csökkentéséhez vagy a kezelés felfüggesztéséhez vezet [48].

### Irinotecan (CPT, Campto)

Az irinotecan a kamptotecin félszintetikus származéka. Az irinotecan "prodrug"-nak tekinthető, mert az SN-38 jelzésű metabolitjának fokozottabb a citotoxicitása. Az irinotecan karboxileszterázok hatására átalakul 7-etil-10-hidroxikamptotecinné (SN-38), amelynek citotoxicitása *in vitro* kísérletben 100x nagyobb az irinotecannál. Az SN-38 a tulajdonképpen aktív metabolit, mely glükuronsavhoz kötődik a májban, és az epével együtt a bélrendszeren át távozik a szervezetből, ezért tehető felelőssé az irinotecan gastrointestinalis mellékhatásaiért. A kamptotecin és származékai gátolják a

topoizomeráz-I működésének második szakaszát, a láncok újraegyesítését. A topoizomeráz-I mutációja, vagy egyéb ok miatti csökkent aktivitása esetén a hatás elmaradhat. Lehetséges az irinotecan aktiválásának az elmaradása, ha a karboxileszteráz nem működik, így azok a tumorsejtek rezisztensek irinotecannal szemben, amelyek karboxileszteráz aktivitása lényegesen lecsökkent.

A gastrointestinalis toxicitás (hasmenés, hányás) tekinthető az adagolást korlátozó legfontosabb szöveti toxicitásnak. A hasmenés, melynek korai és késői formái ismereteseek, loperamiddal és kodeinnal nehezen befolyásolható. A haematológiai toxicitás (neutropenia) súlyos formája minden ötödik betegnél várható [49].

### Oxaliplatin (Eloxatin)

Az oxaliplatin harmadik generációs platinaszármazék. A DNS láncok között ill. a láncokon belül keresztkötéseket hoz létre és ez a génállomány károsodásához vezet. Bár hatásmódja hasonló a ciszplatinéhoz, ennek ellenére ciszplatin rezisztens esetekben is alkalmazható. A DNS-re gyakorolt hatása révén apoptosist indukál [50]. A klinikai vizsgálatban az 5-FU-val erősen szinergista hatásúnak bizonyult [51]. A szinergizmusnak az a háttere, hogy az oxaliplatin „down-regulálja” a TS enzimet, és ezáltal fokozza az 5-FU hatását [50]. Toxicitási profilja a vesekárosítás, halláskárosítás és az alopecia tekintetében kedvezőbb a cisplatinnál és a carboplatinnál, viszont gyakrabban okoz perifériás neuropathiát [52]. Ma a FOLFOX kezelést a III stádiumú CRC standard adjuváns kemoterápiájának tekintik.

### Bevacizumab (Avastin)

Az antiangiogén hatóanyag a bevacizumab (B), egy humanizált monoklonális antitest a vascularis endothelialis növekedési faktor a (VEGF-A) ellen. Az infúziós 5-fluorouracil/leukovorin + irinotecan (FOLFIRI) séma kombinálva bevacizumabbal hatásos kezelés, amely szignifikánsan jobb túlélési előnyt biztosít a metasztatikus CRC első vonalbeli gyógykezelésében [53,54,55,56,57,58]. A FOLFIRI+B kezelési séma, hasonlóan más konvencionális kemoterápiákhoz, hatékonyságában és toxicitásában heterogenitást mutat az egyes betegek között. Többek között az egyéni genotípus különbségek lehetnek felelősek ezért a heterogenitásért és elsősorban azok a

génpolimorfizmusok játszanak szerepet, amelyek befolyásolják az 5-fluorouracil (5-FU) és irinotecan citotoxicitását és a bevacizumab hatásmechanizmusát. Míg az 5-FU farmakogenomikájában számos ismert génavariáns felelős az 5-FU hatékonyságában és mellékhatásaiban észlelt különbségekért, az irinotecan és a bevacizumab esetében nagyon kevés, ha egyáltalán van olyan ismert polimorfizmus, mely hatással van a CRC kezelés kimenetelére [59].

### Cetuximab (Erbix) és panitumumab (Vectibix)

Az epidermális növekedési faktor (EGFR) egy transzmembrán protein, intracelluláris tirozinkináz doménnel. Az EGFR, többek között, a sejtproliferáció, migráció, angiogenesis fokozásában játszik szerepet, és gátolja az apoptózist. Számos tumorban megfigyelhető az EGFR fokozott expressziója, többek között CRC betegekben is. Az EGFR-gén túlexpressziója a colorectalis rákos betegek 60–80%-ában kimutatható.

A cetuximab IgG1 monoklonális antitest kiméra, amely kompetitív módon kötődik az EGFR extracelluláris doménjéhez, anélkül, hogy aktiválná a tirozinkinázt. A kötődés a jelátvitel blokkolásához, a tumornövekedés gátlásához és apoptózishoz vezet. Egyéb mechanizmusok is hozzájárulhatnak a hatáshoz: az angiogenetikus faktorok képződésének gátlása, az antitestdependens, sejtközvetített citotoxicitás, a radio- és kemoterápia hatásának erősítése stb.

Fázis II multicentrikus tanulmányban 329, metasztázist adó, irinotecanra rezisztens colorectalis daganatos beteget kezeltek cetuximabbal vagy cetuximab és irinotecan kombinációjával. A tanulmány eredménye arra utal, hogy a cetuximab képes megváltoztatni az irinotecannal szemben kialakult rezisztenciát, visszaállítja az irinotecan iránti érzékenységet. A cetuximabra jellemző mellékhatás az acne-szerű kiütés, amely a betegek egyharmadánál megfigyelhető. Azt is megfigyelték, hogy azoknál a betegeknél várható jó terápiás eredmény, akiknél a kiütés kialakul. A tumor EGFR-szintje és a cetuximab hatása között nem találtak összefüggést.

Az FDA 2004 februárjában elfogadta a cetuximabot kombinációs kezelésben a terápiarezisztens, előrehaladott CRC kezelésében [60].

A panitumumab az első, teljes mértékben humán IgG2 monoklonális antitest, amely a daganatsejtek jelátviteli mechanizmusában fontos szerepet betöltő epidermális

növekedési faktor receptor (EGFR) fehérje ellen irányul. A panitumumab új terápiás alternatívát kínál az EGFR-t expresszáló áttétes colorectalis carcinomás betegek kezelésére. Javasolt monoterápiaként fluoropirimidin-, oxaliplatin- és irinotecan -tartalmú kemoterápiás protokollok sikertelenségét követően, ha a daganat vad típusú KRAS-t tartalmaz. A készítmény alkalmazása során ritkán lép fel infúziós reakció vagy immunogenitás és az adagolása is kényelmes. Mindezek következtében a panitumumab fontos alternatíva a betegek kezelésében. A kezelések során a betegek 90%-ánál jelentkeznek enyhe-közepes súlyosságú bőrgyógyászati jellegű – az EGFR-inhibitorok farmakológiai hatásaként megfigyelt – reakciók. Azokon a betegeken, akiken súlyos bőrreakció alakul ki a panitumumab alkalmazásának ideje alatt, figyelni kell a gyulladással vagy fertőzéssel szövődmények kialakulását [61].

Az EGFR célzott terápiák részletesebb tárgyalása nem célja az értekezésnek.

#### ***1.4.2 A metasztatikus CRC kezelése***

Távoli áttétek előfordulása esetén az első kérdés az, hogy lehetséges-e azok  $R_0$  rezekciója. Amennyiben igen, a választandó kezelés a műtét. Jelenleg az  $R_0$  metastazektomiát követően szükséges adjuváns (posztoperatív) gyógyszeres kezelést alkalmazni.

Amennyiben az áttét(ek)  $R_0$  resectiója nem lehetséges azt kell eldönteni, hogy van-e esély az áttét(ek) gyógyszeres kezeléssel történő műthetővé tételére. Ha igen, neoadjuváns kombinált kemo-(± célzott) terápiát kell alkalmazni a korszerű kombinációk (FOLFIRI, FOLFOX, FUFA- irinotecan -bevacizumab) valamelyikével. A máj- vagy tüdőáttét neoadjuváns kezeléssel lehetővé tett  $R_0$  rezekciója 35-58%-os ötéves túlélést eredményezhet [62]. Fenti korszerű kemoterápiák valamelyikével egyre több májáttétes CRC-s beteg válhat hosszútávú túlélővé [63].

Ha az áttétes daganat neoadjuváns gyógyszeres kezeléssel nem tehető műthetővé, az onkológiai terápia célja a túlélés meghosszabbítása, a daganatnövekedés lehetőség szerinti kontrollja, a daganattal összefüggő tünetek csökkentése, valamint elfogadható életminőség fenntartása.

A gyógyszeres kezeléssel műthetővé nem tehető IV stádiumú CRC-s betegek általános állapotuk (performance státusz - PS), az áttétes szervek száma, a szérum alkalikus foszfataz (AP) és a fehérvérsejt szám (fvs) alapján jó, közepes és rossz prognózisú csoportba sorolhatók. Az ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) 0 általános állapotú, csak egyetlen szervben távoli áttéttel rendelkező, normális AP és fvs számú betegek tartoznak a jó prognózisú csoportba. A jó és közepes prognózisú csoportba tartozó betegek számára ajánlható lehetséges első vonalbeli kombinációk: FOLFIRI vagy FOLFOX vagy FUFA+bevacizumab ± irinotecan. A rossz prognózisú csoportba tartozó betegek számára fluorpirimidin monoterápia az ésszerű kezelés, lehetőleg orális készítmény (capecitabin) formájában.

Amennyiben a beteg adjuváns kemoterápiaként FOLFOX kombinációt kapott, FOLFIRI ± bevacizumab a javasolható első vonalbeli kombináció. A legmegfelelőbb további (második-harmadik vonalbeli) kemo-biológiai terápiás gyógyszerkombinációkat az aktuális első vonalbeli kombinációk, és - ha volt -, az adjuváns kezelés, valamint a KRAS mutáció ismeretében lehet kiválasztani.

A különféle lehetőségek közül a választást a beteg általános állapota, az esetleges műthetőség elérésének valószínűsége, a metasztázis lokalizációja, más kísérő betegségek megléte, stb. nagymértékben befolyásolja. Az egyénre szabott kezelés megvalósításának céljából, az előbbi sorba próbál egyre jobban beilleszkedni a genetikai markerek alapján történő döntés is (pl. a KRAS mutáció vizsgálata a cetuximab és panitumumab kezelés előtt).

Az első vonalbeli FOLFIRI után adott második vonalbeli FOLFOX-ra kapott tumorválasz jobb, mint fordítva, az első vonalbeli FOLFOX-ot követően adott második vonalbeli FOLFIRI-re kapott tumorválasz [64]. Ezért az első vonalbeli FOLFOX kezelés után a második vonalbeli irinotecan monoterápia az ésszerű választás. Amennyiben a beteg valamilyen okból sem irinotecant, sem oxaliplatin nem kaphat, 5-FU + bevacizumab terápia választható, vagy KRAS vad típus esetén célzott monoterápia.

Az 1990-es években bevezetett kemoterápiás szerek (irinotecan és oxaliplatin) és a 2000-es évek elején először alkalmazott célzott biológiai terápiás szerek alkalmazása szignifikánsan javította az előrehaladott CRC-s betegek életkilátásait. Az 5-FU kezelés előtt a távoli áttétes CRC-vel az átlagos túlélés a diagnózis után alig volt fél év. Ez az 5-

FU- alapú kemoterápiával kb. 1 évre hosszabbodott. A medián túlélés az irinotecan - vagy oxaliplatin-alapú kombinációkkal 14-16 hónapra és mindhárom szer egyidejű vagy egymást követő alkalmazásával, vagy biológiai terápiás kombinációval 20 hónap fölé emelkedett [65].

Elmondható tehát, hogy a korszerű kemoterápiás és célzott terápiás szerek alkalmazásával a távoli áttétes CRC-s betegek ma átlagosan kétszer annyi ideig élnek, mint egy évtizeddel ezelőtt. Mindazonáltal a távoli áttétes, nem operálható CRC még ma is gyógyíthatatlan, végzetes kimenetelű betegség. A további haladás a molekuláris célpontokat tanulmányozó alapvető kutatások eredményeinek a klinikai gyakorlatba való gyors átültetésétől, randomizált klinikai vizsgálatok eredményeitől és a farmakogenetikai vizsgálatok eredményeinek nagyobb beteganyagban történő igazolásától és bevezetésétől várhatóak.

#### 1.4.2.1 Farmakogenetikai markerek szerepe a bevacizumab-alapú kezelésben

Említésre méltó, hogy egyes génpolimorfizmusok nem várt módon hathatnak a terápiás hatékonyságra és a kezelés során kialakuló toxikus mellékhatások megjelenésére. Egy adott gyógyszer, amely összetevője egy kombinált kemoterápiának, befolyásolhatja a másik gyógyszer(ek) hatásmechanizmusát. Továbbá, egyes génpolimorfizmusok, melyek kapcsolatosak egy gyógyszer farmakodinamikájával, meglepő módon, hatással lehetnek a másik gyógyszer(ek) hatékonyságára [66,67,68].

A bevacizumab gátolja a VEGF-A-t, ezért fontos lehet, hogy a többi endogén angiogenesis szabályozó hogyan befolyásolhatja a tumor viselkedését [69]. A folát ciklus génjei és azok termékei, amelyek az 5-FU hatásmechanizmusában is részt vesznek, antiangiogén hatásúak. Csökkentve a Hcy-t csökken a VEGF szintje és expressziója [70], vagy fordítva, a magas Hcy növeli a VEGF szintet [71]. Emellett, a kreatinin klírens, amiről kimutatták, hogy az irinotecan metabolizmusának egyik farmakokinetikai meghatározója (a növekvő kreatinin klírens szignifikánsan alacsonyabb irinotecan metabolit AUC-t eredményez) [72], önálló kapcsolatban van a VEGF szinttel azokban a betegekben, akiknek magas a vérnyomása [73], amit előidézhethet a bevacizumab kezelés is [74]. A fent említett tényezők és természetesen a folát ciklus génpolimorfizmusai, melyek módosíthatják a Hcy szinteket és ezáltal a

VEGF szintet, megváltoztathatják a bevacizumab hatását. A VEGF szint és a bevacizumab hatékonyságának összefüggésével kapcsolatos eredmények ellentmondásosak [75,76], feltételezhetően a VEGF izoformák miatt, amelyek megismerése a jövőben klinikai vizsgálatok tárgya lesz [77].

## **1.5 A gyermekkori osteosarcoma és kezelése**

Az osteosarcoma a leggyakoribb primer csontdaganat [78]. A WHO-meghatározása alapján az osteosarcoma olyan malignus tumor, amelyre jellemző a tumorsejtek direkt csontszövet-, illetve osteoidtermelése. Sokféle megjelenési formája van, és igen eltérő lehet a szövettani képe, alapvető azonban a tumorsejtek osteoidtermelő képessége, ennek alapján akkor is osteosarcomáról beszélünk, ha a tumor állományának nagy része porc- vagy kötőszövet.

Az osteosarcoma gyakorisága évenként körülbelül 1,5/egymillió lakos, ami Magyarországon 15 új esetet jelent évente [78]. Az incidenciája kétszer gyakoribb a férfiaknál. Bármely életkorban előfordulhat, de a 60%-a az első két évtizedben keletkezik. Az előfordulás csúcsa a 20. év a férfiaknál, a nőknél a 17. év és a gyermekkori és fiatal felnőttkori összes daganatos megbetegedés 8%-át képezi. Mindazonáltal 70 év körül ismételt kiugrás észlelhető, amely azonban lényegesen kisebb a serdülőkorinál [79].

A 0-14 év közötti fiatal populációban a csonttumороk az összes malignus daganatoknak az 5%-át alkotják, ebből 52% az osteosarcoma, ezért az osteosarcoma a legfontosabb primer csonttumor gyermek és serdülőkorban [80]. Előfordulása gyakoribb a fiúknál, fiú-leány arány 1,4:1 [79,81,82].

Az osteosarcoma a csontrendszeren, ill. adott csonton belül is jellegzetes meghatározott helyeken alakul ki. A legtöbb daganat a hosszú csöves csontok ízület közeli részein keletkezik. A csöves csontokon belül elsősorban a legaktívabb növekedés helyén, a metaphysisben alakul ki, és csak mintegy 10-15%-ban az epiphysisben, diaphysisben. A gyerek- és serdülőkorban a leggyakrabban érintett csontok a femur (44%), a tibia (17%) és a humerus (15%) [81,82]. A betegség nagyon ritkán a csontrendszeren kívül is előfordulhat, például a mellkasban vagy a hasüregben.

Az elmúlt évtizedekben lényeges változás következett be az osteosarcoma diagnózisában, kezelésében, valamint a túlélési eredményekben. A kezeletlen osteosarcoma a betegek 100%-ában egy éven belül halálhoz vezet. Az 1970-es években kizárólag sebészi kezelést (radikális amputációt) alkalmaztak. A sebészi beavatkozással 15-20%-os ötéves túlélést tudtak elérni a diagnózis idejében áttétekkel nem rendelkező betegek esetében. A még nem metasztatikus osteosarcomában szenvedő betegek 80%-ában az amputációt követően 6-9 hónapon belül jelentkeztek a tüdőáttétek [83,84].

Az 1970-es évek vége felé a kemoterápia hatásosságát sikerült bizonyítani és egyes esetekben végtagmegtartó műtéteket kíséreltek meg. A kemoterápia alkalmazása lényeges előrelépést jelentett az osteosarcomák kezelésében, alapvetően megváltoztatta a kezelési stratégiát, és ezzel a túlélést jelentősen fokozta. Az 1980-as évek második felétől vezették be a preoperatív és posztoperatív kombinált kemoterápiát, ami az ötéves túlélést 55-75%-ra emelte a áttétekkel nem rendelkező betegcsoportban [85,86]. Az összehangoltabb kemoterápiás kezelések kidolgozása, a képalkotó eljárások fejlődése, a műtéti technikák fejlesztése, a multicentrikus osteosarcoma munkacsoportok létrejötte (ortopédsebész, radiológus, patológus, onkológus), az eredményeket tovább javította, és az 1990-es évek elejére a korai, alacsony malignitású stádiumokban 75-85%-os ötéves túlélést is sikerült elérni [87]. A kombinációs kemoterápia alkalmazásával, az időben felismert esetek 80-85%-ában nyílik lehetőség végtagmegtartó műtétek elvégzésére, és egyre nagyobb számban kerül sor a távoli áttétek metastasectomiájára is.

A preoperatív kemoterápia 10 hetes időtartama alatt doxorubicin ( $45 \text{ mg/m}^2$ ), metotrexát (MTX) ( $12 \text{ g/m}^2$ ), ifoszfamid ( $3 \text{ g/m}^2$ ) alkalmazására kerül sor. A sikeres műtétet követően 29 hetes posztoperatív kemoterápia következik a fent alkalmazott gyógyszerekkel, míg a metasztázissal induló, nagy malignitású csoportba sorolt betegek carboplatin ( $150 \text{ mg/m}^2$ ) és etopozid ( $50 \text{ mg/m}^2$ ) terápiát kapnak 3 hetenként, összesen öt alkalommal. Az osteosarcomás betegek 5 éves tünetmentes túlélése átlagosan 55-75% között van. A kemoterápiára jól válaszoló esetek ötéves túlélése 91-95% között mozog, a kemoterápiára kevésbé reagáló daganatoknál ez mindössze 50-60%. Utóbbi betegcsoportban szignifikánsan magasabb a relapsus ráta, a betegek több mint 40%-



ában a betegség progrediál és halálhoz vezet a pulmonális metasztázisok kialakulása miatt [88,89].

Az osteosarcoma kedvezőtlen prognosztikai faktorai: a metasztázis jelenléte a diagnózis idejében, a 40 év feletti életkor, a férfi nem, a nem végtagi lokalizáció, a tumor nagy térfogata, az emelkedett szérum laktát-dehidrogenáz, alkalikus foszfatáz és a rossz hisztológiai válasz a preoperatív kemoterápiára [90,91]. Az osteosarcomás betegek szérumából kimutatott „bone sialoprotein” (BSP) és c-erbB2 expresszió rossz prognózisra utalhat, mivel az esetleges mikrometasztázisokat jelentheti.

A számos kutatás ellenére a kemoterápiára adott alacsony válaszarány továbbra is megoldandó probléma az osteosarcomás betegekben. Klinikai vizsgálatok igazolták, hogy a kemoterápiára rosszul reagáló betegek esetében alkalmazott agresszívebb kemoterápia nem járt sikerrel, csak az amúgy sem elhanyagolható mellékhatásokat tovább növelte [86].

A gyógyszeres kezelések kapcsán kialakuló toxikus mellékhatások mind a beteg, mind az őt kezelő orvos számára súlyos problémát jelentenek. Jelenleg nem pontosan ismeretesek azok a paraméterek amelyek a túlérzékenységet okozzák, azonban feltehetően a genetikai faktorok szerepe igen jelentős. A genetikai predispozíció felismerése, egy adott gyógyszerrel szembeni fokozott érzékenység előrejelzése különösen a gyermekek gyógyszeres kezelése kapcsán nagy jelentőségű.

### ***1.5.1 A metotrexát kezelés jellemzése és a toxicitás farmakogenetikai vonatkozásai***

A metotrexát (MTX) egy folátantagonista, amelyet széles körben alkalmaznak a malignus és benignus betegségek kezelésére, mint citotoxikus, gyulladáscsökkentő vagy immunszuppresszív gyógyszert. A nagy dózisú MTX (HD-MTX) az egyik legfontosabb hatóanyag az osteosarcoma (OSC) adjuváns kezelésében [92]. A gyógyszerrel összefüggő halálozás incidenciáját csökkenteni lehet a szérum MTX szint farmakokinetikai követése alapján alkalmazott leukovorin „rescue”-val, a vizelet lúgosítása és hidratáció mellett [93]. Ennek ellenére akut és késői toxicitások, mint a hányás, mucositis, májtoxicitás, myelosuppressio, veseelégtelenség és neurológiai zavarok még mindig klinikai problémát jelentenek. Az MTX-indukált neurotoxicitás magába foglalja a hányingert, hányást, fejfájást, szédülést, memóriazavart, letargiát,

afáziát, homályos látást, görcs rohamokat, hallucinációt és leukoencephalopathiát [94]. Az akut toxicitás általában átmeneti, permanens károsodás nélkül. A neurotoxicitás pontos patofiziológiai mechanizmusa még nem világos, bár az elmúlt tíz évben széles körben vita tárgyát képezte. Feltételezték, hogy az MTX által okozott neurotoxicitás a központi idegrendszer közvetlen az MTX-okozta károsodásának a következménye. Ehhez még hozzájárulnak az MTX által indukált metabolikus változások, amelyek felelősek lehetnek a megfigyelt neurotoxicitásért [95]. Az MTHFR-nek kulcsszerepe van a folát ciklusban: az 5,10-metilén-THF-ot alakítja 5-metil-THF-tá (1. ábra). Ez a folyamat aktív folátot generál a DNS és Hcy metiláció és a DNS szintézis számára. Az *MTHFR* leggyakoribb polimorfizmusa a 677 nukleotid pozícióban a C->T csere, ami a valin alaninná történő cseréjét okozza az aktív enzimben, ami az aktivitásának 35 ill. 70%-os csökkenésével jár a heterozigótákban ill. a homozigóta variánsokban [96]. Az *MTHFR* 677 TT genotípus a sejtközi folát összetétel kiegyensúlyozatlanságát eredményezi és az antimetabolit kezelés, pl. az MTX is, előidézhethet homociszteinemiát, további toxicitást okozva. A homocisztein legalább is részben felelős az ischémiás fehérállomány változásaiért, az elmeszesedő mikroangiopathiáért és a fokális idegrendszeri hiányosságokért az MTX kezelést követően [97]. Számos beszámoló foglalkozik az *MTHFR* C677T polimorfizmus és MTX toxicitás kapcsolatával [98,99, 100,101,102,103,104], ugyanakkor az *MTHFR* A1298C polimorfizmus jelentősége a MTX kezelésben, a toxicitásban még nincs hasonló részletességgel megvizsgálva. Két vizsgálatban tapasztalták akut limfoid leukémia kezelésekor, hogy az *MTHFR* 1298C allél jelenlétében szignifikánsan kevesebb MTX toxicitás fordul elő [105,106].

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataim során a folát anyagcsere egyes génpolimorfizmusainak szerepét kívántam tanulmányozni a rosszindulatú daganatos megbetegedésekben a 1.) rákrizikó, 2.) a citotoxikus kezelésre adott válasz és 3.) a kialakuló mellékhatások szempontjából.

### 1.) A vizsgált polimorfizmusok hatása a colon és rectum daganat kialakulásának rizikójára

Az *SHMT1* C1420T és az *MTHFR* C677T polimorfizmusok jelentősége a colon- és rectumrák rizikójában. Az *SHMT1* C1420T és az *MTHFR* C677T polimorfizmusok hatásának vizsgálata a Hcy szintekre, mint esetleges rákrizikó tényezőre.

