

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM, ÁLTALÁNOS ORVOSKAR
GYÓGYSZERTANI INTÉZET

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**ANTIFUNGÁLIS AZOL-SZÁRMAZÉKOK ÉS CITOKINEK
HATÁSA NORMÁL ÉS KÓROS HEMOPOETIKUS
KOLÓNIAKÉPZŐ SEJTEKRE**

DR. BENKŐ ILONA

Debrecen, 2001.

1. BEVEZETÉS

Napjainkban az átmenetileg vagy tartósan immundeficiens betegek számának emelkedésével megnőtt a gombás fertőzések jelentősége. A gombák elleni védekezésben döntő szerepet játszanak a granulocyták és monocyták, így a neutropeniás betegekben súlyos szisztémás fertőzések alakulhatnak ki. A daganatos betegek neutropeniás időszakban bekövetkező halálzásáért több mint 50%-ban a szisztémás gombás fertőzések felelősek a post mortem vizsgálatok szerint (Jehn 1988). A neutropeniás betegek szisztémás gombás fertőzései gyakran az antifungális terápia ellenére fatális kimenetelűek. Klinikai tapasztalat, hogy a beteg állapotának javulása, a megfelelő antifungális terápia ellenére, általában csak a myelopoiesis s ezzel az abszolút neutrophil sejtszám normalizálódása után várható (Bodey és mtsai. 1994; Grauer és mtsai. 1994). Nem közömbös, hogy az alkalmazott gyógyszerek milyen további károsodást okoznak az amúgy is deprimált csontvelőben. Az egészséges csontvelőt jelentősen nem károsító hatás is elegendő lehet ugyanis a már más okból károsodott csontvelő regenerációjának késleltetésére, mely a prognózist kedvezőtlenül befolyásolhatja.

A szisztémás gombás fertőzésekben legrégebben alkalmazott szerek az amphotericin B és az 5-fluorocytosin számos mellékhatással rendelkeznek. Az azol antifungális szereket kevésbé toxikus csoportnak tartják. A klasszikus szerek mellett széleskörben felhasználást nyertek a szisztémás fertőzések terápiájában, sőt a neutropeniás betegek esetében prophylaxis céljára fluconazol, ill. itraconazol kezeléssel próbálkoznak (Böhme és mtsai. 1996; Ellis és mtsai. 1994; Glasmacher és mtsai. 1996; Powderly és mtsai. 1992; Tricot és mtsai. 1987). Az amphotericin B csontvelőtoxicitása közismert (Bennett 1977; Charak és mtsai. 1991; Groll 1998; Koeffler és Golde 1977; Meeker és mtsai. 1983). Mivel az azol antifungális anyagok csontvelői hemopoiesisre gyakorolt hatásai kevésbé feltártak, célunk az azol antifungális szerek granulopoiesisre gyakorolt hatásainak vizsgálata volt.

A neutropeniás betegek bakteriális fertőzéseiben alkalmazott antibakteriális antibiotikumok csontvelőtoxicitásának hasonlóan fontos szerepe lehet. A β -laktám antibiotikumok elleni legfontosabb rezisztencia mechanizmus, a β -laktamáz rezisztencia kivédésére β -laktamáz gátlókat alkalmaznak. Intézetünk új β -laktamáz-gátló hatással rendelkező molekulák

fejlesztésével is foglalkozik. Mivel több β -laktám antibiotikum nagyobb dózisokban, hosszabb ideig alkalmazva gátolja a granulopoiesist (Hauser és mtsai. 1994; Neftel és mtsai. 1985; Neftel és Hübscher 1987; Singh és mtsai.1993), a velük kombinációban alkalmazható β -laktamáz gátlók hasonló hatása a granulocyt-macrophag progenitor sejtek (GM-CFU) kolóniaképzésére súlyosbíthatná az antibiotikum toxicitását. Ezért a szóbajövő vegyületek GM-CFU sejtek kolóniaképző képességére gyakorolt hatásainak vizsgálatát már a fejlesztés korai fázisában célul tűztük ki.

Az amphotericin B csontvelő-depressziót okozó hatásait a fiziológias hemopoiesisben szerepet játszó citokinek használatával próbálják kivédeni (Charak és mtsai. 1994, Grauer és mtsai. 1994; Spielberg és mtsai. 1992). Az amphotericin B kezelésre rezisztens esetekben G-CSF-el kombinálva eredményt lehetett elérni állatkísérletekben (Matsumoto és mtsai. 1991). A G-CSF, ill. a GM-CSF kiegészítő kezelés neutropeniás betegekben is segít a gombás fertőzések leküzdésében (Dornbusch és mtsai. 1995; Stevens 1998). Ugyanakkor az azol antifungális anyagokat is gyakran kombinálják granulocyt- ill. granulocyt-macrophag kolónia stimuláló faktorokkal, mivel a polimorphonucleáris sejtek phagocyt és killing funkcióit fokozzák, kivédik, illetve enyhítik a különböző okokból kialakuló neutropeniát. Az azol antifungális szerek statikus hatásúak, így a phagocyt sejtek együttműködésére még inkább szükség van a megfelelő terápiás hatás érdekében (Meunier 1994; Natarajan és mtsai. 1997; Niitsu és Umeda 1996; Stevens 1998).

Napjainkban a human recombinans hemopoetikus növekedési faktorok már a mindennapi klinikai gyakorlat részét képezik. Hatásuk a normál hemopoetikus sejtek kolóniaképzésére valamint a vérben keringő érett sejtalakokra részletesen vizsgált, ismert (Broudy 1997; Dexter 1993; Lowry 1992; Metcalf 1992; Mire-Sluis 1998; Vose és Armitage 1995). A cytopeniás állapotok gyakran vagy primeren, vagy secunder módon a hemopoetikus sejteket érintő betegségekhez kapcsolódnak, vagy a hemopoetikus sejtek malignus betegségeinek citosztatikus és/vagy sugárterápiája idézi elő őket. Kevésbé ismert, hogy az alkalmazott növekedési faktorok hogyan befolyásolják a kóros hemopoetikus sejteket. Ennek vizsgálatára a DEOEC Gyermekklinikájával kollaborálva a gyermekkorban leggyakrabban előforduló leukemiát, az akut lymphoid leukemiát (ALL) választottuk. Az ALL-t a lymphoid prekursor sejtek clonalis proliferációja jellemzi. B vagy T sejt progenitorokra jellemző markereket

viselnek, de nem differenciálható változatok szintén előfordulnak.

Az elsősorban myeloid sejtvonalak proliferációját és differenciálódását befolyásoló CSF-ekkel kapcsolatos vizsgálatok lymphoid leukemiák esetében először a receptoraik kimutatására irányultak, mivel ezt a myeloid és lymphoid leukemiák elkülönítésére alkalmas újabb lehetőségnek gondolták. Ezt igazolni látszott, hogy Shimoda és mtsai. (1992) valamennyi akut myeloid leukemiás (AML) mintában találtak G-CSF receptort, Jubinsky és mtsai. (1994) pedig GM-CSF receptort, míg az ALL-es esetekben nem vagy csak elvétve, a myeloid antigéneket is hordozó akut lymphoid leukemiában (My+ALL) pedig 5/6 esetben lehetett G-CSF receptor pozitivitást kimutatni (Shimoda és mtsai. 1992). A stem cell faktor CD 117 néven is szereplő receptorát (c-kit) többen csak az ALL-es esetekben találták meg, az ALL-es mintákban nem (Wang és mtsai. 1989; Lauria és mtsai. 1995). Az előbbiekkal ellentétben Komada és mtsai. (1993) 10/28 ALL-es esetben mutattak ki GM-CSF receptor pozitivitást, Knapp és mtsai. (1994) az AML-es minták 80%-ában, de az ALL-es minták közel felében is találtak c-kit expressziót.

Befolyásolhatják-e tehát a lymphoid leukémiás klón proliferációját a terápiásan szóba jövő növekedési faktorok, a G-CSF, a GM-CSF és az SCF? Erről a kolóniaképzést vizsgáló módszerek szolgáltatják a legpontosabb információt, hiszen a beteg szempontjából a folyamatos osztódásra képes, clonogen leukemiás sejtek jelentik a veszélyt. A tumor sejtek csak igen kis százaléka tartozik a clonogen sejtekhez, de ezek a sejtek tartják fenn a tumoros populációt (Lajtha 1981; Löwenberg és Touw 1993). Ezért választott módszerünkkel a leukemiás csontvelői blast sejtek kolóniaképzését vizsgáltuk. Mivel a G-CSF, GM-CSF és SCF ALL-es clonogen blast sejtekre gyakorolt hatásairól kevés és ellentmondásos irodalmi adat van, célul tűztük ki a G-CSF, GM-CSF és SCF hatásainak vizsgálatát gyermekkori akut lymphoid leukemiás gyermekek csontvelői kolóniaképző sejtjeire.

Mások az esetek egy részében kolóniaképzés fokozódást írtak le ALL-ben GM-CSF (Freedman és mtsai. 1993), ill. G-CSF, GM-CSF vagy SCF hatására (Drach és mtsai. (1994). Ugyanakkor Piao és Okabe (1990) egy módosított G-CSF molekulát hatástalannak talált. Tsuchiya és mtsai. (1991) Ph¹ kromoszóma pozitív ALL-es esetükben találtak G-CSF receptorokat a blast sejteken, G-CSF és GM-CSF hatására proliferációt triciált timidin

beépülés vizsgálatával, de kolónia növekedést nem tudtak kimutatni ezen citokinek jelenlétében. A citokin hálózat működését figyelembevéve úgy gondoltuk, azt is érdemes tanulmányozni, hogy több citokin együttes jelenléte milyen hatást gyakorolhat a tumorsejtekre. Öt év alatt sikerült megfelelő számú csontvelő mintát gyűjtenünk vizsgálatainkhoz.

.

CÉLKITŰZÉSEK:

Célunk a neutropeniás állapotokban alkalmazott egyes hatóanyagok normál, ill. kóros hemopoietikus kolóniaképző sejtekre gyakorolt hatásainak tanulmányozása volt. Az előbbieken alapján a válaszra váró kérdések és feladatok a következők:

1. Mennyire jellemző az azol antifungális szerekre a granulocyt-macrophag progenitor sejtek kolóniaképzésének gátlása?
2. Hogyan viszonyul egymáshoz a vizsgált antifungális anyagok toxikus potenciája?
3. Hogyan hatnak a fluconazol észter-származékai a GM-CFU kolóniaképzésére?
4. Van-e összefüggés az azolok egér és humán csontvelősejtek tenyésztésében mutatott hatása között? Az egér kísérletekben meghatározható adatok mennyire prediktív értékűek a humán csontvelői sejtek érzékenységére?
5. Hogyan viszonyulnak az *in vitro* mérhető kolóniaképzést gátló koncentráció-tartományok a terápiás adagok után *in vivo* észlelhető koncentrációkhoz?
6. Hogyan viszonyulnak az *in vitro* kolóniaképzést gátló koncentráció-tartományok az azol antifungális anyagok patogen gombákra vonatkozó MIC értékeihez?
7. A csontvelői granulocyt-macrophag progenitor sejtekre gyakorolt hatás

vizsgálata neutropeniás állapotokban szóbajövő anyagok gyógyszerfejlesztésének korai szakaszában. Intézetünk új, β -laktamáz gátló hatással rendelkező anyagainak vizsgálata.

8. Befolyásolják-e az akut lymphoid leukemiás betegek komplex kezelése során szóbajöhető citokinek, a G-CSF, GM-CSF és SCF a leukemiás blast sejtek kolóniaképzését?
9. Képesek-e fokozni a citokin kombinációk az egyes citokinek ALL-s betegek lymphoblastjainak kolóniaképzésére gyakorolt hatásait?

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. SZISZTÉMÁS GOMBÁS FERTŐZÉSEKBE ALKALMAZHATÓ ANTIFUNGÁLIS GYÓGYSZEREK

Az antifungális terápia számára a griseofulvin és a nystatin voltak a legelőször hozzáférhető szerek (1949-től). A griseofulvin nagyfokú toxicitása és a nystatin rossz farmakokinetikai jellemzői (pl. gyakorlatilag nem szívódik fel a gyomor-bél traktusból) nem teszik lehetővé szisztémás fertőzésekben széleskörű felhasználásukat. A nystatin továbbfejlesztésével sikerült legalább intravénásan adható polién antifungális molekulához jutni 1957-ben. Ez az első és azóta is jól használható szer szisztémás gombás fertőzések kezelésére az amphotericin B (AMB). Az AMB hazánkban Ambisome, Amphocil, Fungizone porampulla gyógyszerkészítményként található meg. Néhány évvel később az 5-fluorocytosin (5-FC, Ancotil infúzió) került forgalomba, mely szintén csak intravénásan adható. Bár antifungális spektrum és hatásosság szempontjából máig nélkülözhetetlen antifungális vegyületekről van szó, számos mellékhatásuk, infúziós alkalmazási módjuk korlátozza felhasználásukat (Fromtling 1987).

Sokáig váratott magára egy kevésbé toxikus molekulacsalád megjelenése. A 60-as években fejlesztésre kerülő azol antifungális vegyületek tűntek ilyennek, melyek közül először a miconazolt használták infúziós kezelésként szisztémás fertőzésekben. A miconazol ma már inkább csak lokális kezelésekre alkalmazzák toxicitása miatt. Mazipredonnal kombinálva Mycosolon kenőcs, metronidazollal kombinálva Klion-D 100 hüvelytabletta formájában van forgalomban. Súlyos szisztémás candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis vagy coccidioidomycosis kezelésében ma is szerepet kaphat a miconazol, ha a kórokozó más antifungális anyaggal szemben rezisztens, de miconazolra érzékeny.

Az azolok közül az első hosszútávon is sikeres molekula a szisztémás gombás fertőzések kezelésére a 70-es évek elején bemutatott ketoconazol (Nizoral tabletták) volt. A sikeresség oka a jobb terápiás index és a per os alkalmazhatóság volt, mely a hosszantartó kezeléseket is lehetővé tette a beteg otthonában. Bár a biológiai

hasznosulása 75% per os alkalmazás után, gondot jelent, hogy a gyomornedv pH viszonyai, így a táplálkozás nagymértékben befolyásolhatja. A tartós alkalmazás során bontakozott ki, hogy a máj cytochrom P-450 enzimrendszerére gyakorolt gátlás több mellékhatás és gyógyszerinterakció oka lehet. A ketoconazol (Nizoral krém, sampon) szintén alkalmas helyi kezelésre.

Az általunk vizsgált öt imidazol-származék közül a többit, a clotrimazolt (Canesten hüvelytabletta, kenőcs és oldat, Candibene spray), az econazolt (Pevaryl krém, paszta, Pevaryl G és Gyno-Pevaryl hüvelykúp) és az oxiconazolt lokálisan alkalmazzák.

A 80-as évektől az előbbi imidazol molekulacsalád mellett megjelentek a triazolok (Fromtling, 1987; Kauffman and Carver 1997). Közülük a fluconazol (Diflucan, Mycosyst, Mycosyst-Gyno kapszula, infúzió), itraconazol (Orungal kapszula) napjaink széleskörben alkalmazott antifungális vegyületei. A triazol szerkezetmódosítástól jobb hatásereőséget, nagyobb specificitást vártak kevesebb gyógyszerinterakcióval, mivel a cytochrom P-450 enzimrendszerre lényegesen kisebb gátlást gyakorolnak mint az imidazolok (Groll 1998). A saperconazol fejlesztése megtorpant, mivel az állatkísérletekben mellékvese tumor kialakulását okozta (Groll 1998).

Az azolok továbbfejlesztésével párhuzamosan a polién molekulacsalád toxicitásának csökkentésén is dolgoztak. Többféle lipidkomplex, ill. liposzómális gyógyszerforma tervezésével sikerült az amphotericin B terápiás indexén javítani (Clark és mtsai. 1991; Janoff és mtsai. 1993; Mehta és mtsai. 1989; Swenson és mtsai. 1998). Ma már a liposzómális nystatinnal is ígéretes vizsgálatok zajlanak (Carrilo-Munoz és mtsai. 1999; Groll és mtsai. 1999).

2.2. AZ ANTIFUNGÁLIS ANYAGOK VÉRKÉPZÉSRE GYAKOROLT HATÁSAI

Hematológiai toxicitásra vonatkozóan az amphotericin B-vel kapcsolatban találjuk a legtöbb irodalmi adatot. Ugyanakkor számos egyéb mellékhatást is okozhat, melyek közül a nephro- és hepatotoxicitás a legsúlyosabbak (Butler 1964; Miller és Bates 1969; Takács és mtsai. 1963; Utz és mtsai. 1964). Klinikai tanulmányokban a hemoglobin

koncentráció 18-35%-os csökkenését tapasztalták, melyet az egyéb lehetséges okokat kizárva az erythropoiesis csökkenésével lehetett magyarázni (Brandriss és mtsai. 1964). Nem játszhat szerepet ebben a human erythrocyták membránjának károsítása sem, mivel az AMB csak jóval a terápiás koncentráció-tartomány felett befolyásolja a vörösvértestek permeabilitását (Butler és Cotlove 1971). Lin és mtsai. (1990) 3 beteg adatait feldolgozva azt találták, hogy az amphotericin B kezelés alatt az erythropoietin szint elmarad az anemia fokának megfelelő értékektől, így ez is hozzájárulhat az anemia fokozódásához.

Az AMB hatását a csontvelő vérvézésére *in vitro* először Koeffler és mtsai. (1977) vizsgálták. Egér, ill. human csontvelőtenyészeteket alkalmazva megállapították, hogy az amphotericin B mind az erythroid mind a macrophag-monocytá progenerator sejtek kolóniaképzését dóziszfüggően gátolta. Az 50%-os gátlást kiváltó koncentrációkat 2,0-2,5 mg/l között mérték a CFU-E és GM-CFU egér ill. human progenerator sejtekre vonatkoztatva. Charak és mtsai. (1991) 2 mg/l koncentrációnál 30%-os gátlást tapasztaltak mindkét progenerator sejtfeleségre, míg Meeker és mtsai. (1983) a GM-CFU sejtek vonatkozásában 10 mg/l-nek találták az IC50 értéket normal human csontvelőtenyészetekben. Anemiát *in vivo* gyakran észlelnek a kezelt betegekben, neutropeniát ritkábban (Groll 1998, Harari 1999).

Az 5-fluorocytosin esetében, melyet az AMB-vel gyakran kombinációban alkalmaznak, neutropeniát, thrombocytopeniát, pancytopeniát 5%-ban észleltek (Bennet 1977; Groll 1998). A csontvelőre gyakorolt toxicitás előfordulási gyakorisága kifejezetten és dóziszfüggően nő 100 mg/l szérumszint felett (Kauffmann és Frame 1977). Azonban csontvelőtoxicitásra utaló egyértelmű jelek már jóval 100 mg/l szérumszint alatt is előfordulhatnak (Groll, 1998). A szérumszint 5-fluorocytosin koncentrációjának monitorozását javasolják, hogy elkerülhető legyen az akár teljes csontvelő elégtelenségig fokozódó károsodás, mely a beteg életébe kerülhet.

Az 5-fluorocytosint amphotericin B-vel kombinálva csontvelőre gyakorolt hatásuk összeadódhat. Kombinált kezelést alkalmazva a betegek 15%-ában észleltek leukopeniát, 11%-ukban thrombocytopeniát, és a 194 beteg közül egy csontvelő aplasia miatt halt

meg egy multicentrikus vizsgálat adatai szerint (Stamm és mtsai. 1987). Hiddemann és mtsai. (1991) kontrollált klinikai tanulmánya 87 AML-es betegről számol be, akiknél a citosztatikumok károsította csontvelő vérképzésének regenerációját késleltette az AMB+5-FC kombinált antifungális terápia, a neutropenia időtartama szignifikánsan hosszabb volt, mint a kontroll csoportban.

Bár az azol antifungális anyagok úgy tűnik kevesebb mellékhatással rendelkeznek, mint a klasszikus amphotericin B és az 5-fluorocytosin, hepatotoxicitással kell számolni, mely az átmeneti enzim emelkedéstől súlyosabb májkárosodásig terjedhet (Lavrijsen és mtsai. 1992; Trujillo és mtsai. 1994; Viscoli és mtsai 1991).

A ketoconazol a steroid szintézis megzavarásával férfibetegekben gynecomastiat és oligospermiát idézhet elő, ill. mellékvese hypofunkciót eredményezhet. A triazolok kevésbé hatnak a steroid szintézisre, de az itraconazol 400 mg napi dózisa mellett 1% előfordulási gyakorisággal jelentkezhethet gynecomastia (Tucker 1990).

Hematológiai toxicitásuk mérsékeltebbnek mutatkozik a klasszikus vegyületekkel összehasonlítva. A miconazol kb 5,5%-ban okoz anémiát, mely magasabb dózisok alkalmazásánál akár 40-70%-os incidenciát is mutathat egyes szerzők szerint (Sung és Grendahl 1977). Ugyanakkor az erythrocyták aggregációja figyelhető meg az infúziót követően (Stevens et al 1976). A fluconazol trombocytopeniát okozhat (Agarwal és mtsai. 1990; Sugar és Saunders 1988). Néhány esetben észleltek fluconazol kezeléshez társuló agranulocytosist. Ezekben dózistól és a kezelés időtartamától függetlenül jelentkeztek a tünetek (Wong-Beringer és Shriner 2000). Az itraconazol a betegek 0,5%-ában okoz trombocytopeniát (Tucker et al. 1990). Leukopenia szintén előfordul (Graybill és mtsai. 1990; Horst és mtsai. 1996), míg Denning és mtsai. (1989) csak az AIDS-es betegek körében észlelt neutropeniát az itraconazol kezelés alatt.

Bár az előbbieik alapján az azolok a csontvelőre kevésbé toxikusnak tűnnek, Meeker és mtsai. (1983) a miconazolt és a ketoconazolt vizsgálva direkt gátlást tudott kimutatni csontvelőtenyészetekben a GM-CFU sejtek kolóniaképzésére. Az 50%-os gátláshoz 10-15 mg/l szükséges a ketoconazolból és kb 4 mg/l a miconazolból humán progenitor

sejtek esetében. Ennek alapján felvetődik a kérdés, mivel gyakran neutropeniás betegek gombás fertőzéseinek kezelésére alkalmazzuk őket, mennyire biztonságosak a vérképző sejtek szempontjából az azol antifungális vegyületek. Kísérleteinkkel erre a kérdésre kerestük a választ.

2.3. A G-CSF, GM-CSF ÉS SCF SZEREPE AKUT MYELOID ÉS LYMPHOID LEUKEMIA KEZELÉSÉBEN

A vérképzés fiziológiás serkentő faktorainak a különböző etiológiájú cytopeniák kezelésére történő felhasználása kézenfekvőnek látszott, és gyorsan elterjedt az utóbbi évtizedekben. Először az erythropoietin nyert törzskönyvezést, majd a G-CSF és GM-CSF gazdagította a lehetőségeket. Akut leukemiás kórképekben a G-CSF és GM-CSF többféle céllal kerülhet alkalmazásra, ill. kipróbálásra.

A G-CSF, ill. GM-CSF lehetséges felhasználási területei akut leukemiák kezelése során a következők:

- A daganat-kemoterápiás szerek, radioterápia csontvelő károsítása utáni regeneráció elősegítése
- A daganat-kemoterápia intenzifikálása, a dózisok emelése az alkalmazott kezelési protokollokban
- Intervenciós kezelés lázas neutropenia vagy igazolt fertőzés esetén
- Csontvelő transzplantáció előtti magas dózisú kemoterápia
- Csontvelő transzplantáció után a transzplantátum korai megtapadásának, a hemopoiesis helyreállításának elősegítése
- Össejt mobilizálás csontvelő transzplantáció céljából
- A leukemiás blast sejt populáció csökkentése a „priming hatás” segítségével (Ohno 1994, 1998; Ottmann és Hoelzer 1998; Welte 1996)

A GM-CSF általában a G-CSF-éhez hasonló hatásokkal rendelkezik, kivéve, hogy az érett macrophagok funkcióira több direkt stimuláló hatása van, mint a G-CSF-nek (Rapoport 1992), de több a mellékhatása (Rogers 1992). A szisztémás gombás

fertőzésekben és parazita fertőzésekben a macrophagok stimulációja miatt jobb választás lehet a G-CSF-nél (Fleischman 1993).

A stem cell factor (SCF) még klinikai kipróbálási szakaszban van. Mint őssejt faktor a korai fejlődési fázisban, mind a prekursor, mind a progenitor sejtekre hat, így több sejtvonal expenzióját okozhatja. Főemlősökben jelentős csontvelő hypercellularitást lehetett elérni 200 µg/kg/nap dózisban, emelte mind a GM-CFU mind a BFU-E progenitor sejtek előfordulási gyakoriságát (Andrews és mtsai. 1991). Emberben szintén kimutatható a csontvelőben mérsékelt hyperplasia három sejtvonal expenziójával, a promyelocytá, proerythroblast és a hízósejtek számának növekedésével (Orazi és mtsai. 1995).

A stem cell faktor úgy tűnik több mellékhatással rendelkezik, mint a G-CSF és GM-CSF, mivel több sejtvonal hyperplasiája jöhet létre. Hatásához más exogen vagy endogen citokinek is szükségesek, ami fokozza a mellékhatások valószínűségét. A legnagyobb gondot a súlyos anaphylactoid reakciók jelentik, valószínűleg a hízósejtek felszaporodása miatt. Így lelassult fejlesztése a klinikai stádiumban. Valószínű gyakorlati felhasználása az őssejtek mobilizálásában lesz, mivel G-CSF-el kombinációban kisebb dózisokban is jelentősen fokozza a G-CSF mobilizáló hatását, bár jelentős különbségek (100x-os) észlelhetők az egyes betegek között (Weaver és mtsai. 1996).

2.3.1. A G-CSF és GM-CSF beépítése az ALL kezelési protokolljaiba

Gondolván, hogy a myeloid növekedési faktorok hatásai az ALL-es blast sejteken az AML-hez viszonyítva kevésbé várhatóak, az újabb ALL-es protokollokba próbálják őket beilleszteni. A kemoterápiás kezeléseket követően elkezdett CSF terápia több tanulmány szerint nem okozott kedvezőtlen hatásokat (Ohno 1994, 1998; Pui és mtsai. 1997). Elsősorban a fertőzőes szövődmények csökkentésére a magas kockázatú gyermek és felnőtt ALL-es betegek kezelésének menetébe illesztették be a CSF-eket.

