

Farmakogenetski označevalci v terapiji akutne limfoblastne levkemije pri otrocih

Pharmacogenetic markers in the therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia

Alenka Šmid,¹ Janez Jazbec,² Irena Mlinarič Raščan¹

¹ Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

² Klinični oddelek za hematologijo in onkologijo, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Korespondenca/ Correspondence:

Irena Mlinarič Raščan,
e: Irena.Mlinaric@ffa.uni-lj.si

Ključne besede:

posamezniku prilagojeno zdravljenje; farmakogenetika; akutna limfoblastna levkemija; tiopurin-S-metiltransferaza; tiopurini

Key words:

personalised medicine; pharmacogenetics; acute lymphoblastic leukaemia; thiopurine-S-methyltransferase; thiopurines

Prispelo: 2. 7. 2018

Sprejeto: 5. 4. 2019

Izvleček

Posamezniku prilagojeno zdravljenje predstavlja sodoben koncept v medicinski praksi, ki temelji na spoznanju, da se posamezniki različno odzivajo na določeno terapijo. Osrednji element prilagojenega zdravljenja predstavljajo biološki označevalci, med katere uvrščamo tudi genetske. Med najuspešnejše primere uvajanja farmakogenetskih označevalcev v klinično prakso z namenom prilagajati odmerjanje zdravil posamezniku sodi zdravljenje akutne limfoblastne levkemije (ALL). Ta predstavlja približno 80 % vseh oblik levkemije, ki se pojavijo pri otrocih, mlajših od 15 let, kar jo uvršča na prvo mesto po pogostosti raka v otroštvu. V zadnjih desetletjih smo bili priča izjemnemu napredku na področju zdravljenja ALL, kljub temu pa je le-to še vedno neuspešno pri nekaterih bolnikih bodisi zaradi toksičnih stranskih učinkov, bodisi zaradi neučinkovitosti uporabljenih zdravil, kar vodi v ponovitev bolezni. Dodaten problem predstavljajo še dolgoročni toksični učinki kemoterapije, ki se lahko pojavijo tudi več let po zaključenem zdravljenju. Prav iz teh razlogov se je v zadnjih letih veliko študij posvetilo odkrivanju bioloških označevalcev, na podlagi katerih bi lahko zdravljenje prilagodili posamezniku in s tem izboljšali njegovo učinkovitost in varnost.

Najbolje proučeni so genetski dejavniki, povezani s toksičnostjo 6-merkaptopurina (6-MP), ki predstavlja temelj vzdrževalnega zdravljenja ALL. Encim tiopurin-S-metiltransferaza (TPMT) igra poglobitveno vlogo pri deaktiviranju tiopurinov in v veliki meri vpliva na razlike v odzivu posameznikov na zdravljenje. Znano je, da so za znižane encimske aktivnosti v največji meri odgovorni polimorfizmi v genu za *TPMT*, vendar je ujemanje med genotipom in encimsko aktivnostjo nepopolno. V zadnjem desetletju so identificirali nove farmakogenetske označevalce, povezane s toksičnostjo 6-MP in drugih zdravil, ki se uporabljajo za zdravljenje otroške ALL, vendar se še ne uporabljajo v klinični praksi.

Abstract

Personalised medicine is a contemporary concept in medical practice, based on the observation that individuals respond differently to a particular therapy. Biomarkers, which include genetic markers, are a central element in the development of personalised medicine. Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) therapy is among the most successful examples of the implementation of pharmacogenetic markers into clinical practice in order to adjust the dosage of drugs to an individual. ALL accounts for approximately 80% of all forms of leukaemia occurring in children under the age of 15 years, making it the most common childhood cancer. Despite drastic improvements in the treatment of childhood ALL over the past decades, treatment is still unsuccessful in some patients either due to toxic effects, or due to the inefficacy of the drugs used, which leads to a recurrence of the disease. An additional problem is associated with the long-term toxic effects of chemotherapy, which may occur several years after the treatment has been completed. In order to improve safety and efficacy, numerous studies have been performed aiming to identify

biomarkers which would enable tailoring treatment to the individual patient and improve treatment's efficacy and safety.

Of these, the genetic factors associated with the toxicity of 6-mercaptopurine (6-MP), which is the cornerstone of maintenance treatment of ALL, have been studied most thoroughly. Thiopurine S- methyltransferase (TPMT) is a polymorphic enzyme which plays a major role in the deactivation of thiopurines and to a large extent accounts for the differences in individuals' response to treatment. It has long been known that polymorphisms in the TPMT gene are largely responsible for reduced enzymatic activities, but numerous studies have shown that the accordance between genotype and enzyme activity is incomplete. In many studies published over the past decade, new pharmacogenetic markers have been associated with toxic effects of 6-MP as well as other drugs used for ALL therapy; however, they are not yet used in clinical practice.

Citirajte kot/Cite as: Šmid A, Jazbec J, Mlinarič Raščan I. Farmakogenetski označevalci v terapiji akutne limfoblastne levkemije pri otrocih. Zdrav Vestn. 2019;88(5-6):235-48.

DOI: 10.6016/ZdravVestn.2851

1 Uvod

Akutna limfoblastna levkemija (ALL) predstavlja približno 80 % vseh oblik levkemije, ki se pojavijo pri otrocih, mlajših od 15 let, kar jo uvršča na prvo mesto po pogostosti raka v otroštvu (1). Zdravljenje otroške ALL je v zadnjih desetletjih izjemno napredovalo, tako da je trenutno pričakovano preživetje skoraj 90 % (2). Najpomembnejši prispevek k izboljšanju izidov zdravljenja ALL lahko pripišemo napredku na področju razumevanja genetike bolezni in odkritjem številnih bioloških označevalcev, ki omogočajo razvrščanje bolnikov v skupine s tveganjem in izbiro učinkovitejše sheme zdravljenja. Biološke označevalce, ki so pomembni za napoved kliničnega izida, lahko v splošnem delimo v dve skupini. V prvo skupino uvrščamo napovedne biološke označevalce, ki so v pomoč pri napovedovanju verjetnega poteka bolezni ne glede na zdravljenje. Bolniki se na podlagi teh označevalcev razvrščajo v podskupine z različnimi pričakovanimi izidi bolezni (3). V drugo skupino pa sodijo napovedni biološki označevalci, ki so v pomoč pri napovedovanju izida bolezni, a tudi pri izbiri ustreznega zdravljenja, in sicer tako glede izbire kot

odmerjanja optimalnega zdravila. Z njihovo pomočjo lahko identificiramo bolnike, pri katerih obstaja večja verjetnost za pojav toksičnih učinkov, zato jim skladno s tem prilagodimo zdravljenje (3). V preglednem članku bomo kratko predstavili metode in pristope k proučevanju bioloških označevalcev in povzeli novejša odkritja na področju napovednih farmakogenetskih označevalcev pri zdravljenju otroške ALL.

2 Pristopi k proučevanju bioloških označevalcev

Sodobne raziskave na področju odkrivanja novih farmakogenetskih označevalcev potekajo na različnih ravneh od celičnih in živalskih modelov do retrospektivnih in prospektivnih kliničnih preskušanj, ki so zasnovani bodisi na t.i. hipotetičnih ali nehipotetičnih pristopih. Klasični hipotetični pristopi v odkrivanju bioloških označevalcev temeljijo na korelaciji med posameznim genom, proteinom ali metabolitom in farmakološkim odgovorom. Postavljena hipoteza izhaja iz predhodnega znanja, za njeno preverjanje pa se oblikuje specifi-

čen eksperiment. Z napredkom v razvoju visoko zmogljivih »omskih« tehnologij, ki omogočajo hkratno merjenje več tisoč spremenljivk, se je pričel uveljavljati tudi t.i. nehipotetični pristop. Ta temelji na analizi genoma, transkriptoma, proteoma in/ali metaboloma in obdelavi podatkov z naprednimi bioinformatičnimi in statističnimi orodji in omogoča širše razumevanje in nov uvid v molekularne mehanizme, ki so odgovorni za posameznikov odziv na zdravljenje.