### 2.) A vizsgált polimorfizmusok hatása a kezelésre adott válaszra

Az 5-FU-val kapcsolatos génpolimorfizmusok (*TYMS*, *MTHFR* és *SHMT1*) és más markerek (dihidropirimidin dehidrogenáz (DPD) enzimaktivitás, Hcy, és a becsült szérum kreatinin klírens (eCcr)) hatásának tesztelése első vonalbeli FOLFIRI + bevacizumab kezelési séma hatékonyságára metasztatikus colorectalis daganatos betegeken, ami magába foglalja a klinikai választ, a progressziómentes (PFS) és a teljes túlélést (OS), valamint a mellékhatások kiértékelését is.

### 3.) A vizsgált polimorfizmusok hatása a kezelése alatt jelentkező toxikus mellékhatásokra

A 2. pontban vizsgált polimorfizmusok vizsgálata a FOLFIRI+bevacizumab kezelés nyomán kialakult mellékhatásokra.

A folát anyagcsere génpolimorfizmusainak szerepét a mellékhatások kialakulásában egy külön esettanulmányban is meg kívántuk erősíteni. Tanulmányunkban egy HD-MTX-tal kezelt osteosarcomás beteget írunk le. Az MTX infúziót követően, akut idegrendszeri rendellenességeket észleltünk, amit súlyos májtoxicitás és elhúzódó MTX klírens követett. Az akut toxicitás vizsgálatára farmakogenetikai és farmakokinetikai módszereket alkalmaztunk.

### **3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK**

#### **3.1 A rákrizikó szempontjából tanulmányozott populációk**

A beteg-kontrollos tanulmányba 955 colorectalis adenocarcinomás beteget vontunk be. A colonrákosok száma 476, míg a rectumrákosoké 479. A 461 és 478 nemben és korban a colon- és rectumrákosoknak megfelelően nem daganatos egyént az ország minden területéről vontunk be a kontroll csoportba. Egymás után jelentkező betegeket válogattunk be az ország minden területéről, akiket Dukes A, B, C vagy D stádiumú colon- vagy rectumrákkal diagnosztizáltak és 2001 és 2007 között az Országos Onkológiai Intézetben operáltak és/vagy (radio-)kemoterápiában részesítettek. Az intézet az egyik legnagyobb radioterápiás központ Magyarországon, ezért a rectumrákos betegek nagyobb arányban szerepelnek, mint kisebb területi centrumokban. A vizsgált csoportban 24 betegnek volt a rectum-sigma határon elhelyezkedő tumora. Közülük a klinikai kezelés alapján (radioterápiában részesültek) 12 került a rectum tumoros csoportba a statisztikai analízis során. Azon betegek, akiknek korábbi tumoros megbetegedésük volt, vagy a jelenlegi megbetegedéssel egyidőben egyéb, nem áttétből adódó daganatos megbetegedésük volt, nem kerültek be a vizsgálatba. A vesekárosodás miatt hiperhomociszteinémiás ( $Hcy > 35 \mu M$ ) betegeket kizártuk. Azokat a betegeket, akiknél igazolt volt vagy felmerült a familiáris adenomatosis polyposis vagy hereditær nonpolyposus CRC gyanúja, szintén kizártuk a vizsgálatból.

A kontroll populáció egészséges véradókból, egészségügyi dolgozókból és nem-rákos betegekből állt. A BMI-t a betegek és kontrollok esetében is rögzítettük. A BMI számolást a legegyszerűbben kivitelezhető és legelfogadottabb testtömeg (kg)/magasság<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>) képlettel számoltuk ki.

A tanulmányt az intézet Etikai Bizottsága jóváhagyta, a résztvevőktől a beválasztás vagy mintavétel előtt aláírt tájékoztató és beleegyező nyilatkozatot kértünk.

### **3.2 A FOLFIRI+bevacizumab terápiával kezelt betegek**

A betegek a vizsgálathoz az intézet kemoterápiás osztályairól véletlenszerűen válogattuk be. A betegek bevonása ebbe a prospektív tanulmányba 2006. januárban kezdődött és 2008. szeptemberben fejeződött be.

85 beteg volt alkalmas a besorolásra (46 férfi és 39 nő; medián kor 56 év), akiknek hisztológiailag igazolt, nem műthető, metasztatikus CRC-juk volt legalább egy RECIST szerint radiológiailag mérhető lézióval. A következő beválasztási kritériumokat vettük figyelembe: a várható élethossz  $\geq 12$  hét; az "Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status" (ECOG)  $\leq 2$ ; megfelelő máj, vese és csontvelő funkciók. A betegek nem kerültek beválasztásra, ha korábban a metasztatikus CRC miatt célzott vagy kemoterápiás kezelésben részesültek, vagy ellenőrizhetetlenül súlyos szervi vagy metabolikus működési zavaruk, vagy ismert központi idegrendszeri áttétjük volt. A tumorválaszt minden 2-3 hónapban CT és/vagy MRI segítségével értékeltük ki a „Response Evaluation Criteria in Solid Tumors 1.1” [107] alapján és teljes remisszió (CR), részleges remisszió (PR), stabil betegség (SD) és progresszív betegség (PD) csoportokba soroltuk be. A tanulmányt jóváhagyta az intézet Etikai Bizottsága, a betegektől beválasztás vagy mintavétel előtt tájékoztató alapján beleegyező nyilatkozatot kértünk.

### **3.3 A FOLFIRI+bevacizumab kezelés**

A FOLFIRI+B kezelési séma a következőt foglalja magába: B (5 mg/kg), irinotecan ( $180 \text{ mg/m}^2$ ), bólus 5-FU ( $400 \text{ mg/m}^2$ ) és leukovorin ( $400 \text{ mg/m}^2$ ), amit 46-órás 5-FU infúzió követ ( $2400 \text{ mg/m}^2$ ). Ezt a kezelési módot alkalmaztuk minden 2 hétben és progresszióig vagy nem tolerálható mellékhatások megjelenéséig folytattuk. Az első két B infúzió 90, majd 60 perc alatt adtuk be. A további B infúziók 30 percig tartottak, ha a korábbi infúziókat jól tolerálta a beteg.

Dózis csökkentésre a FOLFIRI kezelés által kiváltott 3-as és 4-es fokú toxicitás miatt volt szükség. A mellékhatások osztályozása a „National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), version 3.0” alapján történt.

### 3.4 Mintaelőkészítés a rákrizikó vizsgálatához

A betegektől és kontrolloktól reggel éhgyomorra vérmintát vettünk EDTA-s (15%) csőbe. A perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC) Ficoll gradiens módszerrel izoláltuk a teljes vérből. A PBMC-ből a DNS-t Master Pure TM Genomic DNA Purification Kit (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA) segítségével vontuk ki a gyártó utasításai alapján. A vérplazmából aliquotokat fagyasztottunk le 10 percen belül a vérvételt követően és -84°C-on tároltuk a Hcy meghatározásig.

### 3.5 Genotipizálás

Az *MTHFR* genotípusokat a beteg perifériás vérből izolált limfocitákból nyer DNS mintából határoztuk meg standard módszerek felhasználásával. Az *MTHFR* C677T (rs1801133) genotípusokat PCR-RFLP módszerrel határoztuk meg a Frosst és mtsai által leírt metodikának megfelelően [96]. A C677T esetében a PCR reakció után a *Hinf*I emésztést alkalmaztuk. A minták kb. 10%-át egy olyan személy újra megvizsgálta, aki nem vett részt a korábbi adatgyűjtésben. Az eredmények között nem volt eltérés. Az emésztés után a termékeket kapilláris elektroforézissel és lézer-indukált fluoreszcens detekcióval (ABI PRISM TM 310) értékeltük ki.

Az *SHMT1* C1420T polimorfizmus (rs1979277) meghatározását allél diszkriminációs módszer alkalmazásával végeztük, amikor is a Skibola és mtsai által leírt fluorogén 3'-kis-árok kötő (MGB) próbát használtunk [34]. A valós-idejű PCR-t Rotorgene 2000 real-time készüléken (Corbette Research, Mortlake, Ausztrália) végeztük. A minták kb. 10%-át párhuzamosan genotipizáltuk valós-idejű PCR és PCR-RFLP módszerrel *Eam* *1104*I restrikciós enzimmal (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). A különbség a két metodika között 1% alatt volt.

A TYMS 5'UTR VNTR és 3'UTR ins/del polimorfizmust a korábban leírtak szerint vizsgáltuk [108]. A minták kb. 10%-át újravizsgálta egy olyan személy, aki nem ismerte a korábbi adatgyűjtést. Nem volt eltérés az eredményekben.

### 3.6 Biokémiai és hematológiai paraméterek meghatározása

A Hcy szintet HPLC technikával határoztuk meg Hcy kit (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany) alkalmazásával. A kitek közti változékonyság (teljes variációs koefficiens, %) a minőség-ellenőrzési minták esetében 4,4% volt. A betegek esetén a Hcy szintet a műtéti beavatkozás és/vagy (radio)kemoterápia előtt határoztuk meg éhgyomri állapotban. A normál Hcy felső értékét (15  $\mu$ M) használtuk vágóértéknek.

Az egyéb biokémiai és hematológiai paramétereket standard laboratóriumi módszerekkel határoztuk meg. A becsült kreatinin klírens (eCcr) értékét Cockcroft & Gault módszerével számoltuk ki [109]. Az eCcr medián értékét (95  $\mu$ M) használtuk vágóértéknek.

A PBMC DPD aktivitását radioenzimatikus módszerrel vizsgáltuk, korábbi részletes leírásunk szerint [110]. Egy korábbi tanulmányunk eredményei alapján a vágóértéket 15 pmol/perc/ $10^6$  PBMC-ben határoztuk meg [111].

A fenti eljárások alatt a vizsgálatot végző személy nem ismerte a minták eredetét.

### 3.7 Statisztikai analízis

#### 3.7.1 Az eset-kontrollos tanulmány statisztikai módszerei

Az átlagokat és arányokat a betegek és kontrollok esetén t teszttel és  $\chi^2$  jó-illeszkedés teszttel vizsgáltuk kivéve a Hcy-t, ahol Mann-Whitney U tesztet használtunk. A diplotípusok megoszlásának különbségét a variáns alléllal rendelkező csoportok összevonásával elemeztük. A nem mellett, a kor esetén a medián 60 évet használtuk küszöbértéknek a stratifikálásnál. A polimorfizmusok és a rákrizikó kapcsolatát nemre, korra és BMI-re illesztett logisztikus regresszióval értékeltük ki. A nemre, korra és BMI-re stratifikált analízis esetében az illesztést rendre korra és BMI-re, nemre és BMI-re valamint nemre és korra végeztük el. Az eredményeket esély-arány (odds ratio, OS) és 95%-os konfidencia intervallum (95% CI) feltüntetésével adtuk meg. Az OR

trendeket (gén-dózis hatás) sorrendi értékeknek a genotípushoz való hozzárendelésével számoltuk ki.

A Hardy-Weinberg egyensúly (HWE) tesztelése Haploview 4.1 programmal (Daly Lab at the Broad Institute, Cambridge, MA, USA) történt.

A feltételezhető populációs rétegződésből eredő hiba lehetséges hatásának megbecsülésére a tanulmányozott populációban a Lee és Wang képlet alkalmas [112].

Az alkalmazott képlet:

$U = (GB)^{1/2} [(GB)^{1/2} + 1]^2 [(GB)^{1/2} + G]^{-1} [(GB)^{1/2} + B]^{-1}$ , ahol  $G = A_H A_L^{-1} (1 - A_L) (1 - A_H)^{-1}$  és  $B = D_H D_L^{-1}$ ;  $A_{H, L}$  – a legmagasabb és legalacsonyabb allél frekvenciák;  $D_{H, L}$  – a legmagasabb és legalacsonyabb megbetegedési ráták. Azért, hogy az eredményeket ne lehessen kizárólag csak a populációs rétegződésből eredő hibával magyarázni, a tényleges OR-nek nagyobbak kell lennie, mint a számított U.

Az európai országok *SHMTI* C1420T genotípus frekvenciái megtalálhatók a dbSNP adatbázisban [113], a magyarországi *MTHFR* C677T genotípus frekvenciákról 12 független közlemény számol be. Az európai [114] és magyarországi (Nemzeti Rákregiszter 2001-2007, Gaudi I. személyes közlése) colon- ill. rectumrák incidenciákat használtuk fel.

A nem, kor, BMI és Dukes stádiumra illesztett átlag Hcy értékeket a különböző geno- és diplotípusok esetén Kruskal-Wallis ANOVA és Kruskal-Wallis Z post-hoc teszttel hasonlítottuk össze. Hasonló analízist végeztünk a különböző Dukes stádiumokban a nemre, korra és BMI-re megfeleltetett Hcy átlagértékekkel. A különböző Dukes stádiumokra a lineáris trendet is teszteltük. A Dukes A csoportot kis létszáma miatt a B stádiumú betegekhez csatoltuk.

Minden statisztikai tesztet az NCSS szoftverrel (Hintze, J. 2001. NCSS and PASS. Number Cruncher Statistical System, Kaysville, UT, <http://www.ncss.com>) végeztük. Az 5%-os szintet és ha a 95% CI nem tartalmazta az egységet tekintettünk szignifikánsnak.



### ***3.7.2 A FOLFIRI+bevacizumab kezeléses tanulmány statisztikai módszerei***

A biológiai jellemzők és klinikai válasz közti összefüggést *rx*c egzakt teszttel vizsgáltuk [115]. A túlélést Kaplan-Meier módszerrel és log-rank teszttel értékeltük. Többváltozós Cox regressziót használtunk az egyes faktorok túlélésre gyakorolt hatásának a kiértékelésére. A kockázati arányt (HR) és a 95%-os konfidencia intervallumot (CI) tüntettük fel. A különböző paraméterek befolyását a magas vérnyomásra többváltozós logisztikus regressziós analízissel számoltuk ki. A többváltozós analíziseket korra, nemre, tumor méretre és differenciáltsági fokra, a metasztázis helyére, az általános állapotra, az adjuváns kezelésre és a platina-alapú kemoterápiára (másod és harmad vonalban, csak az OS esetében) illesztettük. Abban az esetben, ha a többváltozós analízis független változót eredményezett a túléléseket Kaplan-Meier módszerrel és log-rank teszttel is kiértékeljük. Minden statisztikai tesztet (kivéve az egzakt tesztet) NCSS szoftverrel végeztük el.

### ***3.7.3 Az esetleíró tanulmány statisztikai módszerei***

A szérumban MTX és a metabolit, 7-hidroxi-metotrexát (7-OH-MTX), koncentrációk időbeni változását mutató görbéket MEDUSA™ 1.5 (CheMicro Kft, Budapest) programmal illesztettük.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1 A folátciklus génpolimorfizmusainak hatása a rákrizikóra colon- és rectumdaganatos betegek esetében

A betegek és kontrollok válogatott jellemzőit és genotípus megoszlását a 2. táblázatban összegeztük. A betegek és kontrollok kor, nem és BMI szerinti megoszlása megegyezett. A Hcy szintek szignifikánsan magasabbak voltak a rákosokban (átlag $\pm$ SE:  $20.8 \pm 0.30$ ;  $p < 0.0001$  és  $19.1 \pm 0.27$ ;  $p < 0.0001$  a colon- és rectumrákban), mint a megfelelő kontrollokban ( $17.9 \pm 0.32$  és  $17.7 \pm 0.30$ ) (2. táblázat).

Az *SHMT1* C1420T és *MTHFR* C677T genotípusok megoszlása mind a betegek, mind a kontrollok esetében megfelelt a HWE-nak (*SHMT1*: kontroll  $p = 0.131$  és colonrák  $p = 0.843$ ; kontroll  $p = 0.167$  és rectumrák  $p = 0.973$ ; *MTHFR*: kontroll  $p = 0.074$  és colonrák  $p = 0.063$ ; kontroll  $p = 0.126$  és rectumrák  $p = 0.403$ ). (Ezek az adatok a táblázatban nincsenek megadva.)

A betegek és kontrollok genotípus megoszlásának egyváltozós összehasonlítása csak a rectumrákos csoportnál mutatott szignifikáns különbséget, mind az *SHMT1* C1420T, mind az *MTHFR* C677T polimorfizmus esetén. Egy ellentétes elmozdulás figyelhető meg a variáns homozigótától a vad típus felé az *SHMT1* és a vad típustól a heterozigóták felé az *MTHFR* esetében, ezért az *SHMT1* CT+TT / *MTHFR* CC diplotípusok szignifikánsan alulreprezentáltak a rectumrákos csoportban (2. táblázat). A nem összevont diplotípus csoportok megoszlását a 3. táblázat tartalmazza.

**2. táblázat** Válogatott klinikai jellemzők és az *SHMT1* 1420 ill. *MTHFR* 677

genotípus frekvenciák a colon- és rectumrákosok ill. kontrollok esetén

Paraméterek	Kontroll n = 461 n (%)	Colonrák n = 476 n (%)	p	Kontroll n = 478 n (%)	Rectumrák n = 479 n (%)	p
<b>Kor (év)</b>						
átlag ± SD	59.2 ± 12.4	59.5 ± 11.9	0.733	58.9 ± 11.1	58.9 ± 10.5	0.938
< 60	230 (50)	226 (47)	0.300	246 (51)	238 (50)	0.437
≥ 60	231 (50)	250 (53)		232 (49)	241 (50)	
<b>Nem</b>						
Férfi	218 (47)	227 (48)	0.863	304 (64)	302 (63)	0.803
Nő	243 (53)	249 (52)		174 (36)	177 (37)	
<b>BMI</b>						
átlag ± SD	26.2 ± 3.9	26.2 ± 4.0	1.000	26.5 ± 3.5	26.4 ± 4.3	0.882
<b>Dukes stádium</b>						
A		3 (1)			3 (1)	
B		107 (22)			102 (21)	
C		181 (38)			220 (46)	
D		185 (39)			154 (32)	
<b><i>SHMT1</i> 1420</b>						
CC	220 (48)	228 (48)	0.360	220 (46)	249 (52)	0.002
CT	186 (40)	201 (42)		198 (41)	192 (40)	
TT	55 (12)	47 (10)		60 (13)	38 (8)	
CT+TT	241 (52)	248 (52)	0.939	258 (54)	230 (48)	0.009
<b><i>MTHFR</i> 677*</b>						
CC	216 (47)	208 (44)	0.396	226 (47)	190 (40)	0.002
CT	186 (40)	196 (42)		194 (41)	231 (48)	
TT	59 (13)	68 (14)		58 (12)	58 (12)	
CT+TT	245 (53)	264 (56)	0.230	252 (53)	289 (60)	0.001
<b><i>SHMT1 / MTHFR</i></b>						
CC / CC	89 (19)	93 (20)	0.160	91 (19)	103 (22)	<0.001
CC / CT+TT	131 (29)	132 (28)		129 (27)	146 (30)	
CT+TT / CC	127 (28)	115 (24)		135 (28)	87 (18)	
CT+TT/CT+TT	114 (24)	132 (28)		123 (26)	143 (30)	
<b>Hcy</b>						
átlag ± SD	17.9 ± 6.9	20.8 ± 6.5	0.000	17.7 ± 6.6	19.1 ± 5.9	0.000

\* 4 colonrákos esetében sikertelen volt a genotipizálás

**3. táblázat** Az *SHMT1* 1420 / *MTHFR* 677 diplotípusok megoszlása a colon- és rectumrákosok ill. a megfelelő kontrollok esetében

Diplotípus	Megoszlás					
	Kontroll	Colonrák	p	Kontroll	Rectumrák	p
<i>SHMT1</i> 1420 / <i>MTHFR</i> 677	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
CC / CC	89 (19)	93 (20)	0.188	91 (19)	103 (21.5)	<0.001
CC / CT	92 (20)	92 (19)		96 (20)	113 (23.6)	
CC / TT	39 (9)	40 (9)		33 (7)	33 (6.9)	
CT / CC	97 (21)	87 (18)		104 (22)	69 (14.4)	
CT / CT	75 (16)	91 (19)		75 (16)	99 (20.7)	
CT / TT	14 (3)	22 (5)		19 (4)	24 (5.0)	
TT / CC	30 (7)	28 (6)		31 (6)	18 (3.7)	
TT / CT	19 (4)	13 (3)		23 (5)	19 (4.0)	
TT / TT	6 (1)	6 (1)		6 (1)	1 (0.2)	

Nem figyelhető meg eltérés a colonrákban az *SHMT1* és az *MTHFR* CT vagy TT genotípus és a CC genotípus összehasonlításakor (4. táblázat). A colonrákkal ellentétben a rectumrák kockázati aránya szignifikánsan alacsonyabb az *SHMT1* TT és magasabb az *MTHFR* CT genotípusok esetén.

Gén-dózis hatást csak az *SHMT1* esetében észleltünk, amikor is a T allél számának növekedésével fokozatosan csökkent a kockázat részaránya ( $p = 0,014$ ). A kor és nem szerint stratifikált kiértékelés kimutatta, hogy a rectumrák kapcsolata ezekkel a polimorfizmusokkal a fiatalabbak (< 60 év) és férfiak esetében van jelen a leghatározottabban (4. táblázat).

**4. táblázat** A teljes, nem- és korszpecifikus colon- és rectumrák rizikó az *SHMT1* 1420 és *MTHFR* 677 genotípusok esetében

	<b>Colonrák</b>	<b>P</b>	<b>Rectumrák</b>	<b>p</b>
	<b>OR* (95% CI)</b>	<b>p<sup>†</sup></b>	<b>OR* (95% CI)</b>	<b>p<sup>†</sup></b>
<i>SHMT1</i> 1420				
CC	1.00 (referencia)	0.611	1.00 (referencia)	0.014
CT	1.07 (0.81-1.41)	0.62	0.86 (0.66-1.13)	0.27
TT	0.86 (0.56-1.33)	0.49	0.57 (0.36-0.89)	0.013
CT+TT	1.02 (0.79-1.32)	0.90	0.80 (0.62-1.03)	0.08
<i>MTHFR</i> 677				
CC	1.00 (referencia)	0.338	1.00 (referencia)	0.083
CT	1.08 (0.81-1.42)	0.61	1.40 (1.06-1.84)	0.016
TT	1.19 (0.80-1.78)	0.39	1.14 (0.75-1.73)	0.53
CT+TT	1.11 (0.87-1.44)	0.43	1.35 (1.04-1.74)	0.024
<b>Férfiak</b>				
<i>SHMT1</i> 1420				
CC	1.00 (referencia)	0.334	1.00 (referencia)	0.015
CT	0.93 (0.63-1.39)	0.73	0.92 (0.65-1.29)	0.63
TT	0.75 (0.40-1.39)	0.36	0.42 (0.23-0.75)	0.003
CT+TT	0.89 (0.61-1.30)	0.54	0.80 (0.58-1.10)	0.16
<i>MTHFR</i> 677				
CC	1.00 (referencia)	0.121	1.00 (referencia)	0.494
CT	1.36 (0.91-2.05)	0.14	1.45 (1.03-2.05)	0.034
TT	1.42 (0.80-2.50)	0.23	0.89 (0.52-1.51)	0.67
CT+TT	1.37 (0.94-2.00)	0.10	1.29 (0.94-1.79)	0.12
<b>Nők</b>				
<i>SHMT1</i> 1420				
CC	1.00 (referencia)	0.824	1.00 (referencia)	0.390
CT	1.22 (0.83-1.80)	0.31	0.77 (0.49-1.22)	0.27
TT	0.94 (0.50-1.74)	0.83	0.97 (0.47-2.01)	0.93
CT+TT	1.13 (0.79-1.62)	0.50	0.80 (0.52-1.22)	0.29
<i>MTHFR</i> 677				
CC	1.00 (referencia)	0.863	1.00 (referencia)	0.052
CT	0.87 (0.59-1.28)	0.48	1.39 (0.88-2.19)	0.16
TT	1.07 (0.60-1.90)	0.82	1.81 (0.91-3.60)	0.09
CT+TT	0.93 (0.65-1.33)	0.68	1.45 (0.94-2.23)	0.09

<b>Kor &lt; 60 év</b>					
<i>SHMT11420</i>					
CC	1.00 (referencia)	0.485	1.00 (referencia)	0.002	
CT	1.22 (0.82-1.82)	0.33	0.81 (0.55-1.19)	0.29	
TT	0.67 (0.37-1.23)	0.19	0.32 (0.16-0.61)	0.0006	
CT+TT	1.08 (0.74-1.57)	0.69	0.69 (0.48-0.99)	0.044	
<i>MTHFR 677</i>					
CC	1.00 (referencia)	0.047	1.00 (referencia)	0.112	
CT	1.72 (1.15-2.59)	0.008	1.97 (1.33-2.92)	0.0007	
TT	1.37 (0.77-2.44)	0.29	0.98 (0.54-1.76)	0.94	
CT+TT	1.65 (1.14-2.39)	0.008	1.67 (1.16-2.40)	0.005	
<b>Kor ≥ 60 év</b>					
<i>SHMT11420</i>					
CC	1.00 (referencia)	0.943	1.00 (referencia)	0.763	
CT	0.91 (0.62-1.34)	0.64	0.90 (0.61-1.32)	0.58	
TT	1.13 (0.59-2.18)	0.71	1.04 (0.54-1.98)	0.91	
CT+TT	0.92 (0.64-1.33)	0.67	0.92 (0.64-1.31)	0.63	
<i>MTHFR 677</i>					
CC	1.00 (referencia)	0.489	1.00 (referencia)	0.432	
CT	0.70 (0.47-1.03)	0.07	1.03 (0.70-1.52)	0.89	
TT	0.99 (0.56-1.73)	0.96	1.33 (0.73-2.42)	0.35	
CT+TT	0.75 (0.52-1.08)	0.13	1.08 (0.74-1.56)	0.70	

\* illetve a nemre, korra és BMI-re a teljes rizikó esetén, korra és BMI-re illetve a nem-specifikus rizikó esetén, nemre és BMI-re illetve a kor-specifikus rizikó esetén; † a gén-dózis hatás tesztje

A BMI szerinti (<25 vs ≥25) stratifikált elemzés nem eredményezett szignifikáns különbségeket.