Az európai országok által elfogadottan használt, a német leukémia társaság gondozásában folyamatosan átgondolt és módosított ALL-BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) protokoll 1995-ös változatában a high-risk (magas kockázatú) esetekre vonatkozó ág tartalmazza a G-CSF kezelést 5 µg/kg/nap dózisban minden kemoterápiás blokk után. Ennek előzményeként Ottmann és mtsai. (1993), Welte és mtsai. (1996) vizsgálták a G-CSF hatását. Ottman és Hoelzer (1998) összefoglalta a CSF kezelésekre vonatkozó klinikai farmakológiai vizsgálatokat. Azt találták, hogy míg a kemoterápiás blokkok után adott kezelésnek mindig pozitív hatása volt a neutrophil szám emelkedésére, a kemoterápia alatt folyamatosan adagolt CSF kezelés nem mindig volt hatásos.

A kemoterápiával együtt alkalmazott CSF kezelés esetleg szinkronizációra lehet alkalmas. A szinkronizációval az előzőleg nyugvó fázisban lévő leukémiás sejtek érzékenyebbé válnak a sejtciklus specifikus citosztatikumok iránt. Molgramostimmal (GM-CSF) Bettelheim és mtsai. (1991) 18 frissen diagnosztizált AML-es beteg esetében magasabb arányban tudtak teljes remissziót elérni, mint az addigi, történeti kontrollként szolgáló eseteikben. Azonban e tekintetben ellentmondóak az irodalmi adatok. Estey és mtsai. (1992) épp ellenkezőleg, ugyancsak AML-es betegeknel a teljes remisszióba kerülők arányának csökkenését tapasztalták szintén molgramostim hatására. Többen nem találtak szignifikáns változást (Ohno 1998).

Mivel Komada és mtsai. (1993) My+ALL-es esetekben nagy arányban találtak G-CSF és GM-CSF hatására DNS szintézis fokozódást az ALL-es blast sejtekben, Visani és mtsai. (1996) úgy gondolták, hogy ALL-es betegekben is lehet szinkronizációs hatást elérni G-CSF-el. Az általuk kialakított FLAG protokollban a fludarabin+cytosin arabinosid kombinációhoz adták a G-CSF-et. A My+ALL-es betegekben 6/6 esetben sikerült komplett remissziót elérniük.

2.4. A MYELOID KOLÓNIA STIMULÁLÓ FAKTOROK HATÁSA AZ AML-ES BLAST SEJTEKRE

A myeloid kolónia stimuláló faktorok proliferációt fokozó hatása az AML-es blast sejtekre nem meglepő. Számos cikk szól arról, hogy a G-CSF vagy GM-CSF *in vitro* és *in vivo* fokozza a myeloid leukemiás sejtek proliferációját. AML-es betegek csontvelői leukemiás blast sejtjein 11/15 esetben tudott GM-CSF receptorokat kimutatni, 9/15 betegben pedig a GM-CSF fokozta a trícíált timidin beépítését (Budel és mtsai. 1989). A G-CSF 7/7 esetben az AML-es sejtek kolóniaképzését fokozta (Piao és mtsai.1990). A GM-CSF hatásosabbnak tűnik a G-CSF-nél Komada és mtsai. (1993) vizsgálataiban. Mindkét CSF hatását tanulmányozták ugyanazon betegek blast sejtjeire. Fokozott timidin beépülést figyeltek meg 21/26 esetben GM-CSF, míg 12/26 esetben G-CSF hatására. Mirro és mtsai. (1993) az 52 AML-es beteg felénél tapasztaltak timidin incorporatioval proliferációt mind a G-CSF, mind az GM-CSF esetében.

Az SCF szintén fokozhatja az AML-es betegek blast sejtjeinek proliferációját, 12/17 esetben fokozta a DNS szintézist, és kb 10 ng/ml volt az 50%-os hatást kiváltó koncentráció. A kolóniaképzést G-CSF-el, ill. GM-CSF-el kombinációban fokozta (Pietsch és mtsai.1992). Kubota és mtsai. (1994) 3/10-ben kolónia képződést figyeltek meg önmagában alkalmazott SCF hatására.

A CSF-ek *in vivo* szintén stimulálják az AML-es blast sejteket. Bár e hatás szinkronizáció céljára való felhasználására történtek próbálkozások, az eredmények ellentmondásosak voltak. Több cikk arról is beszámol, hogy a leukemiás sejtek kifejezett expansióját okozzák a beteg állapotának romlásával. Baer és mtsai. (1996) 27/28 kezeletlen AML-es beteg G-CSF adásakor tapasztalták ezt.

2.5. A MYELOID KOLÓNIA STIMULÁLÓ FAKTOROK HATÁSA AZ ALL-ES BLAST SEJTEKRE

Bár a myeloid kolónia stimuláló faktorok fiziológiás hatásspektrumát tekintve nem várható az akut lymphoid leukemiás blast sejtek proliferációjának fokozása, Kiss és mtsai. (1993) SCF esetében tapasztaltak proliferáció fokozó hatást egy T-ALL-es sejtvonalon. Több szerző SCF, G-CSF vagy GM-CSF receptorokat tudott kimutatni ALL-es betegek leukemiás sejteiben. Shimoda és mtsai. (1992) csak My+ALL-es esetekben találtak G-CSF receptorokat, My-ALL-es esetekben nem, míg sokan mások nemcsak myeloid pozitív antigénnel rendelkező ALL-es esetekben is. Ugyanakkor ellentmondóak az irodalomban talált adatok, hiszen az előbbi CSF-ekkel kapcsolatban receptor negatív ALL-es eseteket szintén leírtak. Az irodalmi adatok összefoglalását az 1. táblázat tartalmazza.

Ezek a receptorok részben funkcióképesek és proliferatív válaszok is kiválthatók rajtuk keresztül. A legtöbbet a kolóniaképzést vizsgáló módszerek mondhatnak erről, hiszen a beteg szempontjából hosszabb távon a folyamatos osztódásra képes, clonogen leukemiás sejtek jelentik a veszélyt. A tumor sejtek csak igen kis százaléka tartozik a clonogen sejtekhez, de ezek a sejtek tartják fenn a tumoros populációt, és okoznak leukemiás betegséget (Lajtha 1981; Löwenberg és Touw 1993). Az ALL-es blast sejtek kolóniaképzését az előbbi CSF-ek jelenlétében kevesen vizsgálták. Freedman és mtsai. (1993) valamint Drach és mtsai. (1994) az esetek egy részében kolóniaképzés fokozódást írtak le GM-CSF, ill. G-CSF+ GM-CSF hatására. Piao és Okabe (1990) egy módosított G-CSF-el történt vizsgálatban azt nem találták hatásosnak. Handa és mtsai. (2000) G-CSF-el tudtak 4/14 esetben kifejezett ALL-es blast kolóniaképzés fokozódást kimutatni.

A G-CSF ALL-es blast sejtekre gyakorolt *in vivo* hatásának lehetőségét Kita és mtsai. (1993) vetették fel. Relapsust észleltek G-CSF kezelés közben egy olyan CD7+ ALL-es betegüknél, akinek leukemiás sejteji *in vitro* előzőleg stimulálhatók voltak G-CSF-el.

1. táblázat *Myeloid CSF receptorok előfordulása ALL-es betegek blast sejteinek felszínén*

CSF	Receptor pozitív/ összesetszám	Irodalmi forrás	Receptor negatív/ összesetszám	Irodalmi forrás
SCF	4/12 17/24 9/23 B-ALL 4/7 T-ALL 1/7 3/9 T-ALL 15/819	Nishii és mtsai. 1992 Drach és mtsai. 1994 Knapp és mtsai. 1994 Tomeczkowski és mtsai. 1995 Sykora és mtsai. 1997 Bene és mtsai. 1998	19/19 36/37 8/8	Kubota és mtsai. 1994 Lauria és mtsai. 1995 Muroi és mtsai. 1995
GM- CSF	7/19 3/13 My+B-ALL 1/3 My+T-ALL 18/23 B-ALL	Freedman és mtsai. 1993 Komada és mtsai. 1993 Drach és mtsai. 1994	5/5 21/21 My- ALL 4/4 T-ALL	Park és mtsai. 1989 Komada és mtsai. 1993 Drach és mtsai. 1994 Jubinsky és mtsai. 1994
G-CSF	5/6 My+ALL 27/27 13/25	Shimoda és mtsai. 1992 Drach és mtsai. 1994 Shinjo és mtsai. 1997	3/3 My-ALL 18/18 5/5 T-ALL 5/5 79/80	Shimoda és mtsai. 1992 Touw és mtsai. 1989 Park és mtsai. 1989 Piao és Okabe 1990 Mirro és mtsai. 1993

Az előbbi, egymásnak ellentmondó irodalmi közlések alapján felvetődik a gyanú, hogy a fiziológiás hatásaiktól eltérően ezek a döntően myeloid sejtvonalakon ható kolónia stimuláló faktorok a lymphoid eredetű leukemiás sejtek proliferációját is serkenthetik. Ennek vizsgálatát tűztük ki célul gyermekkori akut lymphoid leukemiás esetekben.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. ISMERT HATÓANYAGOK

Az antifungális anyagokat tiszta hatóanyag formájában az oldószerben frissen feloldva, majd táptalajjal megfelelően hígítva használtuk. Az imidazol származékok a következők voltak: clotrimazol, Ms: 344,84; econazolnitrát, Ms: 444,7; miconazol, Ms: 416,12; ketoconazol, Ms: 531,13; oxiconazol, Ms: 492,1 (Janssen Pharmaceutica Inc., Beerse, Belgium). A triazol származékok közül a következőket vontuk be kísérleteinkbe: itraconazol, Ms: 705,64; saperconazol, Ms: 672,73 (Janssen Pharmaceutica Inc., Beerse, Belgium) és fluconazol, Ms: 306,3 (Pfizer, Sandwich, Anglia). Ezeket 0,1 N HCl és 96% ethanol 2:1 arányú keverékében oldva, 150 mg/l-es törzsoldatból hígítottuk, úgy, hogy a sósav végkoncentrációja a tenyészetekben a kontrollt is beleértve minden esetben 0,00033 N, az etanolé 0,16% volt. Ebben a koncentrációban az oldószer nem befolyásolta a kolóniaképzést. Az itraconazol és a saperconazol szintén a fenti oldószerkeverékben oldódott, de 2 órás 80°C-os inkubálást is igényeltek ehhez. Ez az eljárás nem befolyásolta stabilitásukat, ahogy ezt az Igazságügyi Orvostani Intézetben Dr. Somogyi Gábor segítségével végzett vékonyréteg kromatográfiás és HPLC vizsgálatokkal bizonyítottuk. Az azol antifungális anyagok logP értékeit a Semmelweis Egyetem Szerves Kémiai Intézetében prof. Dr. Mátyus Péter számította ki Ghose-Crippen számítógépes program felhasználásával.

Az 5-fluorocytosint (Ms: 129,1; Roche, Svájc) steril desztillált vízben oldottuk. Az amphotericin B hatóanyagot gyári készítményéből oldottuk fel mindig frissen a vizsgálatainkhoz. A Fungizone készítmény (Squibb, Hounslow, Middlesex, Anglia) az amphotericin B (Ms: 924,1) hatóanyagon kívül Na-deoxycholatot tartalmaz. Ennek megfelelően a kontroll tenyészetekben és valamennyi amphotericin B koncentráció esetén a Na-deoxycholat oldószer végkoncentrációját azonos értékre (8,2 mg/l) állítottuk be.

3.2. ÚJONNAN SZINTETIZÁLT VEGYÜLETEK

A kísérleteinkhez szükséges vegyületeket a MTA Központi Kémiai Kutató Intézete állította elő munkacsoportunkkal kooperálva. Dr. Tegyei Zsuzsanna és Dr. Kraicsovits Ferenc kísérleteinkhez a következő fluconazol észterszármazékokat és gamma lacton típusú vegyületeket szintetizálták:

Fluconazol származékok: béta-fenil-propionil-fluconazol, Ms: 511,36; fluconazol-krotonát, Ms: 447,27; fluconazol-kapronát, Ms: 478,35. Valamennyi vegyület NMR analízise megfelelően bizonyította azonosságukat. Ezek a származékok csak dimetilsulfoxidban (DMSO) oldódtak, így - a kontrollként használt fluconazol anyavegyülettel együtt - DMSO-ban oldottuk őket, melynek végkoncentrációja a tenyészetekben 0,066% volt. Ez az oldószerkoncentráció nem befolyásolta a kontroll tenyészetek kolóniaszámát az oldószert nem tartalmazó kontrollokhoz képest.

Gamma-lakton típusú vegyületek: A 3-as és 6-os számú gamma-lakton típusú vegyületek: $C_7H_{10}O_3$, Ms: 142,15 és $C_7H_9O_2N_3$, Ms: 167,16; melyeket Tömösközi és mtsai. (1985, 1992); Gruber és mtsai. (1974); Béres és mtsai. (1988) által leírt módszerek felhasználásával állítottak elő. Hatásaikat a hasonló szerkezetű butyro- γ -lacton, a *Streptomyces griseus* A-faktorának (Sigma, $C_{13}H_{22}O_4$, Ms: 242.3) hatásaival hasonlítottuk össze. Ezek a vegyületek metanolban oldódtak. Az oldószert a tápfolyadék hozzáadása előtt elpárologtattuk a petricsészékből. A kontroll petrikben oldott anyag nélküli metanolt használtunk.

3.3. KÍSÉRLETI ÁLLATOK

25-35 g súlyú (BALBcxCBA)F1 egerek. Egy-egy kísérletben azonos neműek és azonos életkorúak. Mivel nemek között eltérést nem tapasztaltunk, a nőstény és hím egerekkel kapott eredményeket összevontuk.

3.4. BETEGEK

Munkacsoportunk a DEOEC II. sz. Belklinikájával és Gyermekklinikájával kooperálva Dr. Kiss Attila és Dr. Kiss Csongor segítségével a megfelelő etikai szabályok betartásával jutott vizsgálati anyaghoz.

A human csontvelősejteken történt *in vitro* toxicitási vizsgálatokhoz a DEOEC II. sz. Belklinikáján a Hematológiai Osztályon fekvő 11 felnőtt beteg - akiknél nem a granulocytopoiesist érintő hematológiai betegség gyanúja miatt történt diagnosztikus csontvelő punctio - csontvelő mintájának egy része jelentette a forrást. A 9 nő és 2 férfi életkora 24-78 év között volt (median: 51 év). A betegek beleegyező nyilatkozata esetén a megfelelő mennyiségben nyert diagnosztikus csontvelő mintából a Helsinki Declariot betartva kaptunk vizsgálatra csontvelői sejteket.

A citokin érzékenységi vizsgálatokhoz a DEOEC Gyermekklinikájának Hematológiai Osztályán fekvő 8 gyermek - akiknél nem malignus hematológiai betegség vagy csontvelő elégtelenség miatt történt diagnosztikus csontvelő punctio – szolgált összehasonlításul. A 3 lány és 5 fiú életkora 2-13 év között volt (median: 4 év).

A citokinek lymphoid blast sejtekre gyakorolt hatásainak vizsgálatát Dr. Kiss Csongor a DEOEC Gyermekklinikájának Hematológiai Osztályának vezetője segítségével végeztük. Az 1994-2000 között diagnosztizált leukemiás betegek közül a betegek, ill. szüleik beleegyező nyilatkozata és megfelelő mennyiségű csontvelő minta esetén az első, kezelés előtti diagnosztikus csontvelő punctióból elvégezhetjük a csontvelőtenyésztést. Így 13 acut lymphoid leukemiásnak bizonyult gyermeket vonhattuk be vizsgálatainkba. A 3 lány és 10 fiú életkora 7 hónap és 13 év között volt (median: 7 év). A diagnózis a csontvelőkenetek May-Grünwald-Giemsa (MGG) festése, ill. citokémiai reakciók elvégzése, immunfenotípus vizsgálata, kromoszóma elemzés alapján történt a FAB klasszifikációs rendszer szerint (1. később). A betegek a BFM-ALL-95 nemzetközi protokoll szerinti rizikócsoporthoz megfelelő kezelésben részesültek. Két beteg (a 12. és 13. beteg az 1. táblázatban) a ALL-BFM-95 protokoll magas rizikófaktorú betegeknek megfelelő ága szerint G-CSF (Neupogen, Hoffmann La Roche, Basel, Svájc) kezelést kapott a remissziós szakaszban. Egy beteg (1. beteg) súlyos lázas neutropenia miatt intervenciós adjuváns G-CSF terápiában részesült kezelésének indukciós fázisában.

3.5. CSONTVELŐ

Az egerek nyaki gerincvelő distractioja után a kipreparált combcsontból a csontvelőt steril körülményeket biztosítva táptalajjal kimostuk. Vékony tűn (Nr. 16) tápfolyadékkal többször átmosva a femorális csontvelőből egysejt-szuszpenziót nyertünk.

A betegek diagnosztikus célból nyert csontvelő mintáiból megfelelő mennyiség esetén a Helsinki Declaratio szabályait betartva használtunk a csontvelőtenyészteteinkhez mononuclearis sejteket. A steril körülmények között nyert csontvelőből tartósítószer-mentes heparinnal (Richter Gedeon Gyógyszergyár, Budapest) McCoy's 5A (GIBCO, NY, USA) táptalajt 1:1 (v/v) arányban alkalmazva szuszpenziót készítettünk. Óvatosan Ficoll Iodamide-ra (specifikus sűrűség = 1,077 g/ml; Pharmacia, Uppsala, Svédország) rétegezve a hígított csontvelőszuszpenziót 1000g gyorsulást alkalmazva 15 perces grádiens centrifugálással (Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen, Németország) szeparáltuk a vörösvértesteket és a granulocytákat. Az 5% újszülött borjúsavót (FBS; GIBCO, NY, USA) tartalmazó McCoy's 5A táptalajjal a leukocyta rétegből óvatosan leszívott, a mononuclearis sejteket (MNC) tartalmazó frakciót centrifugálás közbeiktatásával kétszer mostuk.

3.6. KOLONIA STIMULÁLÓ FAKTOR FORRÁSOK

3.6.1. L-sejt kondicionált medium (LCM)

Az egér L-929 sejtvonalt folyamatos fenntartása a DEOEC Humán-genetikai Intézetében történik Dr. Schlamadinger József segítségével. A sejtek folyamatosan RPMI-1640 táptalajban tenyészthetők. Megfelelő LCM-et nyerhetünk, ha 5-7 naponta cseréljük rajtuk a mediumot. Ilyenkor a letapadt sejtek felett lévő mediumot óvatosan leszívjuk, és friss táptalajra cseréljük. A leszívott felülúszó lesz a kísérleteinkben használt L-sejt kondicionált medium. Friss leoltás után 1-2 hét szükséges a megfelelő CSF tartalmú medium kialakulásához. Az L-sejt kondicionált medium minták kolónia stimuláló hatását *in vitro* egér

csontvelősejt tenyészetekben teszteljük. A továbbiakban az LCM-et az optimális kolóniaképződést biztosító mennyiségben (általában 0,2 ml) adjuk az 1 ml táptalajt tartalmazó tenyészetekhez.

3.6.2. Phytohaemagglutininnel stimulált humán leukocytá kondicionált medium (PHA-LCM)

Egészséges felnőtt önkéntestől a Helsinki Declarióban foglaltakat betartva nyertünk perifériás vért a human leukocytá tenyészetek számára. Dresch és mtsai. (1979) szerint az előbbieket alapján szeparált mononuclearis sejtszuszpenzióból 4×10^6 /ml-t alkalmazva a sejteket 15% human autolog szérumot tartalmazó McCoy's 5A táptalajban 17 mg/l phytohaemagglutinin és 10 mg/l levamisole jelenlétében szuszpenziós tenyészeteket készítettünk. 37°C-on CO₂ termosztátban inkubáltuk, majd az 5. napon centrifugálás után a kapott felülúszót steril körülmények között üvegekbe töltöttük majd lefagyasztva tároltuk.

3.6.3. Human recombinans kolónia stimuláló faktorok

A recombinans human (rh) kolónia stimuláló faktorokat rhG-CSF, rhGM-CSF és rhSCF-et alkalmaztunk (Genzyme, Cambridge, Anglia). Előfordult, hogy Neupogen (Hoffmann La Roche, Basel, Svájc) vagy Leucomax (Sandoz, Schering-Plough, Svájc) készítményt használtunk, vagy az SCF esetében a Sigma Aldrich cégtől vásároltunk.

3.7. CSONTVELŐTENYÉSZETEK

3.7.1. Egér csontvelőből

A csontvelőszuszpenzióból 10^5 /ml mononuclearis (MNC) sejtet tartalmazó lágyagar tenyészeteket készítettünk. Pike és Robinson szerint (1970) aminosavakkal, vitaminokkal és Na-pyruvátal szupplementált, 20% lósavót (Mezőhegyesi Á.G.) tartalmazó, módosított McCoy's 5A tápfolyadékot használtunk. A lágy gél állapotot 0,3% agar (Ionagar No.2, Oxoid, London, Anglia) hozzáadásával érték el. Kolónia stimuláló faktor forrásként L-sejt

kondicionált médiumot alkalmaztunk, melyben elsősorban CSF-1 található (Byrne és mtsai. 1981). Három párhuzamos tenyészetet készítettünk minden vizsgált dózis szinten. A steril Greiner műanyag petricsészékbe 1-1 ml-t szélesztettünk. A vizsgált anyagok emelkedő koncentrációit a tenyésztés kezdetekor adtuk a tápközeghez, majd a tenyészeteket 7 napig CO₂ termosztátban (New Brunswick Scientific, Edison, NJ., USA) inkubáltuk 5% CO₂-t és telített vízgőzt tartalmazó levegőben, 37 °C hőmérsékleten.

3.7.2. Human csontvelőből

A mononuclearis csontvelősejt-szuspenzióból 2×10^5 /ml MNC-t tartalmazó lágy-gél tenyészeteket készítettünk. A matrixot alkotó anyag vagy agar vagy metilcellulóz (Methocel, 3000-5000 centipoise, Fluka, Buchs, Svájc) volt. Az agart 0,3%-ban, a metilcellulózt 1,2%-ban alkalmaztuk. McCoy's 5A módosított szupplementált táptalajt 20% újszülött borjúsavóval egészítettük ki. Kolónia stimuláló faktor forrásként 10% PHA-LCM-et használtunk. Ez a végkoncentráció bizonyult az előkísérletek alapján megfelelőnek, mivel már maximális stimulust jelentett a kolóniaképzés szempontjából. A tenyészeteket 14 napig inkubáltuk az előbbieik szerint.

3.7.3. Leukémiás csontvelőből

A leukémiás betegek csontvelő mintáinak vizsgálatokor, ill. a kontroll normál csontvelő minták esetén exogen kolónia stimuláló faktor nélküli un. spontán tenyészeteket is készítettünk. Szintén ezekben a vizsgálatokban használtunk recombinans human kolónia stimuláló faktorokat. A szélesztés előtt közvetlenül kevertük ezeket a tenyészetekhez úgy, hogy a kívánt végkoncentrációt kapjuk. A granulocita kolónia stimuláló faktorból (G-CSF) 30, 300, 3000 µg/l, a granulocita-macrophag kolónia stimuláló faktorból (GM-CSF) és a stem cell faktorból (SCF) 10, 100, 1000 µg/l végkoncentrációt alkalmaztunk. Pozitív kontrollként PHA-LCM-et tartalmazó tenyészetek is készültek. A kombinációs kísérletekben a kolónia stimuláló faktorokat fix koncentrációkban alkalmaztuk, melyek a G-CSF esetében 300 µg/l, a GM-CSF és az SCF esetében 100 µg/l értékek voltak. A tenyésztés körülményei az előzőekben leírtakhoz hasonlóak voltak. A táptalaj még 2-mercaptoethanolt (LOBA,

Fischamend, Németország) is tartalmazott $5 \times 10^{-5} \text{M}$ végkoncentrációban. A tenyészeteket az előzőek szerint 14 napig inkubáltuk 5%-os CO_2 atmoszférában telített vízgőz mellett. A mononuclearis sejtszuszpenzióból $2 \times 10^5/\text{ml}$ -t adtunk a lágy-gél tenyészetekhez, melyekben minden esetben 1,2% metilcellulózt alkalmaztunk. A 14 napos inkubációs idő után a kolóniákat alkotó sejtek morfológiáját *in situ* és citospin preparátumokban vizsgáltuk. A leukemiás sejtek identifikálására May-Grünwald festés mellett citokémiai reakciókat használtunk.

3.7.4. In situ preparátumok

A tenyészetek lágy-gél állományát a benne lévő kolóniákkal együtt üveglemezre csúszattuk. Szűrőpapíron keresztül lenyomtattuk. Ilyen körülmények között a gél néhány óra alatt dehidratálódik és a preparátum a kívánt módon megfestve vizsgálható.

3.7.5. Citospin preparátumok

A lágy-gél metilcellulózt tenyészeteket óvatosan kimostuk a petricsészékből, majd a sejtek kinyerése céljából centrifugálás közbeiktatásával 2x mostuk McCoy's 5A táptalajjal. A felülúszót elöntve a sejtszuszpenziót 900 fordulat/perc mellett 2 percig centrifugálva (Universal 30RF Zyto-Rotor, Hettich, Tuttlingen, Németország) a sejteket több tárgylemezre terítettük.

3.7.6. Citokémiai reakciók

A citokémiai reakciókat Dr. Kiss Attila (DEOEC II. sz. Belklinika) végezte. A perjódsav-Schiff (PAS)-festés Hotchkiss módszerével, a savanyú foszfátáz (AP) reakció Goldberg és Barka, a myeloperoxidáz (MPO), a szudán-fekete (SB) reakció Sheehan és Storey, az alfa-naftil-acetát eszteráz (ANAE) reakció Löffler szerint történt.

3.8. IMMUNFENOTÍPUS MEGHATÁROZÁSA

Az immunfenotípus meghatározását a DEOEC Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézetében Dr. Kappelmayer János végezte.

