

MTHFR基因多态性对儿童急性淋巴细胞白血病患者应用甲氨蝶呤耐受性的影响

高胜寒, 赵艳霞*, 刘欣琳, 张瑞祺

青岛大学附属医院儿童血液肿瘤科, 山东 青岛

收稿日期: 2022年10月3日; 录用日期: 2022年10月31日; 发布日期: 2022年11月7日

摘要

目的: 探讨MTHFR A1298C和C677T基因多态性对儿童急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)患者甲氨蝶呤(MTX)耐受性的影响。方法: 选取2020年9月至2021年9月于青岛大学附属医院确诊并接受CCCG-ALL2020方案治疗的42例ALL患者, 检测患者的MTHFR基因型, 结合临床资料分析基因多态性对ALL治疗中HD-MTX方案耐受性的影响。结果: 42例患儿中, MTHFR A1298C: AA型27例(64.28%), AC型15例(35.71%), 未检测到纯合突变型(CC型); MTHFR C677T: CC型10例(23.8%), TT型14例(33.33%), CT型18例(42.85%)。MTHFR A1298C基因不同基因组的MTX化疗不良反应和药代动力学的发生率比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。MTHFR C677T基因多态性与血红蛋白下降、谷丙转氨酶升高和药代动力学方面具有统计学意义($P < 0.05$), 而在其他不良反应方面均无统计学意义($P > 0.05$)。结论: MTHFR基因多态性不能被视为MTX的毒性标志物, 我们可关注其他基因, 如转运基因。

关键词

亚甲基四氢叶酸还原酶, 甲氨蝶呤, 不良反应, 血药浓度

Effect of MTHFR Gene Polymorphism on Methotrexate Tolerance in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia

Shenghan Gao, Yanxia Zhao*, Xinlin Liu, Ruiqi Zhang

Department of Pediatric Hematology and Oncology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

*通讯作者 Email: 18753205085@163.com

文章引用: 高胜寒, 赵艳霞, 刘欣琳, 张瑞祺. MTHFR 基因多态性对儿童急性淋巴细胞白血病患者应用甲氨蝶呤耐受性的影响[J]. 临床医学进展, 2022, 12(11): 9891-9897. DOI: 10.12677/acm.2022.12111427

Abstract

Objective: To investigate the effect of MTHFR A1298C and C677T gene polymorphisms on methotrexate (MTX) tolerance in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Methods:** Forty-two ALL patients diagnosed and treated with CCCG-ALL2020 regimen in Affiliated Hospital of Qingdao University from September 2020 to September 2021 were selected. The MTHFR genotype of the patients was detected, and the effect of gene polymorphism on the tolerance of HD-MTX regimen in ALL treatment was analyzed combined with clinical data. **Results:** Among the 42 children, 27 cases (64.28%) were MTHFR A1298C: AA type, 15 cases (35.71%) were AC type, and no homozygous mutation (CC type) was detected; MTHFR C677T: CC type in 10 cases (23.8%), TT type in 14 cases (33.33%), CT type in 18 cases (42.85%). There was no significant difference in the incidence of adverse reactions and pharmacokinetics of MTX chemotherapy among different genomes of MTHFR A1298C gene (all $P > 0.05$). MTHFR C677T gene polymorphism was significantly associated with hemoglobin decrease, alanine aminotransferase increase and pharmacokinetics ($P < 0.05$), but not with other adverse reactions ($P > 0.05$). **Conclusion:** MTHFR gene polymorphism cannot be regarded as a toxicity marker of MTX. We should pay attention to other genes, such as transport genes.