A diplotípusok alapján történő kockázati elemzés kapcsán megfigyelhető, hogy az *SHMT1 1420T* allél legerősebben a vad típusú *MTHFR* esetén csökkenti a rectumrák rizikót (5. táblázat). Az *SHMT1 1420T* allél rizikócsökkentő hatása teljesen eltűnik az *MTHFR T* allél meglétekor. A teljesség érdekében OR minden egyes diplotípusra a 6. táblázatban van feltüntetve.

**5. táblázat** Az SHMT1 1420 / MTHFR 677 összevont diplotípusok colon- és rectumrák rizikója

Diplotípus <i>SHMT1 / MTHFR</i>	Colonrák		Rectumrák	
	beteg / kontroll	OR* (95% CI)	beteg / kontroll	OR* (95% CI)
CC / CC	93/89	1.00 (referencia)	103/91	1.00 (referencia)
CC / CT+TT	132/131	0.95 (0.65-1.39)	146/129	0.99 (0.69-1.44)
CT+TT / CC	115/127	0.87 (0.59-1.27)	87/135	0.57 (0.39-0.84) <sup>†</sup>
CT+TT / CT+TT	132/114	1.10 (0.75-1.62)	143/123	1.02 (0.71-1.48)

\* nemre, korra és BMI-re illesztve; † eltér a referenciától (p = 0.005) vagy a CT+TT / CT+TT diplotípustól (p = 0.002)

**6. táblázat** Az SHMT1 / MTHFR 677 diplotípusok colon- és rectumrák rizikója

Diplotípus <i>SHMT1 1420 / MTHFR 677</i>	Rákrizikó			
	Colonrák OR* (95%CI)	p	Rectumrák OR* (95%CI)	p
CC / CC	1.00 (referencia)		1.00 (referencia)	
CC / CT	0.94 (0.62-1.42)	0.778	1.04 (0.70-1.54)	0.857
CC / TT	0.97 (0.57-1.65)	0.910	0.88 (0.50-1.54)	0.659
CT / CC	0.86 (0.57-1.29)	0.462	0.57 (0.39-0.89)	0.012
CT / CT	1.15 (0.76-1.76)	0.506	1.16 (0.77-1.76)	0.472
CT / TT	1.50 (0.73-3.14)	0.271	1.11 (0.57-2.17)	0.750
TT / CC	0.90 (0.50-1.62)	0.721	0.51 (0.27-0.98)	0.043
TT / CT	0.66 (0.31-1.41)	0.279	0.72 (0.37-1.42)	0.355
TT / TT	0.95 (0.29-3.07)	0.933	0.15 (0.02-1.25)	0.080

\* nemre, korra és BMI-re illesztve

Mivel az *SHMT1* C1420T genotípusok magyarországi megoszlása nem áll rendelkezésre, ezért az európai genotípus frekvenciákat és rectumrák incidenciákat használtuk, hogy megbecsüljük a populációs rétegződésből adódó hibák lehetőségét.

Az *SHMT1* 1420 CC+CT frekvenciák Európában 0,833 és 0,913 közé esnek [113], a rectumrák incidenciája kb. 9 és 37 között van 100.000 lakosra számítva a különböző európai országokban [114]. Lee és Wang képletét használva azt találtuk, hogy a hiba felső határa 1,29, ami kevesebb mint  $1/0,55 = 1,82$ , ami a tanulmányunkban megfigyelt OR az *SHMT1* 1420C allélt hordozók esetén. Az *MTHFR* C677T esetében 12 egymástól független publikációt találtunk a magyar népességről, ami alapján a CT+TT frekvenciák 0,412 és 0,7 között vannak. A rectumrák incidenciája Magyarországon kb. 32 és 38 közé esik 100.000 lakosra számítva, ezért a hiba felső határa 1,05, ami alacsonyabb, mint 1,38, amit a magyar *MTHFR* 677T allélt hordozók esetében találtunk.

#### ***4.1.1 A vizsgált polimorfizmusok hatása a homocisztein szintre***

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az *SHMT1* C1420T és az *MTHFR* C677T polimorfizmus hatását, a nemre, korra és BMI-re igazított átlag Hcy szinteket hasonlítottuk össze a kontrollok és betegek különböző diplotípusaiban. A Hcy szinteket a betegek esetében Dukes stádiumra is igazítottuk, mivel az átlag Hcy szintek szignifikánsan magasabbak az előrehaladott stádiumú betegségben (7. táblázat).



**7. táblázat** A colon- és rectumrákosok ill a kontrollok szérumban teljes homocisztein szintje különböző Dukes stádiumban és *SHMT1* 1420 / *MTHFR* 677 diplotípusok esetén

Dukes stádium	Átlag szérumban teljes homocisztein* (95% CI) [ $\mu$ M]			
	Kontroll	Colonrák	Kontroll	Rectumrák
	17.9 (17.3-18.5)		17.7 (17.1-18.3)	
A, B		19.4 (16.9-21.8)		18.3 (16.9-19.6)
C		20.8 (19.1-22.5) <sup>°</sup>		19.1 (17.9-20.2) <sup>°</sup>
D		21.6 (20.7-22.6) <sup>°</sup>		20.4 (19.6-21.3) <sup>°</sup>
		$p^{\dagger} = 0.031$		$p^{\dagger} = 0.036$
		trend $p = 0.059$		trend $p = 0.053$
<b><i>SHMT1</i> 1420 / <i>MTHFR</i> 677</b>	Kontroll	Colonrák**	Kontroll	Rectumrák**
CC / CC	15.6 (14.2-17.0)	20.7 (18.9-22.5) <sup>°</sup>	15.9 (14.6-17.2)	19.4 (18.0-20.8) <sup>°</sup>
CC / CT+TT	16.2 (15.1-17.4)	21.5 (20.1-22.8) <sup>°</sup>	15.3 (14.4-16.1)	21.0 (19.7-22.2) <sup>°</sup>
CT+TT / CC	19.1 (17.9-20.2) <sup>#</sup>	22.8 (21.0-24.5) <sup>°</sup>	19.3 (18.1-20.5) <sup>#</sup>	19.6 (17.9-21.4)
CT+TT / CT+TT	20.3 (19.1-21.6) <sup>#</sup>	21.4 (19.8-23.0)	19.8 (18.6-21.0) <sup>#</sup>	20.8 (19.7-21.9)
	$p^{\dagger} < 0.0001$	$p^{\dagger} = 0.155$	$p^{\dagger} < 0.0001$	$p^{\dagger} = 0.221$

\* korra, nemre és BMI-re illesztve; \*\* Dukes stádiumra is illesztve; † Kruskal-Wallis egyutas ANOVA; # eltér a CC / CC vagy CC / CT+TT diplotípustól, Z-érték teszt  $p < 0.05$ ; ° eltér a kontrolltól, Mann-Whitney U-teszt  $p < 0.01$

A kontrollokban az *SHMT1* variáns allél jelenléte szignifikánsan magasabb Hcy szinteket eredményezett, míg ez a hatás a betegek esetében nem volt megfigyelhető. Az *MTHFR* T allélnak nincs egyértelmű hatása a Hcy szintekre. Az összes diplotípus csoportban az igazított átlag Hcy szintek a 8. táblázatban láthatók.

**8. táblázat** A colon- és rectumrákosok ill. a megfelelő kontrollok átlag homocisztein szintje a különböző *SHMT1* 1420 / *MTHFR* 677 diplotípusokban

Diplotípus	Átlag szérumban teljes homocisztein (95% CI) [ $\mu$ M]			
<i>SHMT1</i> / <i>MTHFR</i>	Kontroll átlag* (95% CI)	Colonrák átlag** (95% CI)	Kontroll átlag* (95% CI)	Rectumrák átlag** (95% CI)
CC / CC	15.4 (13.9-16.8)	20.7 (18.9-22.5) <sup>#</sup>	15.9 (14.6-17.2)	19.4 (18.0-20.8) <sup>#</sup>
CC / CT	15.2 (13.8-16.5)	21.0 (19.6-22.5) <sup>#</sup>	14.4 (13.6-15.2)	20.5 (19.2-21.8) <sup>#</sup>
CC / TT	17.9 (14.8-20.9)	22.3 (19.4-25.2) <sup>#</sup>	17.7 (15.2-20.3)	22.5 (19.1-26.0) <sup>#</sup>
CT / CC	18.3 (16.8-19.7)	23.1 (20.8-25.5) <sup>#</sup>	18.6 (17.2-20.0) <sup>†</sup>	18.7 (17.1-20.3)
CT / CT	20.0 (18.2-21.8) <sup>†</sup>	21.9 (19.9-23.8)	19.7 (17.9-21.4) <sup>†</sup>	21.2 (19.9-22.5) <sup>#</sup>
CT / TT	19.8 (15.8-23.8)	18.3 (14.9-21.7)	20.1 (16.9-23.3) <sup>†</sup>	19.9 (17.4-22.3)
TT / CC	20.4 (18.2-22.6) <sup>†</sup>	22.0 (19.8-24.2)	21.6 (19.1-24.2) <sup>†</sup>	22.8 (17.1-28.5)
TT / CT	21.6 (17.7-25.6) <sup>†</sup>	23.7 (16.3-31.1)	19.7 (17.4-22.1) <sup>†</sup>	20.3 (17.2-23.3)
TT / TT	23.3 (15.6-30.9)	19.9 (16.9-29.6)	21.6 (19.2-24.0) <sup>†</sup>	15.9 (13.2-23.0)

\* - korra, nemre és BMI-re illesztve; \*\* - korra, nemre, BMI-re és Dukes stádiumra illesztve; <sup>†</sup> - eltér a CC/CC vagy CC/CT diplotípusoktól, Z-érték teszt  $p < 0.05$ ; <sup>#</sup> - eltér a kontrolltól, Mann-Whitney U-teszt  $p < 0.05$

## 4.2 A vizsgált polimorfizmusok hatása a FOLFIRI + bevacizumab kezelésre adott válaszra

### 4.2.1 A FOLFIRI+bevacizumab kezelésben részesült betegek jellemzői

A betegek kliniko-patológiai jellemzői és a vizsgált polimorfizmusok genotípus frekvenciáit az 9. táblázatban tüntettük fel.

**9. táblázat** A FOLFIRI+bevacizumab kezelésben részesült betegek jellemzői

(n=85)

Paraméter	n (%)	Paraméter	n (%)
Kor (év)		eCcr (ml/perc)	
medián (min-max)	56 (26-79)	<95	43 (51)
<60	48 (56)	≥95	42 (49)
≥60	37 (44)	Hcy (μM)	
Nem		<15	16 (19)
Férfi	45 (53)	≥15	69 (81)
Nő	40 (47)	DPD (nmol/perc/10 <sup>6</sup> PBMC)	
Tumor lokalizáció		<15	28 (33)
Colon	46 (54)	≥15	57 (67)
Rectum	39 (46)	<i>MTHFR</i> 677	
Tumor differenciáció		C/C	32 (38)
Jó	9 (11)	C/T	35 (41)
Közepes	55 (64)	T/T	18 (21)
Rossz	21 (25)	<i>SHMT1</i> 1420	
Metasztázis helye		C/C	39 (46)
Máj	60 (71)	C/T	39 (46)
Tüdő	10 (12)	T/T	7 (8)
Egyéb	15 (17)	<i>TYMS</i> 5'UTR	
Adjuváns kemoterápia		3R/3R	27 (32)
Igen	33 (39)	3R/2R	41 (48)
Nem	52 (61)	2R/2R	17 (20)
Általános állapot, ECOG		<i>TYMS</i> 3'UTR <sup>#</sup>	
0	63 (74)	+6/+6	40 (48)
1	14 (17)	+6/-6	33 (39)
2	8 (9)	-6/-6	11 (13)

<sup>#</sup> 1 betegnél nem sikerült a genotipizálás; ECOG, „Eastern Cooperative Oncology Group”; PBMC, perifériás vér mononukleáris sejtek; eCcr, becsült kreatinin klírens; Hcy, szérumban lévő totál homocisztein; DPD, dihidropirimidin dehidrogenáz; *TYMS*, timidilát szintáz; UTR, nem transzlálódó régió

A legtöbb betegnek (>90%) az ECOG státusa a kezelés kezdetén 0 vagy 1. Az eCcr 37 és 220 ml/perc érték között változott. Öt betegnek (6 %) közepes (eCcr 30-59 ml/perc) míg 17 betegnek (20 %) enyhe (eCcr 60-89 ml/perc) vesekárosodása volt. A Hcy 10,8 és 29,9 (medián 20,3)  $\mu\text{M}$  érték között változott. Említésre méltó, hogy a CRC-s betegek között nagy (>80 %) a hiperhomociszteinémiások (>15  $\mu\text{M}$ ) aránya. A DPD enzimaktivitás értéktartománya 5,3 és 52,6 (medián 19,2)  $\text{pmol/perc}/10^6$  PBMC. Minden genotípus megoszlás megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúly alapján vártnak. (*MTHFR*  $p=0,157$ ; *SHMT1*  $p=0,524$ ; *TYMS* 5'  $p=0,841$ ; *TYMS* 3'  $p=0,322$ ).

#### **4.2.2 A FOLFIRI+bevacizumab kezelés hatékonysága**

Az első-vonalbeli FOLFIRI+B terápia után a legjobb terápiás válasz 10 beteg esetén CR volt (12%), 43 betegnél PR (51%), 23 beteg esetén SD (27%) és 9 beteg progrediált (10%). Az objektív válasz (CR+PR) aránya 63%, míg a klinikai haszon (CR+PR+SD) eléri a 90%-ot. A medián PFS 11 hónap (95% CI 9-13 hónap) és a medián OS 2 év (95% CI 21-27 hónap) (10. táblázat). Tizenhárom beteg (15%) a kezelés eredményeképp alkalmassá vált az áttét(ek) operációval történő eltávolítására.

Az eCcr, Hcy, DPD értékei és minden genotípus összevetésre került a kezelés hatékonyságával (10. táblázat). Az *SHMT1* 1420T allél jelenléte javít a klinikai válaszon ( $p=0,025$ ) és a klinikai haszon (98%) szignifikánsan nagyobb ( $p=0,013$ ) a vad (CC) genotípushoz viszonyítva (82%).

A progressziómentes túlélés szignifikánsan hosszabb ( $p=0,00004$ ) az *SHMT1* 1420T alléllal rendelkezőknél, mint a CC genotípusúaknál.

**10. táblázat** A FOLFIRI+bevacizumab kezelés eredményei

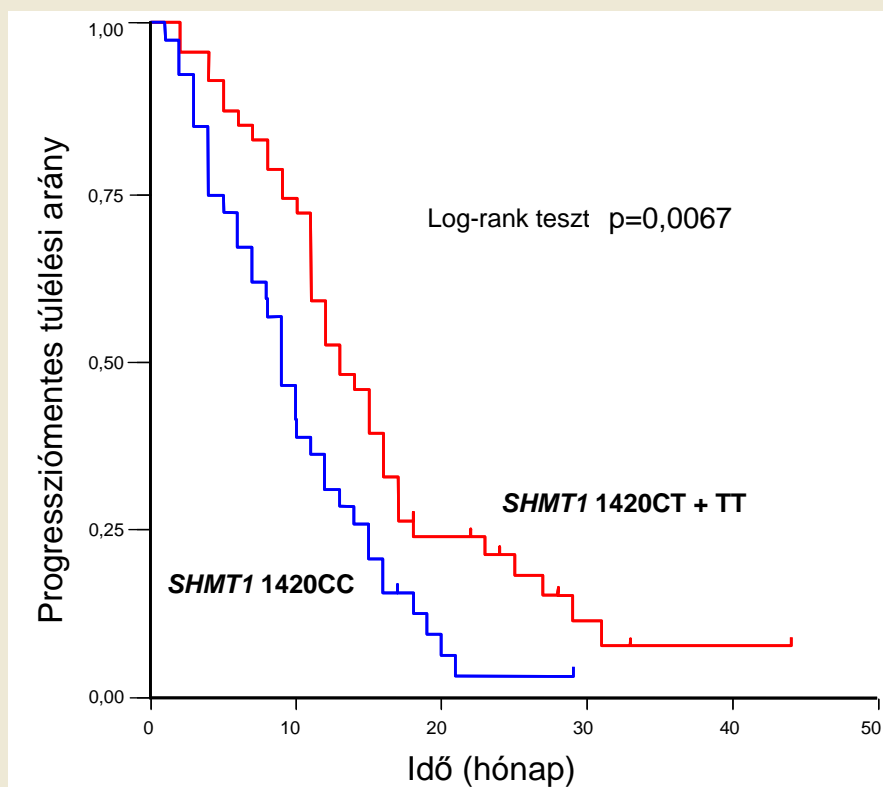
Paraméter	n	Terápiás válasz				P <sup>a</sup>
		CR	PR	SD	PD	
Összes	85	10 (12)	43 (51)	23 (27)	9 (10)	
eCcr (ml/perc)						
<95	43	5 (12)	23 (53)	11 (26)	4 (9)	
≥95	42	5 (12)	20 (48)	12 (28)	5 (12)	0,96
Hcy (μM)						
<15	16	2 (13)	10 (63)	3 (19)	1 (6)	
≥15	69	8 (12)	33 (48)	20 (29)	8 (12)	0,78
DPD (nmol/perc/10 <sup>6</sup> PBMC)						
<15	28	4 (14)	12 (43)	9 (32)	3 (11)	
≥15	57	6 (10,5)	31 (54)	14 (25)	6 (10,5)	0,75
<i>MTHFR</i> 677						
C/C	32	2 (6)	20 (63)	6 (19)	4 (12)	
C/T	35	4 (11,5)	15 (43)	12 (34)	4 (11,5)	
T/T	18	4 (22)	8 (44)	5 (28)	1 (6)	0,45
C/T+T/T	53	8 (15)	23 (43)	17 (32)	5 (10)	0,25
<i>SHMT1</i> 1420						
C/C	39	6 (15)	17 (44)	8 (20,5)	8 (20,5)	
C/T	39	3 (8)	21 (54)	14 (36)	1 (2)	
T/T	7	1 (14)	5 (72)	1 (14)	0 (0)	0,09
C/T+T/T	46	4 (9)	26 (56)	15 (33)	1 (2)	0,025
<i>TYMS</i> 5'UTR						
2R/2R	17	2 (12)	10 (59)	4 (23)	1 (6)	
3R/2R	41	6 (15)	22 (54)	9 (21)	4 (10)	
3R/3R	27	2 (7)	11 (41)	10 (37)	4 (15)	0,74
3R/2R+3R/3R	68	8 (12)	33 (48)	19 (28)	8 (12)	0,93
<i>TYMS</i> 3'UTR <sup>#</sup>						
-6/-6	11	2 (18)	5 (46)	3 (27)	1 (9)	
+6/-6	33	4 (12)	16 (49)	9 (27)	4 (12)	
+6/+6	40	4 (10)	22 (55)	11 (28)	3 (7)	0,97
+6/-6&+6/+6	73	8 (11)	38 (52)	20 (27)	7 (10)	0,88

<sup>#</sup> 1 betegnél nem sikerült a genotipizálás; <sup>a</sup> Egzakt teszt; CR, teljes remisszió; PR, részleges remisszió; SD, stabil betegség; PD, progresszív betegség

Paraméter	Progressziómentes és		teljes túlélés (95% CI)	
	HR <sup>b</sup>	hónap <sup>c</sup>	HR <sup>b</sup>	hónap <sup>c</sup>
Összes		11 (9-13)		24 (21-27)
eCcr (ml/perc)				
<95	1 (Referencia)	11 (9-13)	1 (Referencia)	24 (19-27)
≥95	1,03 (0,59-1,79)	11,5 (9-16)	0,83 (0,42-1,63)	23 (18-29)
Hcy (μM)				
<15	1 (Referencia)	10,5 (8-13)	1 (Referencia)	24,5 (19-29)
≥15	1,04 (0,60-1,81)	12 (10-16)	1,52 (0,81-2,85)	22 (18-27)
DPD (nmol/perc/10 <sup>6</sup> PBMC)				
<15	1 (Referencia)	12 (7-15)	1 (Referencia)	23 (17-27)
≥15	1,23 (0,72-2,10)	11 (9-13)	0,79 (0,41-1,53)	25 (19-28)
<i>MTHFR</i> 677				
C/C	1 (Referencia)	11,5 (9-17)	1 (Referencia)	21 (18-28)
C/T	1,36 (0,74-2,49)	11 (9-14)	1,31 (0,61-2,82)	25 (18-29)
T/T	1,08 (0,55-2,11)	10,5 (8-15)	1,17 (0,51-2,69)	25 (17-27)
C/T+T/T	1,23 (0,72-2,09)	11 (9-13)	1,25 (0,64-2,43)	25 (21-28)
<i>SHMT1</i> 1420				
C/C	1 (Referencia)	9 (6-12)	1 (Referencia)	23 (17-28)
C/T	0,30 (0,16-0,54) <sup>p1</sup>	12 (11-16)	0,52 (0,27-1,00) <sup>p5</sup>	25 (18-29)
T/T	0,36 (0,13-0,99) <sup>p2</sup>	15 (2-33)	0,40 (0,11-1,51)	23 (4-38)
C/T+T/T	0,31 (0,18-0,54) <sup>p3</sup>	13 (11-16) <sup>p4</sup>	0,51 (0,27-0,96) <sup>p6</sup>	24,5 (19-29) <sup>p7</sup>
<i>TYMS</i> 5'UTR				
2R/2R	1 (Referencia)	12 (9-13)	1 (Referencia)	17 (16-25)
3R/2R	0,55 (0,29-1,05)	11 (9-16)	0,51 (0,24-1,10)	25 (21-29)
3R/3R	1,31 (0,64-2,66)	11 (5-15)	0,85 (0,37-1,92)	25 (18-29)
3R/2R+3R/3R	0,75 (0,42-1,35)	11 (9-15)	0,61 (0,31-1,19)	25 (21-28)
<i>TYMS</i> 3'UTR <sup>#</sup>				
-6/-6	1 (Referencia)	15 (5-18)	1 (Referencia)	22 (12-25)
+6/-6	1,86 (0,74-4,68)	11 (7-13)	0,93 (0,32-2,73)	23 (18-29)
+6/+6	1,73 (0,71-4,26)	11,5 (9-15)	0,57 (0,20-1,63)	25 (19-29)
+6/-6&+6/+6	1,78 (0,75-4,24)	11 (9-13)	0,69 (0,25-1,91)	24 (21-28)

<sup>#</sup> 1 betegnél nem sikerült a genotipizálás; HR, kockázati arány; CI, konfidencia intervallum; <sup>b</sup> A többváltozós Cox analízis korra, nemre, tumor lokalizációra és differenciáltsági fokra, metasztázis lokalizációra, általános állapotra, adjuváns kemoterápiára és platina-alapú kemoterápiára (másod és harmad vonalban, csak a teljes túlélésnél) illesztve; <sup>p1</sup> p=0,00009; <sup>p2</sup> p=0,011; <sup>p3</sup> p=0,00004; <sup>p5</sup> p=0,049; <sup>p6</sup> p=0,034; <sup>c</sup> medián túlélés, log-rank teszt; <sup>p4</sup> p=0,0067; <sup>p7</sup> p=0,405

A többváltozós Cox analízis során az *SHMT1* mellett a tumor differenciáltsági foka és a betegek általános állapota bizonyult a PFS független markerének. A medián PFS 4 hónappal hosszabb az *SHMT1* 1420T alléllal rendelkezőknél (13 hónap; HR=0,31; 95% CI 0,18-0,54; p=0,00004) a CC genotípusúakhoz hasonlítva. A progressziómentes túlélés Kaplan-Meier görbéi már a kezelés kezdetén széttartóakká válnak a két *SHMT1* genotípus csoport esetén (2. ábra).



**2. ábra** A FOLFIRI+B kezelésű betegek progressziómentes túlélése az *SHMT1* 1420CC és CT+TT genotípusok esetén

Az teljes túlélés 1,5 hónappal volt hosszabb azoknál a betegeknél, akiknél jelen van az *SHMT1* 1420T allél, a vad genotípusúakhoz viszonyítva. Bár az egyváltozós Kaplan-Meier kiértékelés OS görbéi a 20. és 40. hónapban összeérnek (nem ábrázoltuk) és ezért statisztikailag nem szignifikáns a különbség, de ezzel szemben a többváltozós Cox analízis statisztikailag szignifikáns különbséget mutatott ki (HR=0,51; 95% CI 0,27-0,96; p=0,034).