A sejtszuszpenziót fluorescein isothiocyane-tal (FITC) és phycoerythrinrel (PE) jelzett monoclonalis antitestekkel (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) inkubáltuk. A vörösvértestek FacsLysing oldattal történő lyzálása után a mintákat 2x foszfát pufferes sóoldatban mostuk és 1% paraformaldehiddel fixáltuk. A minták vizsgálata 15mW argon laseres FacScan flow cytometerrel Lysis II software felhasználásával történt (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Minden esetben 10000 sejt vizsgálata alapján határoztuk meg a leukémiás blast sejtek jellemzőit. Az adott antigénre nézve pozitívnak tekintettük azt a mintát, amelyikben a sejtek több mint 20%-a az izotípiás kontrollhoz képest szignifikánsan magasabb fluoreszcens intenzitást mutatott.

3.9. CITOGENETIKAI VIZSGÁLAT

A citogenetikai vizsgálatokat a DEOEC Gyermekklinikájának Citogenetikai Laboratóriumában Dr. Balogh Erzsébet végezte.

A konvencionális G-sávozási technikát alkalmaztuk a sejtek 24 órás 20% FBS-t tartalmazó RPMI táptalajban történő tenyésztése után. Betegenként 17-20 metafázist értékeltünk. A karyotípus jelölésében az International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Mitelman, 1995) javaslatát követtük. A betegek leukémiás sejtjeinek karyotípus meghatározosakor csak a clonális kromoszóma aberrációkat vettük figyelembe.

3.10. A CSONTVELŐTENYÉSZETEK ÉRTÉKELÉSE

A tenyésztési idő végén a fent leírt tenyésztési körülmények között osztódni képes kolóniaképző progenitor sejteket (CFU) a leszármazottaikat tartalmazó kolóniák jelzik, melyeket sztereomikroszkóp (SZ6045; Olympus, Hamburg, Germany) alatt számoltunk meg. Kolóniának a legalább 50 sejtet tartalmazó csoportokat tekintettük. Az egér csontvelő esetében 6-7, a human csontvelő esetében 3-4 független kísérletet végeztünk, kísérletenként 3-3, esetenként 4 párhuzamos tenyészet adatait értékeltük. A leukémiás gyermekektől a

kezelésük megkezdése előtt nyert csontvelőminták vizsgálatakor ismétlésre természetesen nem volt módunk, értékelésük 3-4 párhuzamos tenyészet adatai alapján történt. A human vizsgálatokban azt a tenyészetet értékeltük pozitívnak, azaz az alkalmazott stimulusra reagáló mintának, amelyikben legalább 2 kolónia nőtt a 2×10^5 csontvelői mononuclearis sejtből. A kolónia képzést gátló hatások elemzéséhez a dózis-hatás görbéknek a képződött kolóniák száma és a hatóanyag-koncentráció logaritmusai között lineáris összefüggést mutató szakaszán a legkisebb négyzetek elve alapján regressziószámítást végeztünk. Az így kapott regressziós egyenletekből számítottuk ki a kolóniaképződést 50%-kal, illetve 95%-kal csökkentő koncentrációkat (IC50, ill. IC95). Az ábrákon a számtani átlagot és a középérték szórását tüntettük fel. A dózis-hatás görbék illesztését GraphPad számítógépes program segítségével végeztük.

3.10.1. Statisztikai értékelés

A lineáris regressziós koefficiensek szignifikanciáját t próbával számítottuk (Diem és Lentner, 1970). Az egyes citokinek és citokin kombinációk kolóniaképzésre gyakorolt hatásainak összehasonlítása páros Wilcoxon próbával történt. Az egyes citokinek maximális CFU-L kolóniaszámot stimuláló hatásait lineáris regressziós analízissel vizsgáltuk SPSS statisztikai program segítségével.

3.10.2. Kombinatív hatások elemzése

Additívnak tekintettük a citokinek kombinatív hatásait az egyes betegek csontvelősejtjeire, ha a kombinációban szereplő egyes citokinek okozta kolóniaszám átlagának összege beleesett a citokin kombináció kiváltotta kolóniaszám átlag \pm 2SD szórásstartományába (pl. $\text{átlag-kolóniaszám}_{\text{G-CSF}} + \text{átlag-kolóniaszám}_{\text{GM-CSF}} = \text{átlag-kolóniaszám}_{\text{G-CSF+GM-CSF}} \pm 2\text{SD}$).

Szuperadditívnak tekintettük a citokinek kombinatív hatásait, ha a kombináció kiváltotta kolóniaszám átlaga $-$ 2SD nagyobb volt az egyes citokinek által kiváltott kolóniaszám átlagának összegénél (pl. $\text{átlag-kolóniaszám}_{\text{G-CSF}} + \text{átlag-kolóniaszám}_{\text{GM-CSF}} < \text{átlag-kolóniaszám}_{\text{G-CSF+GM-CSF}} - 2\text{SD}$).

A citokin kombinációt nem tekintettük hatásosnak, ha a citokin-kombináció által stimulált kolóniák száma nem különbözött szignifikánsan Student féle t-tesztet alkalmazva a kombinációban szereplő egyik citokin hatásától sem.

4. EREDMÉNYEK

4.1. ANTIFUNGÁLIS ANYAGOK HATÁSA A GRANULOCYTA-MACROPHAG PROGENITOR SEJTEKRE *IN VITRO*

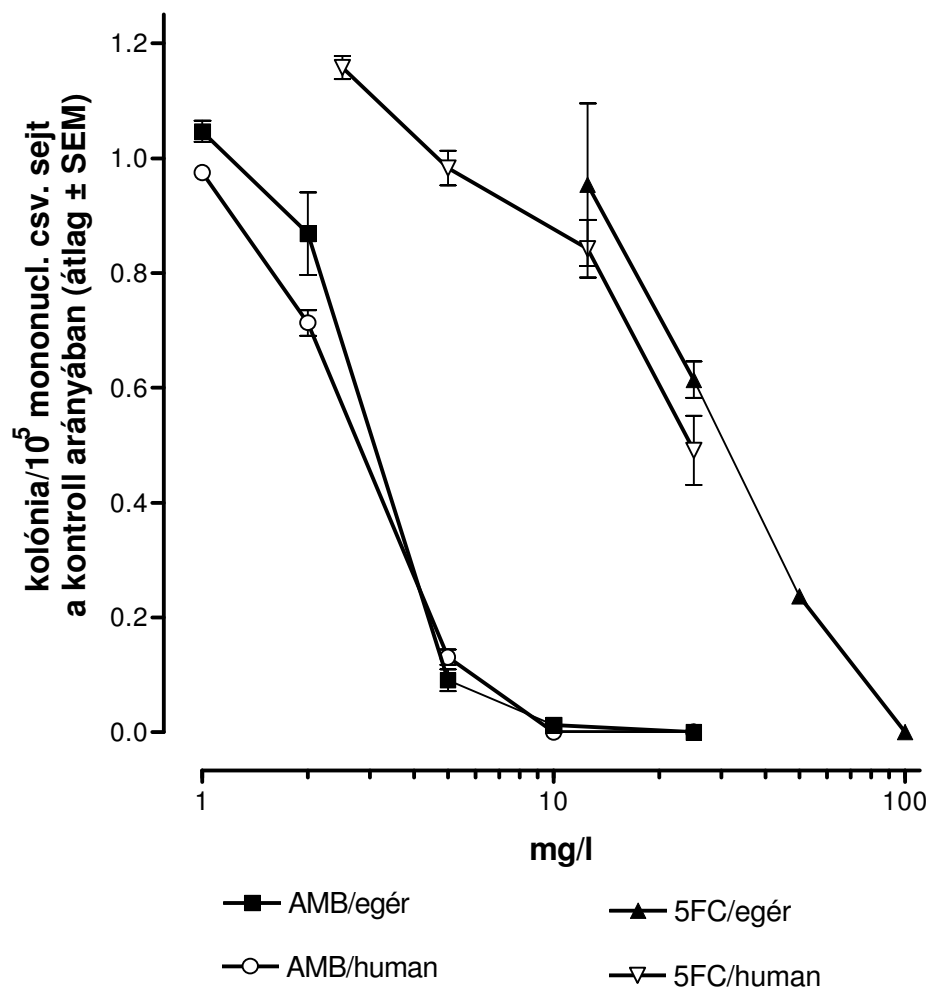
Bár az értekezés témája az azol antifungális anyagok tanulmányozása, összehasonlításként a két klasszikus, standardnak számító antifungális vegyület, az amphotericin B és az 5-fluorocytosin hatásait is vizsgáltuk.

4.1.1. Az amphotericin B és az 5-fluorocytosin hatása a GM-CFU kolóniaképzésére

Az amphotericin B hatását a 0,01-50 mg/l dózistartományban vizsgáltuk. Az AMB rossz oldékonysága miatt nátrium dezoxicholátot alkalmaztunk oldószerként. Ennek végkoncentrációját valamennyi tenyészetben azonosra állítottuk be, mely koncentrációban a kolónianövekedést nem befolyásolta. Összehasonlítottuk az egér és a humán csontvelői granulocyta-macrophag progenitor sejtek kolóniaképzésére gyakorolt hatást. A 0,01-1 mg/l koncentrációtartományban az amphotericin B közömbös volt mind az egér, mind a human GM-CFU progenitor sejtek kolóniaképzésére. Tíz mg/l-t alkalmazva viszont már csak elvétve lehetett egy-egy kolóniát találni a tenyészetekben. Magasabb koncentrációban valamennyi kísérletben és valamennyi párhuzamos tenyészetben teljes gátlást tapasztaltunk. Lényeges eltérést nem találtunk az egér ill. human tenyészetekben kapott dózis-hatás görbék lefutásában, bár a 2 mg/l koncentráció a human progenitor sejtek kolóniaképzését már észrevehetően csökkentette, míg az egér sejtekét nem (1. ábra). Ugyanakkor az 50%-os gátlást kiváltó koncentrációk hasonlóak voltak: az egér GM-CFU progenitorok esetében 3,2 mg/l míg a human GM-CFU progenitor sejtekre vonatkoztatva 2,8 mg/l.

Az 5-fluorocytosin hatását 12,5-100 mg/l dózistartományban tanulmányoztuk az egér csontvelő tenyészetekben, míg a human tenyészetekben 25 mg/l koncentrációig volt lehetőségünk vizsgálatot végezni a csontvelő minták sejttartalma miatt. Az 5-FC a 2,5-

12,5 mg/l dózistartományban nem befolyásolta a kolóniaképzést sem az egér sem a human csontvelő-tenyészetekben. Az egér csontvelőtenyészetekben kapott dózis-hatás görbe párhuzamos az AMB dózis-hatás görbével. Száz mg/l koncentrációtól teljes gátlást tapasztaltunk. Az IC50 érték 31,9 mg/l volt az egér tenyészetekben (1. ábra).



1. ábra: Az amphotericin B és az 5-fluorocytosin hatása a csontvelői sejtek kolóniaképzésére

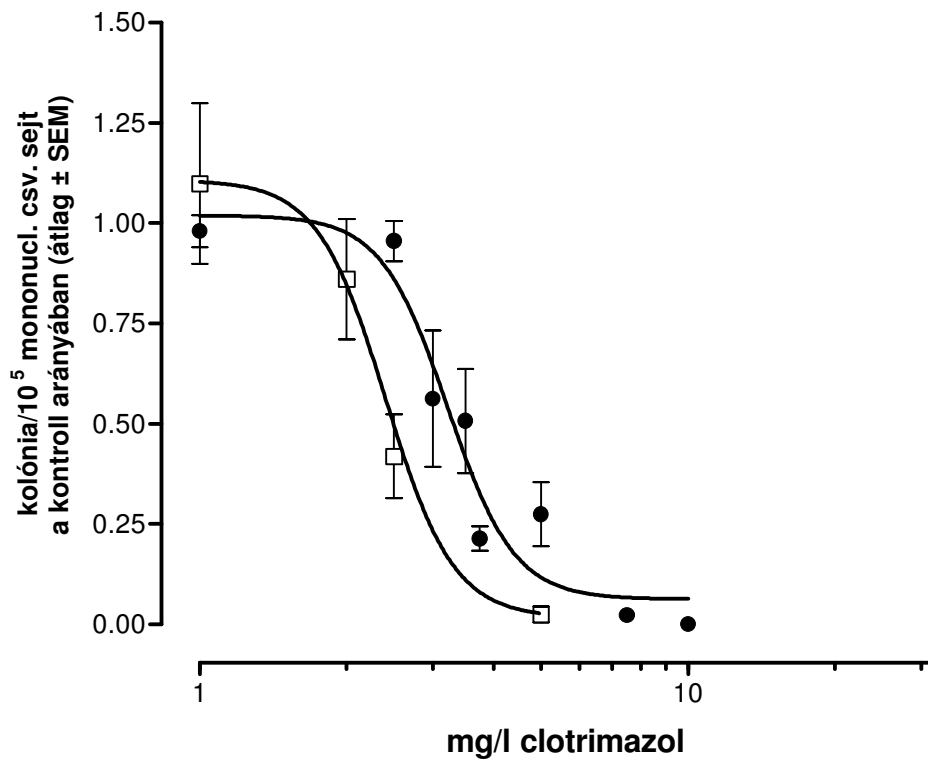
4.1.2. Imidazol antifungális anyagok

Kísérleteinkben öt imidazol-származék esetleges kolóniaképződést gátló hatását tanulmányoztuk. Az általunk vizsgált öt imidazol-származék közül a clotrimazolt, az econazolt és az oxiconazolt lokálisan alkalmazzák. A miconazol infúzióban adva használható szisztémás gombás fertőzésekben. A ketoconazol orálisan is adható és az előbbiekhöz képest viszonylag kevés mellékhatása miatt tartós terápiára is alkalmas. Az indikációs területnek és az alkalmazás módjának megfelelően ezen imidazol-származékok közül a ketoconazol és a miconazol esetleges csontvelő-károsító hatásának lehetne klinikai jelentősége; a clotrimazolt, az econazolt és az oxiconazolt a hasonló kémiai szerkezetű anyagok hatásának összevetése céljából vontuk be kísérleteinkbe. Hatásukat az 1-30 mg/l koncentráció-tartományban vizsgáltuk mind egér, mind human csontvelő-tenyészetekben.

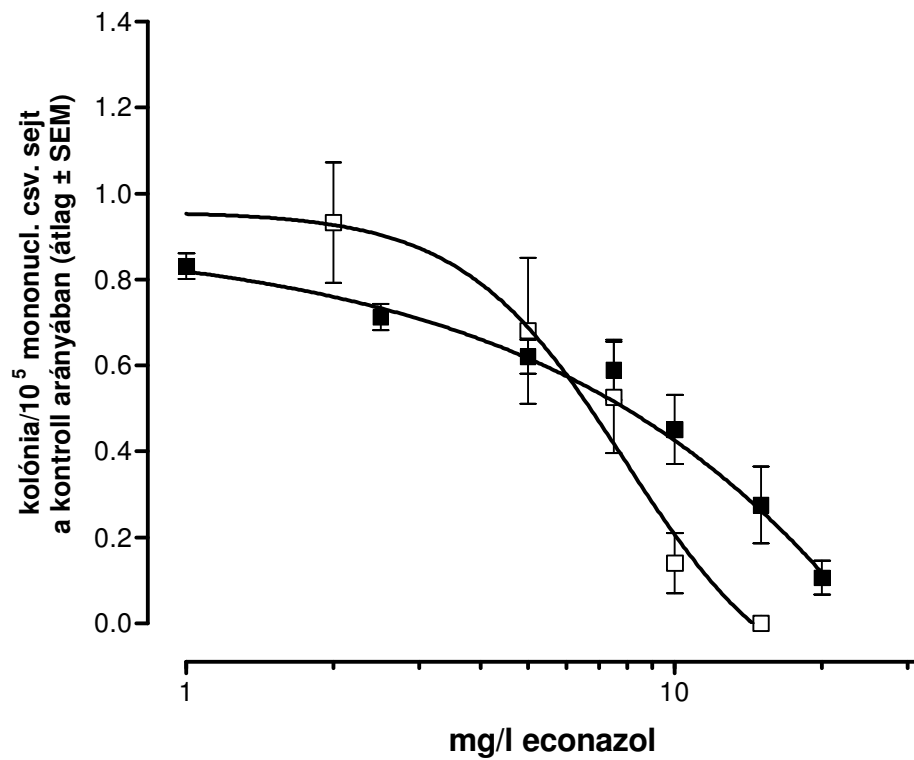
4.1.2.1. Imidazol antifungális anyagok hatása az egér GM-CFU kolóniaképzésére

Az összes vizsgált antifungális imidazol-származék dózistól függően gátolta a csontvelő granulocytá-macrophag progenitor sejtjeinek kolóniaképzését. A legkisebb dózistartományba a clotrimazol gátló hatása esett: már 7,5 mg/l-es koncentrációnál is csak elvétve lehetett kolóniaképződést megfigyelni (2. ábra). A ketoconazol, a miconazol és az oxiconazol esetében ugyanennél a koncentrációnál még a kolóniák 77%-a kifejlődött, az econazol ugyanekkora koncentrációjának jelenlétében pedig 59%-os növekedést észleltünk (3-6. ábra). A dózis-hatás görbék regressziós egyeneseiből számított 50%-os gátló koncentrációk (IC50) 3,5-24 mg/l között szóródtak (2. táblázat).

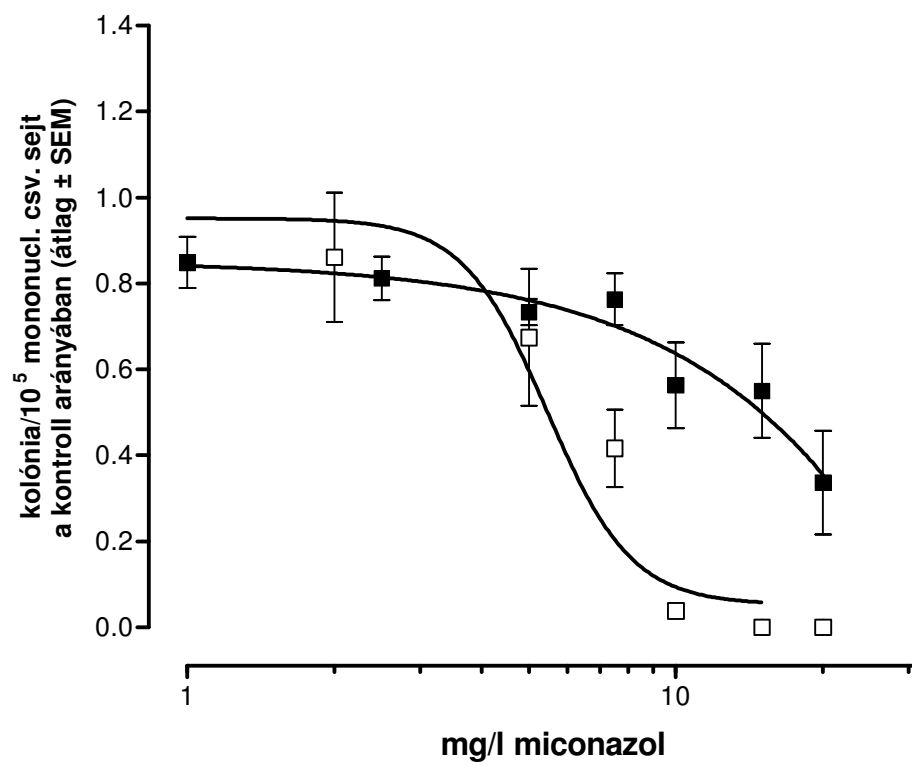
Moláris koncentrációban kifejezve az 50%-os gátláshoz szükséges koncentrációkat felállíthatjuk a potencia sorrendet: clotrimazol > econazol > ketoconazol = miconazol > oxiconazol. A 95%-os gátlást kiváltó koncentrációk alapján hasonló a sorrend, bár a ketoconazol miconazolnál meredekebb dózis-hatás görbéje miatt a két vegyület hatása elvált egymástól (2. táblázat).



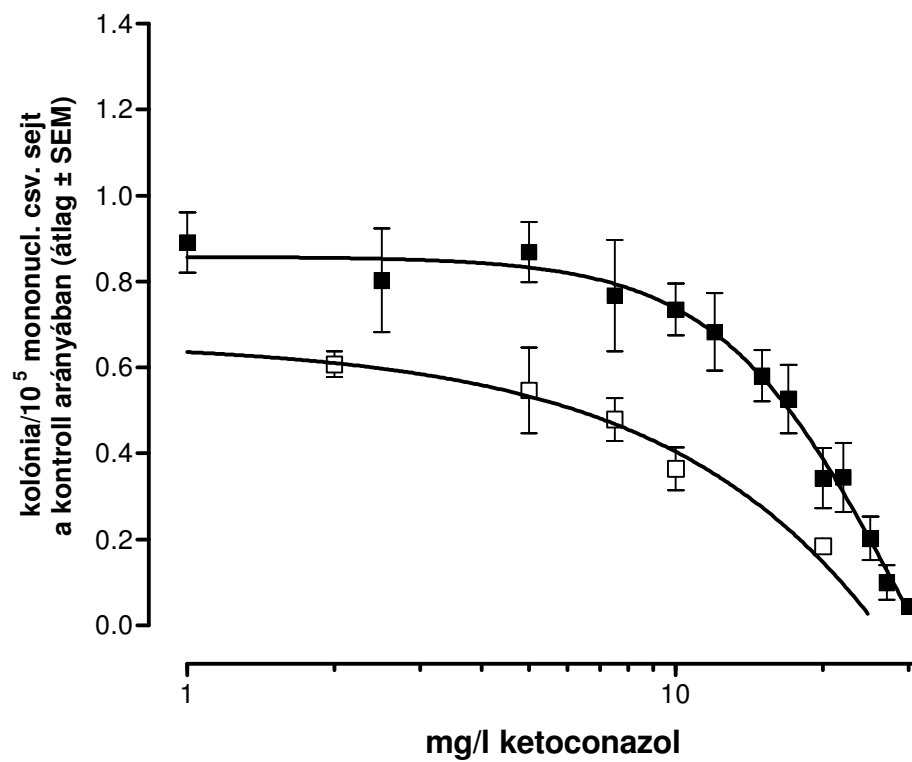
2. ábra *Clotrimazol hatása egér (λ) és human (ρ) csontvelői kolóniaképző sejtekre*



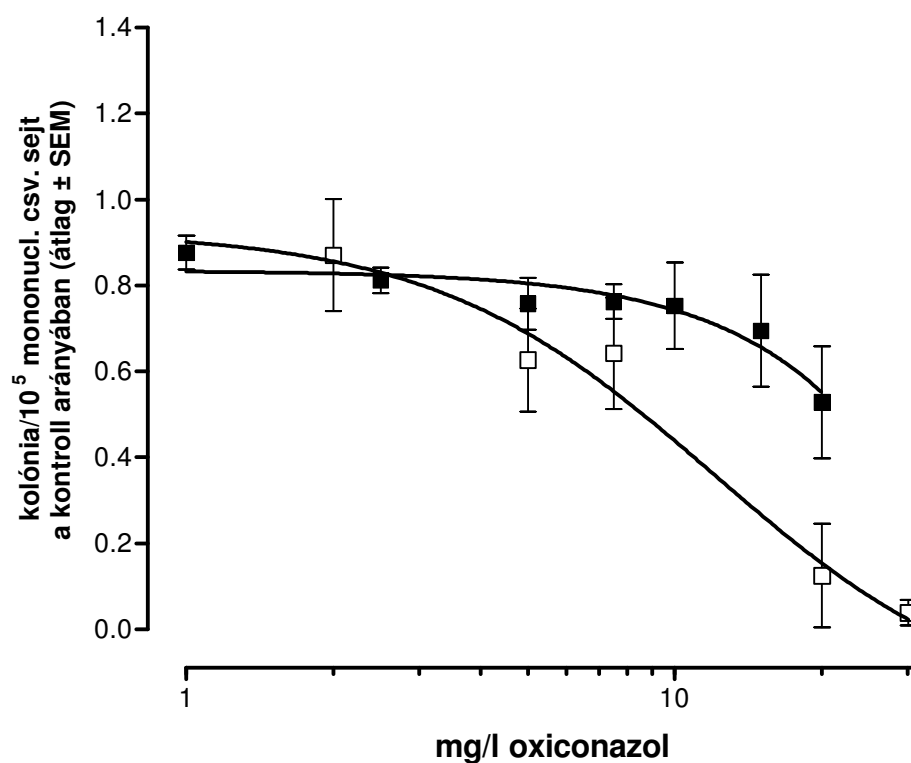
3. ábra *Econazol hatása egér (λ) és human (ρ) csontvelői kolóniaképző sejtekre*



4. ábra *Miconazol hatása egér (λ) és human (ρ) csontvelői kolóniaképző sejtekre*



5. ábra *Ketoconazol hatása egér (λ) és human (ρ) csontvelői kolóniaképző sejtekre*



6. ábra Oxiconazol hatása egér (λ) és human (ρ) csontvelői kolóniaképző sejtekre

2. táblázat: Imidazol antifungális anyagok hatása egér csontvelősejtek kolóniaképzésére

Hatóanyagok	50%-os gátló koncentrációk (IC50)		95%-os gátló koncentrációk (IC95)	
	mg/l	$\mu\text{mol/l}$	mg/l	$\mu\text{mol/l}$
clotrimazol	3,54	10,3	6,5	18,8
econazol	8,07	18,1	26,1	58,6
miconazol	14,0	33,7	69,0	165,8
ketoconazol	16,1	30,3	31,9	60,0
oxiconazol	24,0	48,7	101,4	206,1

4.1.2.2. Imidazol antifungális anyagok hatása a human GM-CFU kolóniaképzésére

Valamennyi vizsgált anyag a human csontvelősejtek tenyésztésében is dózisfüggő módon gátolta a kolóniaképződést (2-6. ábra). Szintén a clotrimazol bizonyult a legtoxikusabbnak. A mólos koncentrációban kifejezett IC₅₀ növekvő értékek alapján a potencia csökkenő sorrendje: clotrimazol>ketoconazol>miconazol>econazol>oxiconazol (3. táblázat).