Večina do sedaj objavljenih študij na področju farmakogenetskih označevalcev, ki bi omogočili posamezniku prilagojeno zdravljenje otroške ALL, temelji na hipotetičnem pristopu – gre za t.i. študije kandidatnih genov.

3 Zdravljenje ALL

Pri zdravljenju ALL ima bistveno vlogo kombinirana kemoterapija, ki jo bolniki prejemajo v obdobju dveh ali treh let. Na izbiro intenzivnosti zdravljenja vpliva predvsem ocena tveganja za ponovitev bolezni, ki temelji na nekaterih kliničnih in laboratorijskih dejavnikih, kot so starost, število levkocitov ob diagnozi, imunofenotip, citogenetske in genetske nepravilnosti, prisotnost ekstramedularne bolezni in levkemije v centralnem živčnem sistemu ter zgodnji odziv na zdravljenje. Podrobneje so napovedni dejavniki predstavljeni v Tabeli 1.

Za zdravljenje ALL se uporabljajo različne sheme, ki so jih razvile skupine strokovnjakov, kot so nemška skupina Berlin-Frankfurt-Münster Group (BFM) (15), skupina bolnišnice St. Jude Children's Research Hospital (SJCRH) (16), skupina inštituta Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium (DFC) (17), skupina Children's Oncology Group (COG) (18) in skandinavsko združenje Nordic Society of Paediatric Haematology and

Oncology (NOPHO) (19), vse pa vključujejo kemoterapijo, ki je razdeljena v tri faze zdravljenja:

1. Faza uvodnega intenzivnega zdravljenja (indukcija). Cilj te faze je doseči popolno remisijo in običajno traja štiri do pet tednov. Zdravljenje temelji na kombinaciji treh ali štirih zdravilnih učinkovin, in sicer vinkristina, kortikosteroida (prednizon ali deksametazon) in L-asparaginaze z antraciklinom (doksorubicin ali daunorubicin) ali brez njega. Četrto ali peto zdravilno učinkovino (antraciklin in/ali ciklofosamid) običajno prejmejo otroci, ki so razvrščeni v skupino (ALL) z visokim ali zelo visokim tveganjem (20).
2. Faza ponovnega intenzivnega zdravljenja (konsolidacija in reindukcija). Cilj konsolidacijske faze je uničenje preostalih (rezidualnih) levkemičnih celic, ki ostanejo po indukcijski fazi. Gre za intenzivno terapijo, pri kateri se uporabljajo podobne kombinacije zdravilnih učinkovin kot v prvi fazi, v režim zdravljenja pa so vključeni še metotreksat v visokih odmerkih v kombinaciji s 6-merkaptopurinom (6-MP), vinkristin in glukokortikoid. Bolniki 20–30 tednov neprekinjeno prejemajo tudi L-asparaginazo. Fazi konsolidacije običajno sledi še t.i. reindukcijska faza zdravljenja, v kateri bolniki prejmejo kemoterapijo, ki je po sestavi zelo podobna kot v fazi indukcije (20).
3. Vzdrževalna faza. Običajno traja dve leti ali več in temelji na dnevnem peroralnem jemanju 6-MP in tedenskem peroralnem jemanju metotreksata s periodičnimi odmerki vinkristina in deksametazona ali brez njiju (20).

Za preprečitev razširitve levkemičnih celic v centralnem živčnem sistemu

Tabela 1: Napovedni dejavniki pri otrocih z ALL (4-14).

Ugodna prognoza	Neugodna prognoza
Starost ob diagnozi	
<ul style="list-style-type: none"> • Od 1 do <10 let 	<ul style="list-style-type: none"> • <1 leta • ≥10 let
Št. levkocitov ob diagnozi	
<ul style="list-style-type: none"> • <50.000/μL 	<ul style="list-style-type: none"> • ≥50.000/μL
Imunofenotip	
<ul style="list-style-type: none"> • Običajna B-celična ALL (CD10 pozitivna) 	<ul style="list-style-type: none"> • T-celična ALL • pro B-celična ALL (CD10 negativna)
Levkemija v centralnem živčnem sistemu (CŽS)	
<ul style="list-style-type: none"> • Negativno (CŽS 1) 	<ul style="list-style-type: none"> • Pozitivno (CŽS 3)
Citogenetske in genetske značilnosti	
<ul style="list-style-type: none"> • Indeks DNA >1.16 • hipediploidnost (> 50 kromosomov) 	<ul style="list-style-type: none"> • Indeks DNA <1.0 • hipoploidnost (< 44 kromosomov)
<ul style="list-style-type: none"> • t(12;21): ETV6-RUNX1 • znana tudi kot TEL-AML1 	<ul style="list-style-type: none"> • t(9;22): BCR/ABL (kromosom filadelfija); • t(4;11): MLL/AF4 • t(1;19): TCF3-PBX1 (tudi E2A-PBX1) • iAMP21 (slabša prognoza le v primeru zdravljenja s standardnimi shemami)
<ul style="list-style-type: none"> • Delecija ERG 	<ul style="list-style-type: none"> • delecija IKZF1 • mutacija v JAK2
Zgodnji odziv na zdravljenje	
<ul style="list-style-type: none"> • <0,01 % minimalne preostale bolezni (MRD) po 7 dneh zdravljenja s prednizonom (določeno v periferni krvi) in po končani indukcijski fazi (določeno v kostnem mozgu) 	<ul style="list-style-type: none"> • >0,01 % minimalne preostale bolezni (MRD) v periferni krvi po 7 dneh zdravljenja s prednizonom in enim intratekalnim odmerkom metotreksata.

(CŽS) poteka še preventivno zdravljenje CŽS, in sicer v obliki intratekalne in sistemske kemoterapije, včasih tudi obsevanja glave. Pri bolnikih z ALL z visokim tveganjem se izvaja tudi alogenična presaditev krvotvornih matičnih celic (20,21).

Zdravljenje otrok z ALL v Sloveniji je v obdobju 1967–1973 potekalo po protokolu, prirejenem po različnih shemah zdravljenja, v obdobju 1973–1983 pa v skladu s shemo, povzeto po Pediatric

Oncology Group (POG). Nato so se od leta 1983 dalje uporabljale različne sheme, povzete po protokolih nemške skupine Berlin–Frankfurt–Münster (ALL-BFM 83, ALL-BFM 86, ALL-BFM 90, ALL-BFM 95, protokol študije ALL IC BFM 2002 in ALL BFM 2010) (1,22).