Az összes többi vizsgált paraméter nem befolyásolta szignifikánsan a kezelésre adott választ, a progressziómentes- és a teljes túlélést.

### 4.3 A vizsgált polimorfizmusok és a kezelések mellékhatásai

#### 4.3.1 A FOLFIRI+bevacizumab kezelés mellékhatásai

A betegek 91%-ánál jelentkezett mellékhatás. A 3-as vagy 4-es fokú toxicitás, kivéve a magas vérnyomást, ritka volt, amint azt a 11. táblázat is mutatja.

**11. táblázat** Az első vonalbeli FOLFIRI+B kezelés után kialakult mellékhatások a CRC betegekben

Mellékhatás	3-as vagy 4-es fokú	Összes
	n (%)	n (%)
Bármely	39 (46)	77 (91)
Magas vérnyomás	23 (27)	47 (55)
Neutropenia	12 (14)	22 (26)
Hasmenés	4 (5)	40 (47)
Hányás	5 (6)	25 (29)
Hányinger	0 (0)	31 (36)
Vérzés	0 (0)	20 (24)
Fáradtság	1 (1)	13 (15)
Mucositis	2 (2)	12 (14)
Hemoglobin	3 (4)	12 (14)
Kopaszság	-	40 (47)
Vesefunkció	1 (1)	3 (4)
Proteinuria	1 (1)	1 (1)
Vénás tromboembólia	2 (2)	2 (2)
Kéz-láb szindróma	1 (1)	2 (2)
Neutropéniás láz	0 (0)	1 (1)
Szív toxicitás	0 (0)	1 (1)

A kezelést 13 betegnél kellett abbahagyni, míg 22 betegnél dózist kellett csökkenteni vagy átmenetileg felfüggeszteni a kezelést. A magas vérnyomás volt a leggyakoribb



mellékhatás, míg a neutropenia volt a leggyakoribb hematológiai toxicitás. A bevacizumabhoz köthető toxicitás, mint a magas vérnyomás, vérzés, vénás thromboembolia és proteinuria a betegek 55%-ánál jelentkezett és kb. a felénél (27%) ez 3-as vagy 4-es fokú volt. Minden betegnél a vérnyomást ellenőrizték és minden negyedik beteg emiatt gyógyszeres kezelésben részesült. Hat betegnél a bevacizumab kezelést ideiglenesen felfüggesztették sebészi beavatkozás miatt.

Statisztikailag szignifikáns összefüggést találtunk a magas vérnyomás és a hatékonyság (terápiás válasz, PFS és OS) között (12. táblázat). Azon betegek esetében, ahol a magas vérnyomás >1-es fokú volt az objektív klinikai válasz 32/36 (89%) szignifikánsan magasabb ( $\chi^2$  teszt  $p=0,00002$ ), mint a többi beteg esetén 21/49 (43%). Az előbbieket esetében hosszabb a PFS (15 vs. 9 hónap, log-rank teszt  $p=0,0002$ ) és az OS (28 vs. 18 hónap;  $p=0,003$ ).

**12. táblázat** A magas vérnyomás és klinikai válasz ill. túlélések közötti összefüggés valamint az *SHMT1* 1420 polimorfizmus hatása

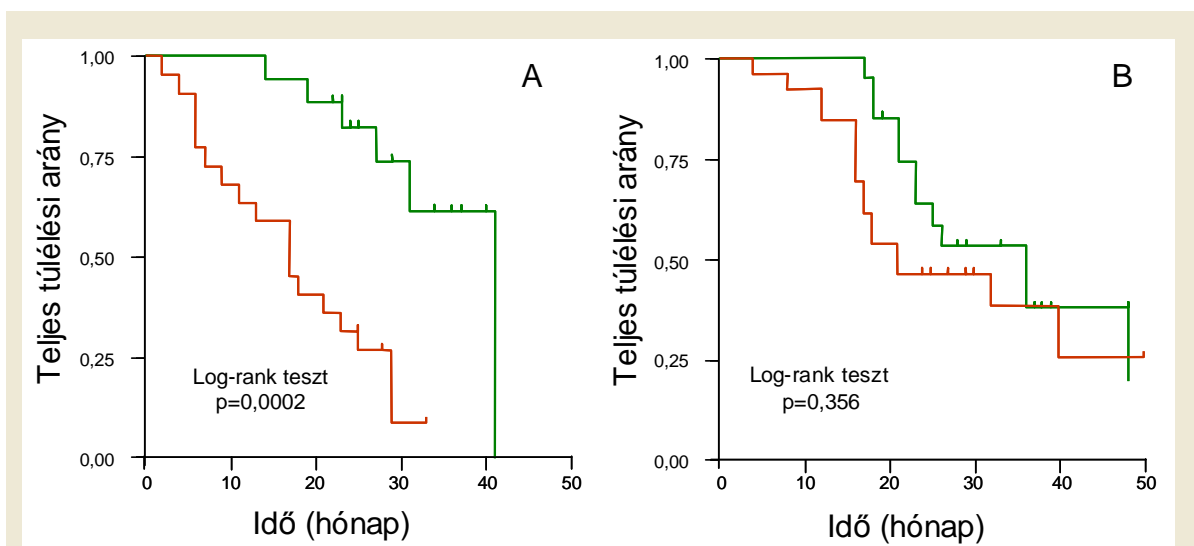
<b>Magas vérnyomás foka</b>	<b>n</b>	<b>CR</b>	<b>PR</b>	<b>SD</b>	<b>PD</b>	<b>PFS HR (95% CI)</b>	<b>OS HR (95% CI)</b>
0 vagy 1	49	3	18	19	9	1 (Referencia)	1 (Referencia)
> 1	36	7	25	4	0	0,23 (0,12 - 0,42)	0,21 (0,09 – 0,51)
		$p<0,0001^a$				$p=0,0002^b$	$p=0,003^b$
<b><i>SHMT1</i> 1420CC</b>							
0 vagy 1	22	1	7	7	7	1 (Referencia)	1 (Referencia)
> 1	17	5	10	1	1	0,16 (0,05 - 0,48)	0,19 (0,04 – 0,78)
		$p=0,007^a$				$p=0,002^b$	$p=0,0002^b$
<b><i>SHMT1</i> 1420CT+TT</b>							
0 vagy 1	26	2	11	12	1	1 (Referencia)	1 (Referencia)
> 1	20	2	15	3	0	0,14 (0,05 - 0,40)	0,55 (0,14 – 2,10)
		$p=0,063^a$				$p=0,016^b$	$p=0,356^b$

<sup>a</sup> Egzakt teszt; <sup>b</sup> Log-rank teszt; CR, teljes remisszió; PR, részleges remisszió; SD, stabil betegség; PD, progresszív betegség; PFS, progressziómentes túlélés; OS, teljes túlélés; HR, kockázati arány; CI, konfidencia intervallum

A többváltozós Cox regressziós modell kimutatta, hogy az *SHMT1* 1420T allél mellett, a >1 fokú magas vérnyomás a szignifikánsan hosszabb progressziómentes és teljes túlélés független prognosztikai faktora.

Sem az *SHMT1* 1420 polimorfizmus sem a többi vizsgált paraméter vagy genotípus nem mutatott összefüggést a 2-es vagy magasabb fokú magas vérnyomással. Hasonló eredményt tapasztaltunk a többváltozós logisztikus regressziós analízissel, ahol a magas vérnyomás volt a függő változó.

A 3. ábra mutatja a magas vérnyomás hatását a teljes túlélésre a két különböző genotípusú csoportban. Míg az *SHMT1* 1420C homoizigóta betegekben szignifikáns hatása van a magas vérnyomásnak a teljes túlélésre ( $p=0,0002$ ), ez a hatás nem volt megfigyelhető a T alléllal rendelkező betegek esetében ( $p=0,356$ ).

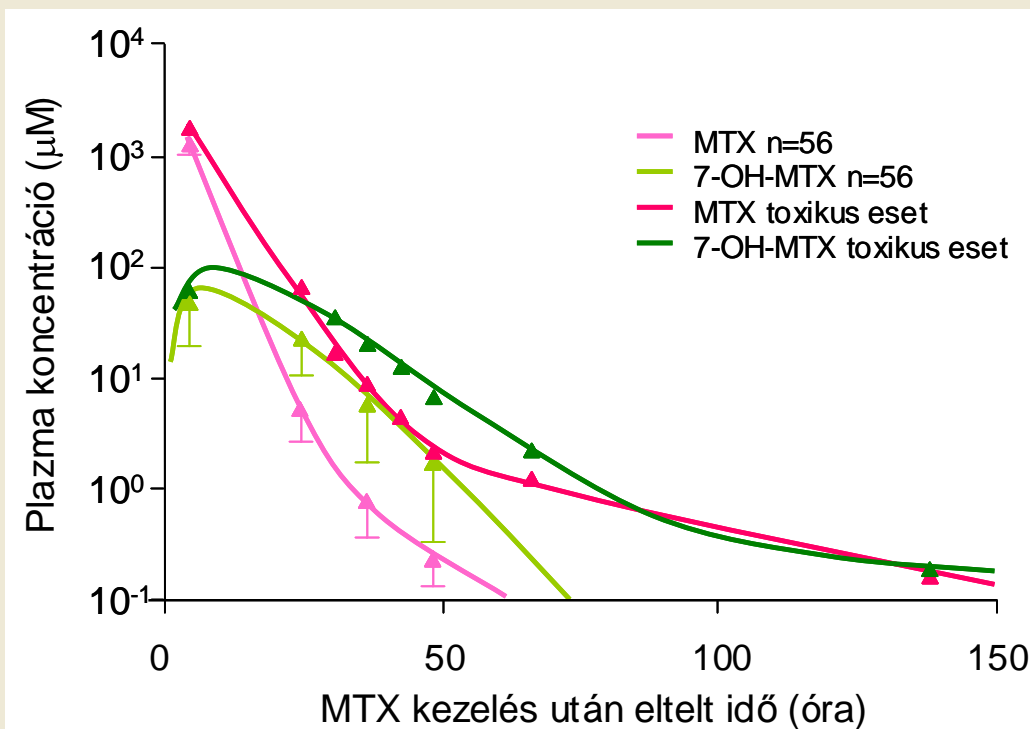


**3. ábra** A magas vérnyomás foka szerint elkülönített (0 vagy 1, piros) ill. (>1, zöld) teljes túlélési görbék az *SHMT1* 1420CC (A) és CT+TT (B) genotípusú betegekben az első vonalbeli FOLFIRI+B kezelés után

#### ***4.3.2 Toxikus metotrexát kezelés bemutatása egy osteosarcomás beteg esetében, az MTHFR C677T polimorfizmus jelentősége***

A metotrexát (MTX) egy folátantagonista gyógyszer, amelyet széles körben alkalmaznak a rosszindulatú daganatos betegségek kezelésében. Különösen nagy jelentősége van a nagy dózisú MTX kezelésnek (HD-MTX) az osteosarcoma neoadjuváns és adjuváns terápiájában, azonban ez a kezelés gyakran súlyos akut és krónikus toxikus mellékhatásokat okozhat, amelynek előrejelzése az esetleges genetikai kockázati tényező(k) felismerése nagy jelentőséggel bír.

Vizsgálatunkban egy 10 éves beteg esetét és vizsgálatát ismertetjük, aki tapintható csomóval és fájdalommal jelentkezett a bal fibulájában. A csontbiopsziás anyagból osteosarcomát diagnosztizáltak. A beteg a kezelését a „Cooperative Osteosarcoma Study 1996” protokoll szerint kapta [116]. Húsz perccel az első HD-MTX infúzió vége után, melyet az ajánlott  $12 \text{ g/m}^2/6\text{h}$  dózisban kapott, a beteg aluszékonyvá vált, vizelet inkontinenciája lett, reflexei csökkentek, enyhe nystagmusa és fényre reagáló miosisa lett. A vitalis paraméterei a normál tartományban voltak. Azonnal parenterális dexametazont kapott az agyödéma gyanúja miatt. Erőltetett diuresist indítottak  $4000 \text{ ml/m}^2$  infúzióval és 6 óránkénti furoszemid adásával. A neurológiai tünetek 24 óra alatt megszűntek. A szérum alanin aminoszféraz (ALT) ( $33 \text{ U/l}$ ) és a  $\gamma$ -glutamil transzpeptidáz (GGT) ( $18 \text{ U/l}$ ) a fiziológiás tartományban voltak a HD-MTX terápia kezdete előtt. Az ALT az akut neurológiai zavarok alatt szignifikánsan megemelkedett ( $1349 \text{ U/l}$ ). A legmagasabb ALT szintet 24 órával a HD-MTX infúzió után mérték ( $2231 \text{ U/l}$ ) és a 35. napig, a normalizálódásig ( $55 \text{ U/l}$ ) követték. A szérum GGT szint  $263 \text{ U/l}$  volt a 11 napon és két hónap alatt normalizálódott. A betegnél nem volt eltérés a vesefunkcióban, mind a szérum kreatinin, mind a kreatinin klírens a normál tartományban volt. A plazma MTX és 7-OH-MTX koncentrációját HPLC-n követték és mindkettő késleltetett kiürülést mutatott (4. ábra). Összehasonlításképpen 56 (szintén HD-MTX-el kezelt) normál MTX kiválasztással rendelkező osteosarcomás beteg MTX és a metabolit a 7-hidroxi-methotrexat (7-OH-MTX) plazma koncentrációinak időbeni változását tüntettük fel a 4. ábrán. Az MTX és 7-OH-MTX eliminációs félidőt ( $t_{1/2}$ ) a 13. táblázatban összegeztük.



**4. ábra** A szérumban MTX és 7-OH-MTX koncentráció változása HD-MTX (12 g/m<sup>2</sup>/6 h) beadása után 56 osteosarcomás (átlag ± SD) és a tanulmányozott beteg esetében.

**13. táblázat** A kiürülési félidők értékeinek összehasonlítása

Mért paraméter	Kiürülési félidők (óra)	
	$t_{1/2\alpha}$	$t_{1/2\beta}$
MTX (toxikus eset)	3,96	29,45
7-OH-MTX (toxikus eset)	8,55	99,75
MTX (n=56)	2,44	10,87
7-OH-MTX (n=56)	5,28	-

A beteg *MTHFR* C677T polimorfizmusát a perifériás vér limfocita frakciójából izolált DNS mintából határoztuk meg, melynek eredménye *MTHFR* 677TT volt. A betegnek 186 órán keresztül kalcium folinátot (leukovorint) adtunk. Az elkövetkező tumortherápiák során MTX-ot nem kapott a beteg, aki később combmegtartó műtéten

esett át és 8 hónap múlva befejeződött a kezelése. Hat éves követés után a beteg továbbra is teljes onkológiai remisszióban volt.

## 5. MEGBESZÉLÉS

### 5. 1 A rákrizikóval kapcsolatos vizsgálatok megbeszélése

Tanulmányunkban mindkét vizsgált polimorfizmus, az *SHMT1* C1420T és az *MTHFR* C677T is hatást gyakorol a rectumrák, de egyik sem a colonrák kialakulásának kockázatára. Korábbi tanulmányok megerősítik az *SHMT1* C1420T polimorfizmus különböző dagakatok kialakulásának rizikójára gyakorolt hatását. Skibola és mtsai azt találták, hogy az *SHMT1* 1420TT genotípusoknál kisebb a felnőttkori akut limfoid leukémia rizikója [34]. Hasonló eredményre jutottak Hishida és mtsai malignus limfóma kapcsán [35]. Nemrég azt figyelték meg, hogy az Észak-Kínai népességben kisebb volt a laphámsejtes nyelőcsőrák és a gyomorszáj adenocarcinoma rizikója az *SHMT1* 1420CT heterozigótákban a C homozigótákhoz viszonyítva [117]. A fent említett tanulmányokban a rizikó csökkenését az *SHMT1* 1420T allél jelenléte befolyásolta, ami megfelel az általunk tapasztaltakkal a rectumrák vonatkozásában. Az eltérő *SHMT1* enzim csökkent 5,10-MTHF termelést és tetrahidrofolát felhalmozódást eredményezhet, bár a pontos biológiai hatása ennek a jelenségnek illetve a teljes carcinogenesis mechanizmusa még nem ismert.

Van den Donk és mtsai egy eset-kontrollos tanulmányban nem tudtak kapcsolatot kimutatni a colorectalis adenoma rizikója és az *SHMT1* C1420T polimorfizmus között. A szerzők a nem szerinti stratifikált elemzést elvégezték, de az adenoma lokalizációja szerintit nem [36].

Chen és mtsai a CRC esetében nem tudtak rizikócsökkentő hatást igazolni az *SHMT1* C1420T polimorfizmus variáns típusánál [37]. Tanulmányukban azonban csak férfiak és a kórházból származó kontrollok kerültek be a amerikai-kaukázusi populációból, de a rectum- és colonrákos betegeket nem elemezték külön, ezért az *SHMT1* C1420T polimorfizmus rizikómódosító hatása rejtve maradhatott. Guerreiro és mtsai megemelkedett CRC rizikót találtak az *SHMT1* 1420C allél esetében, bár a megfigyelésük erősségét korlátozza az alacsony számú variáns homozigóta (n = 9) és ők is, a rectum- és colonrákos betegeket együtt értékelték ki [38]. Steck és mtsai az *SHMT1* 1420TT genotípust hasonlítva a CC genotípushoz a statisztikai szignifikancia határán

lévő rizikó csökkenésről számolnak be a kaukázusi rassz esetén. Ugyanezt afro-amerikaiak colonrákjával kapcsolatban nem sikerült igazolniuk. Ebben a tanulmányban azonban a fehérek kontroll csoportja erősen eltért a HWE-től ( $p = 0,0042$ ) [39].

Munkánk során azt találtuk, hogy az *MTHFR* 677T allél jelenléte a CC homozigótákhoz viszonyítva magasabb kockázatot jelent a rectumrák viszonylatában. A CRC rizikó és az *MTHFR* C677T polimorfizmus összefüggése a korábbi meta- és összevont analízisek eredményei alapján tisztázatlan maradt [118,119]. Meg kell említeni, hogy a legtöbb tanulmányban, amely az *MTHFR* C677T polimorfizmust vizsgálja nem választották szét a rectum- és a colonrákos betegeket [119]. Nemrégiben Cao és mtsai azt találták férfiakban, hogy az *MTHFR* 677TT genotípust hordozók körében az OR a colonrák esetében 2,42, míg rectumráknál 0,52 [46]. A 60 évnél idősebb férfiak esetében eredményeik hasonlóak az általunk kimutatottakkal, ahol a megfelelő OR-k 1,4 és 0,9 voltak. A kínaiak és a kaukázusiak közötti különbséget, az eltérő életstílus, táplálkozás stb. magyarázhatja.

Összhangban a Guerreiro és mtsai által felvetett magyarázattal, - ami a korábban megjelent tanulmányok ellentmondásaira vonatkozik, melyek szerint a folátbevitel és az *MTHFR* C677T polimorfizmus kölcsönhatása módosítja a CRC kockázatát -, a következő megállapítást fogadjuk el: az alacsony folátbevitel és az *MTHFR* 677T allél vagy a TT genotípus megléte előrevetíti a fokozott kockázatot, míg ezzel ellentétben a magas/megfelelő folátbevitel rizikócsökkentő, ha a variáns allél jelen van [37]. Magyarországon a folátbevitel általában alacsony [120], ezért eredményeink a rectumrák kockázat tekintetében egybehangzóak a fenti megállapítással, bár a colonrák esetében ez az összefüggés csak a fiatalabb csoportban (<60 év) figyelhető meg. Iacopetta és mtsai csak a proximális colon esetén találtak magasabb kockázatot, ha alacsony volt a folátbevitel és jelen volt az *MTHFR* 677T allél vagy idősebbek ( $\geq 65$  év) voltak az egyének. Az eltérés az ő és a mi eredményeink között abból fakadhat, hogy másként csoportosították a colon- és rectumrákos eseteket és a vizsgált ausztrál népesség nem csak kaukázusiakból állt [121].

Jelen vizsgálatunkban a *SHMT1* 1420CT+TT és *MTHFR* 677CC genotípus kombináció jelenti a legkisebb rectumrák kockázatot. Egy már idézett tanulmányban az *MTHFR* C677T és az *SHMT1* C1420T interaktív hatását figyelték meg a nyelőcső és gyomorrák kockázatával kapcsolatban [117]. Az *SHMT1* csökkent és az *MTHFR* változatlan aktivitása a pirimidin szintézishez szükséges 5,10-MTHF csökkent mennyiségéhez vezethet. A legnagyobb kockázatot jelentő kombinációt a magas *SHMT1* és a csökkent *MTHFR* aktivitás jellemzi, amely a pirimidin szintézishez szükséges folát elérhetőségét növeli meg. A vizsgált polimorfizmusok hatása a DNS metilációra nagyon komplex. A csökkent *SHMT1* aktivitás csökkent DNS metilációhoz vezethet egy negatív visszacsatolási láncon keresztül, ahol a köztitermékek felhalmozódnak és lecsökken az 5-metil-THF termelés.

Tanulmányunk egyben utal a rectum- és colonrák etiológiájában a nemek különbözőségének szerepére is. A női hormonok befolyásolhatják a másodszorra megjelenő primer (metakron) CRC-re való fogékonyságot [122]. Mindemellett statisztikailag szignifikáns összefüggést találtak a DNS mismatch javító gén promoter polimorfizmusa, *MSH2* T-118C, és a gyakori családi CRC megbetegedések között és ez a kapcsolat csak a nőknél volt megfigyelhető, míg a férfi CRC betegek esetében nem [123].

Az életkort, amikor a CRC megjelenik, szintén befolyásolhatják a polimorfizmusok [124]. Egy kor-specifikus összefüggést is megfigyeltek colon-, de nem rectumráknál az apolipoprotein E (*apoE*) polimorfizmus esetében [125].

A BMI és colonrák közötti összefüggés, amit korábbi tanulmányokban leírtak [43,126] nem volt igazolható a mi kiértékelésünkben, ami abból adódhat, hogy a próba ereje nem volt elégséges. A fenti tanulmányokban szintén kimutattak nem- és kor-specifikus összefüggéseket.

Megbecsülve a népesség rétegződéséből eredő hibát, mindkét polimorfizmus esetében levonható a következtetés, hogy az általunk megállapítottak nem valószínű, hogy ebből a szempontból hibásak.



A Hcy a metionin-függő DNS metilációkor keletkezik. A remetilációjához az MTHFR enzim terméke, az 5-metil-THF, esszenciális. A kevésbé fontos metabolikus átalakulásnál a cisztation- $\beta$ -szintáz vagy a máj betain-homocisztein metiltranszferáz enzime vesz részt. Az SHMT1 funkcionálisan fontos szerepét véve figyelembe a metil csoport több metabolikus út részére történő előállításában bármilyen kis zavar a protein expresszióban, ami a polimorfizmusnak tudható be, a rendelkezésre álló egy-szénatom egységek fogyásával járhat, ami a homocisztein remetilációjához is szükséges. Egészséges idősokban Giesel és mtsai nem szignifikánsan emelkedett Hcy szintet találtak az *SHMT1* 1420TT csoportban [127]. Chen és mtsai szignifikánsan magasabb Hcy szinteket jelentettek *SHMT1* 1420 CT genotípusok esetében egy olyan tanulmányban, amelyben egészséges férfiak szerepeltek [37]. Ehhez hasonlóan, a mi tanulmányunkban az *SHMT1* 1420 T allél jelenléte szignifikánsan megemelte a Hcy szinteket a kontrollokban. Relatív fiatal egészségesekben (20-40 év) Pereira és mtsai [3] és Baily és mtsai [4] szignifikánsan magasabb Hcy szinteket találtak az *MTHFR* 677TT genotípus esetében, mint a más genotípusúaknál. Majdnem hasonló eredményre jutottak Semmler és mtsai [128] azzal a különbséggel, hogy a fenti összefüggés nem volt igazolható az idősebb egyéneknél (>55 év). Ez utóbbi adat alátámasztja a mi eredményeinket, miszerint a kontrollok (átlag életkor 59 év) esetében nem volt összefüggés a Hcy szintek és az *MTHFR* 677 polimorfizmus között.

A vizsgált polimorfizmusok hatása a betegek Hcy értékeire feltehetően elrejtve marad a Hcy értékek kontrollokhoz viszonyított sokkal szűkebb megoszlása miatt (a variancia koefficiens ~20%-kal alacsonyabb). A hatás valószínűleg egy még tisztázatlan Hcy-növelő mechanizmussal lehet kapcsolatba. Úgy tűnik, hogy a proliferáló tumorsejtek a Hcy felhalmozódásának fő okai és ezért alakul ki hiperhomociszteinemia a rákosokban [129]. A Hcy tumormarker jellege, nevezetesen a rákos betegek magas Hcy szintje [129,130,131,132,133,134,135,136,137,138], a megemelkedett Hcy szintek az előrehaladott klinikai stádiumokban [133,137] és a Hcy felhasználhatósága a terápiás hatások monitorizálására [132,133,138,139] szintén igazolt. Figyelemreméltó, hogy, a Hcy koncentráció követi a CEA szinteket a CRC-s betegek esetében [139]. Ez a hatás szorosan összefügg a malignus betegség progressziójával, amint azt a mi tanulmányunkban is tapasztaltuk, hogy a Hcy koncentráció fokozatosan nő a

nyirokmirigyek számának érintettségével (Dukes C stádium) és majd azután a távoli áttétek megjelenésével (Dukes D stádium).