3. táblázat: *Imidazol antifungális anyagok hatása human csontvelősejtek kolóniaképzésére*

Hatóanyagok	50%-os gátló koncentrációk (IC ₅₀)		95%-os gátló koncentrációk (IC ₉₅)	
	mg/l	μmol/l	mg/l	μmol/l
clotrimazol	2,6	7,5	5,0	14,4
econazol	6,2	13,9	17,1	38,4
miconazol	5,3	12,8	15,0	36,0
ketoconazol	6,3	11,8	33,3	62,7
oxiconazol	8,4	17,0	27,9	56,7

A human progenitor sejtek érzékenyebbnak mutatkoztak az egér GM-CFU sejteknél az imidazol antifungális anyagok gátló hatásával szemben. A dózis-hatás görbék valamennyi esetben balra tolódtak (2-6. ábra). Az IC₅₀ értékek kisebb szóródást mutattak és alacsonyabb koncentráció-tartományba estek: 3,54-24 mg/l az egér ill. 2,58-8,38 mg/l a human GM-CFU esetében (3. táblázat).

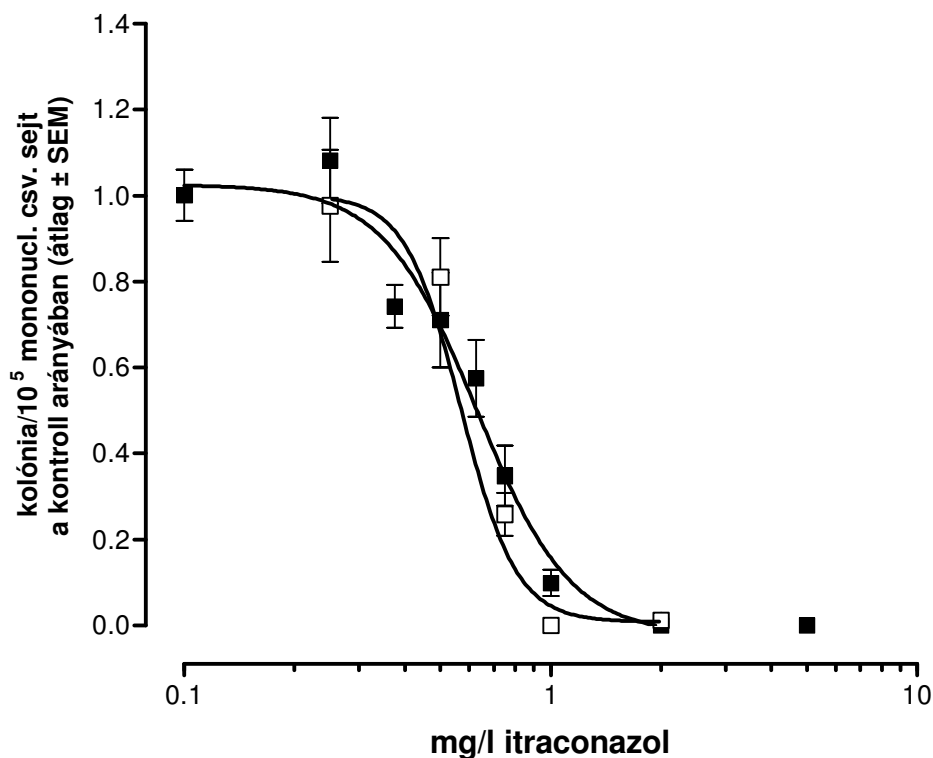
4.1.3. Triazol antifungális anyagok

A triazol antifungális anyagok fejlesztésével jobb terápiás indexű vegyületek létrejötte volt a cél, ezért megvizsgáltuk, hogy az imidazoloknál észlelt toxikus hatás a csontvelő

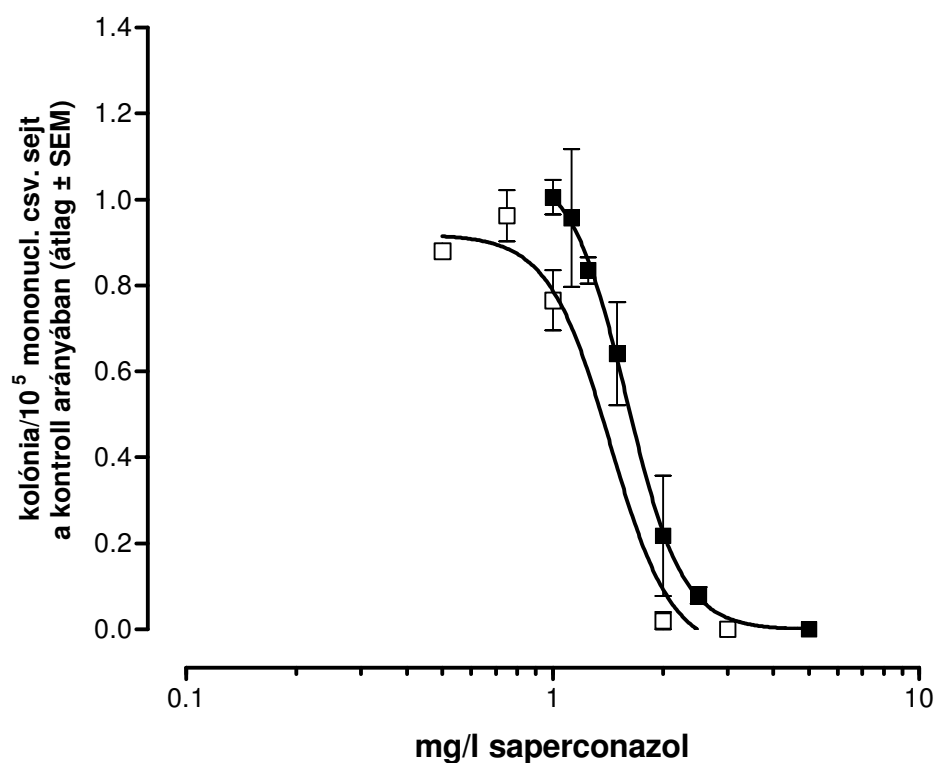
GM-CFU vonatkozásában csökken-e, ha triazol vegyületeket használunk. Három triazol antifungális vegyületet vizsgáltunk, melyek a szisztémás gombás fertőzések kezelése szempontjából szóba jöhető szerek. Az itraconazol és a saperconazol a ketoconazol molekula továbbfejlesztésével nyert vegyületek. A fluconazol más kémiai szerkezetű, az összes eddigi azol származéktól eltérően vízdékony molekula.

4.1.3.1. Triazol antifungális anyagok hatása az egér GM-CFU kolóniaképzésére

Az általunk vizsgált triazol származékok nem viselkedtek egységesen a kolóniaképzés gátlása szempontjából. Az itraconazol és a saperconazol dózisfüggően, meredek dózishatás görbét rajzolva gátolta a vizsgált 1-7,5 mg/l dózis tartományban a kolóniaképződést (7-8. ábra). Ugyanakkor a fluconazol még 100 mg/l koncentrációban sem volt hatással az egér GM-CFU kolóniaképzésére (9. ábra).



7. ábra *Itraconazol hatása egér (λ) és human (ρ) csontvelői kolóniaképző sejtekre*



8. ábra *Saperconazol hatása egér (λ) és human (ρ) csontvelői kolóniaképző sejtekre*

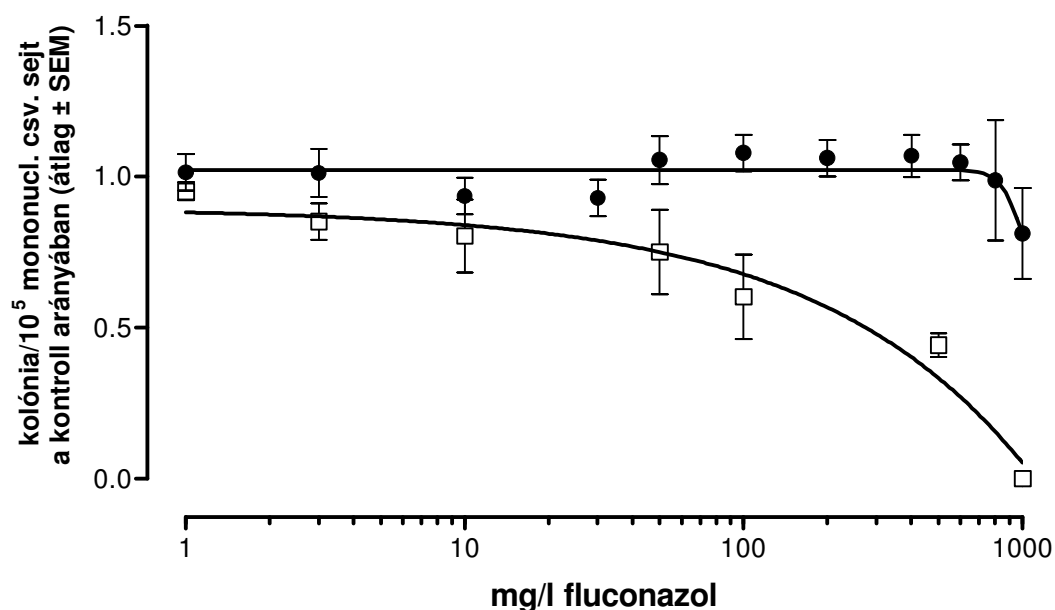
4. táblázat: *Triazol antifungális anyagok hatása egér csontvelősejtek kolóniaképzésére*

Hatóanyagok	50%-os gátló koncentrációk (IC50)		95%-os gátló koncentrációk (IC95)	
	mg/l	μ mol/l	mg/l	μ mol/l
itraconazol	0,60	0,86	1,19	1,69
saperconazol	1,68	2,50	2,49	3,70
fluconazol	>100	>326		

A moláris koncentrációban kifejezett 50%-os gátló koncentrációk összehasonlításával látható, hogy az itraconazol és a saperconazol valamennyi imidazol származéknál toxikusabbnak bizonyult. Még a 95%-os gátlást kiváltó koncentrációik is 2-4-szer nagyobbak a legtoxikusabb imidazol-származék, a clotrimazol 50%-os gátló koncentrációjánál (4. táblázat).

4.1.3.2. Triazol antifungális anyagok hatása a human GM-CFU kolóniaképzésére

A vizsgált dózistartományt 0,25-3,0 mg/l között választottuk meg ill. a fluconazol esetében először 100 mg/l-ig emeltük a tenyészetekben a végkoncentrációt. Az itraconazol és a saperconazol esetében szintén dóziszfüggő, meredek dózis-hatás görbéket kaptunk (7-8. ábra). A legerősebb hatást kifejtő itraconazol esetében hasonló lefutású, mint az egér tenyészetek alapján kapott görbe, a saperconazol esetében balra tolódik.



4. ábra *Fluconazol hatása az egér (λ) és a human (ρ) csontvelői progenitor sejtek kolóniaképzésére*

A fluconazol esetében próbáltuk a dózis-hatás görbe leszálló szakaszát is elérni, így extrém magas koncentrációkig terjesztettük ki a vizsgálatot. Számottevő gátlást nem kaptunk 50 mg/l koncentrációig. Az egér sejtekkel kapott eredményektől eltérően 100 mg/l koncentrációban alkalmazva már kb. 40%-os gátlást lehet tapasztalni. Az egér csontvelőtenyészetekben még 1000 mg/l koncentrációban sem volt számottevő a gátlás. Human csontvelői progenitor sejtek esetében a lassan ereszkedő dózis-hatás görbe alapján a fluconazol 1000 mg/l koncentrációban már megakadályozta a kolóniák képződését (9. ábra).

5. táblázat: *Triazol antifungális anyagok hatása human csontvelősejtek kolóniaképzésére*

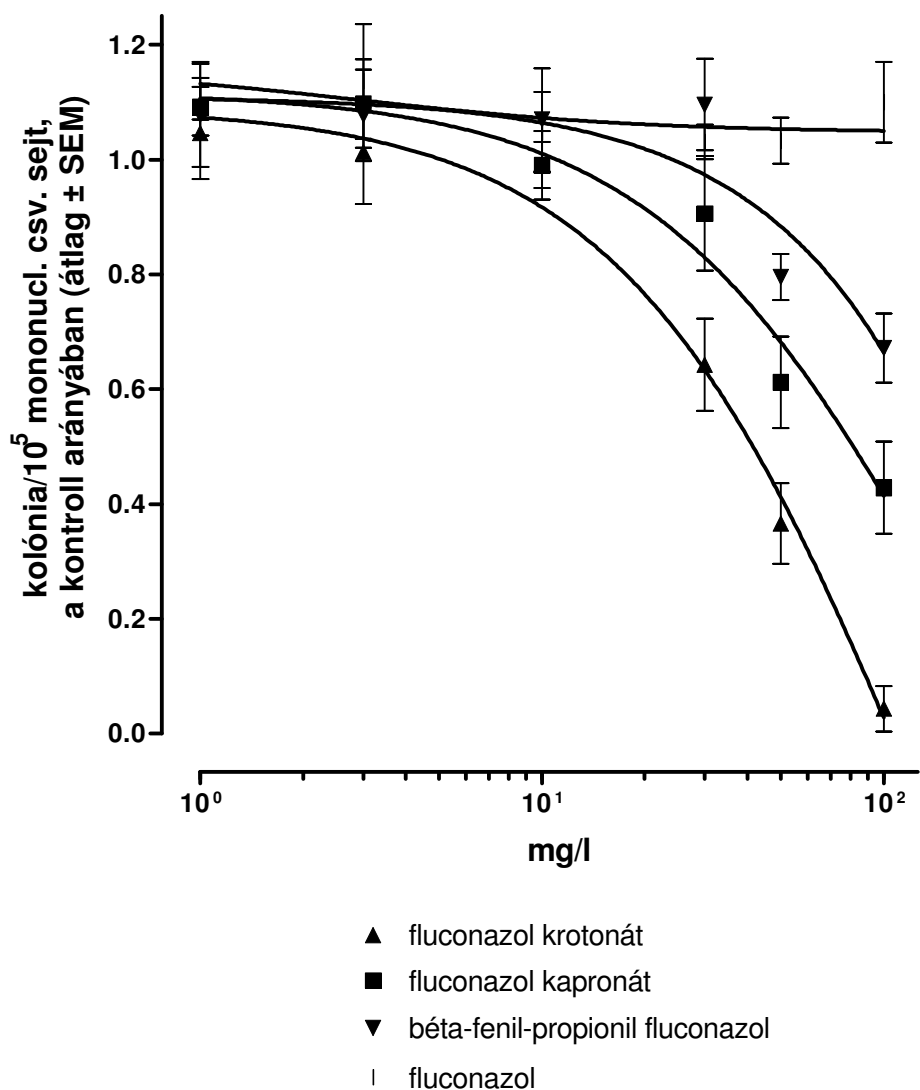
Hatóanyagok	50%-os gátló koncentrációk (IC50)		95%-os gátló koncentrációk (IC95)	
	mg/l	μmol/l	mg/l	μmol/l
itraconazol	0,55	0,78	1,05	1,49
saperconazol	1,24	1,85	1,97	2,93
fluconazol	202	660	839	2742

A triazolok IC50 értékei alapján felállítható potencia sorrendje hasonló az egér progenitor sejtekkel kapotthoz: itraconazol>saperconazol>>fluconazol. Az itraconazol 1 mg/l-es koncentrációban már teljes gátlást okozott, a saperconazol 3 mg/l koncentrációban. Ugyanakkor a fluconazol csak három nagyságrenddel nagyobb, 1000 mg/l dózisban alkalmazva eredményezett teljes gátlást a kolónia növekedésben (5. táblázat).

4.1.3.3. Fluconazol-származékok hatása a GM-CFU sejtek kolóniaképzésére

A fluconazol toxicitása a GM-CFU kolóniaképzése szempontjából jelentősen kedvezőbb

volt a többi azol-származéknál. Ezért az MTA Központi Kémiai Kutató Intézetében fluconazolból kiindulva észterszármazékokat állítottak elő a megfelelő antifungális hatás és a hasonlóan kedvező toxicitás reményében. Munkacsoportunk az egér csontvelői progenitor sejtek kolóniaképzésére gyakorolt gátló hatást vizsgálta a fenil-propionillal, a krotonsavval és a kapronsavval képzett észterszármazékok esetében. Az anyagokat 1-100 mg/l dózis-tartományban vizsgáltuk.



10. ábra *Fluconazol származékok hatása egér csontvelői progenitor sejtekre*

Kiderült, hogy mindhárom származék különböző mértékben, de dóziszfüggően gátolta a kolóniaképzést, míg az anyavegyület a fluconazol jelenléte nem zavarta azt (10. ábra). A vizsgált származékokban az észterifikálásban résztvevő savak hatását külön-külön ugyancsak 1-100 mg/l dózistartományban megvizsgálva nem találtunk egyik esetben sem számottevő gátlást.

6. táblázat: *Fluconazol származékok hatása egér csontvelősejtek kolóniaképzésére*

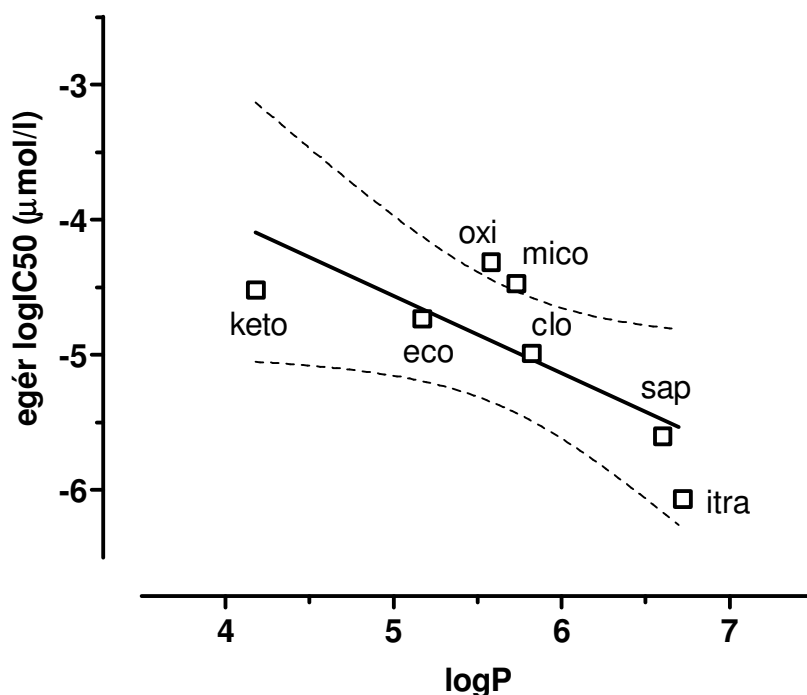
Hatóanyagok	50%-os gátló koncentrációk (IC50)		95%-os gátló koncentrációk (IC95)	
	mg/l	μmol/l	mg/l	μmol/l
fluconazol	>1000	>3265		
β-fenil-propionil-fluconazol	> 100	> 200		
fluconazol kapronát	78,0	163,0	248,2	518,9
fluconazol krotonát	38,2	85,3	105,2	235,2

A potencia sorrend: fluconazol krotonát > fluconazol kapronát > β-fenil-propionil-fluconazol (6. táblázat). A legerősebb hatást kiváltó fluconazol krotonát hatékonysága is 2x kisebb, mint a leggyengébb hatást mutató imidazol-származék, az oxiconazol potenciája.

4.1.4. Azol antifungális anyagok GM-CFU-ra gyakorolt toxikus hatása és logP értékeik közötti összefüggés

Mint láttuk, a vízdékony fluconazol vizsgált lipophil származékai jóval toxikusabbak voltak az anyavegyületnél. Mivel külön-külön az észterifikálásban szereplő savak aequimoláris dózisa nem befolyásolták a kolóniaképzést, felvetődött a gyanú, hogy a lipophilitásnak szerepe lehet a kolónianövekedés gátlásában.

A vegyületek lipophilitásának számszerű jellemzésére az octanol/víz megoszlási hányadosuk logaritmusát ($\log P$) használatos. Az általunk vizsgált antifungális azol-származékok $\log P$ értékeit szerkezeti képletük alapján Ghose-Crippen számítógépes program segítségével számítottuk ki. Az azol antifungális vegyületek lipophilitását jellemző $\log P$ értékek és a kolóniaképzést gátló hatásukat jellemző $\log IC_{50}$ értékek közötti korrelációt tanulmányoztuk.



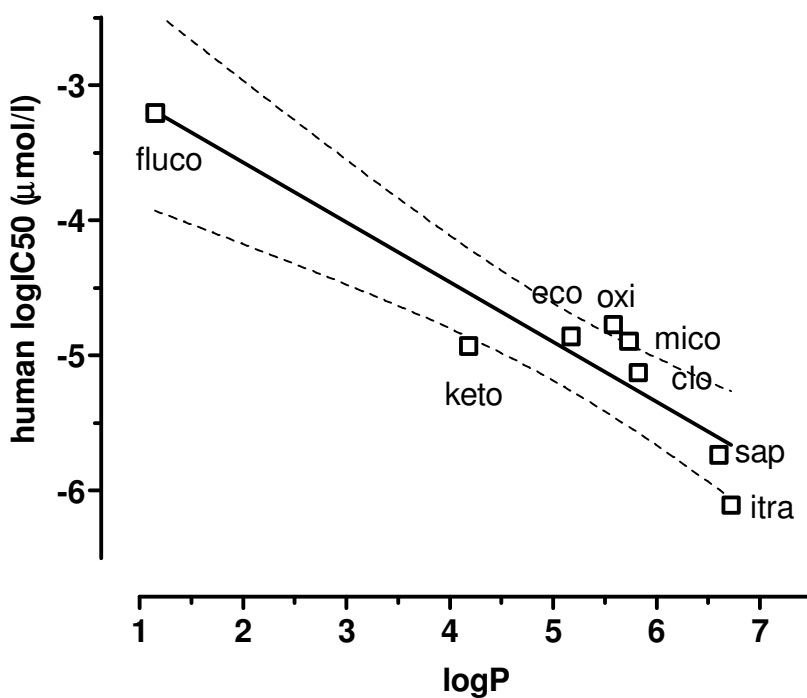
keto: ketoconazol, eco: econazol, oxi: oxiconazol, mico: miconazol, clo: clotrimazol, sap: saperconazol, itra: itraconazol

A lineáris regressziós egyenes melletti szaggatott vonalak a 95%-os konfidencia intervallumot jelölik.

11. ábra *Azol-származékok lipophilitása és kolóniaképzést gátló hatása közötti összefüggés egér GM-CFU esetében*

A $\log IC_{50}$ és $\log P$ értékek közötti korrelációs koefficiens, $r = 0,7608$ az egér sejtek

esetében (11. ábra). A human sejttenyészetekben a fluconazol adatai is felhasználhatók voltak ($r = 0,9328$; 12. ábra). Ez azt jelenti, hogy mind az egér, mind a human csontvelő esetében a GM-CFU kolóniaképzését gátló hatás részben a vegyületek lipophilitásával függ össze.



fluco: fluconazol, keto: ketoconazol, eco: econazol, oxi: oxiconazol, mico: miconazol, clo: clotrimazol, sap: saperconazol, itra: itraconazol

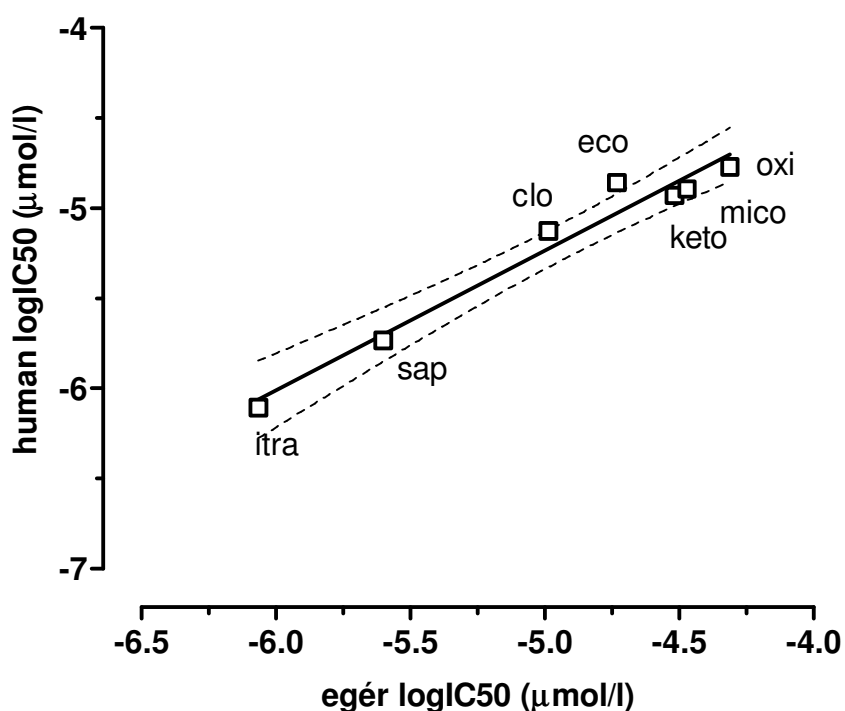
A lineáris regressziós egyenes melletti szaggatott vonalak a 95%-os konfidencia intervallumot jelölik.

12. ábra *Azol-származékok lipophilitása és kolóniaképzést gátló hatása közötti összefüggés human GM-CFU esetében*

4.1.5. Azol antifungális anyagok hatásának összehasonlítása az egér és a human csontvelőtenyészetekben

A gyógyszerfejlesztés számára mindig fontos kérdés, mennyire alkalmasak az

állatkísérletes adatok a human sejtekre gyakorolt hatások előrejelzésére. Ezért vizsgáltuk az egér csontvelőtenyészetek alapján mért adatok prediktív erejét a human sejt-toxicitás szempontjából. Igen szoros és szignifikáns korrelációt sikerült kimutatni az egér és a human progenitor sejtekre gyakorolt gátló hatást jellemző logIC50 értékek között ($r = 0,9822$; $P < 0,001$; 13. ábra).



itra: itraconazol, sap: saperconazol, clo: clotrimazol, eco: econazol, keto: ketoconazol,
mico: miconazol, oxi: oxiconazol

A lineáris regressziós egyenes melletti szaggatott vonalak a 95%-os konfidencia intervallumot jelölik.

13. ábra *Azol antifungdis anyagok human és egér csontvelő lágy-gél tenyészeiben kapott logIC50 értékeinek korrelációja*

A “leave-one-out” módszert alkalmazva, ha a regressziószámításból a hét anyag közül rendre az egyik IC50 értékét kihagyjuk, a többi 6 anyag adataiból számított regresszióból és a kihagyott anyag egér csontvelőtenyészetben mért IC50 értékéből számított, human

csontvelőtenyészetekre vonatkozó IC50 érték öt anyag esetében $\leq 20\%$ -os eltérést mutatott a kísérletileg mért értéktől (kivételek: clotrimazol 31%; econazol 62%; 7. táblázat).