Keywords

MTHFR, MTX, Adverse Reactions, Blood Drug Concentration

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)是一种以骨髓和外周血中原始淋巴细胞增殖为特征的血液系统恶性肿瘤,是儿童中最常见的恶性肿瘤形式,占有儿童恶性肿瘤的30%。在过去的几十年里,由于治疗方案的不断改善,儿童ALL的存活率显著提高。甲氨蝶呤(MTX)作为抗代谢药物之一,是巩固和维持治疗中最常用的药物之一。然而MTX的治疗通常受到其严重毒性的限制,因此,研究MTX相关的毒性发生的预测因子是必要的。有证据证明,亚甲基四氢叶酸还原酶基因(MTHFR)的遗传多态性可能会影响MTX相关的毒性。MTHFR是MTX药代动力学的关键酶,将5,10-亚甲基四氢叶酸转化为5-甲基四氢叶酸。MTHFR A1298C (rs1801131)和C677T (rs1801133)是2个最常见的多态性位点,其多态性会影响该酶的活性[1]。现已被广泛认定为MTX毒性和预后的潜在标志物。具有677CT和677TT基因型的人分别表现出正常MTHFR活性的60%和30% [2],而1298CC个体则具有60%的MTHFR活性 [3]。迄今为止,多个机构已经研究了MTHFR多态性与MTX毒性的潜在作用以及在儿童ALL中的结果,但结论仍有争议。一些研究没有发现关联,而另一些研究在关联性方面则具有相反的结果。

本研究中,我们回顾性分析了42例ALL儿童在进行HD-MTX治疗期间MTHFR C677T和A1298C多态性对MTX相关毒性及血浆浓度之间的相关性。

2. 资料与方法

2.1. 临床资料

选取 2020 年 9 月至 2021 年 9 月青岛大学附属医院儿童血液肿瘤科收治的进行大剂量 MTX 治疗的 42 例初诊 ALL 患儿为研究对象。本研究经青岛大学附属医院伦理委员会批准。所有患儿及其法定监护人均签署知情同意书。

诊断与入选标准：根据形态学 - 免疫学 - 细胞遗传学 - 分子生物学(MICM)诊断，根据 CCCG-ALL2020 方案[4]进行规律化疗，在诱导治疗后骨髓象达到完全缓解(CR)，MRD $\leq 0.01\%$ 。进行四次 HD-MTX 方案为基础的巩固治疗。

2.2. 药品与方法

甲氨蝶呤注射液，剂型：注射剂；规格[2 ml: 50 mg]；批准文号：注册证号 H20140205；生产厂家 Pfizer(Perth) Pty Limited。

DNA 提取及遗传分析：提取患儿 DNA 后测定其浓度和光密度比，通过设计引物、PCR 扩增、电泳检测等步骤，对扩增的 PCR 产物进行检测及纯化。最后采用荧光原位杂交技术进行图像扫描，用 TL 998A 染色体核型分析系统系统分析图像，判断基因型。

MTX 血药浓度测定：分别于静脉滴注 HD-MTX 后第 20、44 小时采取患儿 2 ml 外周血与 EDTA 抗凝管中，采用酶放大免疫分析法检测 MTX 血药浓度。

2.3. 治疗方法

参考 CCCG-ALL2020 方案对 ALL 患儿进行规律化疗，巩固期大剂量甲氨蝶呤(HD-MTX)使用剂量如下：低危患儿 $3 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ ，中、高危患儿 $5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ 。

2.4. 不良反应评估

参照美国国立癌症研究所常规毒性判定标准(第 3 版)，评定患儿每次在进行 HD-MTX 化疗前和化疗后 I 级及以上的 MTX 化疗相关毒副作用。

2.5. 观察指标

回顾性分析 42 例 ALL 患者 4 个周期的 HD-MTX 方案治疗期间的血常规、肌酐清除率、肝肾功检查结果及 20、44 小时 MTX 浓度。与化疗前相比，临床检测项目，如白细胞(WBC)、中性粒细胞(ANC)、血红蛋白(Hb)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、肌酐(Cr)，每升高或降低一个或多个等级被认为存在不良反应。

2.6. 统计学处理

使用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。用 χ^2 检验分析不同 MTHFR C677T 和 A1298C 基因患儿在进行 HD-MTX 化疗后 20、44 小时血浆浓度及 ADR 发生情况的差异。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 一般资料