Munkánkban első látásra úgy tűnik, hogy a Hcy a Dukes C és D stádiumban tumormarker, amint ezt Wu és mtsai javasolták [15], de ha az *SHMT1* 1420 polimorfizmust is figyelembe vesszük, akkor ez csak a vad genotípusok (CC) esetén érvényesül. Ez a tény igaz még a Dukes D stádiumú betegekre is, akiknél a legmagasabb a Hcy szint. Ehhez hasonlóan Battistelli és mtsai szignifikánsan magasabb Hcy szintet mutattak ki a kontrollokhoz képest, de csak az *MTHFR* 677 CC+CT genotípusoknál [134].

Érdekes kérdésselvetés, hogy a rectumrákosok Hcy szintje a „legalacsonyabb rectumrák rizikót” jelentő diplotípusok esetében miért nem szignifikánsan magasabb, mint ahogyan a kontrollokban és amint az a colonráknál is megfigyelhető. Védeltséget nyújthat egy ismeretlen Hcy-csökkentő mechanizmus ebben a kontextusban a rectumrák kialakulása ellen? A jelen eredményekre alapozva, feltételezhető, hogy a rizikócsökkentő diplotípus esetében a kontrollokhoz képest alacsony Hcy szint közvetlenül felelős a csökkent kockázatért. Másfelől, az alacsony Hcy szint lehet egy mellékes eredmény és más mechanizmusok vezetnek a csökkent kockázathoz. Nemrég igazolták [140], hogy ha az *SHMT1* variáns a sejtmagban lokalizált, akkor csak egy károsodott *de novo* timidin szintézis biztosított. A timidilát bioszintézist tovább csökkenti a vad típusú MTHFR által átalakított és lecsökkent 5,10-MTHF szintet. A károsodott timidilát bioszintézis nem kedvez a sejtproliferációnak. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a magas Hcy szintek és a rákrizikó közti kapcsolat nem nyilvánvaló és mindenek előtt a Hcy „tumormarker” jellegét szükséges kiemelni.

## **5.2 A FOLFIRI+bevacizumab kezeléssel kapcsolatos megbeszélés**

Az elmúlt években az első vonalban adott FOLFIRI+B protokoll hatékonyságát és biztonságát felmérő vizsgálatokat végeztek. A FOLFIRI+B kezelési séma nagyobb hatékonyságot igazolt a metasztatikus CRC esetében a csak FOLFIRI kezeléshez viszonyítva. A 63%-os teljes válaszarány (ORR), a 11 hónapos PFS és a 24 hónapos OS

ebben a tanulmányban nagyon hasonló azokhoz az eredményekhez, amelyeket a legutóbbi vizsgálatokban találtak (40-65% ORR, 11,1-12,8 hónapos PFS és 20,5-31,3 hónapos OS) [53,54,55,56,57,58]. A hatékonyság ellenére, amit a bevacizumab-alapú kezelési sémák biztosítanak, a klinikai rezisztencia általában kialakul. A bevacizumab elleni rezisztencia teljes mechanizmusa egyelőre ismeretlen. Örökölt egyéni genetikai különbségek, amik összefüggnek a kezelésre adott válasszal, túléléssel és a kezeléssel kapcsolatos mellékhatásokkal nagy hatást gyakorolhatnak a kezelés kimenetelére. Az utóbbi években, különböző géneken sokféle polimorfizmust vizsgáltak a CRC betegek kezelésének kimenetelére vonatkozólag.

Tanulmányunk mind egy-, mind többváltozós analízissel igazolta, hogy az *SHMT1* C1420T polimorfizmus összefüggésben van a FOLFIRI+B kezeléssel kapcsolatos terápiás válasszal és túléléssel (PFS és OS). Ezen felül, megerősítésre került az a korábban közölt megfigyelés [74], miszerint a bevacizumabbal kapcsolatos magas vérnyomás a CRC betegekben prediktív markerként szerepelhet az első vonalbeli FOLFIRI+B kezelésnél. Az első kérdés, ami válaszra vár az, hogy az *SHMT1* 1420 polimorfizmus egyáltalán kapcsolatba hozható-e a magas vérnyomással vagy egy független prognosztikai marker. Első megközelítésben, nincs különbség a különböző genotípus csoportok között a magas vérnyomás megjelenését illetően, bár a különbség szembetűnő, ha a betegek terápiás válaszát vagy a teljes túlélést hasonlítjuk össze. A magas vérnyomás a kezelés hatékonyságának a markere lehet, de csak a vad (CC) *SHMT1* 1420 genotípusú betegek esetén szignifikánsan.

Kevés olyan tanulmány van, amely az *SHMT1* szerepét vagy a polimorfizmusait vizsgálja a kezelés hatékonyságának tekintetében. Petefészekrákos betegek teljes túlélése hosszabb volt a negatív vagy alacsony *SHMT1* expressziójú csoportban azokhoz a betegekhez viszonyítva, akiknél közepes vagy erős *SHMT1* expressziót határoztak meg a plazmából Western-blott analízissel [141]. További következtetéseket csak óvatosan tehetünk, mivel alacsony a betegszám és a kezelés típusa nem volt megadva. Egy másik tanulmányban az *SHMT1* 1420 polimorfizmust a MTX-érzékenységgel és -toxicitással hozták összefüggésbe. Kizárólag az *SHMT1* 1420TT genotípusú betegek mutattak megnövekedett MTX rezisztenciát gyermekkori akut

limfoid leukémiában [142]. Reumatoid arthritiszese betegek, akik *SHMT1* 1420CC genotípusúak nagyobb valószínűséggel válaszolnak az MTX-re, és ezzel párhuzamosan szignifikánsan alacsonyabb a vörösvértest folát szintjük a többi genotípushoz viszonyítva [143]. Reumatoid arthritiszese betegeknél az *SHMT1* 1420 polimorfizmus szerepe az MTX központi idegrendszeri toxicitásában ellentmondásos maradt [103,144,145]. Ezen megfigyelések nagy része megmagyarázható annak feltételezésével, hogy az *SHMT1* 1420T variáns allél jelenlétéből következő *SHMT1* funkció gátlódik és ez magas folátszinteket eredményez.

A fenti feltételek felvetik azt a kérdést is, hogy az 5-FU-alapú kezelést befolyásolja-e az *SHMT1* polimorfizmus vagy a hatás, amit ebben a tanulmányban leírtunk kizárólagosan a bevacizumbhoz köthető-e. Korábban bemutatták, hogy az *SHMT1* 1420T allél jelenléte csökkenti a PFS-t az első vonalban deGramont (n=95), de nem a FOLFIRI sémával kezelt (n=163) metasztatikus CRC betegek esetén, míg az OS-re egyik séma esetén sem volt hatással [146]. Érdekes módon az *SHMT1* 1420T allél jelenléte fordított hatású a deGramont (5-FU/leukovorin) kezelés esetén, mint amit a jelen vizsgálatban mutattunk be. Feltehetően a bevacizumab hosszútávú hatása felülmúlja az 5-FU és irinotecan jellegzetes antitumor hatását és ez az oka annak, hogy más génpolimorfizmusok és klinikai markerek, melyeket ebben a tanulmányban is vizsgáltunk miért nem fejthetik ki hatásukat.

Ebben a tanulmányban a VEGF szintet vagy polimorfizmusait nem vizsgáltuk. A B hatását befolyásoló polimorfizmusok közül 2011-ben jelent meg 2, a *VEGF* promotor régiójának (G-1154A és C-1498T) polimorfizmusaival kapcsolatos publikáció, melyekben az mCRC első vonalban FOLFIRI+B kezelt betegek PFS-ével találtak összefüggést [147,148].

Az irinotecan és a B hatását befolyásoló polimorfizmusok szerepét jelenleg is aktívan kutatják. Sajnos az *UGT1A1*\*28 polimorfizmust, amely befolyásolja az irinotecan okozta mellékhatásokat [149,150,151] és a választ [150,151] munkánkban nem vizsgáltuk, mindazáltal a FOLFIRI+B kezelés hatékonyságát feltehetően növelni lehetne az irinotecan okozta toxicitás megelőzésével a genotípusokon alapuló dózis optimalizálásával [149,150,151].

Ezeknek az eredményeknek, akárcsak az általunk tapasztaltaknak, további validálására van szükség nagyszámú betegcsoportokon.

### 5.3 A toxikus metotrexát kezeléssel kapcsolatos vizsgálat megbeszélése

Az *MTHFR* 677T homozigóta betegekben az enzim aktivitás 70%-kal kisebb [96]. Ennek következménye az 5-metil-THF szintézis zavara és mivel az 5-metil-THF a legfőbb keringő folát forma, ezért a plazma folát koncentráció lecsökken [152]. A folát a sejtekbe két aktív rendszeren keresztül jut be: a membrán folát receptorok (FR) és a redukált folát szállító (RFC) révén. Magas koncentráció esetén az MTX passzív diffúziót vagy alacsony affinitású szállítókat vesz igénybe [153]. Az FR-ok nagyobb affinitással rendelkeznek a folsav iránt a redukált foláttal összehasonlítva [154]. Megnövekedett *FR* expressziót figyeltek meg normál sejtekben extracelluláris folát hiány esetén [155]. Az RFC-nek viszonylag nagy affinitása van a folsavhoz viszonyítva a redukált folát és folátanalógokhoz, mint amilyen az MTX is [154]. A folát alacsony koncentrációja az *RFC* overexpresszióját indukálja, ami egy jelentős MTX beáramlást és sejten belüli szintet eredményez, anélkül, hogy mérhető változás következne be a kiáramlás kinetikájában [156]. Az MTX, a fiziológias folátokhoz hasonlóan, a folilpoliglutamát szintáz hatására poliglutamálódik [157]. A sejten belüli MTX poliglutamát kialakulása főszerepet játszik az MTX citotoxicitásában [158].

Az *MTHFR* génpolimorfizmusok szerepét az MTX kezelés utáni mellékhatások kialakulásában már tanulmányozták, de az eredmények ellentmondóak. Számos tanulmány a mellékhatások nagyobb gyakoriságáról számolt be az MTX kezelés kapcsán az *MTHFR* 677TT genotípusú betegek esetében [98,104,159]. Mások nem találtak korrelációt a polimorfizmusok és az MTX toxicitás között [160,161], ugyanakkor egyes szerzők megerősítették a kapcsolatot az MTX-indukálta toxicitás és az *MTHFR* A1298C, de nem a C677T polimorfizmus között [162,163]. Imanishi és mtsai beszámoltak az *MTHFR* 677TT genotípus és a 48-ik órában megmaradt MTX koncentráció közötti kapcsolatról [164].

Más szerzők a folát ciklus másik enzimének, a metionin szintáznak (MS) ritka polimorfizmusát (*MTR* A2756G) teszik felelőssé az HD-MTX okozta encephalopathia kialakulásáért [165], másfelől az MTX kipumpálásával kapcsolatos polimorfizmus is szerepet játszhat a neurotoxicitásban [166].

A MTX-ra alapvetően nyálkahártya és csontvelői sejtek érzékenyebbek, mert ott magasabb az osztódási ráta, mint pl. az idegrendszerben. Mivel az MTX a vesén át ürül, így a vese is egy kiemelt szerv a toxicitás szempontjából. Hogy miért éppen máj- és neurológiai tünetei voltak a betegnek, az nyitott kérdés. A vesét magas folyadékbevitellel és forszírozott diurézissel, ill. alkalizálással védték. Az irodalomban [167] azt is leírják, hogy a különböző egészséges szövetek és daganatok között is igen nagy a variabilitás, ami az aktív MTX metabolitok retencióját és ennek megfelelően a gyógyszer hatástartamát illeti. Fontos szempont az esetleges 3. víztér kérdése is, hogy van-e valahol olyan folyadékgyülem, ahol a MTX „megül” és magasabb AUC-t tart fenn. A poliglutamilációért felelős folil poliglutamát-szintáz (FPGS) aktivitás a májban magasabb, ami megnyúlt MTX metabolit kiürülést eredményez, így ez is lehet az oka az *MTHFR* 677 variáns meglétéén kívül a kialakult májtoxicitásnak [168].

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

Ez az első olyan tanulmány, amely a colonrák és a rectumrák genetikai különbözőségét bizonyítja a folát anyagcsere enzimek polimorfizmusainak változásában, nevezetesen az *SHMT1* 1420T allél vagy az *SHMT1* 1420 T allél / *MTHFR* 677 CC diplotípus védő hatását bizonyítja a rectumrák kockázatával kapcsolatosan. Az *SHMT1* 1420 variáns szignifikánsan megemeli a Hcy szinteket a kontrollokban, de a betegekben nem. A Hcy csak a Dukes C és D stádiumú és vad típusú (CC) *SHMT1* 1420 CRC-s betegek esetében tekinthető tumormarkernek. A magas Hcy szint az előrehaladott stádiumú betegekre jellemző. További vizsgálatok elvégzése szükséges, hogy kiderüljön az *SHMT1*, *MTHFR* és más folát enzim polimorfizmusok komplex szerepe a colon- és rectumrák kialakulásának folyamatában. A Hcy szint fontosságát szintén tisztázni kell.

Tanulmányunk kimutatta, hogy az első vonalbeli FOLFIRI+B kezelésben részesült metasztatikus CRC-s betegek válaszát, progressziómentes és teljes túlélését befolyásolhatja az *SHMT1* 1420 polimorfizmus. Az *SHMT1* 1420T allél jelenléte mind egyváltozós, mind többváltozós elemzéssel a FOLFIRI+B terápiára adott kedvezőbb válasz, a hosszabb progressziómentes és teljes túlélés markere. A bevacizumab kezelés okozta magas vérnyomás csak a vad (CC) *SHMT1* 1420 genotípusok esetén prediktív értékű a kezelés hatékonyságának szempontjából. Bár további kutatás szükséges e jelenségek pontos magyarázatának tisztázásához, az eredmények validálása egy nagyobb vagy multicentrikus klinikai vizsgálatban közelebb hozhatná a személyre szabott orvoslás lehetőségét.

Feltételezzük, hogy az összefüggés az *MTHFR* 677TT genotípus és MTX toxicitás között megmagyarázható a folát státusz zavaraival és az elhúzódó MTX klirensz miatt kialakult elnyúlt MTX expozícióval. Az *MTHFR* 677T homozigotizáció alacsony szérumból folát szintekhez vezet, ami miatt az *FR* és *RFC* gének overexpressziója következik be. Az antifolát kezelések esetében, mint amilyen az MTX is, ezek az overexpressziók magas sejten belüli MTX koncentrációhoz vezetnek. Poliglutamációt követően a sejten belüli magasabb MTX szint sokkal citotoxikusabb lesz és elhúzódó MTX klirenszt okoz.

Javasolható az *MTHFR* 677 polimorfizmus meghatározása a HD-MTX kezelés előtt a malignus elváltozásokkal rendelkező betegekben, hogy az életet veszélyeztető komplikációk elkerülhetőek legyenek.

Összefoglalva megállapítható, hogy az *SHMT1* 1420 és/vagy az *MTHFR* 677 polimorfizmusok jelentősen és igen sajátos módon befolyásolják a CRC rizikót, a FOLFIRI+bevacizumab kezelés hatékonyságát és végül, de nem utolsón a kezelések okozta mellékhatások kialakulását, mind a FOLFIRI+bevacizumab kezelésben részesülő CRC, mind az MTX-tal kezelt osteosarcoma esetében.



## 7. ÖSSZEFOGLALÓK

Számos korábbi eredmény felveti, hogy a folát és a folát-ciklus enzimeinek génpolimorfizmusai hatással lehetnek a rák kialakulásának kockázatára, a kezelés hatékonyságára és a mellékhatások kialakulására.

Tanulmányunkban igazoltuk, hogy az *SHMT1* 1420T allél vagy az *SHMT1* 1420T allél / *MTHFR* 677CC diplotípus védő hatású a rectumrák, de nem a colonrák kockázatával kapcsolatban. Az *SHMT1* 1420 variáns szignifikánsan megemeli a Hcy szinteket a kontrollokban, míg a betegekben nem. A Hcy csak a Dukes C és D stádiumú és vad típusú (CC) *SHMT1* 1420 CRC-s betegek esetében tekinthető tumormarkernek. A magas Hcy szint az előrehaladott stádiumú betegekre jellemző.

Vizsgálatunk kimutatta, hogy az *SHMT1* 1420T allél jelenléte a CRC esetében az első vonalbeli FOLFIRI+bevacizumab terápiára adott kedvezőbb válasz, a hosszabb progressziómentes és teljes túlélés független markere. A bevacizumab kezelés okozta magas vérnyomás csak a vad (CC) *SHMT1* 1420 genotípusok esetén prediktív értékű a kezelés hatékonyságának szempontjából.

Feltételezzük, hogy az *MTHFR* 677TT genotípus felelős az osteosarcomás beteg esetében leírt nagy dózisú metotrexát (MTX)-okozta idegrendszeri toxicitásért is, mivel zavar keletkezik a folát státusban és az elhúzódó MTX klirensz miatt elnyúlt gyógyszerexpozíció alakult ki. Javasoljuk az *MTHFR* 677 polimorfizmus vizsgálatát a MTX kezelés előtt, hogy az életet veszélyeztető komplikációk elkerülhetőek legyenek.

Összefoglalva megállapítható, hogy az *SHMT1* 1420 és/vagy az *MTHFR* 677 polimorfizmusok befolyásolják a CRC rizikót, a FOLFIRI+bevacizumab kezelés hatékonyságát és a mellékhatások kialakulását, mind a FOLFIRI+bevacizumabbal kezelt CRC, mind a metotrexáttal kezelt osteosarcoma esetében.

## SUMMARY

Several recent studies suggest that folate and gene polymorphisms of folate-cycle enzymes may influence the risk of cancer development, treatment efficacy and occurrence of adverse effects.

A protective effect of *SHMT1* 1420T allele or *SHMT1* 1420 T allele/*MTHFR* 677 CC diplotype against rectal but not colon cancer risk was demonstrated. The presence of *SHMT1* 1420T allele significantly increases the Hcy levels in controls but not in patients. Homocysteine could be considered as a tumor marker in *SHMT1* 1420 wild-type (CC) CRC patients in Dukes' stage C and D. The high levels of Hcy are characteristic for patients with advanced stage disease.

Our analysis demonstrated that *SHMT1* 1420T allele was associated with better response and longer progression-free and overall survival in both univariate and multivariate analysis after FOLFIRI+bevacizumab treatment. Bevacizumab-related hypertension could be a predictive marker of treatment efficacy in the case of wild (CC) *SHMT1* 1420 genotypes only.

We hypothesize that methotrexate toxicity can be explained by the association between homozygosity of the *MTHFR* C677T polymorphism causing disturbances in the folate status and thus an enhanced vulnerability of the central nervous system to antimetabolites and to the prolonged methotrexate exposure due to delayed clearance.

In summary it can be stated that the *SHMT1* 1420 and/or *MTHFR* 677 polymorphisms affect the CRC risk, the efficacy of FOLFIRI+bevacizumab treatment and the occurrence of toxic side effects both in CRC patients treated by FOLFIRI+bevacizumab and in osteosarcoma patient treated by methotrexate.

## 8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Nijhout HF, Reed MC, Budu P, Ulrich CM: A mathematical model of the folate cycle: new insights into folate homeostasis. *J Biol Chem.* 2004, 279: 55008-55016.
2. Gudnason V, Stansbie D, Scott J, Bowron A, Nicaud V, Humphries S: C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. EARS group. *Atherosclerosis* 1998, 136: 347-354.
3. Pereira AC, Schettert IT, Morandini AAF, Guerra-Shinohara EM, Krieger JE: Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c677t gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate deficient population. *Clin Chim Acta* 2004, 340: 99-105.
4. Bailey LB, Duhaney RL, Maneval DR, Kauwell GP, Quinlivan EP, Davis SR, Cuadras A, Hutson AD, Gregory JF: Vitamin B-12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. *J Nutr* 2002, 132: 1872-1878.
5. Angus SP, Wheeler LJ, Ranmal SA, Zhang X, Markey MP, Mathews CK, Knudsen ES: Retinoblastoma tumor suppressor targets dNTP metabolism to regulate DNA replication. *J Biol Chem* 2002, 277: 44376-44384.
6. Martomo SA, Mathews CK: Effects of biological DNA precursor pool asymmetry upon accuracy of DNA replication in vitro. *Mutat Res* 2002, 499: 197-211.
7. Choi SW, Mason JB: Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr* 2000, 130: 129-132.
8. Choi SW, Mason JB: Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J Nutr* 2002 132(8 Suppl):2413S-2418S.
9. Chu E, Koeller DM, Casey JL, Drake JC, Chabner BA, Elwood PC, Zinn S, Allegra CJ. Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88: 8977-8981.
10. Ulrich CM, Bigler J, Velicer CM, Greene EA, Farin FM, Potter JD: Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common

- polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000, 9: 1381-1385.
11. Sassi S, Cosmi B, Palareti G, Legnani C, Grossi G, Musolesi S, Coccheri S: Influence of age, sex and vitamin status on fasting and post-methionine load plasma homocysteine levels. *Haematologica* 2002, 87: 957-964.
  12. Marchesini G, Manini R, Bianchi G, Sassi S, Natale S, Chierici S, Visani F, Baraldi L, Forlani G, Melchionda N: Homocysteine and psychological traits: a study in obesity. *Nutrition* 2002, 18: 403-407.
  13. Parsons DS, Reaveley DA, Pavitt DV, Brown EA: Relationship of renal function to homocystein and lipoprotein(a) levels: The frequency of the combination of both risk factors in chronic renal impairment. *Am J Kidney Dis* 2002, 40: 916-923.
  14. Valik D, Radina M, Sterba J, Vojtesek B: Homocysteine: exploring its potential as a pharmacodynamic biomarker of antifolate chemotherapy. *Pharmacogenomics* 2004, 5: 1151-1162.
  15. Wu LL, Wu JT: Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker. *Clin Chim Acta* 2002, 322: 21-28.
  16. Oikawa S, Murakami K, Kawanishi S: Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implications for carcinogenesis. *Oncogene* 2003, 22: 3530-3538.
  17. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW: Colorectal cancer. *Lancet* 2005, 365: 153-165.
  18. Otto S, Kasler M: Trends in cancer mortality and morbidity in Hungarian and international statistics. Characteristics and potential outcome of public health screening programmes, *Magy Onkol* 2005, 49: 99-101.
  19. Johns LE, Houlston RS: A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol* 2001, 96: 2992-3003.
  20. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willet WC: A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994, 331: 1669-1674.
  21. Rozen P, Fireman Z, Figer A, Legum C, Ron E, Lynch HT: Family history of colorectal cancer as a marker of potential malignancy within a screening program. *Cancer* 1987, 60: 248-254.

22. Hawk ET, Umar A, Viner JL: Colorectal cancer chemoprevention--an overview of the science. *Gastroenterology* 2004, 126: 1423-1447.
23. Singh PN, Fraser GE: Dietary risk factors for colon cancer in a low-risk population. *Am J Epidemiol* 1998, 148: 761-774.
24. Slattery ML, Potter J, Caan B, Edwards S, Coates A, Ma KN, Berry TD: Energy balance and colon cancer-beyond physical activity. *Cancer Res* 1997, 57: 75-80.
25. Potter JD Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91: 916-932.
26. Heavey PM, McKenna D, Rowland IR: Colorectal cancer and the relationship between genes and the environment. *Nutr Cancer* 2004, 48: 124-141.
27. Gundy S: The role of chemical and physical factors in cancer development. *Magy Onkol* 2006, 50: 5-18.
28. Giovannucci E: Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review. *J Nutr* 2002, 132: 2350S-2355S.
29. Sharp L, Little J: Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004, 159: 423-443.
30. van Guelpen B, Hultdin J, Johansson I, Hallmans G, Stenling R, Riboli E, Winkvist A, Palmqvist R: Low folate levels may protect against colorectal cancer. *Gut* 2006, 55: 1461-1466.
31. Ulvik A, Vollset SE, Hansen S, Gislefoss R, Jellum E, Ueland PM: Colorectal cancer and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C- > T and methionine synthase 2756A- > G polymorphisms: a study of 2,168 case-control pairs from the JANUS cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004, 13: 2175-2180.
32. Chen K, Jiang QT, He HQ: Relationship between metabolic enzyme polymorphisms and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005, 11: 331-335.
33. Hubner RA, Houlston RS: MTHFR C677T and colorectal cancer risk: a meta-analysis of 25 populations. *Int J Cancer* 2006, 120: 1027-1035.
34. Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, Shane B, Roberts AC, Law GR, Rollinson S, Roman E, Cartwright RA, Morgan GJ: Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* 2002, 99: 3786-3791.