7. táblázat *Az azol antifungális anyagok számított és mért human IC50 értékei*

anyagok	mért IC50 (μM)		sámított*	korrelációs	mért IC50 /	eltérés (%)
	egér	human	IC50 (μM)	koefficiens**	sámított IC50	
			human	n = 6	arány	
clotrimazol	10,3	7,5	5,72	0,9853	1,31	+31
econazol	18,1	13,9	8,55	0,9928	1,62	+62
miconazol	33,7	12,8	15,67	0,9822	0,82	-18
ketoconazol	30,3	11,8	14,37	0,9825	0,82	-18
oxiconazol	48,7	17,0	21,28	0,9810	0,80	-20
itraconazol	0,86	0,784	0,97	0,9575	0,81	-19
saperconazol	2,50	1,85	2,04	0,9773	0,91	- 9

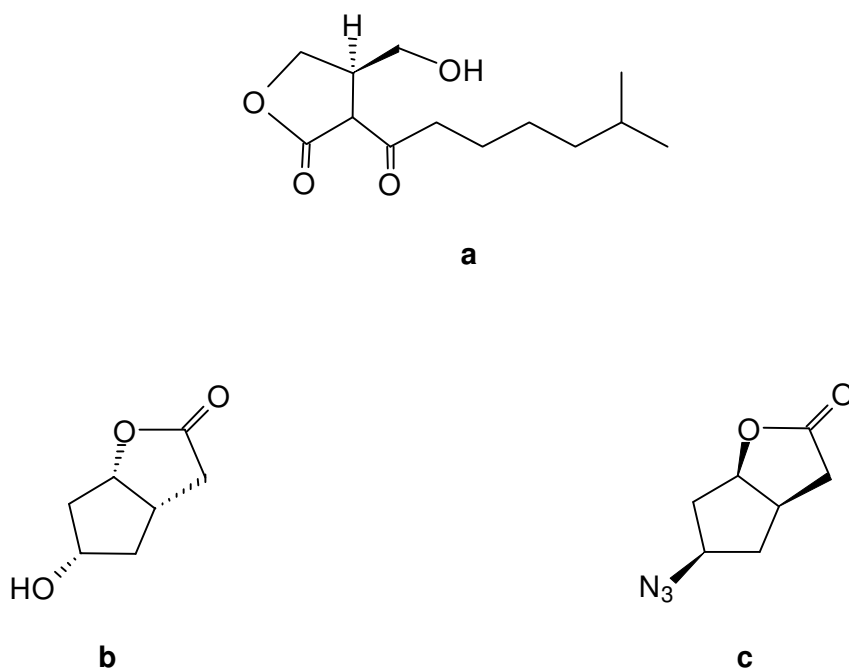
* A számított IC50 értékek meghatározását l. a szövegben.

** A human és egér logIC50 értékekből az adott sorban jelzett anyag adatainak kihagyásával számított korrelációs koefficiens (r)

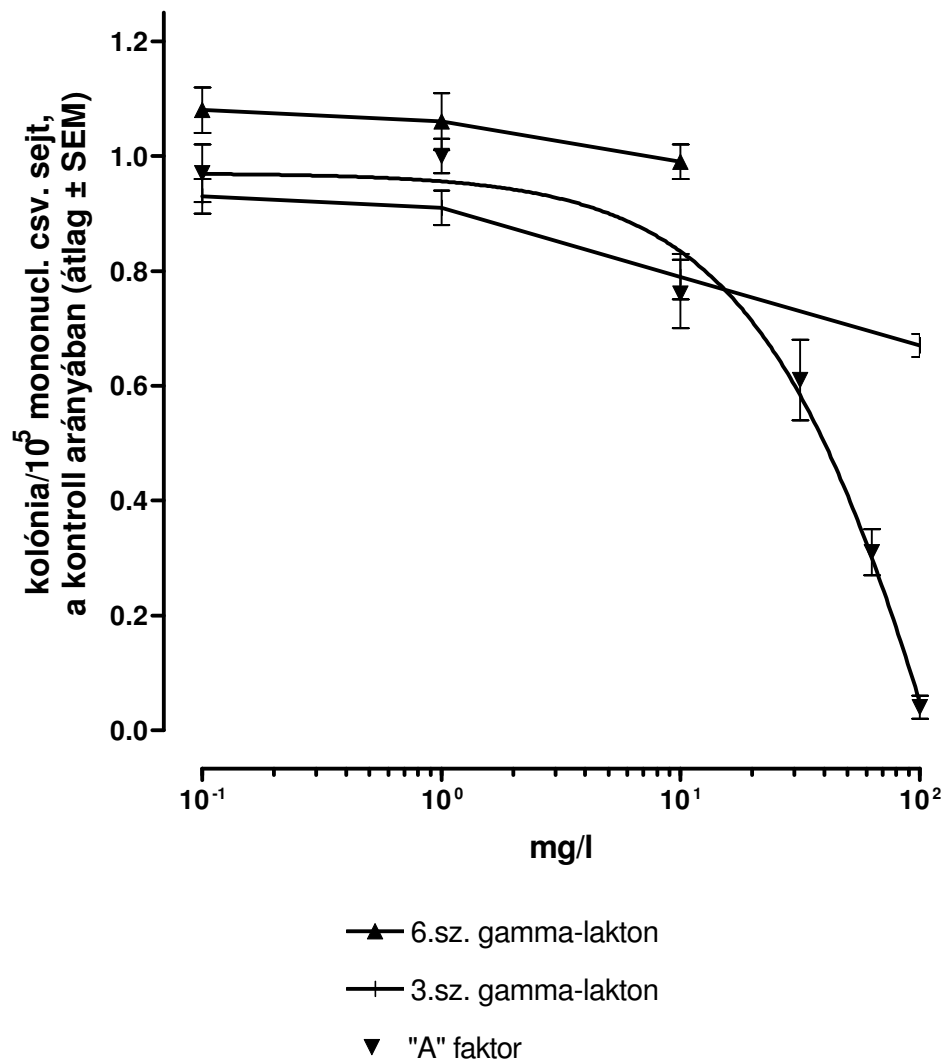
4.2. ÚJ β -LAKTAMÁZ-GÁTLÓ VEGYÜLETEK HATÁSA A CSONTVELŐSEJTEK IN VITRO KOLÓNIAKÉPZÉSÉRE

Intézetünk β -laktám antibiotikumokkal kombinációban alkalmazható, új β -laktamáz-gátló vegyületek keresésére irányuló erőfeszítéseinek eredménye néhány ilyen hatással rendelkező molekula kiszûrése volt. Mivel a neutropeniás betegek kezelésében alkalmazott antibiotikumok és enzimgátló vegyületek csontvelői GM-CFU progenitor sejteket károsító hatása kedvezőtlenül befolyásolhatja a leendő betegek állapotát, úgy gondoltuk, érdemes a gyógyszerfejlesztés e korai szakában megvizsgálnunk, van-e hatása az új vegyületeknek a GM-CFU kolóniaképzésére.

A fentebb említett vegyületek γ -lakton származékok voltak, anyavegyületük a *Streptomyces griseus* gomba egyik szabályozó molekulája, az „A” faktor volt (14. ábra). Az egér csontvelőtenyészetekben az „A” faktor jelentősen gátolta a GM-CFU progenitor sejtek kolóniaképzését. Az 50%-os gátláshoz szükséges koncentráció 38 mg/l volt. Ugyanakkor a vizsgált származékok hasonló dózistartományban nem befolyásolták számottevően a kolóniaképzést (15. ábra).



14. ábra Az A-faktor (a), a 3.sz. γ -lakton (b) és a 6.sz. γ -lakton (c) szerkezeti képlete



15. ábra *Gamma-lakton származékok hatása az egér csontvelő kolóniaképzésére*

4.3. MYELOPOETIKUS ÉS PLEIOTROP CITOKINEK HATÁSA AKUT LYMPHOID LEUKEMIÁS GYERMEKEK BLAST SEJTJEINEK KOLÓNIÁKÉPZÉSÉRE

Közismert, hogy a citosztatikumok csontvelő károsító hatása gyakran okoz neutropeniát. A fatális kimenetelű fertőzésekre hajlamosító immundeficiens időszakot a myelopoiesist serkentő citokinek használatával szeretnék megrövidíteni, és így csökkenteni a fertőzéses

szövődményeket. Myeloid leukemiákban óvatosságra intenek klinikai használatukkal kapcsolatban, hiszen számos kísérleti és klinikai adat mutat arra, hogy a kóros myeloid sejtek proliferációját is serkenthetik. Kísérleteinkkel azt vizsgáltuk, vajon a lymphoid eredetű leukemiák esetében valóban nincs-e hasonló veszély.

A Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségügyi Centrumának Gyermekklinikáján akut leukemia gyanúja miatt az esetleges kezelés megkezdése előtt történt diagnosztikus csontvelő punkcióból megfelelő mennyiség esetén citokin érzékenységet vizsgáló csontvelőtenyészeteket indítottunk. Az öt éven át tartó vizsgálat sorozat alatt a betegek közül 13 bizonyult akut lymphoid leukemiásnak, az ő vizsgálati eredményeiket használtuk fel az értékeléshez.

4.3.1. Betegek

Mind a tizenhárom beteg akut lymphoid leukémia L₁ ill. L₂ típusába tartozott a FAB klasszifikáció szerint (9. táblázat). Kilencnek (No. 1-9) közösleges ALL (cALL) betegsége volt, melyet CD10 pozitivitással együtt jelentkező B sejt markerek (CD19, 20, 22) jeleztek a felszíni immunglobulinok jelenléte nélkül.

Három beteg (No. 7-9) leukemiás sejtjei ezenkívül az őssejtek jellemzőjének tartott CD34 pozitivitást is mutatott (cALL/CD34+). Myeloid markerekkel koexpresszió volt látható két további betegünkénél (My+ALL). A 10. számmal jelölt betegnél CD13 és CD34, a 11. számú betegnél CD13, CD33 és CD34 pozitivitást találtunk a B sejtjes markerek mellett. Két betegnél (No. 12, 13) leukemiás sejtjeik jellemzői alapján korai T-ALL diagnózist lehetett felállítani. Mindkettejükénél (cy)CD3, CD5, CD7 ill. a 13. betegnél még CD8 pozitívitas utalt erre (8. és 9. táblázat).

Az ALL-BFM-95 protokoll szerint kezelt betegek közül a magas rizikófaktorú csoportba kerülő két beteg (No. 12, 13) a protokoll megfelelő ága szerinti profilaktikus G-CSF kezelésben részesült. Bár a G-CSF kezelés közben betegségre utaló tüneteket nem lehetett észlelni, a 13. betegnél 3 hónappal később a fenntartó kezelés alatt relapsus

alakult ki. Az 1. sz. beteg esetében lázas neutropenia miatt került sor G-CSF adására a leukemia ellenes indukciós kezelés 16-23. napja között, aki ennek ellenére a 23. napon sepsis és súlyos pseudomembranosus enterocolitis miatt meghalt. A 15. napon vizsgált csontvelő minta aplastikus képet mutatott, mely a boncolás alkalmával leukemias lymphoblastokkal infiltrált volt.

8. táblázat *A vizsgált betegek adatai*

No.	Nem	Életkor	Diagnózis	Karyotípus
1.	fiú	3 év	cALL- L ₁	sikertelen
2.	lány	7 év	cALL-L ₁	46,XX, t(9,22)(q34;q11)
3.	fiú	7 hónap	cALL-L ₁	46,XY, add(1p)
4.	fiú	19 hónap	cALL-L ₁	sikertelen
5.	fiú	7 év	cALL-L ₂	sikertelen
6.	fiú	5 év	cALL-L ₂	46,XY/44XY-1,-7,-12,-17,-18,-19, + mar1,+mar2,+mar3,+mar4
7.	lány	7 év	cALL-L ₁ /CD34+	46,XX
8.	lány	10 év	cALL-L ₁ /CD34+	46,XX/46,XX, del(12p)
9.	fiú	7 év	cALL-L ₁ /CD34+	46,XY/54-55XY+4,+6,+8,+10, +14,+17,+21,+22
10.	fiú	13 év	My+ALL-L ₁	46,XY, del(11)(q23)
11.	fiú	9 év	My+ALL-L ₂	46,XY
12.	fiú	13 év	T-ALL-L ₂	46,XY/46XY,del(11)(q23),del(4q)
13.	fiú	7 év	T-ALL-L ₂	46XY, add(1q), t(11;17)(p13;p13)

9. táblázat: A vizsgált akut lymphoid leukemiás gyermekek leukemiás sejtjeinek immunfenotípusa

Betegek No.	Nem sejtvonal specifikus			B-sejtvonal specifikus			T-sejtvonal specifikus					Myeloid asszociált		
	CD34	HLA-DR	CD10	CD19	CD20	CD22	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8	CD13	CD14	CD33
1.	1	82	72	80	30	80	14	10	ND	16	6	3	1	1
2.	11	26	27	57	18	23	6	3	10	7	3	16	2	20
3.	3	0	55	69	12	ND	2	2	11	11	1	2	1	3
4.	1	12	34	34	14	ND	2	1	1	1	2	1	1	4
5.	1	43	30	39	33	37	19	10	19	23	9	10	7	9
6.	ND	38	32	35	40	ND	49	24	ND	25	16	2	3	2
7.	26	77	67	75	6	32	16	10	23	19	9	2	1	3
8.	78	78	51	83	1	8	3	1	3	2	2	2	0	1
9.	22	18	25	29	7	ND	33	13	ND	35	ND	4	ND	3
10.	73	95	64	82	5	70	18	6	19	11	12	45	1	0
11.	30	38	37	37	6	41	8	1	13	11	2	31	1	49
12.	ND	1	ND	2	1	ND	ND	6	93	94	2	1	ND	1
13.	9	16	92	1	6	1	4	1	97	98	97	1	0	1

A flow cytometriásan meghatározott antigén expressziót mutató sejtek a vizsgált sejtek %-ában vannak a táblázatban feltüntetve.

Ha a sejtek több mint 20%-ában a fluoreszcencia intenzitása meghaladja az izotópiás kontrollét, a mintát az adott antigénre nézve pozitívnak tekintettük, és ezt az adatok félkövér szedésével jelöltük.

4.3.2. ALL-es blast sejtek kolóniaképzése szemiszolíd táptalajban

A vizsgált 13 akut lymphoid leukemiás gyermek közül három csontvelő mintáinak blast sejtjei képeztek *in vitro* tenyésztési rendszerünkben spontán, exogen kolónia stimuláló faktor forrás nélkül kolóniákat. A kolóniákat alkotó sejteket *in situ* és citospin preparátumokban tovább vizsgáltuk. MGG festéssel jól látható volt a blastokra jellemző morfológia és citokémiai reakciókkal bizonyítható volt a sejtek lymphoid eredete. PAS pozitívnak bizonyultak a cALL, cALL/CD34+ és a My+ALL mintákban és AP pozitívnak a T-ALL-es esetekben. Ugyanakkor az MPO, SB és ANAE reakciók negatív eredményt adtak. Egyedül a 4. sz. beteg esetében tapasztaltuk, hogy a CFU-L kolóniák mellett GM-CFU kolóniák is kialakultak. A párhuzamos tenyészetekből készült preparátumokban a kolóniák 38-43%-a nem blast sejteket tartalmazott. A táblázatokban csak a CFU-L kolóniákat tüntettük fel. Összehasonlítva az egészségesnek bizonyult gyermekek normál csontvelői sejteket tartalmazó tenyészetével láthatjuk, hogy spontán kolóniaképzés nem észlelhető az utóbbiak esetében. A három spontán kolóniaképzést mutató esetben 2×10^5 csontvelői mononuclearis sejt leoltásával 6-39 kolónia nőtt a tenyészetekben (10. táblázat).

Konvencionális kolónia stimuláló forrást alkalmazva, mely a phytohemagglutininnel stimulált human mononuclearis leukocyták felülúszójából készített kondicionált medium volt, a reagálók aránya megfordult: 10/13 gyerek csontvelői blast sejtjei képeztek kolóniákat PHA-LCM hatására. A kolóniaképző sejtek aránya a normál csontvelői mintákhoz viszonyítva kevesebb, de a szórás nagy volt, 3-74 között volt a 2×10^5 mononuclearis sejtől képződő kolóniák száma. A kolóniákat alkotó sejtek MGG és citokémiai reakciókkal az előzőekhez hasonlóan blastoknak bizonyultak.

10. táblázat *ALL-es gyermekek csontvelői sejtjeinek kolóniaképzése*

Betegek		CFU-L kolóniák/2x10⁵ csv. sejt (a párhuzamos tenyészetek átlagai)	
No.	Diagnózis	Exogen CSF nélkül	PHA-LCM (0,1:1,0)
1.	cALL	0	13,7
2.	cALL	8,3	74,0
3.	cALL	0	3,3
4.	cALL	39,0	63,0
5.	cALL	0	12,7
6.	cALL	0	7,0
7.	cALL/CD34+	1,2	9,6
8.	cALL/CD34+	0,3	41,5
9.	cALL/CD34+	0,3	0,5
10.	My+ALL	0	0
11.	My+ALL	6,0	51,0
12.	T-ALL	0	0
13.	T-ALL	0	13,3
átlag±SEM		4,3±3,0	22,2±7,2
median		0	12,7
egészséges gyerekek (n=7)		GM-CFU/2x10⁵ csv sejt	
átlag±SEM		0,5±0,2	69,0±12,7
median		0,7	75

CFU-L=leukemiás kolónia képző sejt; a kolóniaképzéssel reagálókat félkövér szedéssel jelöltük

4.3.3. Kolónia stimuláló faktorok hatása az ALL-es blast sejtek kolóniaképzésére

A recombinans human kolónia stimuláló faktorok hatását széles dózistartományban vizsgáltuk, mivel nem álltak rendelkezésre az irodalomból a várható dózis-hatás görbékre vonatkozó adatok. Eddig nem volt olyan közlemény, ami más citokin forrást nem használva az általunk vizsgált CSF-ek aktív kolónia képző hatását bizonyította volna lymphoid leukemiás sejteken. Így a G-CSF esetében 30-3000, a GM-CSF és az SCF esetében 10-1000 µg/l koncentráció tartományt választottunk. Ebben a tartományban 10/13 gyermek csontvelői mintái esetében észleltünk mind a három CSF-nél valamilyen

mértékû kolóniaképzést stimuláló hatást (11. táblázat, 17-19. ábra).

11. táblázat *Kolónia stimuláló faktorok hatása az ALL-es gyermekek csontvelősejtjeinek kolóniaképzésére*

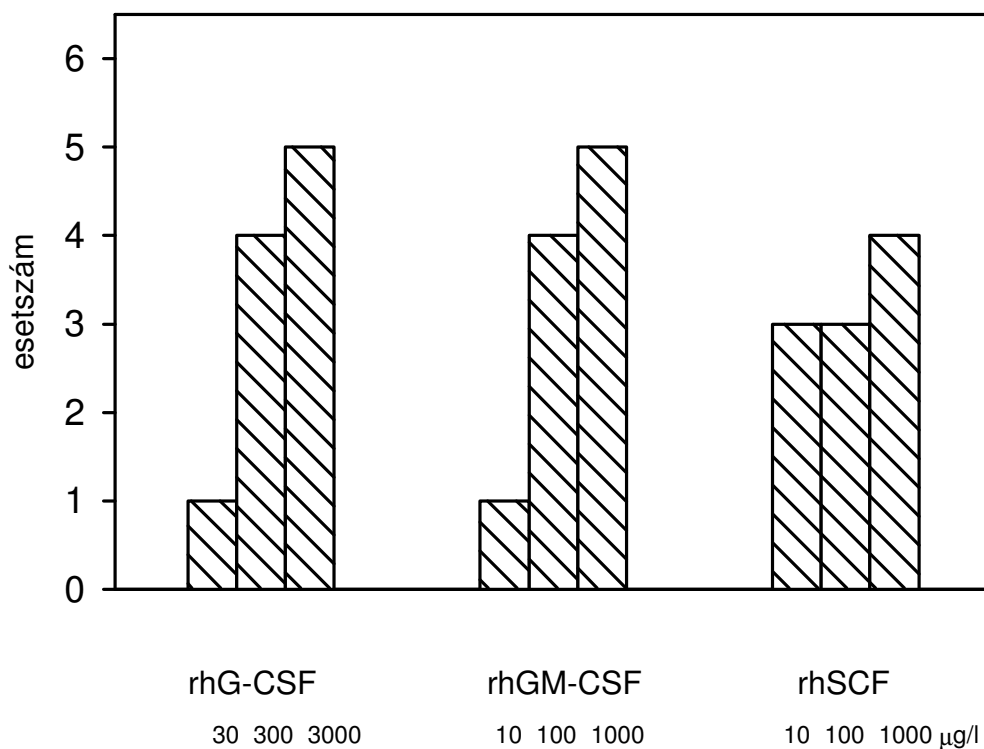
Betegek		CFU-L kolóniák/2x10⁵ csv. sejt		
No.	Diagnózis	(a párhuzamos tenyészetek átlagai)		
		rhG-CSF	rhGM-CSF	rhSCF
		30-3000 µg/l	10-1000 µg/l	10-1000 µg/l
1.	cALL	13,7	7,7	3,7
2.	cALL	91,3	55,0	108,0
3.	cALL	11,6	3,5	18,5
4.	cALL	40,0	23,5	97,0
5.	cALL	24,2	34,6	8,2
6.	cALL	0	0	14,5
7.	cALL/CD34+	19,6	16,4	13,6
8.	cALL/CD34+	44,0	11,5	63,6
9.	cALL/CD34+	6,5	2,3	0,3
10.	My+ALL	1,3	0,6	0
11.	My+ALL	62,0	33,0	36,0
12.	T-ALL	0	0	0
13.	T-ALL	15,0	2,6	8,5
átlag±SEM		25,3±7.57	14,6±4,77	28,6±10,3
median		15,0	7,75	13,6
egészséges gyerekek (n=4-8)		GM-CFU/2x10⁵ csv sejt		
átlag±SEM		96,1±32.4	105±27.7	46,8±18.2
median		77,7	88,7	42

CFU-L=leukemiás kolónia képző sejt; az rhG-CSF, rhGM-CSF és rhSCF maximális stimulációt kiváltó koncentrációi hatására nőtt kolóniák számát tüntettük fel a táblázatban; a kolóniaképzéssel reagálókat vastag szedéssel jelöltük

A kolóniákat alkotó sejtek MGG és citokémiai reakciókkal, hasonlóan az előzőekhez, blastoknak bizonyultak. A 4.sz. beteg esetében az rhCSF-ek alkalmazása során is észleltünk 31-34% közötti arányban GM-CFU kolóniákat, melyeket a táblázatban és az

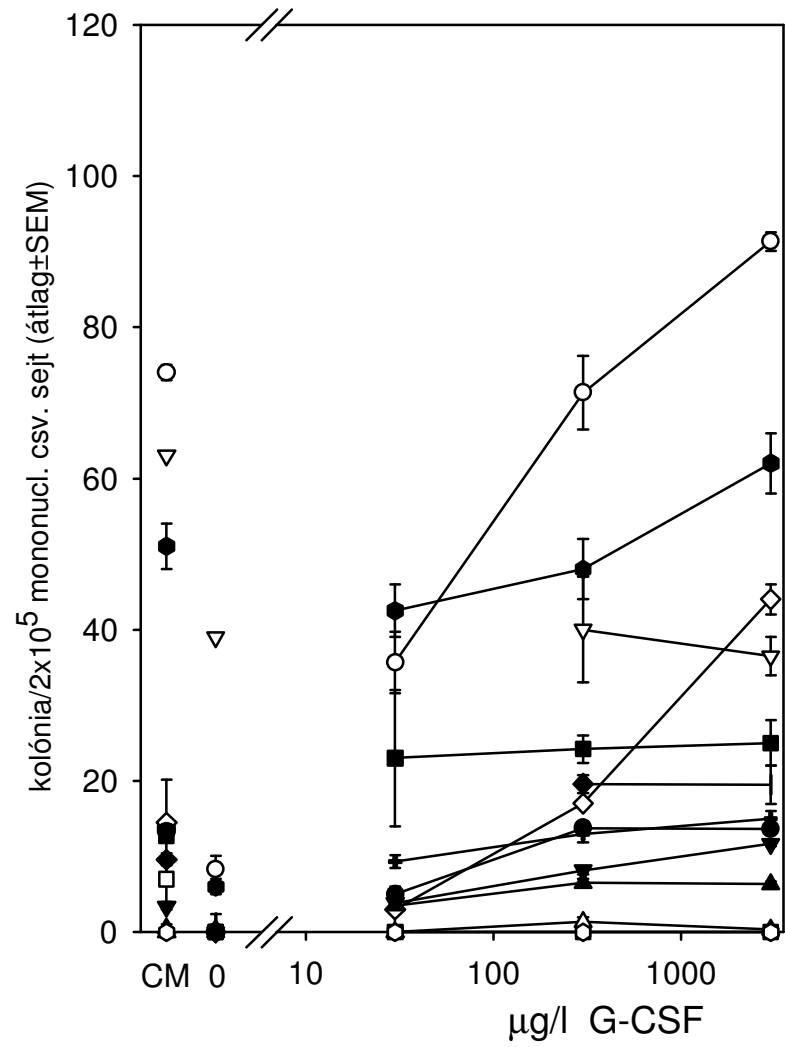
ábrákon nem tüntettünk fel.

Néhány betegnél már a legkisebb alkalmazott koncentráció maximális választ váltott ki a képződött kolóniák számának átlagát tekintve, míg más esetekben a legnagyobb koncentráció volt ehhez szükséges (16. ábra).