在纳入的 42 例患儿中，其中男 25 例(59.52%)、女 17 例(40.47%)；低危 22 例(52.38%)，中、高危 20 例(47.61%)；T-ALL 3 例(7.14%)、B-ALL 39 例(92.85%)。见表 1。

Table 1. Clinical characteristics of 42 children with ALL**表 1.** 42 例儿童 ALL 患者的临床特征

临床特征	参数
性别[例(%)]	
男	25 (59.52)
女	17 (40.47)
免疫分型[例(%)]	
T-ALL	3 (7.14)
B-ALL	39 (92.85)
危险度[例(%)]	
低危	22 (52.38)
中、高危	20 (47.61)

3.2. MTHFR 基因分布情况

对所有入组患儿进行基因分型检测, 结果如下: MTHFR A1298C: AA 型 27 例(64.28%), AC 型 15 例(35.71%), 未检测到纯合突变型(CC 型); MTHFR C677T: CC 型 10 例(23.8%), TT 型 14 例(33.33%), CT 型 18 例(42.85%)。MTHFR A1298C 突变型组(AC + CC 型) 15 例(35.71%), 野生型(AA 型) 27 例(64.28%), 两组之间在性别、免疫分型、危险度均无统计学意义(P 值均 > 0.05)。见表 2。

Table 2. Distribution of genotyping in each group [example (%)]**表 2.** 基因分型在各组分布情况[例(%)]

基因分型	例数	性别		免疫分型		危险度	
		男	女	B-ALL	T-ALL	低危	中高危
MTHFR A1298C							
AA 型	27	18	9	25	2	14	13
AC + CC 型	15	7	8	14	1	8	7
MTHFR C677T							
CC 型	10	7	3	9	1	3	7
CT + TT 型	32	18	14	30	2	19	13

3.3. 基因多态性对患者骨髓抑制及肝肾功损害的影响

42 例 ALL 患儿经 4 次 HD-MTX 后, 发生 WBC 下降 62 例, ANC 下降 39 例, HB 下降 40 例, ALT 升高 67 例, AST 升高 73 例, Cr 升高 2 例。MTHFR A1298C 基因多态性和 HD-MTX 化疗后骨髓抑制及肝肾功损害无相关性(均 $P > 0.05$), 见表 3。MTHFR C677T 基因多态性与 HD-MTX 化疗后 HB 下降及 ALT 升高具有相关性($P < 0.05$), 提示突变型(CT + TT)发生 HB 下降和 ALT 升高的发生率较 CC 型高。余指标无相关性($P > 0.05$), 见表 4。

Table 3. Relationship between MTHFR A1298C gene polymorphism and adverse response to HD-MTX chemotherapy
表 3. MTHFR A1298C 基因多态性和 HD-MTX 化疗不良反映的关系

指标	例数	AA	AC + CC	χ^2	P 值
WBC 下降	62	39	23	0.082	0.775
ANC 下降	39	23	16	0.624	0.43
HB 下降	40	30	10	2.625	0.105
ALT 升高	67	43	24	0.001	0.981
AST 升高	73	48	25	0.121	0.728
Cr 升高	2	1	1	0.18	0.671

Table 4. Relationship between MTHFR C677T gene polymorphism and adverse response to HD-MTX chemotherapy
表 4. MTHFR C677T 基因多态性和 HD-MTX 化疗不良反映的关系

指标	例数	CC	CT	TT	χ^2	P 值
WBC 下降	62	15	27	20	0.051	0.975
ANC 下降	39	10	19	10	1.38	0.502
HB 下降	40	7	24	9	6.326	0.042
ALT 升高	67	12	25	30	6.983	0.030
AST 升高	73	13	31	29	3.54	0.17
Cr 升高	2	0	1	1	0.675	0.714