35. Hishida A, Matsuo K, Hamajima N, Ito H, Ogura M, Kagami Y, Taji H, Morishima Y, Emi N, Tajima K: Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma. *Haematologica* 2003, 88: 159-166.
36. van den Donk M, Visker MH, Harryvan JL, Kok FJ, Kampman E: Dietary intake of B-vitamins, polymorphisms in thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase 1, and colorectal adenoma risk: a Dutch case-control study. *Cancer Lett* 2007, 250: 146-153.
37. Chen J, Kyte C, Valcin M, Chan W, Wetmur JG, Selhub J, Hunter DJ, Ma J: Polymorphisms in the one-carbon metabolic pathway, plasma folate levels and colorectal cancer in a prospective study. *Int J Cancer* 2004, 110: 617-620.
38. Guerreiro CS, Cravo M, Costa AR, Miranda A, Tavares L, Moura-Santos P, MarquesVidal P, Nobre Leitão C: Risk of colorectal cancer associated with the C677T polymorphism in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase in Portuguese patients depends on the intake of methyl-donor nutrients. *Am J Clin Nutr* 2008, 88: 1413-1418.
39. Steck SE, Keku T, Butler LM, Galanko J, Massa B, Millikan RC, Sandler RS: Polymorphisms in methionine synthase, methionine synthase reductase and serine hydroxymethyltransferase, folate and alcohol intake, and colon cancer risk. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2008, 1: 196-204.
40. Kapiteijn E, Liefers GJ, Los LC, Kranenbarg EK, Hermans J, Tollenaar RA, Moriya Y, van de Velde CJ, van Krieken JH: Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer. *J Pathol* 2001, 195: 171-178.
41. Howard RA, Freedman DM, Park Y, Hollenbeck A, Schatzkin A, Leitzmann MF: Physical activity, sedentary behavior, and the risk of colon and rectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Cancer Causes Controls* 2008, 19: 939-953.
42. Frattini M, Balestra D, Suardi S, Oggionni M, Alberici P, Radice P, Costa A, Daidone MG, Leo E, Pilotti S, Bertario L, Pierotti MA: Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004, 10: 4015-4021.

43. Adams KF, Leitzmann MF, Albanes D, Kipnis V, Mouw T, Hollenbeck A, Schatzkin A: Body mass and colorectal cancer risk in the NIH-AARP Cohort. *Am J Epidemiol* 2007, 166: 36-45.
44. Le Marchand L, Wilkens LR, Kolonel LN, Henderson BE: The MTHFR C677T polymorphism and colorectal cancer: the multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, 14: 1198-1203.
45. Kim DH, Ahn YO, Lee BH, Tsuji E, Kiyohara C, Kono S: Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism, alcohol intake, and risks of colon and rectal cancers in Korea. *Cancer Lett* 2004, 216: 199-205.
46. Cao HX, Gao CM, Takezaki T, Wu JZ, Ding JH, Liu YT, Li SP, Su P, Cao J, Hamajima N, Tajima K: Genetic polymorphisms of methylene tetrahydrofolate reductase and susceptibility to colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2008, 9: 203-208.
47. Wolmark N, Fisher B, Rockette H, Redmond C, Wickerham DL, Fisher ER, Jones J, Glass A, Lerner H, Lawrence W: Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer: results from NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst* 1988, 80: 30-36.
48. Kralovánszky J, Katona Cs: Nukleotid bioszintézis gátlók. In: *Onkofarmakológia*, Szerk: Jeney A, Kralovánszky J. Medicina, Budapest, 2005.
49. Jeney A: Topoizomeráz gátlók. In: *Onkofarmakológia*, Szerk: Jeney A, Kralovánszky J. Medicina, Budapest, 2005.
50. Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E: Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther* 2002, 1: 227-235.
51. Rothenberg ML, Oza AM, Bigelow RH, Berlin JD, Marshall JL, Ramanathan RK, Hart LL, Gupta S, Garay CA, Burger BG, Le Bail N, Haller DG: Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial. *J Clin Oncol* 2003, 21: 2059-2069.
52. Grothey A: Oxaliplatin-safety profile: neurotoxicity. *Semin Oncol* 2003, 30(Suppl.15): 5-13.
53. Fuchs CS, Marshall J, Mitchell E, Wierzbicki R, Ganju V, Jeffery M, Schulz J, Richards D, Soufi-Mahjoubi R, Wang B, Barrueco J. Randomized, controlled trial

- of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study. *J Clin Oncol* 2007, 25: 4779-4786.
54. Fuchs CS, Marshall J, Barrueco J. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: updated results from the BICC-C study. *J Clin Oncol* 2008, 26: 689-690.
  55. Van Cutsem E, Rivera F, Berry S, Kretzschmar A, Michael M, DiBartolomeo M, Mazier MA, Canon JL, Georgoulis V, Peeters M, Bridgewater J, Cunningham D; First BEAT investigators. Safety and efficacy of first-line bevacizumab with FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and fluoropyrimidines in metastatic colorectal cancer: the BEAT study. *Ann Oncol* 2009, 20: 1842-1847.
  56. Sobrero A, Ackland S, Clarke S, Perez-Carrión R, Chiara S, Gapski J, Mainwaring P, Langer B, Young S; AVIRI Trial investigators. Phase IV study of bevacizumab in combination with infusional fluorouracil, leucovorin and irinotecan (FOLFIRI) in first-line metastatic colorectal cancer. *Oncology* 2009, 77: 113-119.
  57. Hecht JR, Mitchell E, Chidiac T, Scroggin C, Hagenstad C, Spigel D, Marshall J, Cohn A, McCollum D, Stella P, Deeter R, Shahin S, Amado RG. A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009, 27: 672-680.
  58. Kopetz S, Hoff PM, Morris JS, Wolff RA, Eng C, Glover KY, Adinin R, Overman MJ, Valero V, Wen S, Lieu C, Yan S, Tran HT, Ellis LM, Abbruzzese JL, Heymach JV. Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *J Clin Oncol* 2010, 28: 453-459.
  59. Funke S, Brenner H, Chang-Claude J. Pharmacogenetics in colorectal cancer: a systematic review. *Pharmacogenomics* 2008, 9: 1079-1099.
  60. Lakatos L, Lakatos PL: A colorectalis daganatok korszerű kezelése. *LAM* 2005, 15: 177-786.
  61. Blázovics A: Vectibix előrehaladott colorectalis carcinoma kezelésére. *Orv Hetil* 2009, 37: 1758–1759.



62. Fernandez FG, Drebin JA, Linehan DC, Dehdashti F, Siegel BA, Strasberg SM: Five-year survival after resection of hepatic metastases from colorectal cancer in patients screened by positron emission tomography with F-18 fluorodeoxyglucose (FDG-PET). *Ann Surg* 2004, 240: 438-447.
63. Adam R, Lucidi V, Bismuth H: Hepatic colorectal metastases: methods of improving resectability. *Surg Clin North Am* 2004, 84: 659-671.
64. Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, de Gramont A: FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004, 22: 229-237.
65. Meyerhardt JA, Mayer RJ: Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005, 352: 476-487.
66. Inoue Y, Miki C, Watanabe H, Hiro J, Toiyama Y, Ojima E, Nakatani K, Nobori T, Kusunoki M. Irinotecan cytotoxicity does not necessarily depend on the UGT1A1 polymorphism but on fluoropyrimidine: a molecular case report. *Oncol Rep* 2006, 16: 971-974.
67. Takizawa M, Kawakami K, Obata T, Matsumoto I, Ohta Y, Oda M, Sasaki T, Watanabe G. In vitro sensitivity to platinum-derived drugs is associated with expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in human lung cancer. *Oncol Rep* 2006, 15: 1533-1539.
68. Etienne-Grimaldi MC, Milano G, Maindrault-Goebel F, Chibaudel B, Formento JL, Francoual M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and FOLFOX response in colorectal cancer patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2010, 69: 58-66.
69. Jubb AM, Hurwitz HI, Bai W, Holmgren EB, Tobin P, Guerrero S, Kabbinavar F, Holden SN, Novotny WF, Frantz GD, Hillan KJ, Koeppen H. Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2006, 24: 217-227.
70. Atta HM, El-Rehani MA, Raheim SA, Galal AMF. Lowering homocysteine decreases levels and expression of VEGF(165) and endostatin. *J Surg Res* 2008, 146: 202-210.

71. Lee I, Lee H, Kim JM, Chae EH, Kim SJ, Chang N. Short-term hyperhomocysteinemia-induced oxidative stress activates retinal glial cells and increases vascular endothelial growth factor expression in rat retina. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007, 71: 1203-1210.
72. Rouits E, Charasson V, Pétain A, Boisdron-Celle M, Delord J-P, Fonck M, Laurand A, Poirier AL, Morel A, Chatelut E, Robert J, Gamelin E. Pharmacokinetic and pharmacogenetic determinants of the activity and toxicity of irinotecan in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2008, 99: 1239-1245.
73. Ayerden Ebinç F, Haksun E, Ulver DB, Kotz E, Erten Y, Altok KR, Bali M, Turgay A, Sindel S. The relationship between vascular endothelial growth factor (VEGF) and microalbuminuria in patients with essential hypertension. *Intern Med* 2008; 47: 1511-1516.
74. Scartozzi M, Galizia E, Chiorrini S, Giampieri R, Berardi R, Pierantoni C, Cascinu S: Arterial hypertension correlates with clinical outcome in colorectal cancer patients treated with first-line bevacizumab. *Ann Oncol* 2009, 20: 227-230.
75. Longo R, Gasparini G. Challenges for patient selection with VEGF inhibitors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007, 60: 151-170.
76. Schneider BP, Radovich M, Miller KD. The role of vascular endothelial growth factor genetic variability in cancer. *Clin Cancer Res* 2009, 15: 5297-5302.
77. Varey AH, Rennel ES, Qiu Y, Bevan KS, Perrin RM, Raffy S, Dixon AR, Paraskeva C, Zaccheo O, Hassan AB, Harper SJ, Bates DO. VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer* 2008, 98: 1366-1379.
78. Szendrői M: A csontdaganatok kezelésének újabb lehetőségei. Doktori értekezés. Semmelweis Egyetem, Budapest, 1992.
79. Dorfman H, Czerniak B: Bone cancers. *Cancer* 1995, 75: 203-210.
80. Miller R, Yound J, Novakovic B: Childhood cancer. *Cancer* 1995, 75: 395-405.
81. Huvos A: Bone Tumors: Diagnosis, Treatment and Prognosis. Eds: WB Saunders, Philadelphia, 1991.

82. Unni K: Dahlin's bone tumors - General aspects and data on 11087 cases. Eds: Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996.
83. Dahlin DC, Coventry MB: Osteosarcoma: a study of six hundred cases. *J Bone Joint Surg* 1967, 49: 101-110.
84. Provisor A, Ettinger L, Nachaman J, Krailo M, Makley J, Yunis E, Huvos A, Betcher D, Baum E, Kisker C, Miser J: Treatment of nonmetastatic osteosarcoma of the extremity with preoperative and postoperative chemotherapy: a report from the children's cancer group. *J Clin Oncol* 1997, 15: 76-84.
85. Bacci G, Picci P, Ruggieri P, Mercuri M, Avella M, Capanna R, Brach DP, Mancini A, Gherlinzoni F, Padovani G: Primary chemotherapy and delayed surgery (neoadjuvant chemotherapy) for osteosarcoma of the extremities. The Instituto Rizzoli Experience in 127 patients treated preoperatively with intravenous methotrexate (high versus moderate doses) and intraarterial cisplatin. *Cancer* 1990, 54: 2539-2553.
86. Mintz B, Sowers R, Brown M, Hilmer C, Mazza E, Huvos G, Meyers A, LaFleur B, McDonough S, Henry M, Ramsey E, Antonescu R, Chen W, Healey H, Daluski A, Berens E, MacDonald J, Gorlick R, Stephan A: An expression signature classifies chemotherapy-resistant pediatric osteosarcoma. *Cancer Res* 2005, 65: 1748-1754.
87. Aparacio J, Segura A, Montalar J: Long-term results after combined modality treatment for non-metastatic osteosarcoma. *Med Oncol* 1999, 16: 255-260.
88. Saeter G, Hoie J, Stenwig AE, Johansson AK, Hannisdal E, Solheim OP: Systemic relapse of patients with osteogenic sarcoma. Prognostic factors for long term survival. *Cancer* 1995, 75: 1084-1093.
89. Kashima T, Nakamura T, Kawaguchi J, Takanashi M, Ishida T, Aburatani H, Kudo A, Fukayama M, Grigoriadis A: Overexpression of cadherins suppresses pulmonary metastasis of osteosarcoma in vivo. *Int J Cancer* 2003, 104: 147-154.
90. Saeter G: ESMO minimum clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of osteosarcoma. *Ann Oncol* 2003, 14: 1165-1166.
91. Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Longhi A, Bacchini P, Giacomini S, Forni C: A comment and update on "Does the histological subtype of high-grade central osteosarcoma influence the response to treatment with chemotherapy and does it

- affect overall survival? A study on 570 patients of two consecutive trials of the European Osteosarcoma Intergroup". *Eur J Cancer* 2003, 39: 548-549.
92. Winkler K, Beron G, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Beck J, Beck W, Brandeis W, Ebell W, Erttmann R and Gobel U: Neoadjuvant chemotherapy for osteogenic sarcoma: results of a Cooperative German/Austrian study. *J Clin Oncol* 1984, 2: 617-624.
  93. Wolfrom C, Hepp R, Hartmann R, Breithaupt H and Henze G: Pharmacokinetic study of methotrexate, folinic acid and their serum metabolites in children treated with high-dose methotrexate and leucovorin rescue. *Eur J Clin Pharmacol* 1990, 39: 377-383.
  94. McKendry RJ: The remarkable spectrum of methotrexate toxicities. *Rheum Dis Clin North Am* 1997, 23: 939-954.
  95. Vezmar S, Becker A, Bode U and Jaehde U: Biochemical and clinical aspects of methotrexate neurotoxicity. *Chemotherapy* 2003, 49: 92-104.
  96. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA and van den Heuvel LP and Rozen R: A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995, 10: 111-113.
  97. Quinn CT and Kamen BA: A biochemical perspective of methotrexate neurotoxicity with insight on nonfolate rescue modalities. *J Investig Med* 1996 44: 522-530.
  98. Chiusolo P, Reddicono G, Casorelli I, Laurenti L, Sora F, Mele L, Annino L, Leone G and Sica S: Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate. *Ann Oncol* 2002, 13: 1915-1918.
  99. Strunk T, Gottschalk S, Goepel W, Bucsky P and Schultz C: Subacute leukoencephalopathy after low-dose intrathecal methotrexate in an adolescent heterozygous for the MTHFR C677T polymorphism. *Med Pediatr Oncol* 2003, 40: 48-50.
  100. Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner JL, Bigler J, Ariail KS, Keener CL, Li S, Liu H, Farin FM and Potter JD: Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the

- methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood* 2001, 98: 231-234.
101. van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, Huizinga TW, Haagsma CJ, Giesendorf BA, de Boo TM and van de Putte LB: The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2001, 44: 2525-2530.
  102. Gemmati D, Ongaro A, Tognazzo S, Catozzi L, Federici F, Mauro E, Della Porta M, Campioni D, Bardi A, Gilli G, Pellati A, Caruso A, Scapoli GL and De Mattei M: Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene variants in adult non-Hodgkin's lymphoma patients: association with toxicity and survival. *Haematologica* 2007, 92: 478-485.
  103. Weisman MH, Furst DE, Park GS, Kremer JM, Smith KM, Wallace DJ, Caldwell JR and Dervieux T: Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side-effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006, 54: 607-612.
  104. Robien K, Schubert MM, Bruemmer B, Lloid ME, Potter JD and Ulrich CM: Predictors of oral mucositis in patients receiving hematopoietic cell transplants for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 2004, 22: 1268-1275.
  105. Liu JX, Chen JP, Tan W, Lin DX: Association between mthfr gene polymorphisms and toxicity of HDMTX chemotherapy in acute lymphocytic leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2008, 16: 488-492.
  106. Karathanasis NV, Stiakaki E, Goulielmos GN, Kalmanti M: The role of the methylenetetrahydrofolate reductase 677 and 1298 polymorphisms in Cretan children with acute lymphoblastic leukemia. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011,15: 5-10.
  107. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaertsc J, Schwartz LH, Shargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J: New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009, 45: 228-247.

108. Hitre E, Budai B, Adleff V, Czeglédi F, Horváth Zs, Gyergyay F, Lövey J, Kovács T, Orosz Z, Láng I, Kásler M, Kralovánszky J: Influence of thymidylate synthase gene polymorphisms on the survival of colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Pharmacogenet Genomics* 2005, 15: 723-730.
109. The Clinician's Ultimate Reference, GlobalRPh.com, Multiple Creatinine Clearance Methods. [www.globalrph.com/multiple\\_crcl.htm](http://www.globalrph.com/multiple_crcl.htm)
110. Réti A, Barna G, Pap E, Adleff V, Komlósi VL, Jeney A, Kralovánszky J, Budai B: Enhancement of 5-fluorouracil efficacy on high COX-2 expressing HCA-7 cells by low dose indomethacin and NS-398 but not on low COX-2 expressing HT-29 cells. *Pathol Oncol Res* 2009, 15: 335-344.
111. Katona C, Rosta A, Tóth K, Fónyad G, Jeney A, Pandi E, Kralovánszky J: Determination of dihydropyrimidine dehydrogenase in the prediction of toxic side effects of 5-fluorouracil. *Orv Hetil* 1997, 138: 1843-1847.
112. Lee WC, Wang LY: Simple formulas for gauging the potential impacts of population stratification bias. *Am J Epidemiol* 2007, 167: 86-89.
113. Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>] dbSNP accession: {rs1979277 and rs1801133}, (dbSNP Build ID: 129) .
114. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM: GLOBOCAN 2002: Cancer incidences, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancer Base No. 5 version 2.0. Lyon, France: IARC Press; 2004.
115. Exact  $r \times c$  Contingency Table: How many rows? columns? [www.physics.csbsju.edu/stats/exact\\_NROW\\_NCOLUMN\\_form.html](http://www.physics.csbsju.edu/stats/exact_NROW_NCOLUMN_form.html)
116. Eselgrim M, Grunert H, Kuhne T, Zoubek A, Kevric M, Burger H, Jurgens H, Mayer-Steinacker R, Gosheger G and Bielack SS: Dose intensity of chemotherapy for osteosarcoma and outcome in the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS) trials. *Pediatr Blood Cancer* 2006, 47: 42-50.
117. Wang Y, Guo W, He Y, Chen Z, Wen D, Zhang X, Wang N, Li Y, Ge H, Zhang J: Association of MTHFR C677T and SHMT(1) C1420T with susceptibility to ESCC and GCA in a high incident region of Northern China. *Cancer Causes Control* 2007, 18: 143-152.

118. Taioli E, Garza MA, Ahn YO, Bishop DT, Bost J, Budai B, Chen K, Gemignani F, Keku T, Lima CSP, Le Marchand L, Matsuo K, Moreno V, Plaschke J, Pufulete M, Thomas SB, Toffoli G, Wolf CR, Moore CG, Little J: Meta- and pooled analyses of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and colorectal cancer: a HuGE-GSEC review. *Am J Epidemiol* 2009, 170: 1207-1221.
119. Huang Y, Han S, Li Y, Mao Y, Xie Y: Different roles of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in colorectal adenoma and colorectal cancer: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2007, 52: 73-85.
120. Zajkás G, Bíró L, Greiner E, Szórád I, Ágoston H, Balázs A, Vitrai J, Hermann D, Boros J, Németh R, Kéki Z, Martos É: Dietary survey in Hungary, 2003-2004. Micronutrients: vitamins. *Orv Hetil* 2007, 148: 1593-1600.
121. Iacopetta B, Heyworth J, Girschik J, Grieu F, Clayforth C, Fritschi L: The MTHFR C677T and  $\Delta$ DNMT3B C-149T polymorphism confer different risks for right- and left-sided colorectal cancer. *Int J Cancer* 2009, 125: 84-90.
122. Liang W: Age sex and the risk of grade-specific second primary colorectal cancer: Evidence for the protective effect of female hormone. *Eur J Cancer* 2007, 43: 1856-1861.
123. Mrkonjic M, Raptis S, Green RC, Monga N, Daftary D, Dicks E, Younghusband HB, Parfrey PS, Gallinger SS, McLaughlin JR, Knight JA, Bapat B: MSH2 118T>C and MSH6 159C>T promoter polymorphisms and the risk of colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2007, 28: 2575-2580.
124. Talseth BA, Ashton KA, Meldrum C, Suchy J, Kurzawski G, Lubinski J, Scott RJ: Aurora-A and Cyclin D1 polymorphisms and the age of onset of colorectal cancer in hereditary nonpoliposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 2007, 122: 1273-1277.
125. Slattery ML, Sweeney C, Murtaugh M, Ma KN, Potter JD, Levin TR, Samowitz W, Wolff R: Associations between apoE genotype and colon and rectal cancer. *Carcinogenesis* 2005, 26: 1422-1429.
126. Jacobs ET, Ahnen DJ, Ashbeck EL, Baron JA, Greenberg ER, Lance P, Lieberman DA, McKeown-Eyssen G, Schatzkin A, Thompson PA, Martínez ME: Association between body mass index and colorectal neoplasia at follow-up colonoscopy: a pooling study. *Am J Epidemiol* 2009, 169: 657-666.

127. Geisel J, Hübner U, Bodis M, Schorr H, Knapp JP, Obeid R, Herrmann W: The role of genetic factors in the development of hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med* 2003, 41: 1427-1434.
128. Semmler A, Moskau S, Stoffel-Wagner B, Weller M, Linnebank M: The effect of MTHFR c.677C > T on plasma homocysteine levels depends on health, age and smoking. *Clin Invest Med* 2009, 32: E310-E314.
129. Schroecksadel K, Frick B, Fiegl M, Winkler C, Denz HA, Fuchs D: Hyperhomocysteinaemia and immune activation in patients with cancer. *Clin Chem Lab Med* 2007, 45: 47-53.
130. Ferroni P, Palmirotta R, Martini F, Riondino S, Savonarola A, Spila A, Ciatti F, Sini V, Mariotti S, Del Monte G, Roselli M, Guadagni F: Determinants of homocysteine levels in colorectal and breast cancer patients. *Anticancer Res* 2009, 29: 4131-4138.
131. Almadori G, Bussu F, Galli J, Cadoni G, Zappacosta B, Persichilli S, Minucci A, Giardina B: Serum folate and homocysteine levels in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2002, 94: 1006-1011.
132. Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM: Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res* 1991, 51: 828-835.
133. Ozkan Y, Yardim-Akaydin S, Firat H, Calışkan-Can E, Ardiç S, Simşek B: Usefulness of homocysteine as a cancer marker: total thiol compounds and folate levels in untreated lung cancer patients. *Anticancer Res* 2007, 27: 1185-1189.
134. Battistelli S, Vittoria A, Stefanoni M, Bing C, Roviello F: Total plasma homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in patients with colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006, 12: 6128-6132.
135. Eleftheriadou A, Chalastras T, Ferekidou E, Yiotakis I, Kyriou L, Tzagarakis M, Ferekidis E, Kandiloros D: Association between squamous cell carcinoma of the head and neck and serum folate and homocysteine. *Anticancer Res* 2006, 26: 2345-2348.
136. Zacho J, Yazdanyar S, Bojesen SE, Tybjærg-Hansen A, Nordestgaard BG: Hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase c.677C>T polymorphism, and risk of cancer: cross-sectional and prospective studies and



- meta-analyses of 75,000 cases and 93,000 controls. *Int J Cancer* 2010, 128: 644-652.
137. Gatt A, Makris A, Cladd H, Burcombe RJ, Smith JM, Cooper P, Thompson D, Makris M: Hyperhomocysteinemia in women with advanced breast cancer. *Int J Lab Hematol* 2007, 29: 421-425.
138. Ruud E, Holmstrøm H, Brosstad F, Wesenberg F: Diagnostic value of family histories of thrombosis to identify children with thrombophilia. *Pediatr Hematol Oncol* 2005, 22: 453-462.
139. Melichar B, Kalábová H, Krcmová L, Kasparová M, Malírová E, Melicharová K, Pecka M, Hyspler R, Solichová D: Serum homocysteine, cholesterol, retinol, alpha-tocopherol, glycosylated hemoglobin and inflammatory response during therapy with bevacizumab, oxaliplatin, 5-fluorouracil and leucovorin. *Anticancer Res* 2009, 29: 4813-4820.
140. Anderson DD, Stover PJ: SHMT1 and SHMT2 are functionally redundant in nuclear de novo thymidylate biosynthesis. *PLoS ONE* 2009, 4: e5839.
141. Lomnytska M, Dubrovskaya A, Hellman U, Volodko N, Souchelnytskyi S: Increased expression of cSHMT, Tbx3 and utrophin in plasma of ovarian and breast cancer patients. *Int J Cancer* 2006, 118: 412-421.
142. de Jonge R, Hooijberg JH, van Zelst BD, Jansen G, van Zantwijk CH, Kaspers GJL, Peters GJ, Ravindranath Y, Pieters R, Lindemans J: Effect of polymorphisms in folate-related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005, 106: 717-720.
143. Dervieux T, Greenstein N, Kremer J: Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006, 54: 3095-3103.
144. Stamp LK, Chapman PT, O'Donnell JL, Zhang M, James J, Frampton C, Barclay ML, Kennedy MA, Roberts RL: Polymorphisms within the folate pathway predict folate concentrations but are not associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Pharmacogenet Genomics* 2010, 20: 367-376.
145. Dervieux T, Wessels JA, van der Straaten T, Penrod N, Moore JH, Guchelaar HJ, Kremer JM: Gene-gene interactions in folate and adenosine biosynthesis pathways

- affect methotrexate efficacy and tolerability in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenet Genomics* 2009, 19: 935-944.
146. Hitre E, Budai B, Adleff V, Komlósi V, Czeglédi F, Pap É, Rubovszky G, Horváth Z, Kralovánszky J, Láng I: Comparison of first-line deGramont, FOLFIRI and bevacizumab+FOLFIRI treatments in case of different genotypes of metastatic colorectal cancer patients. *Magy Onkol* 2009, 53(Suppl): 47.
147. Formica V, Palmirotta R, Del Monte G, Savonarola A, Ludovici G, De Marchis ML, et al. Predictive value of VEGF gene polymorphisms for metastatic colorectal cancer patients receiving first-line treatment including fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab. *Int J Colorectal Dis.* 2011, 26: 143-151.
148. Loupakis F, Ruzzo A, Salvatore L, Cremolini C, Masi G, Frumento P, Schirripa M, Catalano V, Galluccio N, Canestrari E, Vincenzi B, Santini D, Bencardino K, Ricci V, Manzoni M, Danova M, Tonini G, Magnani M, Falcone A, Graziano F: Retrospective exploratory analysis of *VEGF* polymorphisms in the prediction of benefit from first-line FOLFIRI plus bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 2011, 11:247-251.
149. Hoskins JM, Goldberg RM, Qu P, Ibrahim JG, McLeod HL. UGT1A1\*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters. *J Natl Cancer Inst* 2007, 99:1290-1295.
150. Palomaki GE, Bradley LA, Douglas MP, Kolor K, Dotson WD. Can UGT1A1 genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? An evidence-based review. *Genet Med* 2009, 11:21-34.
151. Martinez-Balibrea E, Abad A, Martínez-Cardús A, Ginés A, Valladares M, Navarro M, Aranda E, Marcuello E, Benavides M, Massutí B, Carrato A, Layos L, Manzano JL, Moreno V: UGT1A and TYMS genetic variants predict toxicity and response of colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan and fluorouracil combination therapy. *Br J Cancer* 2010, 103:581-589.
152. Castro R, Rivera I, Ravasco P, Jakobs C, Blom HJ, Camilo ME, de Almeida IT: 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase 677C->T and 1298A->C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine. *Q J Med* 2003, 96: 297-303.