Kljub izjemnemu napredku v zadnjih desetletjih je zdravljenje ALL v nekaterih primerih še vedno neuspešno zaradi toksičnih stranskih učinkov, med katerimi so lahko tudi življenjsko

ogrožajoči, bodisi zaradi neučinkovitosti uporabljenih zdravil, kar vodi v ponovitve bolezni (20). Med najpomembnejše neželene učinke vinkristina uvrščamo hematološko toksičnost in nevrotoksičnost (23), medtem ko so najpomembnejši neželeni učinki L-asparaginaze alergijske reakcije, vključno z anafilakso, motnje strjevanja krvi in pankreatitis (24). Pri bolnikih, ki dalj časa jemljejo glukokortikoide, se lahko v levkemičnih celicah razvije rezistentnost na steroide, pojavljajo pa se tudi neželeni učinki, kot so pogoste okužbe ali sepsa, osteonekroza, diabetes in miopatija (25). Pri zdravljenju z metotreksatom lahko pride do neželenih učinkov na prebavilih, okvare sluznice ali mukozitisa, hepatotoksičnosti, nefrotoksičnosti ali do zavore delovanja kostnega mozga in nevrotoksičnosti (26). Pri uporabi 6-MP pa lahko pride do zavore delovanja kostnega mozga in hepatotoksičnosti, ki lahko v nekaterih primerih zahtevajo hospitalizacijo in prekinitev zdravljenja (22,27). Poleg neželenih učinkov, ki se pojavljajo med samo terapijo, problem predstavljajo tudi dolgoročni toksični učinki kemoterapije, kot so kardiomiopatija, osteonekroza in sekundarni tumorji, ki se lahko pojavijo tudi več let po zaključenem zdravljenju (28,29).

4 Farmakogenetski označevalci toksičnosti zdravljenja ALL

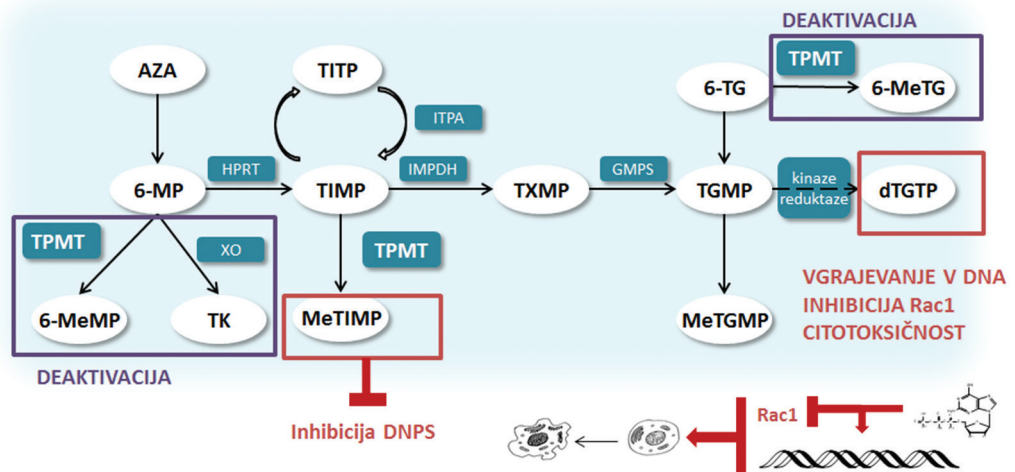
Zaradi omenjenih neželenih učinkov, ki se lahko pojavijo med zdravljenjem ALL, se je v zadnjih letih veliko študij posvetilo odkrivanju novih z zdravljenjem povezanih bioloških označevalcev, ki bi omogočili posamezniku prilagojen izbor in odmerjanje zdravil. Med temi so najboljše proučili farmakogenetske dejavnike, ki so povezani s toksičnostjo

6-merkaptopurina v vzdrževalni fazi zdravljenja ALL (opisani v poglavjih 4.1. in 4.2.), nekoliko manj pa farmakogenetski dejavniki, ki so povezani z zdravili, ki se uporabljajo v preostalih fazah zdravljenja (opisani v poglavju 4.3.).

4.1 Tiopurin-S-metiltransferaza (TPMT) kot napovedni farmakogenetski označevalec toksičnosti 6-merkaptopurina v vzdrževalni fazi zdravljenja ALL

Ene prvih študij kandidatnih genov pri zdravljenju ALL so študije tiopurin-S-metiltransferaze (TPMT), ki sodi med najuspešnejše klinično uporabne farmakogenetske označevalce za prilagajanje odmerjanja 6-MP. Ta predstavlja osnovo dolgoročnega vzdrževalnega zdravljenja ALL, ki poleg azatioprina (AZA) in 6-tiogvanina (6-TG) sodi med tiopurinske učinkovine. Tiopurini so predzdravila, ki preko aktivnih presnovkov delujejo citotoksično in imunosupresivno. Zato se poleg zdravljenja ALL uporabljajo tudi pri nekaterih avtoimunskih boleznih, kot sta na primer Chronova bolezen in ulcerativni kolitis, in za preprečevanje zavrnitve organov po presaditvah (30).

Poglavitni mehanizem citotoksičnega delovanja tiopurinov je vgrajevanje 6-tiogvanozinov (6-TGN) v DNA. To sproži mehanizem popravljanja neujemanja, ki je neuspešen, kar vodi v prekinitev hčerinske verige DNA. V naslednji fazi celičnega cikla pride zaradi porušene strukture DNA do zaustavitve celičnega cikla in programirane celične smrti (apoptoze) (31). Poleg tega lahko apoptozo 6-TGN sprožijo tudi neposredno preko mitohondrijske poti, pri čemer so v signalizacijski poti vpleteni proteini Rac1, Bcl-xL in NF-κB (32). Kot potencialni mehanizem za doseganje imunosupresivnega učinka, ki pa po



Slika 1: Poenostavljena shema presnove in mehanizma delovanja tiopurinov.

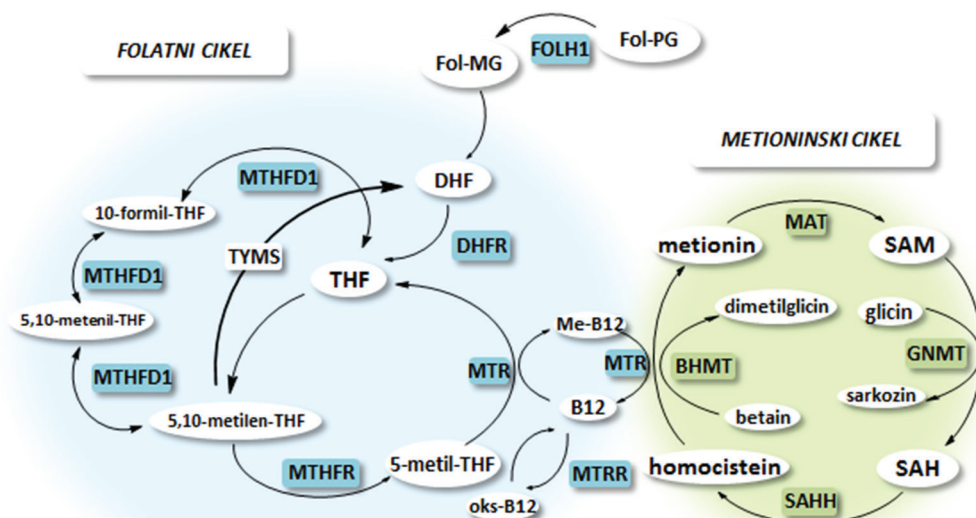
Rdeče obrobljeni so aktivni presnovki z opisom mehanizma delovanja, vijolično obrobljeni so neaktivni presnovki. 6-MP: 6-metilmerkaptopurin; 6-MeMP: 6-metilmerkaptopurin; 6-MeTG: 6-metiltiogvanin; 6-TG: 6-tiogvanin; AZA: azatioprin; DNPS: *de novo* sinteza purinov; dTGTP: deoksitiogvanozin trifosfat; GMPS: gvanozin monofosfat sintaza; HPRT: hipoksantin:gvanin fosforiboziltransferaza; IMPDH: inozin monofosfat dehidrogenaza; ITPA: inozin trifosfat dehidrogenaza; MeTGMP: metiltiogvanozin monofosfat; MeTIMP: metiltioinozin monofosfat; TGMP: tiogvanozin monofosfat; TIMP: tioinozin monofosfat; TITP: tioinozin trifosfat; TK: tiosečna kislina; TXMP: tioksantozin monofosfat; XO: ksantin oksidaza; TPMT: tiopurin S- metiltransferaza

vsej verjetnosti manj prispeva k citotoksičnemu učinku, se v literaturi omenja tudi zaviranje *de novo* sinteze purinskih nukleotidov (DNPS) zaradi nastanka 6-metiltioinozin-5'-monofosfata (MeTIMP) pri presnovi tiopurinov (33).