3.4. 基因多态性对患者 HD-MTX 化疗后 20、44 小时浓度的影响

42 例 ALL 患儿经 4 次 HD-MTX 后, 第 20 小时浓度发生异常有 68 例, 第 44 小时浓度发生异常有 34 例。MTHFR A1298C 不同基因型 MTX 化疗后不同时间的血药浓度异常发生率比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 见表 5。MTHFR C677T 基因在 MTX 化疗后 20 小时浓度具有统计学意义, 见表 6, 提示突变型(CT + TT)发生浓度异常的发生率较 CC 型高。

Table 5. Relationship between MTHFR A1298C gene polymorphism and MTX concentration abnormality
表 5. MTHFR A1298C 基因多态性和 MTX 浓度异常的关系

指标	例数	AA	AC + CC	χ^2	P 值
20 小时浓度	68	44	24	1.586	0.208
44 小时浓度	34	25	9	0.009	0.925

Table 6. Relationship between MTHFR C677T gene polymorphism and MTX concentration abnormalities
表 6. MTHFR C677T 基因多态性和 MTX 浓度异常的关系

指标	例数	CC	CT	TT	χ^2	P 值
20 小时浓度	68	9	32	27	7.227	0.027
44 小时浓度	34	7	18	9	1.799	0.407

4. 讨论

MTX 是一种叶酸类似物,通过还原叶酸载体(RFC1)介导的主动转运进入细胞,抑制二氢叶酸还原酶从而抑制叶酸循环。MTHFR 是细胞内叶酸稳态和代谢的关键酶,其作用是在叶酸代谢通路中将 5,10-亚甲基四氢叶酸转化为具有生物学功能的 5-甲基四氢叶酸,在 DNA 的甲基化、合成和修复中起着关键作用[5]。MTHFR 基因编码区域存在多个单核苷酸多态性(SNP)可能导致 MTHFR 活性在不同程度上下降。A1298C (rs1801131)和 C677T (rs1801133)是 MTHFR 常见的多态性位点,这可能会降低 MTX 的生物活性,改变白血病细胞对药物的敏感性,调整叶酸拮抗剂化疗的反应[6],影响体内的血药浓度,并改变 MTX 的疗效和预后。而另一个多态位点 MTHFR G1793A (rs2274976) [7]可能会影响蛋白质的结构和功能,但是否会影响 MTHFR 的活性有待确定。

在本次研究中,我们评估了 MTHFR 基因多态性对儿童 ALL 患者 MTX 耐受性的影响。国内外研究报道 MTHFR A1298C 等位基因频率分布存在差异,如日本、夏威夷和高加索人群的基因频率分别为 21.0%、23.0%和 30.7%,而中国人群为 16%~17% [8]。本研究中 MTHFR A1298C 突变基因型频率 17.9%,接近之前相关报道。MTHFR 突变的频率差异可能与干扰基因组结果的种族和环境因素有关,然而缺乏关于一些流行病学决定因素(环境、饮食、风险群体等)的数据,对这些因素结合的研究很少。本研究发现 MTHFR A1298C 各基因型与 ALL 儿童的 MTX 化疗不良反应和血药浓度的相关性并无统计学意义,该研究结果与 Lopez-Lopez 等和 Rim Frikha [9]等的研究结果一致。而白小红等[10]研究认为 MTHFR A1298C 各基因型与大剂量 MTX 化疗后的胃肠道反应、黏膜损伤等 ADR 发生风险相关,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),而与骨髓抑制、肝损害等 ADR 发生风险无关,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。同样 Maitance Umerez [6]等系统综述中得出结论, MTHFR 多态性与 MTX 毒性之间无关联性,偶有少数具有关联的研究却经常得到相反的结果,如 Fukushima [11]认为 A1298C (CC 型)较 AA 型患者的肝毒性风险低,而部分研究者认为 CC 型基因使肝功能受损的发生率提高。因此认为 MTHFR 多态性不是预测 MTX 化疗毒性的标志物。