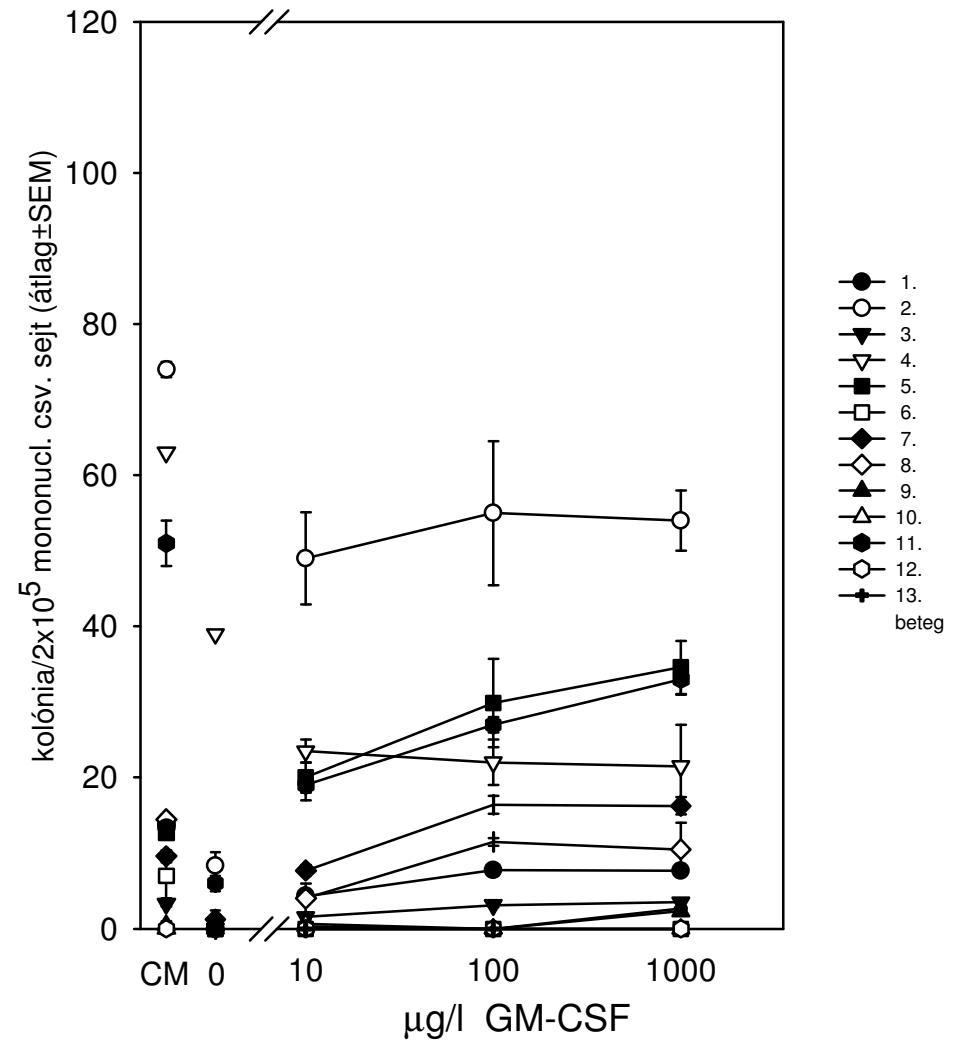


Az oszlopok az adott kolónia stimuláló faktor dózisa maximális kolóniaképzéssel reagáló betegek számát jelzik a 10 reagáló beteg közül.

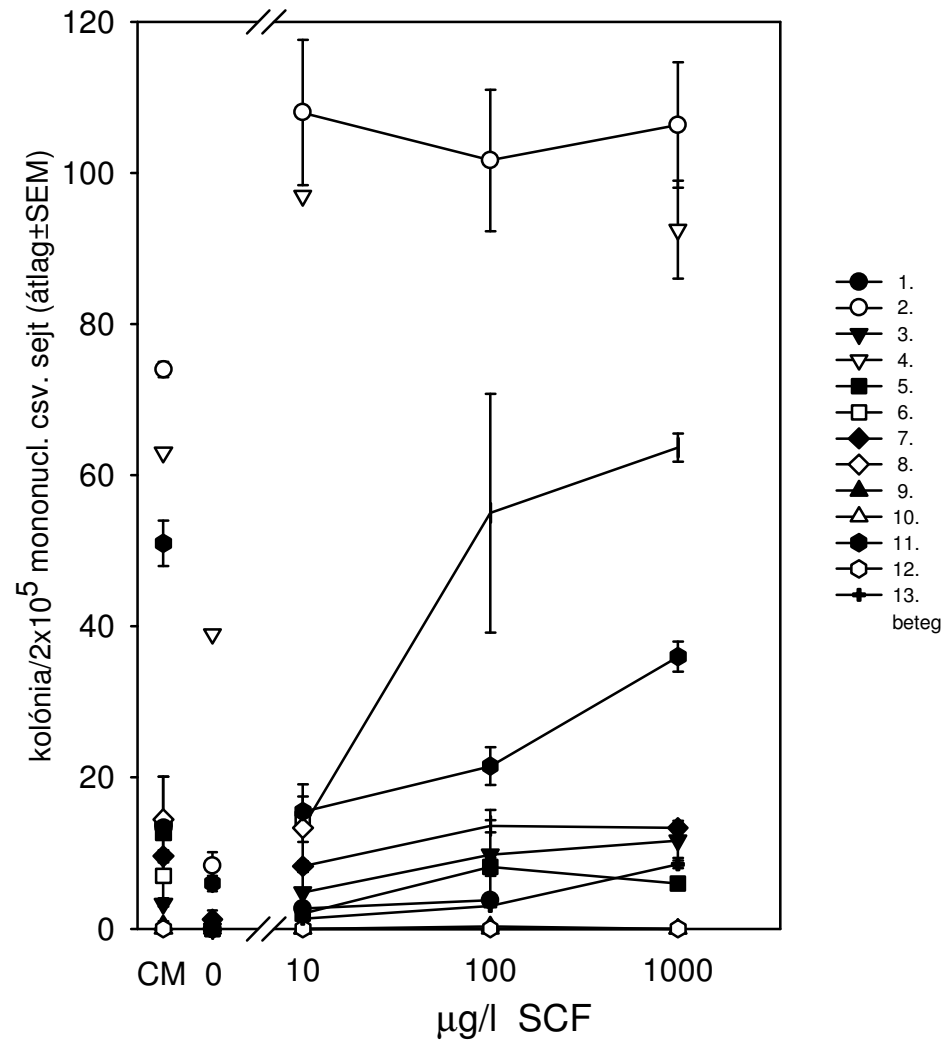
16. ábra *Az ALL-es gyermekek megoszlása csontvelői blast sejtjeik kolónia stimuláló faktor érzékenysége szerint*



17. ábra Az rhG-CSF dózis-hatás görbéi az egyes ALL-es gyermekek esetében



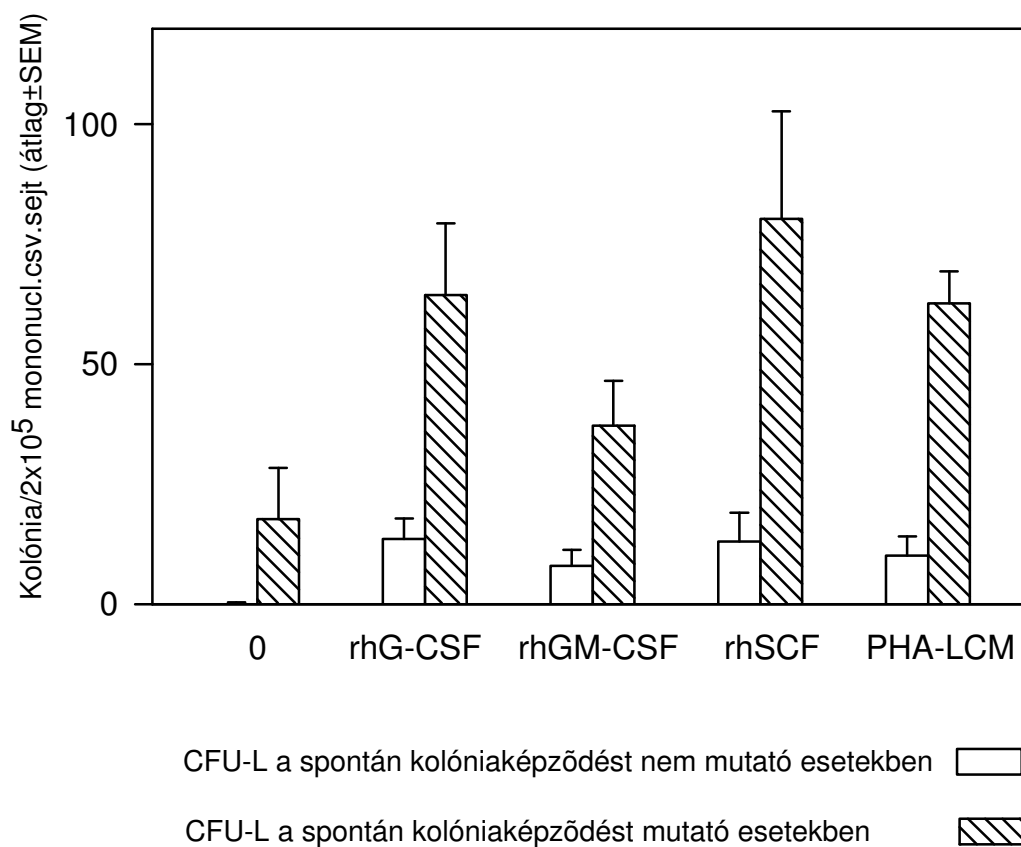
18. ábra Az rhGM-CSF dózis-hatás görbéi az egyes ALL-es gyermekek esetében



19. ábra Az rhSCF dózis-hatás görbéi az egyes ALL-es gyermekek esetében

Az előző ábrákon a spontán (0) és a PHA-LCM stimulált kolóniák számát is ábrázoltuk.

Mindhárom vizsgált citokin hatása dózisfüggőnek látszott, bár a leukémiás blast sejtek érzékenysége nagymértékben változott az egyes betegek esetében, így volt akinél már a legkisebb vizsgált koncentráció maximális kolóniaszámot eredményezett (17-19. ábra). A dózis-hatás görbék pontosabb felvételét korlátozta, hogy csak három dózis szinten tudtunk vizsgálatokat végezni, mivel a diagnosztikus célból levett csontvelő minták ésszerű megfontolások alapján nyerhető mennyisége korlátozta a csontvelőtenyészetekhez rendelkezésre álló sejtek számát.



20. Ábra A spontán kolóniaképződést mutató és nem mutató minták CFU-L kolóniaszámainak összehasonlítása

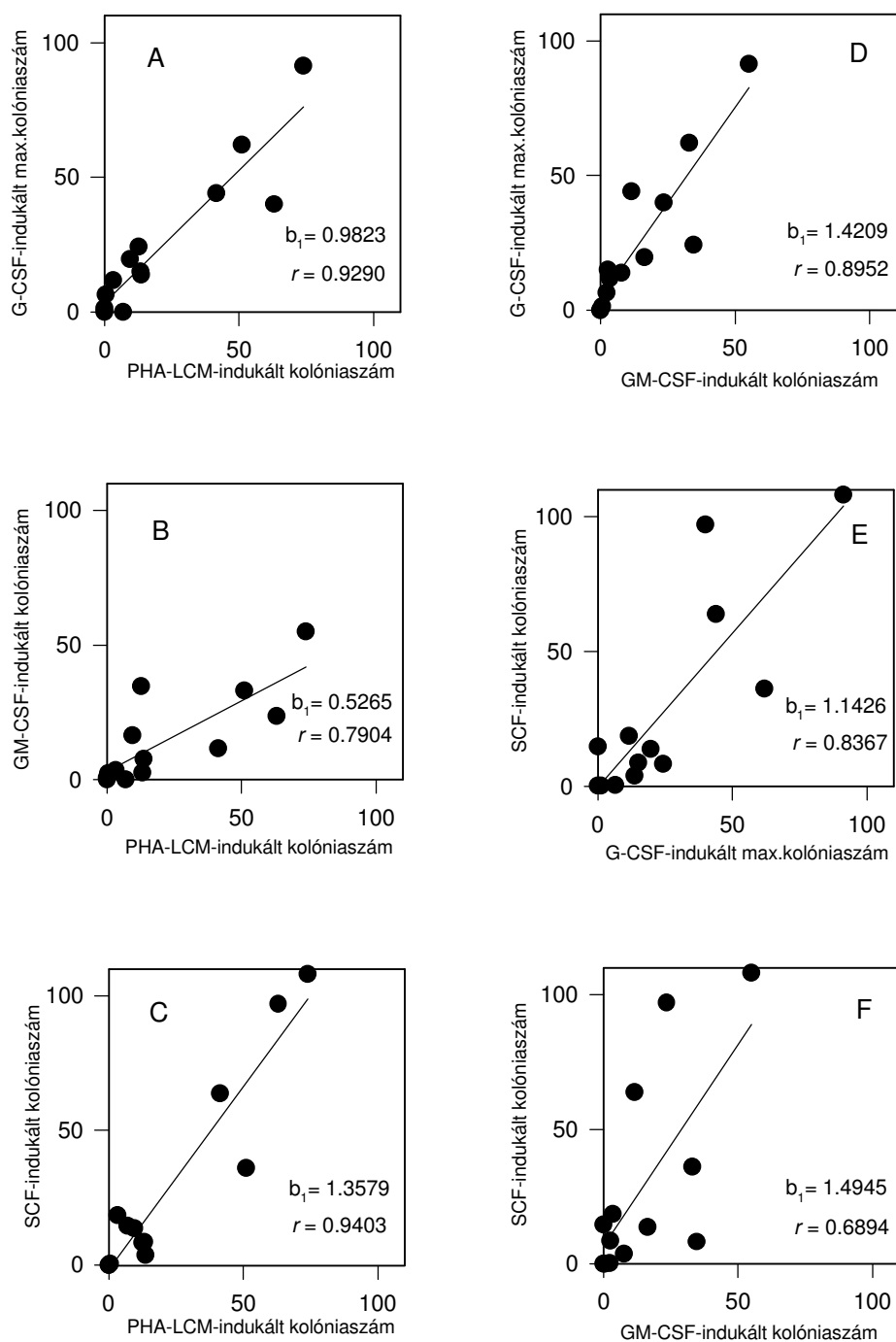
A különböző kolónia stimuláló faktor források bármelyike szignifikánsan magasabb kolóniaszámot eredményezett a spontán kolóniaképződést mutató három betegnél mint a többiek esetében (G-CSF, SCF és PHA-LCM: $P < 0,01$, GM-CSF: $P < 0,05$; 20. ábra)

4.3.4. Kolónia stimuláló faktorok ALL-es blast sejtek kolóniaképzésére gyakorolt hatásának összehasonlítása

A különböző kolónia stimuláló faktor források hatása összefüggést mutatott egymással. Ha az egyik hatására képződtek kolóniák, nagy valószínűséggel egy másik is képes volt stimulálni azt. Két kivétel volt csak ez alól a szabály alól; a 6.sz. beteg, akinek blast sejtjeit egyedül csak az SCF stimulálta, illetve a 9.sz. beteg, aki esetében a G-CSF és kisebb mértékben a GM-CSF volt hatásos, míg az SCF illetve a PHA-LCM nem.

A vizsgált citokinek kiváltotta válasz heterogénnek bizonyult, de nemcsak abban a tekintetben, hogy milyen koncentrációra volt szükség a maximális válaszhoz, hanem abban is, hogy milyen mértékű volt a kolóniaképzés stimulálása (10. és 11. táblázat, 11. ábra). A maximálisan elérhető kolónia szám a G-CSF esetében 0-91, a GM-CSF esetében 0-55 és az SCF esetében 0-108 között volt.

Az egyes CSF-ek esetében a maximális hatást kiváltó koncentráció mellett észlelt kolóniaszámok összehasonlítása azt sugallta, hogy a GM-CSF a legkevésbé hatásos stimulus az ALL-es gyermekek blast sejtjeinek kolóniaképzése szempontjából. Lineáris regressziós analízist végeztünk ennek vizsgálatára.



21. ábra *Az egyes rhCSF-ek maximális hatásos koncentrációi által indukált kolónia számok közötti összefüggések lineáris regressziós analízise*

Az ábramagyarázat a túloldalon olvasható:

A PHA-LCM és rhG-CSF (A, $P < 0,001$), a rhGM-CSF (B, $P < 0,01$) és rhSCF (C, $P < 0,001$) között szignifikáns volt az összefüggés. Hasonlóan a rhG-CSF és a rhGM-CSF (D, $P < 0,001$) és rhSCF (E, $P < 0,001$) között és az rhSCF és rhGM-CSF (F, $P < 0,01$) között is. A G-CSF-indukált vs PHA-LCM-indukált (A) valamint az SCF-indukált vs PHA-LCM-indukált (C) kolóniák regressziós egyenesei szignifikánsan meredekebbek voltak, mint a GM-CSF-indukált vs PHA-LCM-indukált (B) kolóniák regressziós egyenese (b_1 =meredekség; A vs B: $P < 0,001$ és C vs B: $P < 0,01$).

A lineáris regressziós analízis azt igazolta, hogy a G-CSF, illetve az SCF szignifikánsan erősebb hatású, mint a GM-CSF. A G-CSF és az SCF hatáserőssége között viszont nem volt szignifikáns különbség (21. ábra).

4.3.5. Citokin kombinációk hatása az ALL-es blast sejtek kolóniaképzésére

Szerettük volna megtudni, vajon van-e valamilyen kombinatív hatás az általunk vizsgált citokinek esetében, hiszen a csontvelői őssejt-progenitor sejtvonalakon fiziológiásan a citokinek egymást szinergista módon támogatják, így hatásaik felerősödnek. Fix koncentrációkat alkalmaztunk a kombinációkban, G-CSF-ből $300 \mu\text{g/l}$ -t, a GM-CSF-ből és az SCF-ből $100 \mu\text{g/l}$ -t. Tíz esetben sikerült a kettős kombinációk, és 9 esetben a hármas kombináció hatását vizsgálni.

A kombinációk kiváltotta kolóniaképződést a kombinációban szereplővel azonos koncentrációban alkalmazott egyes citokinek okozta kolóniaszámokkal hasonlítottuk össze páros Wilcoxon próbával. A G-CSF+GM-CSF kombináció szignifikánsan magasabb kolóniaszámokat eredményezett, mint akár a G-CSF vagy a GM-CSF magában alkalmazva (G-CSF: $P < 0,05$; GM-CSF: $P < 0,01$). Bár a G-CSF és az SCF hatása között nem volt szignifikáns különbség, kombinációjuk több kolóniát eredményezett mint akár a G-CSF ($P < 0,05$) akár az SCF ($0,1 > P > 0,05$) egyedül alkalmazva. Egy My+ALL minta blast sejtjei (10.sz. beteg) egyik citokinnel sem voltak stimulálhatók, viszont bármelyik vizsgált kombinációban kolóniaképzést indukáltak (12. táblázat).

12. táblázat *CSF kombinációk hatása az ALL-es gyermekek csontvelői blast sejtjeinek kolóniaképzésére*

CFU-L kolónia/2x10 ⁵ csv. sejt (párhuzamos tenyészetek átlagai)									
Betegek	Stimuláló faktorok egyedül alkalmazva			Az előbbi stimuláló faktorok kombinációi					
No.	rhG-CSF 300 µg/l	rhGM-CSF 100 µg/l	rhSCF 100 µg/l	rhG-CSF+rhGM-CSF		rhG-CSF+rhSCF		rhG-CSF+ rhGM-CSF+rhSCF	
1.	13,7	7,7	3,7	ND		ND		14,3	N
2.	71,3	55,0	101,0	190,0	S	294,0	S	385,0	S
5.	24,2	29,8	8,2	41,6	A	69,2	S	83,8	S
6.	0	0	14,5	1,7	N	12,6	N	ND	
7.	19,6	16,4	13,6	21,4	N	27,7	A	58,0	A
8.	17,0	11,5	55,0	14,0	N	16,0	N	ND	
9.	6,5	0	0,3	9,6	A	4,0	N	16,0	S
10.	1,3	0	0	9,3	S	22,6	S	31,3	S
11.	48,0	27,0	21,5	185,0	S	87,0	S	215,0	S
12.	0	0	0	0	N	0,6	N	5,3	S
13.	13,0	0	3,0	12,0	N	26,0	S	34,5	S
átlag±SEM	19,5±6,7	13,4±5,3	20,1±9,5	48,5±23,4		55,9±27,8		93,7±42,2	
median	13,3	3,9	6,0	13,0		24,3		34,5	

A kolóniaképzéssel reagálók félkövéren szedettek. ND = nem végeztünk (not done), S = szuperadditivitás, A = additivitás, N = nincs változás

A citokinek hármaskombinációja bizonyult a legerélyesebb stimulusnak. Szignifikánsan több kolónia képződött akár az egyes citokinek, akár a citokinek kettős kombinációja által okozott kolónia számoknál ($P < 0,01$ valamennyi összehasonlításnál). Egy gyermek esetében (12.sz. beteg), akinek T sejt akut lymphoid leukémiája volt, csak a hármaskombináció hatására képződtek kolóniák (12. táblázat).

5. MEGBESZÉLÉS

Célunk a neutropeniás állapotokban alkalmazott néhány hatóanyag normál, ill. kóros hemopoiitikus kolóniaképző sejtekre gyakorolt hatásainak tanulmányozása volt. A neutropeniás állapotokban gyakori szisztémás gombás fertőzések kezelésében az azol antifungális anyagok használata az utóbbi évtizedekben rohamosan elterjedt. Viszonylag kisebb toxicitásuk miatt az amphotericin B mellett alternatív lehetőséget képviselnek, ill. tartós kezelésre alkalmasabbak per os adagolhatóságuk miatt. Feltett kérdéseinkre a következő válaszokat kaptuk kísérleti eredményeink tükrében:

5.1. Mennyire jellemző az azol antifungális szerekre a granulocytá-macrophag progenitor sejtek (GM-CFU) kolóniaképzésének gátlása?

Az antifungális anyagok csontvelői progenitor sejtekre gyakorolt hatásairól kevés irodalmi adat van (1. Irodalmi összefoglaló fejezet). Az azolok közül a miconazol és a ketoconazol esetében vizsgálták a csontvelő progenitor sejtjeinek kolóniaképzését befolyásoló hatást (Meeker és mtsai. 1983). Dózisfüggő gátlást tapasztaltak human GM-CFU progenitor sejtek tenyésztésében, az 50%-os gátláshoz 10-15 mg/l volt szükséges a ketoconazolból és kb 4 mg/l a miconazolból. Kísérleti eredményeink jó összhangban vannak az előbbi adatokkal. Hasonlóan dózisfüggő gátlást tapasztaltunk, és a ketoconazol esetében 6,3 mg/l, a miconazolnál 5,3 mg/l IC₅₀ értéket számolhattunk a dózis-hatás görbék alapján szintén human GM-CFU sejtek tenyésztésében.

Vizsgálatainkat az előzőeken kívül 6 másik azol származékra is kiterjesztettük. Közülük ötöt alkalmaznak a klinikai gyakorlatban. A 8 vizsgált anyagból 7 dózisfüggően gátolta mind az egér, mind a human GM-CFU progenitor sejtek kolóniaképzését. Az imidazol származékok: clotrimazol, econazol, miconazol, ketoconazol és oxiconazol dózis-hatás görbéinek leszálló szakaszai közelálló, egymást fedő dózistartományokba, 1-30 mg/l közé estek. Az imidazolok 50%-os gátló koncentrációi 10-50 μ mol/l között szóródtak az egér progenitor sejtek esetében,

míg a human progenitor sejteknél a szórás kisebb volt, 7,5-20 $\mu\text{mol/l}$ közötti értékeket kaptunk.

A vizsgált triazol származékok már nem viselkedtek egységesen. Az itraconazol és a saperconazol az imidazolokkal összehasonlítva meredekebb dózis-hatás görbéket adtak, melyek leszálló szakaszai alacsonyabb dózistartományba estek, 0,1-3 mg/l közé. Ugyanakkor a fluconazol nem befolyásolta a kolóniaképződést sem az egér-, sem a human progenitor sejtek esetében, még egy nagyságrenddel nagyobb, 100 mg/l koncentrációban sem. Human sejtek esetében ugyan 50 mg/l felett lassan ereszkedni kezdett a dózis-hatás görbe, de az 50%-os gátló koncentráció 202 mg/l és csak extrém magas 1000 mg/l koncentrációban gátolta teljesen a kolóniaképzést.

A ketoconazolról ismeretes, hogy más proliferáló, pl. malignus sejtek szaporodását gátolja: a kolóniaképzést 90%-kal gátló koncentrációt Rochlitz és mtsai. (1988) különféle malignus sejtvonalakon 7-40 mg/l-nek találták. A proliferáció gátlásának magyarázatára a sejtek szteroid-szintézisének gátlását, vagy a membrán-permeabilitás kóros megváltozását említik, de a mechanizmus nem teljesen tisztázott. Az itraconazol és a miconazol gátolja több citokin-gén expresszióját (Friccius és mtsai. 1992). Ez citokin-dependens, pl. kolónia-stimuláló faktort (CSF-et) igénylő sejtek növekedésének gátlását magyarázhatná. A csontvelősejtek kolóniaképzése ugyan CSF-függő, a mi kísérleti rendszerünkben azonban a tenyészetek exogen CSF-et tartalmaztak, ezért a kolóniaképzéshez a tenyészetben belüli CSF-termelés nem volt szükséges. Így az azol-származékok kolóniaképződést gátló hatását a citokin-gének expressziójára gyakorolt hatásukkal nem magyarázhatjuk.

A granulocytá-macrophag kolóniaképző sejtekre gyakorolt toxikus hatás az azol antifungális vegyületek jellemző, de - mint a fluconazol példája mutatja - nem szükségszerű tulajdonsága.

5.2. Hogyan viszonyul egymáshoz a vizsgált antifungális anyagok toxikus potenciája?

Az azol-származékok potencia sorrendje az egér és human sejtek esetében alapvetően hasonló volt. Valamennyi származék közül az itraconazol bizonyult a legtoxikusabbnak, az imidazolok közül pedig a clotrimazol. Az imidazolok és triazolok ebből a szempontból nem alkottak elkülönülő csoportokat, hanem a triazolok IC₅₀ értékei mintegy körbefogják az imidazolokéit. A két végletet képviselő vegyület, a legtoxikusabb itraconazol és a kolóniaképzést legkevésbé gátló fluconazol ugyanis egyaránt triazol-származék.

Az itraconazol és a saperconazol kifejezetten toxikusabbak voltak, mint a ketoconazol vagy a többi imidazol vegyület. A moláris koncentrációban kifejezett 50%-os gátló koncentrációk összehasonlításával látható, hogy a human GM-CFU-ra az itraconazol kb.10x toxikusabb, mint a legtoxikusabbnak bizonyult imidazol-származék, a clotrimazol, a saperconazol pedig 4x hatékonyabb a clotrimazolnál. A ketoconazolnál az itraconazol 15x, míg a saperconazol 6x toxikusabb.