Presnova tiopurinov, ki je shematsko predstavljena na Sliki 1, poteka po treh glavnih poteh. Fosforibozilacija s hipoksantin-gvanin fosforiboziltransferazo (HPRT) predstavlja aktivacijsko pot, pri čemer preko številnih vmesnih presnovkov, kot je na primer tioinozinmonofosfat (TIMP), vodi v sintezo aktivnih 6-TGN. Po drugi strani predstavljata oksidacija s ksantin oksidazo (XO) in S-metilacija s TPMT deaktivacijski poti tiopurinov (45). Ker se XO izraža predvsem v jetrih in črevesju, je ta encim pomemben pri metabolizmu prvega prehoda, pri čemer se v neaktivno

tiosečno kislino pretvori približno 84 % odmerka 6-MP. Kljub temu, da je XO polimorfen encim, zaradi česar obstajajo med posamezniki razlike v encimski aktivnosti, pa študije doslej še niso ugotovile njihovega pomembnega vpliva na izid zdravljenja ALL (34). Druga pot deaktiviranja tiopurinov, ki je poglavitna predvsem v krvotvornih tkivih, poteka preko S-metilacije s TPMT, pri čemer nastane neaktivni 6-metilmerkaptopurin (6-MMP). V nasprotju z XO je variabilnost v encimski aktivnosti TPMT, ki je v veliki meri posledica prisotnosti polimorfizmov v genu *TPMT*, poglavitni vzrok za različne odzive posameznikov na zdravljenje s 6-MP.

Tiopurin S-metiltransferaza (TPMT; EC 2.1.1.67) je citosolni encim, ki se uvršča v družino od S-adenozilmetionina odvisnih metiltransferaz. Čeprav je nje-



Slika 2: Shema folatnega in metioninskega cikla.

B12: vitamin B12; oks-B12: oksidirana oblika vitamina B12; BHMT: betain-homocistein metiltransferaza; DHFR: dihidrofolat reduktaza; DHF: dihidrofolat; FOLH1: folat hidrolaza; Fol-MG: folat monoglutamat; Fol-PG: folat poliglutamat; GNMT: glicin N-metiltransferaza; Me-B12: metilirani vitamin B12; MAT: metionin adenziltransferaza; MTHFD1: metilentetrahidrofolat dehidrogenaza 1; MTHFR: 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza; MTR: metionin sintaza; MTRR: metionin sintaza reduktaza; SAM: S-adenozil metionin; SAH: S-adenozil homocistein; TYMS: timidilat sintaza; SHMT: serin hidroksimetiltransferaza; THF: tetrahidrofolat.

gova vloga pri presnovi tiopurinov dobro ovrednotena, pa njegova endogena vloga in endogeni substrat še vedno nista poznana. Encimska aktivnost TPMT se med posamezniki precej razlikuje. Porazdelitev aktivnosti v kavkaški populaciji je trimodalna, pri čemer 89–94 % posameznikov izkazuje visoko oziroma normalno, 6–11 % posameznikov srednjo in 0,3 % posameznikov nizko encimsko aktivnost (35). Poglavitni vzrok za znižanje aktivnosti pripisujemo prisotnosti polimorfizmov v genu *TPMT*. Do sedaj je bilo odkritih že 42 polimorfizmov (36), najpogostejši in klinično najbolj pomembni polimorfizmi, ki so odgovorni za zmanjšano aktivnost TPMT, pa so predvsem *TPMT**3A (rs1142345 in rs1800460), *TPMT**3C (rs1142345), in *TPMT**2 (rs1800462) (37). Zaradi zmanjšane aktivnosti TPMT pride do

povečanega nastajanja aktivnih presnovkov, ti pa lahko v primeru prekomernega kopičenja v zdravih celicah povzročijo hude neželene učinke, med katerimi je najpogostejša zavora delovanja kostnega mozga. Da bi se izognili hudim neželenim učinkom, je zato odmerek 6-MP priporočljivo prej prilagoditi. Konzorcij za implementacijo farmakogenomike v klinično prakso (Clinical Pharmacogenomics Implementation Consortium, CPIC) v svojih smernicah priporoča, naj se pri bolnikih z enim variantnim alelom TPMT odmerki zmanjša na 30–70 % standardnega odmerka 6-MP, pri bolnikih z dvema variantnima aleloma TPMT pa kar za 90 % standardnega odmerka (38). Določanje polimorfizmov v genu *TPMT* pred uvedbo zdravljenja s 6-MP sicer predstavlja hiter, enostaven in cenovno ugoden test,

vendar številne študije ugotavljajo, da pri določenem številu bolnikov zgolj iz genotipa ne moremo predvideti encimske aktivnosti TPMT in odziva na zdravljenje (39-41). Poleg genotipa *TPMT* na encimsko aktivnost namreč vplivajo tudi nekateri drugi dejavniki, med katerimi je tudi S-adenozilmetionin (SAM) – kofaktor TPMT in metilni donor v številnih reakcijah metilacije. V več študijah smo pokazali, da višje koncentracije SAM korelirajo z višjimi aktivnostmi TPMT in sicer zaradi posttranslacijske stabilizacije encima (42-44). Preko vpliva na koncentracijo SAM lahko tako vplivajo tudi številni drugi polimorfizmi, ki se nahajajo v genih metioninskega ali folatnega cikla, ki so predstavljeni na Sliki 2.

SAM namreč nastaja iz metionina v metioninskem ciklu, po prenosu metilne skupine se pretvori v S-adenozilhomocistein (SAH), ta pa naprej v homocistein. Homocistein nato vstopi v pot transulfuracije ali se pretvori nazaj v metionin, pri čemer je substrat v reakciji 5-metiltetrahidrofolat (5-metil-THF). Ta nastaja v reakciji, ki jo katalizira 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza (*MTHFR*), eden najpomembnejših encimov folatnega cikla (Slika 2). Polimorfizmi v genu *MTHFR*, ki vplivajo na encimsko aktivnost tako preko vpliva na koncentracijo 5-metil-THF in SAM, zato lahko vplivajo na aktivnost TPMT in toksičnost 6-MP. V retrospektivni študiji pri pediatričnih bolnikih z ALL v Sloveniji smo pokazali, da prisotnost vsaj enega variantnega alela *MTHFR* 677C>T (rs1801133) in/ali 1298A>C (rs1801131) sočasno s prisotnim variantnim alelom *TPMT**3A ali *TPMT**3C prispeva k povečani toksičnosti vzdrževalnega zdravljenja (45). Z neželenimi učinki med vzdrževalnim zdravljenjem sta bila povezana še dva polimorfizma v genih, povezanih s folatnim oziroma metioninskim ciklom, in sicer polimor-

fizma rs61886492 v genu *FOLH1* (46) in rs10948059 v genu *GNMT* (47). Gen *FOLH1* kodira encim folat hidrolazo, ki je udeležen v folatnem ciklu, medtem ko *GNMT* kodira encim glicin-N-metiltransferazo, ključni encim pri vzdrževanju ravnotežja metilacije v celici in pomemben regulator znotrajcelične koncentracije S-adenozilmetionina (48).