153. Goldman ID, Matherly LH: Biochemical factors in the selectivity of leucovorin rescue: selective inhibition of leucovorin reactivation of dihydrofolate reductase and leucovorin utilization in purine and pyrimidine biosynthesis by methotrexate and dihydrofolate polyglutamates. *NCI Monogr* 1987, 5: 17-26.
154. Spinella MJ, Brigle KE, Sierra EE, Goldman ID: Distinguishing between folate receptor-alpha-mediated transport and reduced folate carrier-mediated transport in L1210 leukemia cells. *J Biol Chem* 1995, 270: 7842-7849.
155. Kane MA, Elwood PC, Portillo RM, Antony AC, Najfeld V, Finley A, Waxman S, Kolhouse JF: Influence on immunoreactive folate-binding proteins of extracellular folate concentration in cultured human cells. *J Clin Invest* 1988, 81: 1398-1406.
156. Jansen G, Westerhof GR, Jarmuszewski MJ, Kathmann I, Rijksen G, Schornagel JH: methotrexate transport in variant human CCRF-CEM leukemia cells with elevated levels of the reduced folate carrier. Selective effect on carrier-mediated transport of physiological concentrations of reduced folates. *J Biol Chem* 1990, 265: 18272-18277.
157. Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Clendeninn NJ, Baram J, Koizumi S, Drake JC, Jolivet J: Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest* 1985, 76: 907-912.
158. Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP: Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacol* 2000, 47: 247-257.
159. Toffoli G, Russo A, Innocenti F, Corona G, Tumolo S, Sartor F, Mini E, Boiocchi M: Effect of methylenetetrahydrofolate reductase 677C->T polymorphism on toxicity and homocysteine plasma level after chronic methotrexate treatment of ovarian cancer patients. *Int J Cancer* 2003, 103: 294-299.
160. Aplenc R, Thompson J, Han P, La M, Zhao H, Lange B, Rebbeck T: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and therapy response in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2005, 65: 2482-2487.
161. Krajcinovic M, Lemieux-Blanchard E, Chiasson S, Primeau M, Costea I, Moghrabi A: Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J* 2004, 4: 66-72.
162. Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Heijmans BT, Slagboom PE, Goekoop-Ruiterman YP, Allaart CF, Kerstens PJ, van Zeben D, Breedveld FC, Dijkmans

- BA, Huizinga TW, Guchelaar HJ: Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes. *Arthritis Rheum* 2006, 54: 1087-1095.
163. Hughes LB, Beasley TM, Patel H, Tiwari HK, Morgan SL, Baggott JE, Saag KG, McNicholl J, Moreland LW, Alarcon GS, Bridges SL: Racial or ethnic differences in allele frequencies of singlenucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and their influence on response to methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006, 65: 1213-1218.
164. Imanishi H, Okamura N, Yagi M, Noro Y, Moriya Y, Nakamura T, Hayakawa A, Takeshima Y, Sakaeda T, Matsuo M, Okumura K: Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. *J Hum Genet* 2007, 52: 166-171.
165. Linnebank M, Malessa S, Moskau S, Semmler A, Pels H, Klockgether T, Schlegel U: Acute methotrexate-induced encephalopathy - causal relation to homozygous allelic state for MTR c.2756A>G (D919G)? *J Chemother* 2007, 19: 455-457.
166. Vagace JM, Caceres-Marzal C, Jimenez M, Casado MS, de Murillo SG, Gervasini G: Methotrexate-induced subacute neurotoxicity in a child with acute lymphoblastic leukemia carrying genetic polymorphisms related to folate homeostasis. *Am J Hematol* 2011, 86: 98-101.
167. Poser RG, Sirotnak FM, Chello PL: Differential Synthesis of Methotrexate Polyglutamates in Normal Proliferative and Neoplastic Mouse Tissues *in Vivo*. *Cancer Res* 1981, 41:4441-4446.
168. Takimoto CT: New Antifolates: Pharmacology and Clinical Applications. *The Oncologist* 1996, 1:68-81.

## 9. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

### A disszertációval kapcsolatos közlemények

1. **Komlósi V**, Hitre E, Pap E, Adleff V, Réti A, Székely E, Bíró A, Rudnai P, Schoket B, Müller J, Tóth B, Ottó S, Kásler M, Kralovánszky J, Budai B: SHMT1 1420 and MTHFR 677 variants are associated with rectal but not colon cancer. BMC Cancer. 2010, 10:525. **IF 3,153**

2. Budai B, **Komlósi V**, Adleff V, Pap É, Réti A, Tünde N, Kralovánszky J, Láng I, Hitre E: Impact of *SHMT1* polymorphism on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line FOLFIRI + bevacizumab. Pharmacogenet Genomics, 2011, elfogadva **IF<sub>2010</sub> 3,865**

3. Müller J, Kralovánszky J, Adleff V, Pap E, Németh K, **Komlósi V**, Kovács G: Toxic encephalopathy and delayed MTX clearance after high-dose methotrexate therapy in a child homozygous for the MTHFR C677T polymorphism. Anticancer Res 2008, 28:3051-3054. **IF 1,390**

### Egyéb onkológiai tárgyú közlemények

1. Réti A, Barna G, Pap E, Adleff V, **Komlósi V**, Jeney A, Kralovánszky J, Budai B: Enhancement of 5-fluorouracil efficacy on high COX-2 expressing HCA-7 cells by low dose indomethacin and NS-398 but not on low COX-2 expressing HT-29 cells. Pathol Oncol Res 2009, 15:335-344. **IF 1,152**

2. Kralovánszky J, Adleff V, Hitre E, Pap E, Réti A, **Komlósi V**, Budai B: Farmakogenetikai vizsgálatok a fluoropirimidint tartalmazó adjuváns kezelés hatékonyságának és toxicitásának előrejelzésére colorectalis daganatokban. Magy Onkol 2007, 51:113-125.

## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Prof. Dr. Kásler Miklósnak, hogy lehetővé tette, hogy ösztöndíjas doktori időmet az Országos Onkológiai Intézetben töltssem és a PhD értekezés alapját képező vizsgálatokat elvégezhessem.

Dr. Kralovánszky Juditnak, témavezetőmnek, hálás köszönet, hogy a témaválasztástól kezdve mindvégig mindenben támogatta haladásomat és minden segítséget megadott.

Dr. Budai Barnának kiemelt köszönet az eredmények értékelésében, a statisztikai számítások elvégzésében és a közlemények összeállításában nyújtott igen magas színvonalú szakmai segítségért.

Dr. Hitre Erikának köszönet a klinikai együttműködésért, az értékelt betegek klinikai adatainak követéséért és együtt értékeléséért

Pap Évának köszönet jár az MTX és homocisztein szint mérése, farmakokinetikai számítások és értékelésük elvégzése kapcsán.

Dr. Müller Juditnak köszönet a szakmai együttműködés és a MTX toxicitás farmakogenetikai jellemzése terén.

Dr. Adleff Vilmosnak köszönet a DNS munka, nevezetesen a génpolimorfizmus meghatározások metodikai kérdéseibe való bevezetésért.

Dr. Székely Éva, Dr. Bíró Anna, Dr. Rudnai Péter, Dr. Schoket Benadett és Dr. Tóth Béla a kontroll csoport összeállításához szükséges vér- és DNS mintákat bocsájtották rendelkezésre. Köszönöm mindannyiuknak.

A KKLO valamennyi, eddig nem említett munkatársának, Kútvölgyi Ferencnének, Mousáné Éber Andreának, Makácsné Polényi Csillának és Nagy Attilának, a minták farmakogenetikai és -kinetikai vizsgálatához nyújtott precíz, megbízható technikai segítségét köszönöm.

Hálával tartozom szüleimnek és barátaimnak, hogy a hosszú évek alatt mindig szeretettel vettek körül, hogy idáig sikeresen eljuthassak.

---

<sup>1</sup> Nijhout HF, Reed MC, Budu P, Ulrich CM: A mathematical model of the folate cycle: new insights into folate homeostasis. *J Biol Chem.* 2004, 279: 55008-55016.

<sup>2</sup> Gudnason V, Stansbie D, Scott J, Bowron A, Nicaud V, Humphries S: C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. EARS group. *Atherosclerosis* 1998, 136: 347-354.

<sup>3</sup> Pereira AC, Schettert IT, Morandini AAF, Guerra-Shinohara EM, Krieger JE: Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c677t gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate deficient population. *Clin Chim Acta* 2004, 340: 99-105.

<sup>4</sup> Bailey LB, Duhaney RL, Maneval DR, Kauwell GP, Quinlivan EP, Davis SR, Cuadras A, Hutson AD, Gregory JF: Vitamin B-12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. *J Nutr* 2002, 132: 1872-1878.

<sup>5</sup> Angus SP, Wheeler LJ, Ranmal SA, Zhang X, Markey MP, Mathews CK, Knudsen ES: Retinoblastoma tumor suppressor targets dNTP metabolism to regulate DNA replication. *J Biol Chem* 2002, 277: 44376-44384.

<sup>6</sup> Martomo SA, Mathews CK: Effects of biological DNA precursor pool asymmetry upon accuracy of DNA replication in vitro. *Mutat Res* 2002, 499: 197-211.

<sup>7</sup> Choi SW, Mason JB: Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr* 2000, 130: 129-132.

---

<sup>8</sup> Choi SW, Mason JB: Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J Nutr* 2002 132(8 Suppl):2413S-2418S.

<sup>9</sup> Chu E, Koeller DM, Casey JL, Drake JC, Chabner BA, Elwood PC, Zinn S, Allegra CJ. Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88: 8977-8981.

<sup>10</sup> Ulrich CM, Bigler J, Velicer CM, Greene EA, Farin FM, Potter JD: Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000, 9: 1381-1385.

<sup>11</sup> Sassi S, Cosmi B, Palareti G, Legnani C, Grossi G, Musolesi S, Coccheri S: Influence of age, sex and vitamin status on fasting and post-methionine load plasma homocysteine levels. *Haematologica* 2002, 87: 957-964.

<sup>12</sup> Marchesini G, Manini R, Bianchi G, Sassi S, Natale S, Chierici S, Visani F, Baraldi L, Forlani G, Melchionda N: Homocysteine and psychological traits: a study in obesity. *Nutrition* 2002, 18: 403-407.

<sup>13</sup> Parsons DS, Reaveley DA, Pavitt DV, Brown EA: Relationship of renal function to homocystein and lipoprotein(a) levels: The frequency of the combination of both risk factors in chronic renal impairment. *Am J Kidney Dis* 2002, 40: 916-923.

<sup>14</sup> Valik D, Radina M, Sterba J, Vojtesek B: Homocysteine: exploring its potential as a pharmacodynamic biomarker of antifolate chemotherapy. *Pharmacogenomics* 2004, 5: 1151-1162.



- 
- <sup>15</sup> Wu LL, Wu JT: Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker. *Clin Chim Acta* 2002, 322: 21-28.
- <sup>16</sup> Oikawa S, Murakami K, Kawanishi S: Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implications for carcinogenesis. *Oncogene* 2003, 22: 3530-3538.
- <sup>17</sup> Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW: Colorectal cancer. *Lancet* 2005, 365: 153-165.
- <sup>18</sup> Otto S, Kasler M: Trends in cancer mortality and morbidity in Hungarian and international statistics. Characteristics and potential outcome of public health screening programmes, *Magy Onkol* 2005, 49: 99-101.
- <sup>19</sup> Johns LE, Houlston RS: A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol* 2001, 96: 2992-3003.
- <sup>20</sup> Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willet WC: A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994, 331: 1669-1674.
- <sup>21</sup> Rozen P, Fireman Z, Figer A, Legum C, Ron E, Lynch HT: Family history of colorectal cancer as a marker of potential malignancy within a screening program. *Cancer* 1987, 60: 248-254.
- <sup>22</sup> Hawk ET, Umar A, Viner JL: Colorectal cancer chemoprevention--an overview of the science. *Gastroenterology* 2004, 126: 1423-1447.

- 
- <sup>23</sup> Singh PN, Fraser GE: Dietary risk factors for colon cancer in a low-risk population. *Am J Epidemiol* 1998, 148: 761-774.
- <sup>24</sup> Slattery ML, Potter J, Caan B, Edwards S, Coates A, Ma KN, Berry TD: Energy balance and colon cancer-beyond physical activity. *Cancer Res* 1997, 57: 75-80.
- <sup>25</sup> Potter JD Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91: 916-932.
- <sup>26</sup> Heavey PM, McKenna D, Rowland IR: Colorectal cancer and the relationship between genes and the environment. *Nutr Cancer* 2004, 48: 124-141.
- <sup>27</sup> Gundy S: The role of chemical and physical factors in cancer development. *Magy Onkol* 2006, 50: 5-18.
- <sup>28</sup> Giovannucci E: Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review. *J Nutr* 2002, 132: 2350S-2355S.
- <sup>29</sup> Sharp L, Little J: Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004, 159: 423-443.
- <sup>30</sup> van Guelpen B, Hulthdin J, Johansson I, Hallmans G, Stenling R, Riboli E, Winkvist A, Palmqvist R: Low folate levels may protect against colorectal cancer. *Gut* 2006, 55: 1461-1466.
- <sup>31</sup> Ulvik A, Vollset SE, Hansen S, Gislefoss R, Jellum E, Ueland PM: Colorectal cancer and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C- > T and methionine synthase

---

2756A- > G polymorphisms: a study of 2,168 case-control pairs from the JANUS cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004, 13: 2175-2180.

<sup>32</sup> Chen K, Jiang QT, He HQ: Relationship between metabolic enzyme polymorphisms and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005, 11: 331-335.

<sup>33</sup> Hubner RA, Houlston RS: MTHFR C677T and colorectal cancer risk: a meta-analysis of 25 populations. *Int J Cancer* 2006, 120: 1027-1035.

<sup>34</sup> Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, Shane B, Roberts AC, Law GR, Rollinson S, Roman E, Cartwright RA, Morgan GJ: Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* 2002, 99: 3786-3791.

<sup>35</sup> Hishida A, Matsuo K, Hamajima N, Ito H, Ogura M, Kagami Y, Taji H, Morishima Y, Emi N, Tajima K: Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma. *Haematologica* 2003, 88: 159-166.

<sup>36</sup> van den Donk M, Visker MH, Harryvan JL, Kok FJ, Kampman E: Dietary intake of B-vitamins, polymorphisms in thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase 1, and colorectal adenoma risk: a Dutch case-control study. *Cancer Lett* 2007, 250: 146-153.

<sup>37</sup> Chen J, Kyte C, Valcin M, Chan W, Wetmur JG, Selhub J, Hunter DJ, Ma J: Polymorphisms in the one-carbon metabolic pathway, plasma folate levels and colorectal cancer in a prospective study. *Int J Cancer* 2004, 110: 617-620.

- 
- <sup>38</sup> Guerreiro CS, Cravo M, Costa AR, Miranda A, Tavares L, Moura-Santos P, MarquesVidal P, Nobre Leitão C: Risk of colorectal cancer associated with the C677T polymorphism in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase in Portuguese patients depends on the intake of methyl-donor nutrients. *Am J Clin Nutr* 2008, 88: 1413-1418.
- <sup>39</sup> Steck SE, Keku T, Butler LM, Galanko J, Massa B, Millikan RC, Sandler RS: Polymorphisms in methionine synthase, methionine synthase reductase and serine hydroxymethyltransferase, folate and alcohol intake, and colon cancer risk. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2008, 1: 196-204.
- <sup>40</sup> Kapiteijn E, Liefers GJ, Los LC, Kranenbarg EK, Hermans J, Tollenaar RA, Moriya Y, van de Velde CJ, van Krieken JH: Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer. *J Pathol* 2001, 195: 171-178.
- <sup>41</sup> Howard RA, Freedman DM, Park Y, Hollenbeck A, Schatzkin A, Leitzmann MF: Physical activity, sedentary behavior, and the risk of colon and rectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Cancer Causes Controls* 2008, 19: 939-953.
- <sup>42</sup> Frattini M, Balestra D, Suardi S, Oggionni M, Alberici P, Radice P, Costa A, Daidone MG, Leo E, Pilotti S, Bertario L, Pierotti MA: Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004, 10: 4015-4021.
- <sup>43</sup> Adams KF, Leitzmann MF, Albanes D, Kipnis V, Mouw T, Hollenbeck A, Schatzkin A: Body mass and colorectal cancer risk in the NIH-AARP Cohort. *Am J Epidemiol* 2007, 166: 36-45.

- 
- <sup>44</sup> Le Marchand L, Wilkens LR, Kolonel LN, Henderson BE: The MTHFR C677T polymorphism and colorectal cancer: the multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, 14: 1198-1203.
- <sup>45</sup> Kim DH, Ahn YO, Lee BH, Tsuji E, Kiyohara C, Kono S: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, alcohol intake, and risks of colon and rectal cancers in Korea. *Cancer Lett* 2004, 216: 199-205.
- <sup>46</sup> Cao HX, Gao CM, Takezaki T, Wu JZ, Ding JH, Liu YT, Li SP, Su P, Cao J, Hamajima N, Tajima K: Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and susceptibility to colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2008, 9: 203-208.
- <sup>47</sup> Wolmark N, Fisher B, Rockette H, Redmond C, Wickerham DL, Fisher ER, Jones J, Glass A, Lerner H, Lawrence W: Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer: results from NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst* 1988, 80: 30-36.
- <sup>48</sup> Kralovánszky J, Katona Cs: Nukleotid bioszintézis gátlók. In: *Onkofarmakológia*, Szerk: Jeney A, Kralovánszky J. Medicina, Budapest, 2005.
- <sup>49</sup> Jeney A: Topoizomeráz gátlók. In: *Onkofarmakológia*, Szerk: Jeney A, Kralovánszky J. Medicina, Budapest, 2005.
- <sup>50</sup> Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E: Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther* 2002, 1: 227-235.

---

<sup>51</sup> Rothenberg ML, Oza AM, Bigelow RH, Berlin JD, Marshall JL, Ramanathan RK, Hart LL, Gupta S, Garay CA, Burger BG, Le Bail N, Haller DG: Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial. *J Clin Oncol* 2003, 21: 2059-2069.

<sup>52</sup> Grothey A: Oxaliplatin-safety profile: neurotoxicity. *Semin Oncol* 2003, 30(Suppl.15): 5-13.

<sup>53</sup> Fuchs CS, Marshall J, Mitchell E, Wierzbicki R, Ganju V, Jeffery M, Schulz J, Richards D, Soufi-Mahjoubi R, Wang B, Barrueco J. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study. *J Clin Oncol* 2007, 25: 4779-4786.

<sup>54</sup> Fuchs CS, Marshall J, Barrueco J. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: updated results from the BICC-C study. *J Clin Oncol* 2008, 26: 689-690.

<sup>55</sup> Van Cutsem E, Rivera F, Berry S, Kretzschmar A, Michael M, DiBartolomeo M, Mazier MA, Canon JL, Georgoulas V, Peeters M, Bridgewater J, Cunningham D; First BEAT investigators. Safety and efficacy of first-line bevacizumab with FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and fluoropyrimidines in metastatic colorectal cancer: the BEAT study. *Ann Oncol* 2009, 20: 1842-1847.

---

<sup>56</sup> Sobrero A, Ackland S, Clarke S, Perez-Carrión R, Chiara S, Gapski J, Mainwaring P, Langer B, Young S; AVIRI Trial investigators. Phase IV study of bevacizumab in combination with infusional fluorouracil, leucovorin and irinotecan (FOLFIRI) in first-line metastatic colorectal cancer. *Oncology* 2009, 77: 113-119.

<sup>57</sup> Hecht JR, Mitchell E, Chidiac T, Scroggin C, Hagenstad C, Spigel D, Marshall J, Cohn A, McCollum D, Stella P, Deeter R, Shahin S, Amado RG. A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009, 27: 672-680.

<sup>58</sup> Kopetz S, Hoff PM, Morris JS, Wolff RA, Eng C, Glover KY, Adinin R, Overman MJ, Valero V, Wen S, Lieu C, Yan S, Tran HT, Ellis LM, Abbruzzese JL, Heymach JV. Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *J Clin Oncol* 2010, 28: 453-459.

<sup>59</sup> Funke S, Brenner H, Chang-Claude J. Pharmacogenetics in colorectal cancer: a systematic review. *Pharmacogenomics* 2008, 9: 1079-1099.

<sup>60</sup> Lakatos L, Lakatos PL: A colorectalis daganatok korszerű kezelése. *LAM* 2005, 15: 177-786.

<sup>61</sup> Blázovics A: Vectibix előrehaladott colorectalis carcinoma kezelésére. *Orv Hetil* 2009, 37: 1758–1759.

---

<sup>62</sup> Fernandez FG, Drebin JA, Linehan DC, Dehdashti F, Siegel BA, Strasberg SM: Five-year survival after resection of hepatic metastases from colorectal cancer in patients screened by positron emission tomography with F-18 fluorodeoxyglucose (FDG-PET). *Ann Surg* 2004, 240: 438-447.

<sup>63</sup> Adam R, Lucidi V, Bismuth H: Hepatic colorectal metastases: methods of improving resectability. *Surg Clin North Am* 2004, 84: 659-671.

<sup>64</sup> Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, de Gramont A: FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004, 22: 229-237.

<sup>65</sup> Meyerhardt JA, Mayer RJ: Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005, 352: 476-487.

<sup>66</sup> Inoue Y, Miki C, Watanabe H, Hiro J, Toiyama Y, Ojima E, Nakatani K, Nobori T, Kusunoki M. Irinotecan cytotoxicity does not necessarily depend on the UGT1A1 polymorphism but on fluoropyrimidine: a molecular case report. *Oncol Rep* 2006, 16: 971-974.

<sup>67</sup> Takizawa M, Kawakami K, Obata T, Matsumoto I, Ohta Y, Oda M, Sasaki T, Watanabe G. In vitro sensitivity to platinum-derived drugs is associated with expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in human lung cancer. *Oncol Rep* 2006, 15: 1533-1539.



---

<sup>68</sup> Etienne-Grimaldi MC, Milano G, Maindrault-Goebel F, Chibaudel B, Formento JL, Francoual M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and FOLFOX response in colorectal cancer patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2010, 69: 58-66.

<sup>69</sup> Jubb AM, Hurwitz HI, Bai W, Holmgren EB, Tobin P, Guerrero S, Kabbinavar F, Holden SN, Novotny WF, Frantz GD, Hillan KJ, Koeppen H. Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2006, 24: 217-227.

<sup>70</sup> Atta HM, El-Rehani MA, Raheim SA, Galal AMF. Lowering homocysteine decreases levels and expression of VEGF(165) and endostatin. *J Surg Res* 2008, 146: 202-210.

<sup>71</sup> Lee I, Lee H, Kim JM, Chae EH, Kim SJ, Chang N. Short-term hyperhomocysteinemia-induced oxidative stress activates retinal glial cells and increases vascular endothelial growth factor expression in rat retina. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007, 71: 1203-1210.