本研究结果显示, C677T 基因多态性与 MTX 肝毒性及血红蛋白降低风险增加相关,该研究结果与 Hagleitner [12]的分析结果一致。Haase [13]等人表明 C677T 的突变与毒性降低有关,而 Zgheib [14]等人发现了相反的效果。而朱忱等[15]研究发现 MTHFR C677T 多态性在肝功损害、骨髓抑制、黏膜损伤方面均布不存在显著相关性,但单个研究显示,非洲人群在其方面, C677T 等位基因相对于其他人种而言具有较明显的保护作用。在血浆浓度方面,本研究显示 C677T 多态性与大剂量化疗后 20 小时浓度具有相关性,这与 Mahmoud 等的研究一致,认为 C677T 基因分型可用于预测 MTX 毒性。而陈先睿[4]则认为 MTX 血浆浓度异常与该基因突变无关联性。这可能与是与化疗后给予亚叶酸钙解救在一定程度上降低了血同型半胱氨酸水平有关。上述研究表明目前国内外研究结果的差异可能受到种族差异基因频率、化疗合用药物、个体叶酸水平、环境及样本量等影响。

本研究存在病例数相对不足、观察指标未覆盖甲氨蝶呤常见毒副作用,使得本研究存在局限性,需行进一步探索研究。

5. 结论

综上所述, MTHFR C677T 和 A1298C 多态性与儿童 ALL 之间存在较弱的相关性,不能被视为 MTX 的毒性标志物。因此,我们可关注在其他基因上。如转运基因, Treviño [16]等人对 ALL 患者进行了全基因组关联研究,发现 SLCO1B1 中的 rs4149081 和 rs11045879 与 MTX 首次清除密切相关,在 MTX 转运体中的多态性分析上,发现 SLC19A1、ABCC4 和 ABCC2 等基因中的几个 SNP 也与 MTX 水平和其他毒性有关[17]。