4.2 Drugi farmakogenetski dejavniki, povezani s toksičnostjo v vzdrževalnem zdravljenju ALL

V zadnjih letih je bilo objavljenih več študij, ki kažejo, da so s toksičnostjo vzdrževalnega zdravljenja povezani tudi nekateri polimorfizmi v genu za nudiks hidrolazo 15 (*NUDT15*). *NUDT15* je nukleozid difosfataza, ki celice varuje pred oksidativnimi poškodbami DNA z razgrajevanjem oksidiranih purinskih nukleozid trifosfatov. Zaradi strukturne podobnosti lahko *NUDT15* razgrajuje tudi deoksi-tiogvanozin trifosfat, ki je aktivni metabolit 6-MP. V primeru, da ima posameznik, ki prejema 6-MP, v genu *NUDT15* polimorfizem, ki zmanjša encimsko aktivnost, lahko to vodi do prevelikega kopičenja aktivnih presnovkov in s tem do čezmerne toksičnosti zdravlila. Do sedaj je bilo opisanih 7 polimorfizmov, ki so povezani z nižjo encimsko aktivnostjo *NUDT15* in toksičnostjo tiopurinov, med katerimi pa je najpomembnejši polimorfizem c.415C>T (rs116855232), ki je bil opisan v več neodvisnih študijah. Pokazano je bilo, da imajo posamezniki z variantnim alelom T večje tveganje za pojav neželenih učinkov zaradi zavore kostnega mozga v primerjavi s posamezniki z alelom divjega tipa C (49-51). Dokazi o povezanosti polimorfizmov v genu *NUDT15* so številni, vendar pa so bili razen enega do sedaj vsi opisani le v azijskih in hispanskih po-

pulacijah (52), zato je njihov vpliv in pomen v ostalih populacijah precej manjši.

S toksičnostjo vzdrževalnega zdravljenja so v nekaterih študijah povezovali tudi polimorfizme v genih *PACSIN2* in *ITPA*. *PACSIN2* kodira substrat proteina kinaze C in kazein kinaze v nevronih 2 (*PACSIN2*), ki med drugim sodeluje v procesih endocitoze, organizaciji membrane in membranskem prenosu in dinamiki aktinskega citoskeleta. Polimorfizem rs2413739 se je kot kandidatni dejavnik z vplivom na aktivnost *TPMT* pokazal v asociacijski študiji na celotnem genomu, ki je bila izvedena v vzorcih celičnih linij Hapmap in potrjena v skupini 286 pediatričnih bolnikov z ALL. Pri bolnikih s prisotnima dvema variantnima aleloma *PACSIN2* rs2413739 so izmerili nižje aktivnosti *TPMT*, poleg tega so imeli ti bolniki večje tveganje za pojav gastrointestinalne toksičnosti (53). V retrospektivni študiji, ki je vključevala skupino pediatričnih bolnikov z ALL v Sloveniji, so imeli bolniki z genotipom *TPMT* divjega tipa in z dvema variantnima aleloma *PACSIN2* rs2413739 večje tveganje za pojav hematološke toksičnosti v primerjavi z bolniki brez variantnega alela ali samo enim (47).

ITPA kodira encim inozin trifosfatazo, ki katalizira hidrolizo inozin trifosfata (*ITP*) do inozin monofosfata (*IMP*) in na ta način preprečuje kopičenje škodljivih nukleotidov v celici. *ITPA* sodeluje tudi v metabolizmu 6-MP, v katerem katalizira pretvorbo tioinozin trifosfata (*TITP*) v tioinozin monofosfat (*TIMP*), kot je prikazano na Sliki 1. Najpogosteje proučevana polimorfizma, ki zmanjšata aktivnost encima *ITPA*, sta 94C > A (rs1127354) in IVS2 + 21A > C (rs7270101). Prisotnost prvega so tako v nekaterih študijah povezovali z večjo pojavnostjo febrilne nevtropenije, predvsem pri bolnikih, ki so imeli zdravljenje prilagojeno na genotip *TPMT* (54) in z večjim tveganjem

za hepatotoksičnost (55). Prisotnost vsaj enega nefunkcionalnega alela (94C > A in/ali IVS2 + 21A > C) je bila v študiji, ki je vključevala pediatrične bolnike z ALL v Sloveniji, povezana z daljšim preživetjem brez dogodka oziroma manjšim tveganjem za pojav zgodnjega relapsa (56).

4.3 Farmakogenetski dejavniki, povezani s toksičnimi učinki v ostalih fazah zdravljenja ALL

V zadnjih letih so obširno proučevali tudi farmakogenetske dejavnike, povezane s toksičnostjo in učinkovitostjo metotreksata, ki se v visokih odmerkih uporablja v konsolidacijski fazi zdravljenja otroške ALL. V študijah kandidatnih genov so proučevali predvsem pogoste polimorfizme v genih za encime, povezane s folatnim ciklom, kot so *MTHFR*, metionin sintaza reduktaza (*MTRR*), timidilat sintaza (*TYMS*), dihidrofolat reduktaza (*DHFR*), metilentetrahidrofolat dehidrogenaza (*MTHFD1*) in serin hidroksimetiltransferaza (*SHMT1*) (57-60). Med temi sta bila gotovo najbolj proučevana polimorfizma *MTHFR* 677C > T (rs1801133) in 1298A > C (rs1801131), ki sta povezana z znižano encimsko aktivnostjo in za katera so nekatere študije pokazale povezanost s hematološko toksičnostjo, preživetjem ali izpostavljenostjo zdravlilu, medtem ko druge te povezave niso potrdile (61,62). Poleg genov folatnega cikla so številne študije proučevale tudi vpliv polimorfizmov v genih, ki bi lahko vplivali na farmakokinetiko metotreksata. V asociacijski študiji na celotnem genomu, ki so jo izvedli Trevino in sodelavci, so prvič identificirali nekatere pogoste polimorfizme v genu za organski anionski prenašalec *SLCO1B1*, ki so bili povezani z očistkom metotreksata in gastrointestinalno toksičnostjo (63). *SLCO1B1* sodeluje pri prenosu metotre-

Tabela 2: Geni, povezani s toksičnostjo zdravilnih učinkovin v terapiji ALL. Našteti so geni, katerih polimorfizmi so glede na podatkovno zbirko PharmGKB (76) potencialni označevalci toksičnosti pri zdravljenju otroške ALL. Za posamezni gen je navedena tudi stopnja dokazov glede na klasifikacijo PharmGKB.