<sup>72</sup> Rouits E, Charasson V, Pétain A, Boisdron-Celle M, Delord J-P, Fonck M, Laurand A, Poirier AL, Morel A, Chatelut E, Robert J, Gamelin E. Pharmacokinetic and pharmacogenetic determinants of the activity and toxicity of irinotecan in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2008, 99: 1239-1245.

<sup>73</sup> Ayerden Ebinç F, Haksun E, Ulver DB, Kotz E, Erten Y, Altok KR, Bali M, Turgay A, Sindel S. The relationship between vascular endothelial growth factor (VEGF) and

---

microalbuminuria in patients with essential hypertension. *Intern Med* 2008; 47: 1511-1516.

<sup>74</sup> Scartozzi M, Galizia E, Chiorrini S, Giampieri R, Berardi R, Pierantoni C, Cascinu S: Arterial hypertension correlates with clinical outcome in colorectal cancer patients treated with first-line bevacizumab. *Ann Oncol* 2009, 20: 227-230.

<sup>75</sup> Longo R, Gasparini G. Challenges for patient selection with VEGF inhibitors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007, 60: 151-170.

<sup>76</sup> Schneider BP, Radovich M, Miller KD. The role of vascular endothelial growth factor genetic variability in cancer. *Clin Cancer Res* 2009, 15: 5297-5302.

<sup>77</sup> Varey AH, Rennel ES, Qiu Y, Bevan KS, Perrin RM, Raffy S, Dixon AR, Paraskeva C, Zaccaro O, Hassan AB, Harper SJ, Bates DO. VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer* 2008, 98: 1366-1379.

<sup>78</sup> Szendrői M: A csontdaganatok kezelésének újabb lehetőségei. Doktori értekezés. Semmelweis Egyetem, Budapest, 1992.

<sup>79</sup> Dorfman H, Czerniak B: Bone cancers. *Cancer* 1995, 75: 203-210.

<sup>80</sup> Miller R, Yound J, Novakovic B: Childhood cancer. *Cancer* 1995, 75: 395-405.

<sup>81</sup> Huvos A: Bone Tumors: Diagnosis, Treatment and Prognosis. Eds: WB Saunders, Philadelphia, 1991.

---

<sup>82</sup> Unni K: Dahlin's bone tumors - General aspects and data on 11087 cases. Eds: Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996.

<sup>83</sup> Dahlin DC, Coventry MB: Osteosarcoma: a study of six hundred cases. *J Bone Joint Surg* 1967, 49: 101-110.

<sup>84</sup> Provisor A, Ettinger L, Nachaman J, Krailo M, Makley J, Yunis E, Huvos A, Betcher D, Baum E, Kisker C, Miser J: Treatment of nonmetastatic osteosarcoma of the extremity with preoperative and postoperative chemotherapy: a report from the children's cancer group. *J Clin Oncol* 1997, 15: 76-84.

<sup>85</sup> Bacci G, Picci P, Ruggieri P, Mercuri M, Avella M, Capanna R, Brach DP, Mancini A, Gherlinzoni F, Padovani G: Primary chemotherapy and delayed surgery (neoadjuvant chemotherapy) for osteosarcoma of the extremities. The Instituto Rizzoli Experience in 127 patients treated preoperatively with intravenous methotrexate (high versus moderate doses) and intraarterial cisplatin. *Cancer* 1990, 54: 2539-2553.

<sup>86</sup> Mintz B, Sowers R, Brown M, Hilmer C, Mazza E, Huvos G, Meyers A, LaFleur B, McDonough S, Henry M, Ramsey E, Antonescu R, Chen W, Healey H, Daluski A, Berens E, MacDonald J, Gorlick R, Stephan A: An expression signature classifies chemotherapy-resistant pediatric osteosarcoma. *Cancer Res* 2005, 65: 1748-1754.

<sup>87</sup> Aparacio J, Segura A, Montalar J: Long-term results after combined modality treatment for non-metastatic osteosarcoma. *Med Oncol* 1999, 16: 255-260.

- 
- <sup>88</sup> Saeter G, Hoie J, Stenwig AE, Johansson AK, Hannisdal E, Solheim OP: Systemic relapse of patients with osteogenic sarcoma. Prognostic factors for long term survival. *Cancer* 1995, 75: 1084-1093.
- <sup>89</sup> Kashima T, Nakamura T, Kawaguchi J, Takanashi M, Ishida T, Aburatani H, Kudo A, Fukayama M, Grigoriadis A: Overexpression of cadherins suppresses pulmonary metastasis of osteosarcoma in vivo. *Int J Cancer* 2003, 104: 147-154.
- <sup>90</sup> Saeter G: ESMO minimum clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of osteosarcoma. *Ann Oncol* 2003, 14: 1165-1166.
- <sup>91</sup> Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Longhi A, Bacchini P, Giacomini S, Forni C: A comment and update on "Does the histological subtype of high-grade central osteosarcoma influence the response to treatment with chemotherapy and does it affect overall survival? A study on 570 patients of two consecutive trials of the European Osteosarcoma Intergroup". *Eur J Cancer* 2003, 39: 548-549.
- <sup>92</sup> Winkler K, Beron G, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Beck J, Beck W, Brandeis W, Ebell W, Erttmann R and Gobel U: Neoadjuvant chemotherapy for osteogenic sarcoma: results of a Cooperative German/Austrian study. *J Clin Oncol* 1984, 2: 617-624.
- <sup>93</sup> Wolfrom C, Hepp R, Hartmann R, Breithaupt H and Henze G: Pharmacokinetic study of methotrexate, folinic acid and their serum metabolites in children treated with high-dose methotrexate and leucovorin rescue. *Eur J Clin Pharmacol* 1990, 39: 377-383.
- <sup>94</sup> McKendry RJ: The remarkable spectrum of methotrexate toxicities. *Rheum Dis Clin North Am* 1997, 23: 939-954.

---

<sup>95</sup> Vezmar S, Becker A, Bode U and Jaehde U: Biochemical and clinical aspects of methotrexate neurotoxicity. *Chemotherapy* 2003, 49: 92-104.

<sup>96</sup> Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA and van den Heuvel LP and Rozen R: A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995, 10: 111-113.

<sup>97</sup> Quinn CT and Kamen BA: A biochemical perspective of methotrexate neurotoxicity with insight on nonfolate rescue modalities. *J Investig Med* 1996 44: 522-530.

<sup>98</sup> Chiusolo P, Reddiconto G, Casorelli I, Laurenti L, Sora F, Mele L, Annino L, Leone G and Sica S: Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate. *Ann Oncol* 2002, 13: 1915-1918.

<sup>99</sup> Strunk T, Gottschalk S, Goepel W, Bucsky P and Schultz C: Subacute leukoencephalopathy after low-dose intrathecal methotrexate in an adolescent heterozygous for the *MTHFR* C677T polymorphism. *Med Pediatr Oncol* 2003, 40: 48-50.

<sup>100</sup> Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner JL, Bigler J, Ariail KS, Keener CL, Li S, Liu H, Farin FM and Potter JD: Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood* 2001, 98: 231-234.

---

<sup>101</sup> van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, Huizinga TW, Haagsma CJ, Giesendorf BA, de Boo TM and van de Putte LB: The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2001, 44: 2525-2530.

<sup>102</sup> Gemmati D, Ongaro A, Tognazzo S, Catozzi L, Federici F, Mauro E, Della Porta M, Campioni D, Bardi A, Gilli G, Pellati A, Caruso A, Scapoli GL and De Mattei M: Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene variants in adult non-Hodgkin's lymphoma patients: association with toxicity and survival. *Haematologica* 2007, 92: 478-485.

<sup>103</sup> Weisman MH, Furst DE, Park GS, Kremer JM, Smith KM, Wallace DJ, Caldwell JR and Dervieux T: Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side-effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006, 54: 607-612.

<sup>104</sup> Robien K, Schubert MM, Bruemmer B, Lloid ME, Potter JD and Ulrich CM: Predictors of oral mucositis in patients receiving hematopoietic cell transplants for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 2004, 22: 1268-1275.

<sup>105</sup> Liu JX, Chen JP, Tan W, Lin DX: Association between mthfr gene polymorphisms and toxicity of HDMTX chemotherapy in acute lymphocytic leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2008, 16: 488-492.

- 
- <sup>106</sup> Karathanasis NV, Stiakaki E, Goulielmos GN, Kalmanti M: The role of the methylenetetrahydrofolate reductase 677 and 1298 polymorphisms in Cretan children with acute lymphoblastic leukemia. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011,15: 5-10.
- <sup>107</sup> Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J: New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009, 45: 228-247.
- <sup>108</sup> Hitre E, Budai B, Adleff V, Czeglédi F, Horváth Zs, Gyergyay F, Lövey J, Kovács T, Orosz Z, Láng I, Kásler M, Kralovánszky J: Influence of thymidylate synthase gene polymorphisms on the survival of colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Pharmacogenet Genomics* 2005, 15: 723-730.
- <sup>109</sup> The Clinician's Ultimate Reference, GlobalRPh.com, Multiple Creatinine Clearance Methods. [www.globalrph.com/multiple\\_crcl.htm](http://www.globalrph.com/multiple_crcl.htm)
- <sup>110</sup> Réti A, Barna G, Pap E, Adleff V, Komlósi VL, Jeney A, Kralovánszky J, Budai B: Enhancement of 5-fluorouracil efficacy on high COX-2 expressing HCA-7 cells by low dose indomethacin and NS-398 but not on low COX-2 expressing HT-29 cells. *Pathol Oncol Res* 2009, 15: 335-344.
- <sup>111</sup> Katona C, Rosta A, Tóth K, Fónyad G, Jeney A, Pandi E, Kralovánszky J: Determination of dihydropyrimidine dehydrogenase in the prediction of toxic side effects of 5-fluorouracil. *Orv Hetil* 1997, 138: 1843-1847.

---

<sup>112</sup> Lee WC, Wang LY: Simple formulas for gauging the potential impacts of population stratification bias. *Am J Epidemiol* 2007, 167: 86-89.

<sup>113</sup> Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>] *dbSNP accession: {rs1979277 and rs1801133}*, (*dbSNP Build ID: 129*).

<sup>114</sup> Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM: *GLOBOCAN 2002: Cancer incidences, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancer Base No. 5 version 2.0*. Lyon, France: IARC Press; 2004.

<sup>115</sup> Exact  $r \times c$  Contingency Table: How many rows? columns? [www.physics.csbsju.edu/stats/exact\\_NROW\\_NCOLUMN\\_form.html](http://www.physics.csbsju.edu/stats/exact_NROW_NCOLUMN_form.html)

<sup>116</sup> Eselgrim M, Grunert H, Kuhne T, Zoubek A, Kevric M, Burger H, Jurgens H, Mayer-Steinacker R, Gosheger G and Bielack SS: Dose intensity of chemotherapy for osteosarcoma and outcome in the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS) trials. *Pediatr Blood Cancer* 2006, 47: 42-50.

<sup>117</sup> Wang Y, Guo W, He Y, Chen Z, Wen D, Zhang X, Wang N, Li Y, Ge H, Zhang J: Association of MTHFR C677T and SHMT(1) C1420T with susceptibility to ESCC and GCA in a high incident region of Northern China. *Cancer Causes Control* 2007, 18: 143-152.

<sup>118</sup> Taioli E, Garza MA, Ahn YO, Bishop DT, Bost J, Budai B, Chen K, Gemignani F, Keku T, Lima CSP, Le Marchand L, Matsuo K, Moreno V, Plaschke J, Pufulete M,



---

Thomas SB, Toffoli G, Wolf CR, Moore CG, Little J: Meta- and pooled analyses of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and colorectal cancer: a HuGE-GSEC review. *Am J Epidemiol* 2009, 170: 1207-1221.

<sup>119</sup> Huang Y, Han S, Li Y, Mao Y, Xie Y: Different roles of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in colorectal adenoma and colorectal cancer: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2007, 52: 73-85.

<sup>120</sup> Zajkás G, Bíró L, Greiner E, Szórád I, Ágoston H, Balázs A, Vitrai J, Hermann D, Boros J, Németh R, Kéki Z, Martos É: Dietary survey in Hungary, 2003-2004. Micronutrients: vitamins. *Orv Hetil* 2007, 148: 1593-1600.

<sup>121</sup> Iacopetta B, Heyworth J, Girschik J, Grieu F, Clayforth C, Fritschi L: The MTHFR C677T and DNMT3B C-149T polymorphism confer different risks for right- and left-sided colorectal cancer. *Int J Cancer* 2009, 125: 84-90.

<sup>122</sup> Liang W: Age sex and the risk of grade-specific second primary colorectal cancer: Evidence for the protective effect of female hormone. *Eur J Cancer* 2007, 43: 1856-1861.

<sup>123</sup> Mrkonjic M, Raptis S, Green RC, Monga N, Daftary D, Dicks E, Younghusband HB, Parfrey PS, Gallinger SS, McLaughlin JR, Knight JA, Bapat B: MSH2 118T>C and MSH6 159C>T promoter polymorphisms and the risk of colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2007, 28: 2575-2580.

---

<sup>124</sup> Talseth BA, Ashton KA, Meldrum C, Suchy J, Kurzawski G, Lubinski J, Scott RJ: Aurora-A and Cyclin D1 polymorphisms and the age of onset of colorectal cancer in hereditary nonpoliposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 2007, 122: 1273-1277.

<sup>125</sup> Slattery ML, Sweeney C, Murtaugh M, Ma KN, Potter JD, Levin TR, Samowitz W, Wolff R: Associations between apoE genotype and colon and rectal cancer. *Carcinogenesis* 2005, 26: 1422-1429.

<sup>126</sup> Jacobs ET, Ahnen DJ, Ashbeck EL, Baron JA, Greenberg ER, Lance P, Lieberman DA, McKeown-Eyssen G, Schatzkin A, Thompson PA, Martínez ME: Association between body mass index and colorectal neoplasia at follow-up colonoscopy: a pooling study. *Am J Epidemiol* 2009, 169: 657-666.

<sup>127</sup> Geisel J, Hübner U, Bodis M, Schorr H, Knapp JP, Obeid R, Herrmann W: The role of genetic factors in the development of hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med* 2003, 41: 1427-1434.

<sup>128</sup> Semmler A, Moskau S, Stoffel-Wagner B, Weller M, Linnebank M: The effect of MTHFR c.677C > T on plasma homocysteine levels depends on health, age and smoking. *Clin Invest Med* 2009, 32: E310-E314.

<sup>129</sup> Schroecksnadel K, Frick B, Fiegl M, Winkler C, Denz HA, Fuchs D: Hyperhomocysteinaemia and immune activation in patients with cancer. *Clin Chem Lab Med* 2007, 45: 47-53.

- 
- <sup>130</sup> Ferroni P, Palmirotta R, Martini F, Riondino S, Savonarola A, Spila A, Ciatti F, Sini V, Mariotti S, Del Monte G, Roselli M, Guadagni F: Determinants of homocysteine levels in colorectal and breast cancer patients. *Anticancer Res* 2009, 29: 4131-4138.
- <sup>131</sup> Almadori G, Bussu F, Galli J, Cadoni G, Zappacosta B, Persichilli S, Minucci A, Giardina B: Serum folate and homocysteine levels in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2002, 94: 1006-1011.
- <sup>132</sup> Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM: Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res* 1991, 51: 828-835.
- <sup>133</sup> Ozkan Y, Yardim-Akaydin S, Firat H, Calışkan-Can E, Ardiç S, Simşek B: Usefulness of homocysteine as a cancer marker: total thiol compounds and folate levels in untreated lung cancer patients. *Anticancer Res* 2007, 27: 1185-1189.
- <sup>134</sup> Battistelli S, Vittoria A, Stefanoni M, Bing C, Roviello F: Total plasma homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in patients with colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006, 12: 6128-6132.
- <sup>135</sup> Eleftheriadou A, Chalastras T, Ferekidou E, Yiotakis I, Kyriou L, Tzagarakis M, Ferekidis E, Kandiloros D: Association between squamous cell carcinoma of the head and neck and serum folate and homocysteine. *Anticancer Res* 2006, 26: 2345-2348.
- <sup>136</sup> Zacho J, Yazdanyar S, Bojesen SE, Tybjærg-Hansen A, Nordestgaard BG: Hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase c.677C>T polymorphism,

---

and risk of cancer: cross-sectional and prospective studies and meta-analyses of 75,000 cases and 93,000 controls. *Int J Cancer* 2010, 128: 644-652.

<sup>137</sup> Gatt A, Makris A, Cladd H, Burcombe RJ, Smith JM, Cooper P, Thompson D, Makris M: Hyperhomocysteinemia in women with advanced breast cancer. *Int J Lab Hematol* 2007, 29: 421-425.

<sup>138</sup> Ruud E, Holmstrøm H, Brosstad F, Wesenberg F: Diagnostic value of family histories of thrombosis to identify children with thrombophilia. *Pediatr Hematol Oncol* 2005, 22: 453-462.

<sup>139</sup> Melichar B, Kalábová H, Krcmová L, Kasparová M, Malířová E, Melicharová K, Pecka M, Hyspler R, Solichová D: Serum homocysteine, cholesterol, retinol, alpha-tocopherol, glycosylated hemoglobin and inflammatory response during therapy with bevacizumab, oxaliplatin, 5-fluorouracil and leucovorin. *Anticancer Res* 2009, 29: 4813-4820.

<sup>140</sup> Anderson DD, Stover PJ: SHMT1 and SHMT2 are functionally redundant in nuclear *de novo* thymidylate biosynthesis. *PLoS ONE* 2009, 4: e5839.

<sup>141</sup> Lomnytska M, Dubrovska A, Hellman U, Volodko N, Souchelnytskyi S: Increased expression of cSHMT, Tbx3 and utrophin in plasma of ovarian and breast cancer patients. *Int J Cancer* 2006, 118: 412-421.

<sup>142</sup> de Jonge R, Hooijberg JH, van Zelst BD, Jansen G, van Zantwijk CH, Kaspers GJL, Peters GJ, Ravindranath Y, Pieters R, Lindemans J: Effect of polymorphisms in folate-

---

related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005, 106: 717-720.

<sup>143</sup> Dervieux T, Greenstein N, Kremer J: Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006, 54: 3095-3103.

<sup>144</sup> Stamp LK, Chapman PT, O'Donnell JL, Zhang M, James J, Frampton C, Barclay ML, Kennedy MA, Roberts RL: Polymorphisms within the folate pathway predict folate concentrations but are not associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Pharmacogenet Genomics* 2010, 20: 367-376.

<sup>145</sup> Dervieux T, Wessels JA, van der Straaten T, Penrod N, Moore JH, Guchelaar HJ, Kremer JM: Gene-gene interactions in folate and adenosine biosynthesis pathways affect methotrexate efficacy and tolerability in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenet Genomics* 2009, 19: 935-944.

<sup>146</sup> Hitre E, Budai B, Adleff V, Komlósi V, Czeglédi F, Pap É, Rubovszky G, Horváth Z, Kralovánszky J, Láng I: Comparison of first-line deGramont, FOLFIRI and bevacizumab+FOLFIRI treatments in case of different genotypes of metastatic colorectal cancer patients. *Magy Onkol* 2009, 53(Suppl): 47.

<sup>147</sup> Formica V, Palmirotta R, Del Monte G, Savonarola A, Ludovici G, De Marchis ML, et al. Predictive value of VEGF gene polymorphisms for metastatic colorectal cancer patients receiving first-line treatment including fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab. *Int J Colorectal Dis.* 2011, 26: 143-151.

- 
- <sup>148</sup> Loupakis F, Ruzzo A, Salvatore L, Cremolini C, Masi G, Frumento P, Schirripa M, Catalano V, Galluccio N, Canestrari E, Vincenzi B, Santini D, Bencardino K, Ricci V, Manzoni M, Danova M, Tonini G, Magnani M, Falcone A, Graziano F: Retrospective exploratory analysis of *VEGF* polymorphisms in the prediction of benefit from first-line FOLFIRI plus bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 2011, 11:247-251.
- <sup>149</sup> Hoskins JM, Goldberg RM, Qu P, Ibrahim JG, McLeod HL. UGT1A1\*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters. *J Natl Cancer Inst* 2007, 99:1290-1295.
- <sup>150</sup> Palomaki GE, Bradley LA, Douglas MP, Kolor K, Dotson WD. Can UGT1A1 genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? An evidence-based review. *Genet Med* 2009, 11:21-34.
- <sup>151</sup> Martinez-Balibrea E, Abad A, Martínez-Cardús A, Ginés A, Valladares M, Navarro M, Aranda E, Marcuello E, Benavides M, Massutí B, Carrato A, Layos L, Manzano JL, Moreno V: UGT1A and TYMS genetic variants predict toxicity and response of colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan and fluorouracil combination therapy. *Br J Cancer* 2010, 103:581-589.
- <sup>152</sup> Castro R, Rivera I, Ravasco P, Jakobs C, Blom HJ, Camilo ME, de Almeida IT: 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase 677C->T and 1298A->C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine. *Q J Med* 2003, 96: 297-303.
- <sup>153</sup> Goldman ID, Matherly LH: Biochemical factors in the selectivity of leucovorin rescue: selective inhibition of leucovorin reactivation of dihydrofolate reductase and

---

leucovorin utilization in purine and pyrimidine biosynthesis by methotrexate and dihydrofolate polyglutamates. NCI Monogr 1987, 5: 17-26.

<sup>154</sup> Spinella MJ, Brigle KE, Sierra EE, Goldman ID: Distinguishing between folate receptor-alpha-mediated transport and reduced folate carrier-mediated transport in L1210 leukemia cells. J Biol Chem 1995, 270: 7842-7849.

<sup>155</sup> Kane MA, Elwood PC, Portillo RM, Antony AC, Najfeld V, Finley A, Waxman S, Kolhouse JF: Influence on immunoreactive folate-binding proteins of extracellular folate concentration in cultured human cells. J Clin Invest 1988, 81: 1398-1406.

<sup>156</sup> Jansen G, Westerhof GR, Jarmuszewski MJ, Kathmann I, Rijksen G, Schornagel JH: methotrexate transport in variant human CCRF-CEM leukemia cells with elevated levels of the reduced folate carrier. Selective effect on carrier-mediated transport of physiological concentrations of reduced folates. J Biol Chem 1990, 265: 18272-18277.

<sup>157</sup> Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Clendeninn NJ, Baram J, Koizumi S, Drake JC, Jolivet J: Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? J Clin Invest 1985, 76: 907-912.

<sup>158</sup> Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP: Mechanisms of action of methotrexate. Immunopharmacol 2000, 47: 247-257.

<sup>159</sup> Toffoli G, Russo A, Innocenti F, Corona G, Tumolo S, Sartor F, Mini E, Boiocchi M: Effect of methylenetetrahydrofolate reductase 677C->T polymorphism on toxicity and homocysteine plasma level after chronic methotrexate treatment of ovarian cancer patients. Int J Cancer 2003, 103: 294-299.

- 
- <sup>160</sup> Aplenc R, Thompson J, Han P, La M, Zhao H, Lange B, Rebbeck T: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and therapy response in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2005, 65: 2482-2487.
- <sup>161</sup> Krajcinovic M, Lemieux-Blanchard E, Chiasson S, Primeau M, Costea I, Moghrabi A: Role of polymorphisms in *MTHFR* and *MTHFD1* genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J* 2004, 4: 66-72.
- <sup>162</sup> Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Heijmans BT, Slagboom PE, Goekoop-Ruiterman YP, Allaart CF, Kerstens PJ, van Zeben D, Breedveld FC, Dijkmans BA, Huizinga TW, Guchelaar HJ: Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes. *Arthritis Rheum* 2006, 54: 1087-1095.
- <sup>163</sup> Hughes LB, Beasley TM, Patel H, Tiwari HK, Morgan SL, Baggott JE, Saag KG, McNicholl J, Moreland LW, Alarcon GS, Bridges SL: Racial or ethnic differences in allele frequencies of singlenucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and their influence on response to methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006, 65: 1213-1218.
- <sup>164</sup> Imanishi H, Okamura N, Yagi M, Noro Y, Moriya Y, Nakamura T, Hayakawa A, Takeshima Y, Sakaeda T, Matsuo M, Okumura K: Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. *J Hum Genet* 2007, 52: 166-171.



---

<sup>165</sup> Linnebank M, Malessa S, Moskau S, Semmler A, Pels H, Klockgether T, Schlegel U: Acute methotrexate-induced encephalopathy - causal relation to homozygous allelic state for MTR c.2756A>G (D919G)? J Chemother 2007, 19: 455-457.

<sup>166</sup> Vagace JM, Caceres-Marzal C, Jimenez M, Casado MS, de Murillo SG, Gervasini G: Methotrexate-induced subacute neurotoxicity in a child with acute lymphoblastic leukemia carrying genetic polymorphisms related to folate homeostasis. Am J Hematol 2011, 86: 98-101.

<sup>167</sup> Poser RG, Sirotiak FM, Chello PL: Differential Synthesis of Methotrexate Polyglutamates in Normal Proliferative and Neoplastic Mouse Tissues *in Vivo*. Cancer Res 1981, 41:4441-4446.

<sup>168</sup> Takimoto CT: New Antifolates: Pharmacology and Clinical Applications. The Oncologist 1996, 1:68-81.