A progenitor sejtekre vonatkozó gátlás az antifungális anyagok között nemcsak az azolokra jellemző. Mint az irodalomból ismert, a két klasszikus szer az amphotericin B és az 5-fluorocytosin kifejezett csontvelőtoxicitással rendelkezik. Kísérleteinkben az amphotericin B esetében hasonló eredményeket kaptunk, mint Koeffler és Golde (1977), az egér és human csontvelőtenyészetekben azonos, meredek dózis-hatás görbéket 2,8-3,2 mg/l IC₅₀ értékekkel. Az 5-FC esetében szintén dóziszfüggő gátlást tapasztaltunk. Koeffler és Golde (1979) szerint az 5-FC 65 mg/l koncentrációban kb 90%-os gátlást eredményezett a human GM-CFU sejtek kolóniaképzésében, míg Kissling és mtsai. (1988) 100 mg/l koncentrációig nem találtak eltérést a kolóniaszámokban. Kísérleteinkben 100 mg/l koncentrációban már teljes gátlást tapasztaltunk. Eredményeink összhangban vannak azzal a megfigyeléssel, hogy csontvelőtoxicitásra utaló klinikai tünetek 100 mg/l szérumkoncentráció felett nagyon gyakoriak, így nem ajánlott ennek túllépése, viszont csontvelőtoxicitásra utaló egyértelmű jelek már jóval 100 mg/l koncentráció alatt is előfordulhatnak (Groll, 1998). Az amphotericin B kétszer toxikusabb volt a clotrimazolnál, de az itraconazol 4x, a saperconazol 1,5x toxikusabbnak bizonyult az AMB-nél. A vízdékony 5-fluorocytosin potenciája a szintén vízdékony fluconazoléhoz közelített. A legkisebb hatékonyságú oxiconazolnál kb. 11x volt kevésbé hatékony.

5.3. Hogyan hatnak a fluconazol észter-származékai a GM-CFU kolóniaképzésére?

Az azol-származékok lipophilitása és GM-CFU-ra gyakorolt toxikus hatása közötti összefüggés.

A fluconazol észterszármazékai az anyavegyületnél jóval toxikusabbnak bizonyultak. Talán a lipophilitásnak szerepe lehet a csontvelői sejtek kolóniaképzésének gátlása szempontjából. A hét lipophil azol származék IC₅₀ értékei <50 µmol/l, míg a vízdékony fluconazol molekula human sejtekre vonatkoztatott IC₅₀ értéke 660 µmol/l, vagy a szintén vízdékony 5-FC esetében 247 µmol/l. Közülük a legkifejezettebben lipoidoldékonynak ismert itraconazol bizonyult a legtoxikusabb vegyületnek. A vizsgált fluconazol észter származékok szintén erősen lipoidoldékonyak voltak, csak DMSO-ban oldva tudtuk vizsgálni őket. Az azol-származékok lipophilitását számszerűen kifejező logP értékek szerinti sorrendjük hasonló volt, bár nem teljesen ugyanaz, mint a kolóniaképzést gátló hatást jellemző IC₅₀ értékek által meghatározott potencia sorrend. A három legtoxikusabb vegyület a három legnagyobb logP értékkel rendelkező vegyület volt. A logIC₅₀ és a logP értékek közötti korreláció szignifikáns volt (egér GM-CFU: $r = 0,7608$, $P < 0,05$; human GM-CFU: $r = 0,9328$, $P < 0,001$).

Az azolokra vonatkozó irodalom szerint az érett vérsejtekre gyakorolt hatásokban szintén mutatkozik különbség a lipoidoldékony származékok és a fluconazol között. A miconazol és az itraconazol ≤10 mg/l koncentrációban gátolja a mitogén indukált lymphocita transzformációt vagy a neutrophil granulocyták kemotaxisát és baktériumölő képességét, míg a fluconazol nem befolyásolja azokat (Roilides és mtsai. 1989; Rowan-Kelly és mtsai. 1984; Vuddhakul és mtsai. 1990).

5.4. Van-e összefüggés az azolok egér és humán csontvelősejtek tenyészetében mutatott hatása között? Az egér kísérletekben meghatározható adatok mennyire prediktív értékűek a humán csontvelői sejtek érzékenységére?

A human csontvelősejtek tenyésztési adatai az imidazolok, a saperconazol és az 5-FC esetében érzékenyebbek voltak az egér csontvelői progenitor sejteknél, a dózis-hatás görbék balra tolódtak. Az AMB és a legtoxikusabb itraconazol esetében a két dózis-hatás görbe nem válik el egymástól.

A gyógyszerfejlesztés számára mindig fontos kérdés mennyire alkalmasak az állatkísérletes adatok a human sejtekre gyakorolt hatások előrejelzésére. Igen szoros és szignifikáns korrelációt lehetett kimutatni az egér és a human progenitor sejtekre gyakorolt gátló hatást jellemző logIC₅₀ értékek között ($r = 0,9818$; $P < 0,001$; 8. ábra). Ez azt jelenti, hogy az egér csontvelőtenyésztések alapján mért adatok megfelelő prediktív értékkel rendelkeznek a human sejt-toxicitás szempontjából.

5.5. Hogyan viszonyulnak az *in vitro* mérhető gátló koncentráció tartományok az *in vivo* terápiás adagok után észlelhető koncentrációkhoz ?

Eredményeink *in vivo* relevanciájának felmérésére irodalmi adatok összehasonlításával a terápiás dózisok után kialakuló szérumban lévő gyógyszerkoncentrációkat az általunk kapott *in vitro* gátló koncentrációkkal. A klinikai gyakorlatban az imidazolok közül a ketoconazol ill. esetenként a miconazol használják szisztémás gombás fertőzésekben. Embernél 200 mg-os adag után a ketoconazol átlagos szérumban lévő csúcskoncentrációja 4,4 mg/l (Daneshmend és mtsai. 1984). Nagyobb, 400 mg-os adagok után a csúcskoncentrációk esetenként már elérhetik a 12,5-18 mg/l tartományt, míg 600 mg-os dózis után 30-50 mg/l-es szérumban lévő koncentrációkat mértek (Brass és mtsai. 1982). Tumoros betegekben a ketoconazol kisfokú kumulációját lehetett megfigyelni egyhetes kezelést követően (Maksymiuk és mtsai. 1982). Az általunk human csontvelőtenyésztésekben kapott IC₅₀ érték 6,3 mg/l volt.

Miconazollal a szérumban 2-9 mg/l-es csúcskoncentrációkat értek el intravénás infúzióban adott 500 mg-os dózist alkalmazva (Heel és mtsai. 1980). A miconazol egyszeri ajánlott maximális intravénás adagja (15 mg/kg) után még magasabb szérumszint várható. Kísérleteinkben az egér-csontvelősejtek *in vitro* kolóniaképzését 7,5 mg/l miconazol még csak 24%-kal gátolta, de human progenitor sejtek esetében az 50%-os gátláshoz 5,3 mg/l

koncentrációra volt szükség.

Az itraconazol 100 mg per os adagja után a plazma csúcskoncentrációk 0,13-0,16 mg/l között mérhetők. Intravénásan alkalmazva kb. 5x magasabb (0,66 mg/l) csúcskoncentrációk alakulnak ki (Negroni és Arechavala, 1993). Az itraconazol kumulációja miatt ismételt dózisok adása után a kb. 14. napra kialakuló egyensúlyi koncentráció a p.o. 100 mg napi dózisok után 0,4 mg/l, de magasabb dózisok esetén, pl. 200 mg/nap p.o. adag után már 1,1 mg/l, 400 mg/nap p.o. adag után pedig 1,9-2,0 mg/l (Barone és mtsai. 1993; Negroni és Arechavala, 1993). Ugyanakkor az itraconazol a szövetekbe jól penetrál, így ott 2-3x magasabb koncentrációkat érhet el, mint a plazmában (Heykants és mtsai. 1989). Az általunk human csontvelőtenyészetekben kapott IC50 érték 0,55 mg/l volt.

A saperconazollal kapcsolatban, mivel fejlesztése az állatkísérletes toxicitási vizsgálatok miatt megtorpant – mellékvese tumorok kialakulását észlelték - nem találni human farmakokinetikai adatokat. Egerekben egyszeri 100 mg/kg adag után a plazma csúcskoncentráció 18 mg/l volt (Hostetler és mtsai. 1992). Ez tízszer nagyobb az általunk tapasztalt 1,68 mg/l-es 50%-os gátló koncentrációknál.

A fluconazol számottevően nem befolyásolta a kolóniaképződést 100 mg/l koncentrációig. Ilyen magas koncentrációkat még extrém nagy, 2000 mg/nap dózisok után sem lehet a plazmában mérni (Anaissie és mtsai. 1995). Az általunk human csontvelőtenyészetekben kapott IC50 érték 202 mg/l volt.

Megállapíthatjuk, hogy a szisztémás gombás fertőzések terápiájában szóbajövő azol származékok közül a ketoconazol szokásos 200 mg/nap adagja után az irodalom szerint mérhető plazma koncentrációk kísérleteinkben nem gátolták jelentősen a csontvelői progenitor sejtek kolóniaképzését. Azonban a ketoconazol 400 mg vagy a feletti napi dózisait alkalmazva a kialakuló plazma koncentrációk meghaladják az általunk mért 50%-os gátlást okozó koncentrációkat. A miconazol terápiásan alkalmazott magasabb i.v. adagjai után kialakuló plazmakoncentráció értékek szintén magasabbak a human progenitor sejtekre vonatkoztatott IC50 koncentrációnál.

A triazolok közül az itraconazol 100 mg/nap p.o. adagja után mérhető koncentrációk ugyan még nem befolyásolják számottevően a kolóniaképzést, de i.v. alkalmazás esetén már meghaladják az IC50 értéket. A 100 mg/nap adagok után kialakuló egyensúlyi koncentráció azonban már megközelíti az 50%-os gátlást kiváltó koncentrációt, a magasabb, 200 ill. 400 mg/nap adagok utáni egyensúlyi koncentrációk pedig jelentősen meghaladják azt. Az itraconazol esetében ugyanakkor számolnunk kell azzal is, hogy a szövetekben mérhető koncentrációk jelentősen nagyobbak a plazmában mértéknél.

A másik széles körben alkalmazott triazol, a fluconazol a plazmában még olyan extrém dózisok, mint 2000 mg/nap, után sem ér el *in vivo* 100 mg/l koncentrációt, így nem várható, hogy a granulopoesisre direkt toxikus hatása lenne. Eredményünk összhangban van azzal, hogy a fluconazol szedésével összfüggésbe hozható – igen ritka – neutropeniát dózistól függetlenül, nem toxikus, hanem immunológiai mechanizmusúnak tartják (Wong-Beringer és Shriner 2000).

5.6. Hogyan viszonyulnak az *in vitro* mérhető kolóniaképzést gátló koncentráció-tartományok az azol antifungális anyagok pathogen gombákra vonatkozó MIC értékeihez?

Összehasonlítva az egyes azol származékok gombákra hatásos gátló koncentráció-tartományait a csontvelői progenitor sejtek kolóniaképzését gátló koncentráció-tartományokkal, képet kaphatunk az azolok csontvelői GM-CFU sejtekre vonatkoztatott terápiás szélességéről.

Irodalmi adatok szerint a clotrimazolnak a *Candida* törzsek 50%-át gátló koncentrációja (MIC50) 1,56-3,12 mg/l, míg más gombatörzseken általában magasabb MIC50 értékeket találtak (Burgess és Bodey 1972). Az econazol MIC50 értéke különböző gombatörzseken 0,01-10 mg/l, míg *Candida albicans*ra kevésbé hat (Heel és mtsai. 1978). A miconazol irodalmi adatok szerint 0,5-10 mg/l koncentrációban gátolja a *Candida albicans* törzsek növekedését (Heel és mtsai. 1980), és a

ketoconazol MIC50 értéke a különböző gombák esetében 0,01-10 mg/l (Heel és mtsai. 1982). A human GM-CFU kolóniaképzését gátló koncentráció- tartományokkal összevetve az előbbi irodalmi értékeket a gombák szaporodását gátló koncentráció-tartományokkal, a clotrimazol esetében a kettő egymást jelentősen átfedi.

A triazolok szerkezetmódosításával a terápiás szélesség javulását tűzték ki célul. Ez részben meg is valósult, ami nagy jelentőségű több mellékhatás (pl. gynecomastia) és a gyógyszerkölcsonhatások szempontjából. Ennek oka, hogy a szelektivitás a cytochrom P-450 3A függő gomba lanosterol 14-alpha-demetiláz enzim és az emlős máj cytochrom P-450 enzimrendszere tekintetében fokozódott. Ugyanakkor kísérleti eredményeink szerint a terápiás szélesség az itraconazol esetében a csontvelői progenitor sejtekre vonatkoztatva szűkülni látszik. Bár a saperconazol *Candida*, ill. *Aspergillus* fajokra vonatkoztatott MIC50 értékei 0,1-0,2 mg/l (Odss 1989), az itraconazolé pedig 0,07-0,1 mg/l (Espinel és mtsai. 1984), az itraconazol ajánlott terápiás egyensúlyi szérumszintje (minimális terápiás koncentrációja), melyet az ismételt adagolás 8-15. napja között ér el, >0,5 mg/l (Groll 1998) megegyezik az általunk mért 0,55 mg/l IC50 értékkel. Mások még magasabb, 1 mg/l terápiás szérumszintet javasolnak (Prentice és mtsai. 1994; Summers és mtsai. 1997).

A neutropeniás betegek antifungális profilaxisa komoly gondot jelent. Per os adagolhatóságuk, relatív kisebb toxicitásuk a triazolokat előnyben részesíthetik az amphotericin B-vel szemben. Azonban az ajánlott napi dózisok és plazma koncentrációk az itraconazol esetében elég magasak. Glasmacher és mtsai. (1996) 600 mg/nap adagot és 0,5-2 mg/l folyamatos plazma koncentrációt javasol. Böhme és mtsai. (1996) 2x200 mg/nap itraconazol profilaktikus adásával csökkenteni tudták a szisztémás gombás fertőzések incidenciáját neutropeniás hematológiai betegségekben szenvedőkben, de az aspergillosisét nem. A fluconazol 2x200 mg/kg adagjával végzett kontrollált klinikai tanulmány szerint csontvelő transzplantáción átesett betegek felületi és szisztémás gombás fertőzéseinek incidenciája sikeresen csökkenthető volt (Goodman és mtsai. 1992). Huijgens és mtsai. (1999) már alacsony dózisu profilaxist javasolnak: itraconazalból 2x100 mg/nap, fluconazalból 2x50 mg/nap dózisban. 202 beteg vizsgálatával nem találtak szignifikáns különbségeket az előbbi két azol preventív hatása között. Eredményeink tükrében az itraconazol esetében ajánlott tartós 0,5-2 mg/l plazma koncentráció, de még az alacsonyabb 200 mg napi dózis

után kialakuló egyensúlyi plazma koncentrációk is, veszélyt jelenthetnek a GM-CFU sejtek szempontjából.

Az érett neutrophil granulocyták funkcióképessége sem közömbös a szisztémás gombás fertőzések leküzdése szempontjából. A fluconazol nem befolyásolja, míg az itraconazol csökkenti a phagocytosist, de csak magas, 20 mg/l koncentrációban (Abruzzo és mtsai. 1987; Vlem és mtsai. 1996). Kimutatták, hogy 10-20 mg/l koncentráció-tartományban mind a miconazol, mind a ketoconazol jelentősen csökkenti az érett granulocyták kemotaxisát és killing aktivitását (Rowan-Kelly és mtsai. 1984). Alacsonyabb, 10 mg/l alatti koncentrációban a ketoconazolnak nincs ilyen hatása (Marmer és mtsai. 1981). A ketoconazol 400 mg napi dózis esetén már gátolhatja mind a granulocyta-macrophag sejtek képződését a csontvelőben, mind az érett granulocyták kemotaxisát és killing aktivitását.

Jelentős klinikai myelotoxicitást nem írtak le egyik vizsgált azol antifungális anyaggal kapcsolatban sem. Azonban neutropeniás betegek esetében annak is lehet jelentősége, ha a neutropeniás beteg kezelésére használt bármely gyógyszer csupán lassítja a neutropeniából való felépülést. A neutropeniás betegekben nehéz elkülöníteni az antifungális anyagok okozta myelotoxicitást a csontvelődepressziót okozó egyéb hatásoktól. Megfigyeléseinkkel összhangban van, hogy az itraconazol *in vivo*, betegekben okoz leukopeniát (Graybill és mtsai. 1990), többen immundeficiens betegek kezelésekor számoltak be neutropeniáról pl. tumoros vagy AIDS-es betegek kezelése során (Denning és mtsai. 1989; Horst és mtsai. 1996).

5.7. A csontvelői granulocyta-macrophag progenitor sejtekre gyakorolt hatás vizsgálata neutropeniás állapotokban szóbajövő anyagok gyógyszerfejlesztésének korai szakaszában. Intézetünk új, β -laktamáz-gátló hatással rendelkező anyagainak vizsgálata.

Neutropeniás betegek bakteriális fertőzései között nagy arányban szerepelnek Gram negatív kórokozók. A széles spektrumú, újabb β -laktám antibiotikumok a leggyakrabban alkalmazott

szerek. Leggyakoribb rezisztencia mechanizmusuk, a β -laktamáz rezisztencia kivédésére béta-laktamáz gátlókat alkalmaznak. Intézetünk új β -laktamáz-gátló vegyületek fejlesztése során előállított két béta-laktamáz gátló hatással rendelkező γ -lakton származék hatását vizsgáltuk. A 3. sz. és a 6. sz. gamma-lakton származék *in vitro* nem gátolta számottevően a GM-CFU sejtek kolóniaképzését 700 $\mu\text{mol/l}$ ill. 60 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációig. Biztató, hogy a vizsgált származékok az anyavegyületnél lényegesen kevésbé voltak toxikusak, így hasonló vegyületek előállítása és vizsgálata eredménnyel kecsegtethet. Fontos, hogy a β -laktamáz-gátló vegyületek lehetőleg ne befolyásolják a csontvelő GM-CFU sejtjeinek kolóniaképzését, mivel több béta-laktám antibiotikumról derült ki, hogy nagy dózisban, hosszabb időn át adva gátolják a granulopoiesist. A cephalosporinok és az imipenemek 3-25x hatékonyabbak a penicillin származékoknál, míg a monobactamok hatástalanok (Nefitel és Hübscher 1987). Az *in vitro* gátló koncentrációk jól korreláltak a betegekben neutropeniát okozó átlag napi dózisos értékeivel (Nefitel és mtsai. 1985).

5.8. Befolyásolják-e az akut lymphoid leukemiás betegek komplex terápiája során szóbjághető citokinek, a G-CSF, GM-CSF és az SCF a leukemiás blast sejtek kolóniaképzését ?

Neutropeniás betegek infectios szövődményeinek megelőzésére, kezelésük hatásosságának növelésére, az antifungális anyagok hatásának erősítésére, az érett neutrophilek funkcióinak javítása céljából kézenfekvő a G-CSF és GM-CSF terápiás felhasználása. A jelenleg klinikai kipróbálási stádiumban lévő SCF szintén szóbjághet, bár több mellékhatás várható vele kapcsolatban.

A pleiotropia és redundancia jelensége jól ismert a hematopoiitikus target sejtek és a citokinek interakcióiban (Dexter 1993; Metcalf 1992). Mégis, nincs nagy átfedés a normál lympho- és myelopoiesisben résztvevő prekurzorok és progenitorok proliferációját és differenciálódását szabályozó citokinek hatásspektruma között. A G-CSF-nek és a GM-CSF-nek nincs alapvető, ismert szerepe a normál lymphoid érési sor szabályozásában. Még a legősibb, korai sejtalakokra ható SCF-ről is azt mutatták ki, hogy nagyobb hatással van a myeloid, mint a lymphoid éretlen progenitor sejtekre (Broudy 1997; Ulich és mtsai. 1991). Ezért ezen citokinek terápiás

felhasználása az ALL-es betegek kezelése során nem tűnt kockázatosnak (Ohno 1994; Welte és mtsai. 1996b).

A normál lymphoid progenitor sejtek citokin érzékenységi mintázata alapján kialakult várákosokkal ellentétben, néhány szerző azt találta, ezek a citokinek képesek stimulálni a leukemiás lymphoblastok proliferációját (Drach és mtsai. 1994; Freedman és mtsai. 1993; Pontvert-Delucq és mtsai. 1996), míg mások az esetek többségében nem tudtak ilyen hatást kimutatni (Komada és mtsai. 1993; Lauria és mtsai. 1995; Mirro és mtsai. 1993; Piao és Okabe 1990; Tomeczowski és mtsai. 1995). Ezért vizsgálni kezdtük az ALL-es gyermekek friss csontvelő sejtjeinek kolóniaképzését az előbbi citokinek jelenlétében. Mindhárom citokin az esetek egy részében dóziszfüggő módon kolóniaképzést stimulált. A kolóniákat alkotó sejtek lymphoblastoknak bizonyultak. Néhány esetben már az alkalmazott legkisebb dózis maximális kolóniaszámokat eredményezett, mely a leukemiás kolóniaképző sejtek érzékenységének nagyfokú varianciáját jelenti (16-19. ábra). A reagálók között nemcsak myeloid markerekkel rendelkező My+ALL vagy CD34+ ALL mintákat találtunk. Más B-ALL és T-ALL minták blast sejtjei is stimulálhatók voltak. Ez nem egyezik Komada és mtsai. (1993) eredményeivel, akik csak a My+ALL minták egy részében tudtak proliferációt kimutatni G-CSF és GM-CSF hatására, My-ALL esetekben nem.

A szignifikánsan legkevésbé hatásos citokin a GM-CSF volt, míg a G-CSF, SCF vagy a konvencionális, citokin keveréket tartalmazó, PHA-LCM stimulus hasonló mértékben volt eredményes. Jó korrelációt lehetett kimutatni az egyes citokinek hatáserősségében az egyes minták esetében (21. ábra). Ez kissé meglepő, ha arra gondolunk, hogy nincs nagy átfedés az egyes szignál transzdukciós útvonalak között (Mire-Sluis és Thorpe 1998). Ugyanakkor a három spontán kolóniaképződést mutató esetben szignifikánsan több kolónia növekedett valamennyi citokin hatására, mint a spontán kolóniaképzést nem mutató esetekben. Ehhez hasonló megfigyelést közöltek Pontvert-Delucq és mtsai. (1996) az SCF, IL-7 és IL-3 citokinekkal kapcsolatban.

Hozzánk hasonlóan Freedman és mtsai. (1993) a GM-CSF, Drach és mtsai. (1994) a G-CSF, GM-CSF és SCF esetében kapott kolóniaképzést fokozó hatást. Utóbbiak sem találtak összefüggést a proliferatív hatás és a myeloid antigének expressziója között. A reagálók aránya az ALL-es minták között alacsonyabb volt, mint a mi esetünkben. Ezek a szerzők azonban kontrollként feeder layer-

rel és PHA-LCM-el stimulált tenyészeteket használtak, és azokat a csontvelő mintákat tekintették pozitívnak, amelyekben a kolóniák számát *az ilyen kontrollokhoz viszonyítva növelte* a tenyészetekhez adott citokin. A mi kontroll tenyészeinkhez sem feeder-layert, sem PHA-LCM-et nem adtunk, tehát azok semmiféle exogen citokint nem tartalmaztak; ez is növelhette a kontroll és a kezelt tenyészetekben képződő kolóniák közötti különbséget. További különbség, hogy a citokinek mi nagyobb koncentráció-tartományban alkalmaztuk, és a tenyésztés időtartama is hosszabb volt. Piao és Okabe (1990), akik azt találták, hogy egy módosított human G-CSF (KW-2228) nem stimulálta 5 ALL-es betegük blast sejteinek kolóniaképzését, szintén alacsonyabb (≤ 100 $\mu\text{g/l}$) koncentráció tartományt vizsgáltak, és lényegesen rövidebb tenyésztési időt alkalmaztak.

A G-CSF, a GM-CSF vagy SCF hatástalanságát az ALL-es blastok proliferációjára elsősorban a tricíált timidin beépülését vizsgálók észlelték (Komada és mtsai. 1993; Lauria és mtsai. 1995; Mirro és mtsai. 1993; Tomeczkowski és mtsai. 1995), bár ezek az eredmények sem voltak teljesen negatívak. Komada és mtsai. (1993) 11/16 My+ALL esetben és 21/21 My-ALL esetben a G-CSF-et és a GM-CSF-et, míg Lauria és mtsai. (1995) 36/37 esetben az SCF-et, Mirro és mtsai. (1993) 71/75-ben a GM-CSF-et és 79/80 esetben a G-CSF-et találta hatástalannak. A timidin beépülés vizsgálatával a DNS szintézist, közelebbről a pirimidin mentési útvonalat lehet vizsgálni. A leukemiás sejtek többsége terminális osztódási szakaszban van és csak a sejtek igen kis frakciója osztódik folyamatosan fenntartva a leukemiás clont (Lajtha 1981; Löwenberg és Touw 1993). Ezek a CFU-L kolónia képző sejtek jóval kisebb arányban vannak jelen mint az előbbieket, így proliferációs aktivitásuk tricíált timidin beépülésével nem észlelhető. Ezen frakció sejteinek kimutatására a kolóniaképzést vizsgáló módszerek alkalmasak. A kétféle módszerrel kapott eredmények divergenciája nemcsak elméleti lehetőség. Consolini és mtsai. (1997) IL-7 hatására kolóniákat képző gyermekkori ALL-es minták esetében nem talált proliferációra utaló timidin beépülés fokozódást. Tchuchiya és mtsai. (1993) pedig ellenkezőleg a timidin beépülés fokozódását észlelték, de kolóniaképződést nem G-CSF hatására Ph¹-pozitív ALL-es betegük esetében.