Učinkovina in gen	Stopnja dokazov*
6-merkaptopurin (6-MP)	
<i>TPMT</i>	1A
<i>NUDT15</i>	1B
<i>MTHFR; GNMT; FOLH1; ITPA; PACSIN2</i>	3
Metotreksat	
<i>ABCB1; SLC01B1</i>	2A
<i>MTRR</i>	2B
<i>GSTP1; ABCC2; ABCC3; ABCC4; DHFR; GGH; ARID5B; MTHFR; ITPA; TYMS; SHMT1; MTHFD1; CCND1; NALCN</i>	3
Asparaginaza	
<i>GRIA1; HLA-DRB1; SOD2; PNPLA3; CPA2; NFATC2</i>	3
Vinkristin	
<i>CEPT2</i>	2B
<i>ABCB1</i>	3
Glukokortikoidi (deksametazon)	
<i>SERPINE1; TYMS; VDR Fok1; ACP1; CNTNAP2</i>	3

*Klasifikacija stopnje dokazov: (1A) Za kombinacijo polimorfizmov v genu in učinkovine obstajajo klinične smernice Združenja za implementacijo farmakogenetike v klinično prakso (CPIC) ali posameznih združenj zdravniške stroke. (1B) Za kombinacijo polimorfizmov v genu in učinkovine obstajajo številni trdni dokazi o povezanosti s toksičnostjo ali z učinkovitostjo, ki so bili prikazani v več neodvisnih študijah. (2A) Kombinacija polimorfizma v genu in učinkovine sodi med zelo pomembne farmakogene, za katere je poznan njihov funkcionalni pomen. (2B) Za kombinacijo polimorfizma in učinkovine obstajajo srednje trdni dokazi o povezanosti s toksičnostjo ali z učinkovitostjo. Povezava je prikazana v več kot eni študiji, vendar pa lahko obstajajo tudi študije, ki povezave ne potrjujejo, ali pa je vpliv polimorfizma majhen. (3) Povezanost kombinacije polimorfizma in učinkovine s toksičnostjo ali učinkovitostjo je prikazana v eni pomembni, a še ne ponovljeni študiji, ali pa so dokazi o povezanosti iz različnih študij nekonsistentni.

ksata iz krvi v hepatocite, polimorfizmi v genu pa so bili povezani tako z zvečano kot zmanjšano funkcijo prenašalca (64).

Očistek metotreksata in posledično učinkovitost in toksičnost zdravljenja so v nekaterih študijah povezovali tudi s polimorfizmi v genih, ki kodirajo druge prenašalce in sicer *ABCB1*, za katerega obstaja več dokazov (65-67), ter *ABCC2*, *ABCC3* in *ABCC4*, za katere so o povezavi z očistkom in toksičnostjo metotreksata poročali le v posameznih študijah (67-69). Tu omenjeni in nekateri ostali polimorfizmi, ki so bili povezani s toksičnostjo in učinkovitostjo metotreksata v konsolidacijski fazi zdravljenja ALL so našteti tudi v Tabeli 2, obširneje pa opisani tudi v drugih preglednih člankih (61,70).

Farmakogenetski označevalci, ki so povezani s toksičnostjo preostalih učinkovin, ki se uporabljajo za zdravljenje ALL, so zaenkrat še slabše raziskani. V posameznih študijah so ugotavljali, da imajo posamezniki, ki nosijo alel *HLA-DRB*07:01*, večje tveganje za pojav preobčutljivostne reakcije pri zdravljenju z L-asparaginazo, ki se pri ALL uporablja tako v indukcijski kot v konsolidacijski fazi (71). Z večjim tveganjem za preobčutljivost so v nekaterih študijah povezovali tudi več polimorfizmov v genu *GRIA1*, ki kodira za podenoto receptorja AMPA, tetramernega ionotropnega transmembranskega glutamatnega receptorja, ki se nahaja v centralnem živčnem sistemu (72). Z neodzivnostjo na glukokortikoide, ki se uporabljajo v konsolidacijski fazi zdravljenja ALL, so bili povezani posamezni polimorfizmi v genu za prenašalec *ABCB1*, ki so bili povezani s povečanim izražanjem letega, medtem ko so bili polimorfizmi v genih *TYMS*, *VDR Fok1*, *SERPINE1* in *ACP1* povezani z večjim tveganjem za pojav osteonekroze (73-75). Ti in nekateri drugi geni, katerih polimorfizmi so bili povezani s toksičnostjo in učinkovitostjo zdravil za ALL, so našteti v Tabeli 2.

5 Zaključek

Sodobni pristopi v medicini so usmerjeni v posamezniku prilagojeno zdravljenje, ki lahko, v primerjavi s tradicionalnim pristopom, omogoči bolj učinkovito in varno uporabo zdravil, zmanjša stranske učinke in zagotavlja stroškovno učinkovito farmacevtsko oskrbo. Tak pristop je osnovan na selektivnih in občutljivih bioloških označevalcih, zato je njihovo proučevanje postalo osrednji element tako v procesu razvoja zdravil kot v obdobju po pridobitvi dovoljenja za promet z zdravilom (77).

Eden prvih napovednih farmakogenetskih označevalcev, ki je bil uspešno uveden v klinično prakso, je genotip

TPMT, ki se uporablja za prilagoditev odmerka 6-MP pri otrocih z ALL. Kot potencialne farmakogenetske označevalce za napoved toksičnosti 6-MP smo v naših študijah identificirali tudi polimorfizme v genu *MTHFR* in *PACSIN2*, vendar pa se le-ti zaradi pomanjkanja zadostnega števila ponovitvenih študij trenutno še ne uporabljajo v klinični praksi. V Sloveniji lahko zdravniki za bolnike, ki se zdravijo s tiopurini, naročijo določitev genotipov *TPMT* in *MTHFR* kakor tudi meritve koncentracij metabolitov 6-MP/AZA v krvi v Laboratoriju za molekularno diagnostiko, ki deluje v okviru Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Literatura

1. Jazbec J, Rajic V, Karas-Kuzelicki N. Leukemias of Childhood. Zdr Vestn-Slov Med J. 2008 Apr;77:125–30.
2. Pui C-H, Evans WE. A 50-Year Journey to Cure Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Semin Hematol. 1. julij 2013.;50(3):185–96.
3. Oldenhuis CN, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EG. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. Eur J Cancer. maj 2008.;44(7):946–53. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.03.006>.
4. Friedmann AM, Weinstein HJ. The Role of Prognostic Features in the Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. The Oncologist. 8. januar 2000.;5(4):321–8. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-4-321>.
5. Burger B, Zimmermann M, Mann G, Kuhl J, Loning L, Riehm H, in sod. Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. J Clin Oncol. 15. januar 2003.;21(2):184–8.
6. Kaspers GJ, Smets LA, Pieters R, Van Zantwijk CH, Van Wering ER, Veerman AJ. Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: results of an *in vitro* study. Blood. 1. februar 1995.;85(3):751–6.
7. Loh ML, Goldwasser MA, Silverman LB, Poon WM, Vattikuti S, Cardoso A, in sod. Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95–01. Blood. 1. junij 2006.;107(11):4508–13.
8. Schrappe M, Arico M, Harbott J, Biondi A, Zimmermann M, Conter V, in sod. Philadelphia chromosome-positive (Ph+) childhood acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome. Blood. 15. oktober 1998.;92(8):2730–41.
9. Johansson B, Moorman AV, Haas OA, Watmore AE, Cheung KL, Swanton S, in sod. Hematologic malignancies with t(4;11)(q21;q23)—a cytogenetic, morphologic, immunophenotypic and clinical study of 183 cases. European 11q23 Workshop participants. Leukemia. maj 1998.;12(5):779–87.
10. Crist WM, Carroll AJ, Shuster JJ, Behm FG, Whitehead M, Vietti TJ, in sod. Poor prognosis of children with pre-B acute lymphoblastic leukemia is associated with the t(1;19)(q23;p13): a Pediatric Oncology Group study. Blood. 1. julij 1990.;76(1):117–22.
11. Heerema NA, Carroll AJ, Devidas M, Loh ML, Borowitz MJ, Gastier-Foster JM, in sod. Intrachromosomal amplification of chromosome 21 is associated with inferior outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia treated in contemporary standard-risk children's oncology group studies: a report from the children's oncology group. J Clin Oncol. 20. september 2013.;31(27):3397–402.
12. Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LA, Miller CB, in sod. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med. 29. januar 2009.;360(5):470–80.
13. Clappier E, Auclerc MF, Rapon J, Bakkus M, Caye A, Khemiri A, et al. An intragenic ERG deletion is a marker of an oncogenic subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a favorable outcome despite frequent IKZF1 deletions. Leukemia. 2014 Jan;28(1):70–7.

14. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, et al.; Children's Oncology Group. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2008 Jun;111(12):5477–85.
15. Möricke A, Zimmermann M, Reiter A, Henze G, Schrauder A, Gadner H, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia*. 2010 Feb;24(2):265–84.
16. Pui CH, Pei D, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, et al. Long-term results of St Jude Total Therapy Studies 11, 12, 13A, 13B, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2010 Feb;24(2):371–82.
17. Silverman LB, Stevenson KE, O'Brien JE, Asselin BL, Barr RD, Clavell L, et al. Long-term results of Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1985–2000). *Leukemia*. 2010 Feb;24(2):320–34.
18. Hunger SP, Loh ML, Whitlock JA, Winick NJ, Carroll WL, Devidas M, et al.; COG Acute Lymphoblastic Leukemia Committee. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 Jun;60(6):957–63.
19. Schmiegelow K, Forestier E, Hellebostad M, Heyman M, Kristinsson J, Söderhäll S, et al.; Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology. Long-term results of NOPHO ALL-92 and ALL-2000 studies of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2010 Feb;24(2):345–54.
20. PDQ® Pediatric Treatment Editorial Board. PDQ Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Posodobljeno: 30. november 2018. Dostopno na: <https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq> [citirano 4. januar 2019].
21. Balduzzi A, Valsecchi MG, Uderzo C, De Lorenzo P, Klingebiel T, Peters C, in sod. Chemotherapy versus allogeneic transplantation for very-high-risk childhood acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission: comparison by genetic randomisation in an international prospective study. *Lancet*. 20. avgust 2005.;366(9486):635–42.
22. Kuželički NK, Šmid A, Raščan IM, Jazbec J. 6-MP based maintenance therapy of childhood ALL in Slovenia: a retrospective study from 1970 to 2004. *Slov Med J [Internet]*. 7. april 2015;84(2). Dostopno na: <https://vestnik.szd.si/index.php/ZdravVest/article/view/1016>
23. Crews K, Lew G, Pei D, Cheng C, Bao J, Zheng J, in sod. Genome-Wide Association Analyses Identify Susceptibility Loci For Vincristine-Induced Peripheral Neuropathy In Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 15. november 2013.;122(21):618–618.
24. Hijjiya N, Sluis IM van der. Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2. april 2016.;57(4):748–57. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1101098>.
25. Inaba H, Pui CH. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukemia: comparison of prednisone and dexamethasone. *Lancet Oncol*. 2010 Nov;11(11):1096–106.
26. Schmiegelow K. Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review. *Br J Haematol*. 2009 Sep;146(5):489–503.
27. Schmiegelow K, Nielsen SN, Frandsen TL, Nersting J. Mercaptopurine/Methotrexate maintenance therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical facts and fiction. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2014 Oct;36(7):503–17.
28. Nachman JB. Osteonecrosis in childhood ALL [Internet]. *Let*. 117. 2011. 2298–2299 str. Dostopno na: <http://www.bloodjournal.org/bloodjournal/117/8/2298.full.pdf>
29. Robison LL. Late Effects of Acute Lymphoblastic Leukemia Therapy in Patients Diagnosed at 0–20 Years of Age. *ASH Educ Program Book*. 10. december 2011.;2011(1):238–42.
30. Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol*. 1992;43(4):329–39.
31. Karran P, Attard N. Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008 Jan;8(1):24–36.
32. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest*. 2003 Apr;111(8):1133–45.
33. Dervieux T, Brenner TL, Hon YY, Zhou Y, Hancock ML, Sandlund JT. in sod. De novo purine synthesis inhibition and antileukemic effects of mercaptopurine alone or in combination with methotrexate *in vivo* [Internet]. *Let*. 100. 2002. 1240–1247 str. Dostopno na: <http://www.bloodjournal.org/bloodjournal/100/4/1240.full.pdf>
34. Panetta JC, Evans WE, Cheok MH. Mechanistic mathematical modelling of mercaptopurine effects on cell cycle of human acute lymphoblastic leukaemia cells. *Br J Cancer*. 16. januar 2006.;94(1):93–100. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602893>.
35. Weinshilboum R. Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. *Drug Metab Dispos*. 2001 Apr;29(4 Pt 2):601–5.
36. Appell ML, Berg J, Duley J, Evans WE, Kennedy MA, Lennard L, et al. Nomenclature for alleles of the thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenet Genomics*. 2013 Apr;23(4):242–8.
37. Milek M, Murn J, Jaksic Z, Lukac Bajalo J, Jazbec J, Mlinaric Rascan I. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: genotype to phenotype correlation in the Slovenian population. *Pharmacology*. 2006;77(3):105–14.
38. Relling MV, Schwab M, Whirl-Carrillo M, Suarez-Kurtz G, Pui CH, Stein CM. in sod. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for thiopurine dosing based on TPMT and NUDT15 genotypes: 2018 update. *Clin Pharmacol Ther*. 2018 Nov;17.