参考文献

- [1] Yeh, C.C., Lai, C.Y., Chang, S.N., Hsieh, L.L., Tang, R., Sung, F.C. and Lin, Y.K. (2017) Polymorphisms of MTHFR C677T and A1298C Associated with Survival in Patients with Colorectal Cancer Treated with 5-Fluorouracil-Based Chemotherapy. *International Journal of Clinical Oncology*, **22**, 484-493. <https://doi.org/10.1007/s10147-016-1080-z>
- [2] Cheok, M.H. and Evans, W.E. (2006) Acute Lymphoblastic Leukaemia: A Model for the Pharmacogenomics of Cancer Therapy. *Nature Reviews Cancer*, **6**, 117-129. <https://doi.org/10.1038/nrc1800>
- [3] Weisberg, I.S., Jacques, P.F., Selhub, J., Bostom, A.G., Chen, Z., Curtis Ellison, R., Eckfeldt, J.H. and Rozen, R. (2001) The 1298A > C Polymorphism in Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR): *In Vitro* Expression and Association with Homocysteine. *Atherosclerosis*, **156**, 409-415. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(00\)00671-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(00)00671-7)
- [4] Shen, S., Chen, X., Cai, J., Yu, J., Gao, J., *et al.* (2020) Effect of Dasatinib vs Imatinib in the Treatment of Pediatric Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*, **6**, 358-366. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.5868>
- [5] Lopez-Lopez, E., Martin-Guerrero, I., Ballesteros, J. and Garcia-Orad, A. (2013) A Systematic Review and Meta-Analysis of MTHFR Polymorphisms in Methotrexate Toxicity Prediction in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *The Pharmacogenomics Journal*, **13**, 498-506. <https://doi.org/10.1038/tpj.2012.44>
- [6] Umeriz, M., Gutierrez-Camino, Á., Muñoz-Maldonado, C., Martin-Guerrero, I. and Garcia-Orad, A. (2017) MTHFR Polymorphisms in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Influence on Methotrexate Therapy. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, **10**, 69-78. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S107047>
- [7] Li, Y., Pei, Y.X., Wang, L.N., Liang, C., Tang, Y.L., Zhang, X.L., Huang, L.B., Luo, X.Q. and Ke, Z.Y. (2020) MTHFR-C677T Gene Polymorphism and Susceptibility to Acute Lymphoblastic Leukemia in Children: A Meta-Analysis. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, **30**, 125-136. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2020033468>
- [8] 陈先睿, 温红, 郭碧赞, 白海涛, 吴谨淮, 黄建琪, 王玥. 闽南地区急性淋巴细胞白血病患者亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与甲氨蝶呤的相关性[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019, 34(14): 1068-1071.
- [9] Frikha, R., Jemaa, M.B., Frikha, F., Turki, I., Elloumi, M., Keskes, L., Kamoun, H. and Rebai, T. (2021) Involvement of C677T MTHFR Variant but Not A1298C in Methotrexate-Induced Toxicity in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, **27**, 1382-1387. <https://doi.org/10.1177/1078155220951898>
- [10] 白小红, 牛佳慧, 倪美艳, 童荣生. MTHFR 基因多态性与大剂量甲氨蝶呤治疗儿童急性淋巴细胞白血病的临床疗效及药物不良反应的相关性分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(22): 3056-3059.
- [11] Fukushima, H., Fukushima, T., Sakai, A., Suzuki, R., Nakajima-Yamaguchi, R., Kobayashi, C., Iwabuchi, A., Saito, M., Yoshimi, A., Nakao, T., Kato, K., Tsuchida, M., Takahashi, H., Koike, K., Kiyokawa, N., Noguchi, E. and Sumazaki, R. (2013) Polymorphisms of MTHFR Associated with Higher Relapse/Death Ratio and Delayed Weekly MTX Administration in Pediatric Lymphoid Malignancies. *Leukemia Research and Treatment*, **2013**, Article ID: 238528. <https://doi.org/10.1155/2013/238528>
- [12] Hagleitner, M.M., Coenen, M.J., Aplenc, R., *et al.* (2014) The Role of the MTHFR 677C > T Polymorphism in Methotrexate-Induced Liver Toxicity: A Meta-Analysis in Patients with Cancer. *The Pharmacogenomics Journal*, **14**, 115-119. <https://doi.org/10.1038/tpj.2013.19>
- [13] Haase, R., Elsner, K., Merkel, N., Stiefel, M., Mauz-Körholz, C., Kramm, C.M. and Körholz, D. (2012) High dose Methotrexate Treatment in Childhood ALL: Pilot Study on the Impact of the MTHFR 677C > T and 1298A > C Polymorphisms on MTX-Related Toxicity. *Klinische Pädiatrie*, **224**, 156-159. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1304623>
- [14] Zgheib, N.K., Akra-Ismail, M., Aridi, C., Mahfouz, R., Abboud, M.R., Solh, H. and Muwakkit, S.A. (2012) Genetic Polymorphisms in Candidate Genes Predict Increased Toxicity with Methotrexate Therapy in Lebanese Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pharmacogenet Genomics*, **24**, 387-396. <https://doi.org/10.1097/FPC.000000000000069>
- [15] 朱忱, 王晓玲, 李晓玲. 急性淋巴细胞白血病患者亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)C677T 多态性与甲氨蝶呤毒性相关性的 Meta 分析[J]. 实用药物与临床, 2017, 20(9): 1009-1014.
- [16] Treviño, L.R., Shimasaki, N., Yang, W., Panetta, J.C., Cheng, C., Pei, D., Chan, D., Sparreboom, A., Giacomini, K.M., Pui, C.H., Evans, W.E. and Relling, M.V. (2009) Germline Genetic Variation in an Organic Anion Transporter Polypeptide Associated with Methotrexate Pharmacokinetics and Clinical Effects. *Journal of Clinical Oncology*, **27**, 5972-5978. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.4156>
- [17] Gutierrez-Camino, A., Lopez-Lopez, E. and Garcia-Orad, A. (2014) SLC19A1 Hot Spot for MTX Plasma Concentration. *Medical Oncology*, **31**, Article No. 204. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0204-4>