39. Hindorf U, Appell ML. Genotyping should be considered the primary choice for pre-treatment evaluation of thiopurine methyltransferase function. *J Crohns Colitis*. julij 2012.;6(6):655–9.
40. Ford L, Kampanis P, Berg J. Thiopurine S-methyltransferase genotype-phenotype concordance: used as a quality assurance tool to help control the phenotype assay. *Ann Clin Biochem*. marec 2009.;46(Pt 2):152–4.
41. Chouchana L, Narjoz C, Roche D, Golmard JL, Pineau B, Chatellier G, et al. Interindividual variability in TPMT enzyme activity: 10 years of experience with thiopurine pharmacogenetics and therapeutic drug monitoring. *Pharmacogenomics*. 2014 Apr;15(6):745–57.
42. Karas-Kuzelicki N, Smid A, Tamm R, Metspalu A, Mlinaric-Rascan I. From pharmacogenetics to pharmacometabolomics: SAM modulates TPMT activity. *Pharmacogenomics*. avgust 2014.;15(11):1437–49.
43. Milek M, Karas Kuzelicki N, Smid A, Mlinaric-Rascan I. S-adenosylmethionine regulates thiopurine methyltransferase activity and decreases 6-mercaptopurine cytotoxicity in MOLT lymphoblasts. *Biochem Pharmacol*. 15. junij 2009.;77(12):1845–53.
44. Milek M, Smid A, Tamm R, Kuzelicki NK, Metspalu A, Mlinaric-Rascan I. Post-translational stabilization of thiopurine S-methyltransferase by S-adenosyl-L-methionine reveals regulation of TPMT*1 and *3C allozymes. *Biochem Pharmacol*. 1. april 2012.;83(7):969–76.
45. Karas-Kuzelicki N, Jazbec J, Milek M, Mlinaric-Rascan I. Heterozygosity at the TPMT gene locus, augmented by mutated MTHFR gene, predisposes to 6-MP related toxicities in childhood ALL patients. *Leukemia*. 2009 May;23(5):971–4.
46. Dorababu P, Naushad SM, Linga VG, Gundeti S, Nagesh N, Kutala VK, in sod. Genetic variants of thiopurine and folate metabolic pathways determine 6-MP-mediated hematological toxicity in childhood ALL. *Pharmacogenomics*. julij 2012.;13(9):1001–8.
47. Smid A, Karas-Kuzelicki N, Jazbec J, Mlinaric-Rascan I. PACSIN2 polymorphism is associated with thiopurine-induced hematological toxicity in children with acute lymphoblastic leukaemia undergoing maintenance therapy. *Sci Rep*. 25. julij 2016.;6:30244.
48. Rutherford K, Daggett V. Polymorphisms and disease: hotspots of inactivation in methyltransferases. *Trends Biochem Sci*. 2010 Oct;35(10):531–8.
49. Chiengthong K, Ittiwut C, Muensri S, Sophonphan J, Sosothikul D, Seksan P, et al. NUDT15 c.415C>T increases risk of 6-mercaptopurine induced myelosuppression during maintenance therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016 Jan;101(1):e24–6.
50. Tanaka Y, Kato M, Hasegawa D, Urayama KY, Nakadate H, Kondoh K, et al. Susceptibility to 6-MP toxicity conferred by a NUDT15 variant in Japanese children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2015 Oct;171(1):109–15.
51. Yang JJ, Landier W, Yang W, Liu C, Hageman L, Cheng C, in sod. Inherited NUDT15 Variant Is a Genetic Determinant of Mercaptopurine Intolerance in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*. 10. april 2015.;33(11):1235–42.
52. Moriyama T, Yang Y-L, Nishii R, Ariffin H, Liu C, Lin T-N, in sod. Novel variants in NUDT15 and thiopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia from diverse ancestry. *Blood*. 7. september 2017.;130(10):1209–12.
53. Stocco G, Yang W, Crews KR, Thierfelder WE, Decorti G, Londero M, in sod. PACSIN2 polymorphism influences TPMT activity and mercaptopurine-related gastrointestinal toxicity. *Hum Mol Genet*. 1. november 2012.;21(21):4793–804.
54. Stocco G, Cheok MH, Crews KR, Dervieux T, French D, Pei D, et al. Genetic polymorphism of inosine triphosphate pyrophosphatase is a determinant of mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Clin Pharmacol Ther*. 2009 Feb;85(2):164–72.
55. Wan Rosalina WR, Teh LK, Mohamad N, Nasir A, Yusoff R, Baba AA, et al. Polymorphism of ITPA 94C>A and risk of adverse effects among patients with acute lymphoblastic leukaemia treated with 6-mercaptopurine. *J Clin Pharm Ther*. 2012 Apr;37(2):237–41.
56. Smid A, Karas-Kuzelicki N, Milek M, Jazbec J, Mlinaric-Rascan I. Association of ITPA genotype with event-free survival and relapse rates in children with acute lymphoblastic leukemia undergoing maintenance therapy. *PLoS One*. 2014 Oct;9(10):e109551.
57. Huang L, Tissing WJ, de Jonge R, van Zelst BD, Pieters R. Polymorphisms in folate-related genes: association with side effects of high-dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2008 Sep;22(9):1798–800.
58. Radtke S, Zolk O, Renner B, Paulides M, Zimmermann M, Moricke A, in sod. Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 27. junij 2013.;121(26):5145–53.
59. Erculj N, Kotnik BF, Debeljak M, Jazbec J, Dolzan V. Influence of folate pathway polymorphisms on high-dose methotrexate-related toxicity and survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. junij 2012.;53(6):1096–104. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.639880>.
60. Krajcinovic M, Costea I, Primeau M, Dulucq S, Moghrabi A. Combining several polymorphisms of thymidylate synthase gene for pharmacogenetic analysis. *Pharmacogenomics J*. 2005;5(6):374–80.
61. Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I, Ballesteros J, Garcia-Orad A. A systematic review and meta-analysis of MTHFR polymorphisms in methotrexate toxicity prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2013 Dec;13(6):498–506.

62. Umerez M, Gutierrez-Camino Á, Muñoz-Maldonado C, Martin-Guerrero I, Garcia-Orad A. MTHFR polymorphisms in childhood acute lymphoblastic leukemia: influence on methotrexate therapy. *Pharmacogenomics Pers Med*. 27. marec 2017.;10:69–78. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S107047>.
63. Treviño LR, Shimasaki N, Yang W, Panetta JC, Cheng C, Pei D, in sod. Germline Genetic Variation in an Organic Anion Transporter Polypeptide Associated With Methotrexate Pharmacokinetics and Clinical Effects. *J Clin Oncol*. 10. december 2009.;27(35):5972–8.
64. Ramsey LB, Bruun GH, Yang W, Treviño LR, Vattathil S, Scheet P, in sod. Rare versus common variants in pharmacogenetics: SLCO1B1 variation and methotrexate disposition. *Genome Res*. 1. januar 2012.;22(1):1–8.
65. Liu S-G, Gao C, Zhang R-D, Zhao X-X, Cui L, Li W-J, in sod. Polymorphisms in methotrexate transporters and their relationship to plasma methotrexate levels, toxicity of high-dose methotrexate, and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 11. maj 2017.;8(23):37761–72.
66. Zgheib NK, Akra-Ismael M, Aridi C, Mahfouz R, Abboud MR, Solh H, in sod. Genetic polymorphisms in candidate genes predict increased toxicity with methotrexate therapy in Lebanese children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics*. avgust 2014.;24(8):387–96.
67. Gervasini G, de Murillo SG, Jiménez M, de la Maya MD, Vagace JM. Effect of polymorphisms in transporter genes on dosing, efficacy and toxicity of maintenance therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Gene*. 10. september 2017.;628:72–7. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.025>.
68. Simon N, Marsot A, Villard E, Choquet S, Khe HX, Zahr N, et al. Impact of ABCC2 polymorphisms on high-dose methotrexate pharmacokinetics in patients with lymphoid malignancy. *Pharmacogenomics J*. 2013 Dec;13(6):507–13.
69. Ansari M, Sauty G, Labuda M, Gagné V, Rousseau J, Moghrabi A, et al. Polymorphism in multidrug resistance-associated protein gene 3 is associated with outcomes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2012 Oct;12(5):386–94.
70. Campbell JM, Bateman E, Stephenson MD, Bowen JM, Keefe DM, Peters MDJ. Methotrexate-induced toxicity pharmacogenetics: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1. julij 2016.;78(1):27–39. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3043-5>.
71. Fernandez CA, Smith C, Yang W, Daté M, Bashford D, Larsen E. in sod. HLA-DRB1*07:01 is associated with a higher risk of asparaginase allergies [Internet]. *Let*. 124. 2014. 1266–1276 str. Dostopno na: <http://www.bloodjournal.org/bloodjournal/124/8/1266.full.pdf>
72. Chen SH, Pei D, Yang W, Cheng C, Jeha S, Cox NJ, in sod. Genetic variations in GRIA1 on chromosome 5q33 related to asparaginase hypersensitivity. *Clin Pharmacol Ther*. avgust 2010.;88(2):191–6.
73. Relling MV, Yang W, Das S, Cook EH, Rosner GL, Neel M, in sod. Pharmacogenetic risk factors for osteonecrosis of the hip among children with leukemia. *J Clin Oncol*. 1. oktober 2004.;22(19):3930–6.
74. French D, Hamilton LH, Mattano LA Jr, Sather HN, Devidas M, Nachman JB, in sod. A PAI-1 (SERPINE1) polymorphism predicts osteonecrosis in children with acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*. 1. maj 2008.;111(9):4496–9.
75. Kawedia JD, Kaste SC, Pei D, Panetta JC, Cai X, Cheng C, in sod. Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and pharmacogenetic determinants of osteonecrosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 24. februar 2011.;117(8):2340–7; quiz 2556.
76. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, et al. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2012 Oct;92(4):414–7.
77. Day M, Rutkowski JL, Feuerstein GZ. Translational medicine—a paradigm shift in modern drug discovery and development: the role of biomarkers. *Adv Exp Med Biol*. 2009;655:1–12.