Az Irodalmi bevezetőben részletezett cikkekben többen vizsgálták az adott citokin receptorainak expresszióját ALL-es blast sejteken. Freedman és mtsai. (1993) pozitív korrelációt találtak a receptorok jelenléte és a GM-CSF-re adott clonogen válasz között. Más szerzők nem találtak ilyen összefüggést ALL-es blast sejtek esetében (Drach és mtsai. 1994). Ez magyarázható azzal, hogy a

citokinek receptorhoz kötődése a clonogen és a nem-clonogen frakció sejtjei között megoszlik. Ugyanakkor a receptorok jelenléte feltétele, de nem bizonyítéka a citokinekre adott proliferatív válasznak. Valójában több sejtfeleség - pl. az érett neutrophilek – viszonylag nagy számban expresszálják G-CSF vagy GM-CSF receptorokat (Shinjo és mtsai. 1997), melyek nem proliferatív válaszokat váltanak ki. Az ALL-es blastok közül a GM-CSF-re kolóniaképzéssel reagáló sejtek száma nagyságrendekkel kisebb, mint a GM-CSF receptort expresszáló sejtek száma. Pl. Freedman és mtsai. (1993) közleményében a 7. sz. beteg esetében 1:500 GM-CSF receptor pozitív csontvelői sejt volt clonogen blast sejt. Fordított irányban is találunk eltérésekre példát: Drach és mtsai. (1994) 1/3 T-ALL-es betegének blast sejtjei kolóniákat képeztek, bár kimutatható SCF receptor nem volt rajtuk.

Általában a citokin receptorszám denzitás a hemopoietikus érési sor előrehaladtával nő. Pl. a G-CSF receptorok száma sejtenként 400 a CD34-CD33+ sejtekben, míg csak 80 a kevésbé érett CD34+CD33- normal human csontvelői sejtek felszínén, és néhány száz az ALL-es blast sejteken (Shinjo és mtsai. 1997). Ha csak a sejtek kis frakciója (<0,1%) clonogen és ráadásul az ilyen sejteken lévő kötődési helyek száma alacsony, a legtöbb ma használatos receptor kimutatási módszerrel nehéz felderíteni a hozzájuk köthető citokineket. Ez magyarázhatja, hogy az ALL-es csontvelő minták kísérleteinkben magas arányban reagáltak kolóniaképzéssel az adott citokinek hatására, annak ellenére, hogy az irodalmi adatok szerint a betegek kisebb hányadának ALL-es sejtjeit tartották az adott citokinek receptoraira pozitívnak (Bene és mtsai. 1998; Knapp és mtsai. 1994; Lauria és mtsai. 1995; Shimoda és mtsai. 1992; Shinjo és mtsai. 1997). Ráadásul a legtöbb szerző akkor tekintette pozitívnak a receptorok expresszióját, ha a sejtek >20%-ának felszínén jelenvoltak (Bene és mtsai. 1998; Komada és mtsai. 1993; Shimoda és mtsai. 1992), míg a sejtek <0,1%-ának receptor pozitivitása elég lehet az általuk észlelt számú kolónia képződéséhez.

Az, hogy a spontán kolóniaképzést mutató blast sejtek bármely citokinnel szignifikánsan jobban stimulálhatók, mint a spontán kolóniaképzést nem mutató minták sejtjei, felveti annak lehetőségét, hogy a leukemiás sejtek által termelt citokinnel szinergista hatás jött létre. Annak ellenére, hogy az SCF fiziológiásan önmagában nem, csak más citokinekkal együtt, azok hatását potenciózva fokozza a kolóniaképzést (Dexter 1993), kísérleteinkben a citokinek közül az önmagában alkalmazott SCF hatására észleltük a két legmagasabb kolóniaszámot két spontán kolónia képzést

mutató ALL-es minta esetében. Ezt magyarázhatja, hogy akut lymphoid leukemiás sejtek autokrin citokin termelését többen bizonyították. Freedman és mtsai. (1993) GM-CSF termelését mutatták ki egyik ALL-es betegük esetében.

Az SCF-nek önmagában alkalmazva nemcsak a spontán kolóniaképzők között volt hatása vizsgálatainkban. Ennek egyik oka lehet addig alacsony autokrin citokin termelésük fokozása. Kiss és mtsai. (1993) GM-CSF-et termelő T-ALL-es sejtvonal esetében SCF hatására kifejezett GM-CSF termelés fokozódást mutattak ki. A citokinek egymást támogató, szinergista hatásait a normál hemopoiesisben gyakran tapasztalhatjuk (Broudy 1997; Dexter 1993). Ezért vizsgáltuk citokin kombinációk hatásait is az ALL-es betegek esetében.

5.9. Képesek-e fokozni a citokin kombinációk az egyes citokinek ALL-s betegek lymphoblastjainak kolóniaképzésére gyakorolt hatásait?

Kísérleteinkben a kettős és a hármas citokin kombinációk szignifikánsan magasabb kolóniaszámokat eredményeztek, mint a kombinációt alkotó egyes citokinek külön-külön. A hármas kombináció volt a leghatásosabb, mely a kettős kombinációkhoz képest is szignifikánsan tovább emelte a kolóniaszámokat (12. táblázat).

Bár a csonvelő minták sejttartalmának korlátozott volta miatt a dózis-hatás görbék több pontjának meghatározására és isobologramok elemzésére nem volt lehetőségünk, a Módszerek részben definiált módon szuperadditív és additív szinergizmus utalhat a vizsgált citokinek közötti interakciókra. Feltétlenül pozitív interakcióra utalnak ráadásul a 10. és a 12. sz. beteg adatai, hiszen esetükben egyik citokin sem váltott ki kolóniaképzést önmagában alkalmazva, ugyanakkor a 10. sz. beteg csonvelői blast sejtei valamennyi kombináció hatására képeztek kolóniákat. A 12. sz. beteg sejteinek kolóniaképzését csak a hármas kombináció tudta kiváltani. A hármas kombináció legeredményesebb voltát bizonyítja, hogy a szuperadditív, potencírozó szinergista hatás előfordulási gyakorisága itt a legnagyobb. A kilenc esetből hétben szuperadditív hatást észleltünk, míg a kettős kombinációk esetében 3/10 (G-CSF+GM-CSF) ill. 5/10 (G-CSF+SCF) esetben (12. táblázat).

Mivel a hemopoietikus növekedési faktorok a szervezetben nem izolált módon fejtik ki a hatásaikat, hanem citokin hálózatot alkotva, úgy gondoljuk, a citokin kombinációs kísérletek közelebb állnak az *in vivo* körülményekhez. Az akut lymphoid leukemiás betegek endogen citokin szintje megemelkedhet akár az infectiók okozta CSF stimuláció, akár a terápiásan alkalmazott citokinek miatt (Sallerfors és Olofsson 1991). A blast sejtek proliferációját vagy mobilizációjukat eredményező pozitív szinergizmus az endogen és az exogen citokinek között lehetővé válhat egyedül, önmagában alkalmazott citokin terápia esetén is.

Láthattuk, hogy még a myelopoetikus és pleiotrop citokinek is, melyek a terápiás gyakorlatban szóba jöhetnek, képesek stimulálni a blast sejtek clonális proliferációját gyermekkori ALL-ban. Nem volt olyan esetünk, melyben ne lehetett volna vagy egyedül vagy kombinációban alkalmazva kolónia növekedést stimulálni. Ez a G-CSF, GM-CSF és SCF terápia lehetséges kockázatát jelentheti még akut lymphoid leukemia esetében is. Autolog csontvelő transzplantáció céljára G-CSF-el mobilizált stem sejt frakció leukemiás blast sejtekkel történt szennyeződését írták le remisszióban levő Philadelphia kromoszóma pozitív ALL-es betegnél (Kobbe és mtsai. 1998). Az általunk vizsgált 13 beteg adatai természetesen nem elegendők az *in vitro* és az *in vivo* hatások közötti összefüggések vizsgálatára, a CSF-terápia kockázatának felmérésére. Azonban az 1. sz. betegünk elvesztése az intervencionális adjuváns G-CSF terápia alatt, miközben az addig blast mentes csontvelője leukemiás blastokkal volt elárasztva a boncolás időpontjában, további vizsgálatokra sarkall. Az *in vitro* kolóniaképződés vizsgálata segíthet az egyes betegeknél a citokinek lehetséges hatásainak előzetes felmérésében.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A gyógyszerek csontvelőtoxicitása különös figyelmet érdemel, ha neutropeniás betegnek adjuk őket, mert még a csekély mértékű myelotoxicitás is ronthatja a prognózist a csontvelő regenerációjának késleltetésével. Neutropeniás időszakban szóbajövő hatóanyagokat vizsgáltunk: antifungális anyagokat, β -laktamáz-gátlókat, melyek a nagy dózisban esetenként neutropeniát okozó β -laktám antibiotikumok védelmére adhatók, és a csontvelő citosztatikum-okozta károsodásból való gyógyulását elősegítő myelopoetikus és pleiotrop citokineket. Ez utóbbiak hematológiai malignus betegségekben való alkalmazásakor azonban felmerülhet, hogy velük - nem kívánt módon - a malignus sejtek szaporodását is serkenthetjük. A lymphoid leukemiás sejtek myelopoetikus és pleiotrop citokinekkal szembeni érzékenységéről található irodalom ellentmondó adatokat tartalmaz.

E területen végzett kísérleteink új eredményei:

1. Antifungális anyagok hatása a GM-CFU-ra

- 1.1. A granulocyt-macrophag kolóniaképző sejtek *in vitro* kolóniaképzését a vizsgált antifungális azol-származékok gátolták, egy kivétellel: a nyolc vizsgált anyag közül egyedül a fluconazol nem gátolta a kolóniák képződését, még a terápiás adagok után észlelhető szérumszinteknél lényegesen nagyobb koncentrációban sem.
- 1.2. E hatás tekintetében az imidazolok és a triazolok nem alkottak elkülönülő csoportokat. Potencia sorrendjük a human GM-CFU sejtek esetében: itraconazol>saperconazol>clotrimazol>ketoconazol>miconazol>econazol>oxiconazol>fluconazol-krotonát>fluconazol-kapronát>b-fenil-propionil-fluconazol >>fluconazol volt.
- 1.3. A GM-CFU kolóniaképzésének gátlása összefüggést mutatott az azolok lipophilitását jellemző logP értékekkel, amelyek a gátlóhatás potencia sorrendjéhez hasonlóan az itraconazol>saperconazol>clotrimazol esetében voltak a legnagyobbak. A vízdékony fluconazol lipophil származékai jelentősen toxikusabbak voltak az anyavegyületnél.

1.4. Az egér csontvelőtenyészetekben mért logIC₅₀ adatok jó prediktív értékkel rendelkeztek a human sejt-toxicitás szempontjából.

2. **Béta-laktamázt gátló gamma-lakton származékok hatása a GM-CFU-ra**

A potenciális β -laktamázgátló vegyületeket – megfelelő β -laktám antibiotikumakkal kombinálva – neutropeniás betegekben is alkalmazhatják. Ezért célszerű az ilyen anyagok esetleges myelotoxicitását már a gyógyszerfejlesztés korai szakaszában vizsgálni. Intézetünk új β -laktamázt gátló γ -lakton származékai az anyavegyületnél kevésbé toxikusaknak bizonyultak, számottevő kolóniaképzést gátló hatásuk nem volt.

3. **G-CSF, GM-CSF és SCF hatása akut lymphoid leukemiás betegek csontvelői blast sejtjeire**

3.1. A vizsgált myelopoetikus és pleiotrop citokinek (G-CSF, GM-CSF és SCF) - fiziológiás hatásaik alapján nem várt módon - képesek stimulálni ALL-es gyermekek blast sejtjeinek kolóniaképzését. A GM-CSF volt a legkevésbé hatásos, míg a G-CSF és SCF hatása között nem volt különbség.

3.2. Az öt év alatt vizsgált 13 friss ALL-es gyermek esetében a csontvelői blast sejtek citokin-érzékenysége és a maximális válasz mértéke jelentős individuális különbségeket mutatott.

3.3. A spontán kolóniaképzést mutató csontvelőminták blast sejtjei valamennyi citokin hatására magasabb kolóniaszámokkal reagáltak, mint az exogen citokinek hozzáadása nélkül kolóniákat nem képzők.

3.4. A G-CSF, GM-CSF és SCF kombinációi az egyes citokinekkal önmagukban nem stimulálható esetekben is képesek voltak az ALL-es blastok kolóniaképzését kiváltani. Minden esetben a hármas kombináció hatására nőtt a legtöbb kolónia.

3.5. Az előbbieket alapján az egyes betegek citokin terápiáját az ALL-es esetekben is érdemes gondosan mérlegelni. Az *in vitro* kolóniaképződés vizsgálata segíthet az egyes betegeknek a citokinek lehetséges hatásainak előzetes felmérésében.

6. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani elsősorban Prof. Dr. Kovács Péter úrnak, a DEOEC Gyógyszertani Intézete igazgatójának – témavezetőmnek - aki lehetővé tette, és mindenre kiterjedően, messzemenően segítette munkámat.

Köszönöm az értekezés alapjául szolgáló közlemények valamennyi társszerzőjének a segítőkész együttműködését. Kiemelendő közülük Dr. Kiss Csongor (DEOEC Gyermekklinika), akinek köszönöm, hogy közte és munkacsoportunk között több közös pályázat kapcsán sikeres, egymásra odafigyelő munkakapcsolat tudott kialakulni.

Ezúton szeretném megköszönni Horkay Sándorné, Németh Árpádné, Gnotek Edit asszisztenseknek, hogy az évek során a gyakorlati problémák megoldásában odaadóan segítettek.

8. IRODALOMJEGYZÉK

7. Abruzzo GK, Fromtling RA, Turnbull TA, Giltinan DM (1987) Effects of bifonazole, fluconazole, itraconazole and terbinafine on the chemiluminescence response of immune cells. *J Antimicrob Chemother* 20: 61-68.
8. Agarwal A, Sakhuja V, Chugh KS (1990) Fluconazole-induced thrombocytopenia. *Ann Intern Med* 113:899.
9. Anaissie EJ, Kontoyiannis DP, Huls C, Vartivarian SE, Karl C, Prince RA, Bosso J, Bodey GP (1995) Safety, plasma concentrations and efficacy of high-dose fluconazole in invasive mold infections. *J Infect Dis* 172: 599-602.
10. Andrews RG, Knitter GH, Bartelmez SH, Langley KE, Farrar D, Hendren RW, Appelbaum FR, Bernstein ID, Zsebo KM (1991) Recombinant human stem cell factor, a c-kit ligand, stimulates hematopoiesis in primates. *Blood* 78:1975-1980.
11. Asano Y, Shibuya T, Okamura S, Yamaga S, Otsuka T, Niho Y (1987) Effect of human recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and native granulocyte colony-stimulating factor on clonogenic leukemic blast cells. *Cancer Res* 47:5647-5648.
12. Baer MR, Bernstein SH, Brunetto VL, Heinonen K, Mrózek K, Swann VL, Minderman H, Block AW, Pixley LA, Christiansen NP, Fay JW, Barcos M, Rustum Y, Herzig GP, Bloomfield CD (1996) Biological effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients with untreated acute myeloid leukemia. *Blood* 87:1484-1494.
13. Barone JA, Koh JG, Bierman RH., Colaizzi JL, Swanson KA, Gaffar MC, Moskowitz BL, Mechlinski W, Van de Velde V (1993) Food interaction and steady-state pharmacokinetics of itraconazole capsules in healthy male volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 778-784.

14. Bene MC, Bernier M, Casasnovas RO, Castoldi G, Knapp W, Lanza F, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, Sporling C (1998) The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. *Blood* 92:596-599.
15. Benkő I, Kovács P, Megyeri A, Szegedi I, Kiss C (1997) Stimulation of blast cells *in vitro* in children with acute lymphoblastic leukaemia by Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor, Granulocyte Colony Stimulating Factor and Stem Cell Factor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 356:R20
16. Benkő I, Kiss C, Megyeri A, Kovács P (1999) Effect of Granulocyte Colony Stimulating Factor on bone marrow cells of children with acute lymphocytic leukemia. *Fundam Clin Pharmacol* 13:363s
17. Bennet JE (1974) Chemotherapy of systemic mycoses. *New Engl J Med* 290:30-32.
18. Bennet JE (1977) Flucytosine. *Ann Intern Med* 86:3319-322.
19. Bodey, G. P., Anaissie, E. J., Elting, L. S., Estey, E., O'Brien, S., Kantarjian, H. (1994). Antifungal prophylaxis during remission induction therapy for acute leukemia fluconazole versus intravenous amphotericin B. *Cancer* 73: 2009-2106.
20. Böhme A, Just-Nubling G, Bergmann L, Shah PM, Stille W, Hoelzer D (1996) Itraconazole for prophylaxis of systemic mycoses in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother* 38:953-961.
21. Brandriss MW, Wolff SM, Moores R, Stohlman F (1964) Anemia induced by amphotericin B. *JAMA* 189:663-666.
22. Brass C, Galgiani JN, Blaschke TF, DeFelice R, O'Reilly RA, Stevens DA (1982) Disposition of ketoconazole, an oral antifungal, in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 21: 151-158.

23. Broudy VC (1997) Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 90:1345-1364.
24. Budel LM, Touw IP, Delwel R, Löwenberg B (1989) Granulocyte colony-stimulating factor receptors in human acute myelocytic leukemia. *Blood* 74:2668-2673.
25. Burgess MA, Bodey GP (1972) Clotrimazole (Bay b 5097): *In vitro* and clinical pharmacological studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2: 423-426.
26. Butler WT (1964) Amphotericin B toxicity: Changes in renal function. *Ann Intern Med* 61:344-349.
27. Butler WT, Cotlove E (1971) Increased permeability of human erythrocytes induced by amphotericin B. *J Infect Dis* 123:341-350.
28. Byrne PV, Guilbert LJ, Stanley ER (1981) Distribution of cells bearing receptors for a colony-stimulating factor (CSF-1) in murine tissues. *J Cell Biol* 91:848-853.
29. Carrilo-Munoz AJ, Quindos G, Tur C, Ruesga MT, Miranda Y, del-Valle O, Cossum PA, Wallace TL (1999) In vitro antifungal activity of liposomal nystatin in comparison with nystatin, amphotericin B cholesterol sulphate, liposomal amphotericin B, amphotericin B lipid complex, amphotericin B desoxycholate, fluconazole and itraconazole. *J Antimicrob Chemother* 44:397-401.
30. Charak B. S., Louie, R., Malloy, B., Twomey, P., Mazumder, A. (1991). The effect of amphotericin B, aztreonam, imipenem and cephalosporins on the bone marrow progenitor cell activity. *J Antimicrob Chemother* 27, 95-104.
31. Charak BS, Brown EG, Mazumder A (1994) Protective effect of granulocyte-colony stimulating factor against amphotericin B-induced myelosuppression in vitro. *Br J Haematol* 88:693-698.

32. Clark JM, Whitney RR, Olsen SJ, George RJ, Swerdel MR, Kunselman L, Bonner DP (1991) Amphotericin B lipid complex therapy of experimental fungal infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 35:615-621.
33. Consolini R, Legitimo A, Cattani M, Simi P, Mattii L, Petrini M, Putti C, Basso G (1997) The effect of cytokines, including IL-4, IL-7, stem cell factor, insulin-like growth factor on childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 21:753-761.
34. Van Cutsem J, Van Gerven F, Janssen PAJ (1987) The in vitro and in vivo antifungal activity of itraconazole. A következõ könyvben: Fromtling R.A. Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents. J.R. Prous Science Publishers, 177-192.
35. Daneshmend TK, Warnock DW, Ene MD, Johnson EM, Potten MR, Richardson MD, Williamson PJ (1984) Influence of food on the pharmacokinetics of ketoconazole. *Antimicrob. Agents Chemother* 25: 1-3 .
36. Denning DW, Tucker RM, Hanson LH, Hamilton JR, Stevens DA (1989) Itraconazole therapy for cryptococcal meningitis and cryptococcosis. *Arch Intern Med* 149: 2301-2308.
37. Dexter TM (1993) Synergistic interactions in haemopoiesis: Biological implications and clinical use. *Eur J Cancer* 29A:S6-S9.
38. Diem K, Lentner C (1970) Documenta Geigy: Scientific Tables. 7th edition. Ciba-Geigy, Basle 60-61.
39. Dornbusch HJ, Urban CE, Pinter H, Ginter G, Fötter R, Becker H, Miorini T, Berghold C (1995) Treatment of invasive pulmonary aspergillosis in severely neutropenic children with malignant disorders using liposomal amphotericin B (AmBisome), granulocyte colony-stimulating factor, and surgery: report of five cases. *Pediatr Hematol Oncol* 12:577-586.

40. Drach D, Estrov Z, Zhao S, Drach J, Cork A, Collins D, Kantarjian H, Andreeff M (1994) Granulocyte-colony stimulating factor, granulocyte-macrophage colony stimulating factor, PIXY-321, stem cell factor, interleukin-3, and interleukin-7: Receptor binding and effects on clonogenic proliferation in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 16:79-88.
41. Dresch C, Faille A, Poirier O, Balitrand N, Najean Y (1979) Hydroxyurea suicide study of the kinetic heterogeneity of colony forming cells in human bone marrow. *Exp Hematol* 7:337-344.
42. Ellis ME, Clink H, Ernst P, Halim MA, Padmos A, Spence D, Kalin M, Qadri SMH, Burnie J, Greer W (1994) Controlled study of fluconazole in the prevention of fungal infections in neutropenic patients with hematological malignancies and bone marrow transplant recipients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13: 3-11.
43. Espinel-Ingroff A, Shadomy S, Gebhart RJ (1984) In vitro studies with R 51,211 (itraconazole). *Antimicrob Agents Chemother* 26: 5-7.
44. Fleischman RA (1993) Southwestern internal medicine conference: Clinical use of hematopoietic growth factors. *Am J Med Sciences* 305: 248-273.
45. Francis P , Walsh TJ (1992) Evolving role of flucytosine in immunocompromised patients: New insights into safety, pharmacokinetics and antifungal therapy. *Clin Infect Dis* 169:356-368.
46. Freedman MH, Grunberger T, Correa P, Axelrad AA, Dube ID, Cohen A (1993) Autocrine and paracrine growth control by granulocyte-monocyte colony-stimulating factor of acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 81:3068-3075.
47. Friccius H, Pohla H, Abidzadeh M, Spiegels-Hübenthal P, Schenk A, Pawelec G (1992) The effects of the antifungala zoles itraconazole, fluconazole, ketoconazole and miconazole on cytokine gene exoression in human lymphoid cells. *Int J Immunopharmac* 14: 791-799.

48. Fromtling R.A. (1987) Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents. J.R. Prous Science Publishers
49. Glasmacher A, Molitor E, Mezger J, Marklein (1996) Antifungal prophylaxis with itraconazole in neutropenic patients: pharmacological, microbiological and clinical aspects. *Mycoses* 39:249-258.
50. Goodman JL, Winston DJ, Greenfield RA, Chandrasekar PH, Fox B, Kaizer H, Shaddock RK, Shea TC, Stiff P, Friedman DJ, Powderly WG, Silber JL, Horowitz H, Lichtin A, Wolff SN, Mangan KF, Silver SM, Weisdorf D, Ho WG, Gilbert G, Buell D (1992) A controlled trial of fluconazole to prevent fungal infections in patients undergoing bone marrow transplantation. *New Engl J Med* 326: 845-851.
51. Goldber AF, Barka T (1962) Acid phosphatase activity in human blood cells. *Nature* 195:297-
52. Graybill JR, Stevens DA, Galgiani JN, Dismukes WE, Cloud GA (1990) Itraconazole treatment of coccidioidomycosis. *Am J Med* 89: 182-290.
53. Grauer ME, Bokemeyer C, Bautsch W, Freund M, Link H (1994) Successful treatment of a *Trichosporon beigelii* septicemia in a granulocytopenic patient with amphotericin B and granulocyte colony stimulating factor. *Infection* 22:283-286.
54. Groll AH, Piscinelli, SC, Walsh T J (1998) Clinical pharmacology of systemic antifungal agents. *Advances in Pharmacology* **44**, 343-499.
55. Groll AH, Gonzales CE, Giri N, Kligys K, Love W, Peter J, Feuerstein E, Bacher J, Piscitelli SC, Walsh TJ (1999) Liposomal nystatin against experimental pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits: efficacy, safety and non-compartmental pharmacokinetics. *J Antimicrob Chemother* 43:95-103.

56. Harari S (1999) Current strategies in the treatment of invasive *Aspergillus* infections in immunocompromised patients. *Drugs* 58: 621-631.
57. Hauser SP, Udupa KB, Lipschitz DA (1994) Effects of ceftazidime, a β -lactam antibiotic, on murine haemopoiesis in vitro. *Br J Haematol* 86:733-739.
58. Heel RC, Brogden RN, Pakes GE, Speight TM, Avery GS (1978) Econazole: A review of its antifungal activity and therapeutic efficacy. *Drugs* 16: 177-201.
59. Heel RC, Brogden RN, Pakes GE, Speight TM, Avery GS (1980) Miconazole: A preliminary review of its therapeutic efficacy in systemic fungal infections. *Drugs* 19: 7-30 .
60. Heel RC, Brogden RN, Carmine A, Morley PA, Speight TM, Avery GS (1982) Ketoconazole: A preliminary review of its therapeutic efficacy in superficial and systemic fungal infections. *Drugs* 23: 1-36.
61. Heykants J, Van Peer A, Van de Velde V, Van Rooy P, Meuldermans W, Lavrijsen K, Woestenborghs R, Van Cutsem J, Cauwenbergh G (1989). The clinical pharmacokinetics of itraconazole: An overview. *Mycoses* 32 Suppl.1. 67-87.
62. Hiddemann W, Essink ME, Fegeler W, Zühlsdorf M, Sauerland C, Büchner Th (1991) Antifungal treatment by amphotericin B and 5-fluorocytosine delays the recovery of normal hematopoietic cells after intensive cytostatic therapy for acute myeloid leukemia. *Cancer* 68:9-14.
63. Higashigawa M, Kuwabara H, Cao DC, Hori H, Ohkubo T, Kawasaki H, Ido M, Komada Y, Sakurai M (1996) Heterogeneous effects of G-CSF and GM-CSF on cell growth and ara-c cytotoxicity in childhood leukemias which express myeloid markers. *Leuk Lymphoma* 22:279-285.
64. Horst HA, Parwaresh R, Loffler H (1996) Thrombocytopenia and leukopenia associated with

- itraconazole. *Ann Intern Med* 125: 156-157.
65. Hostetler JS, Hanson LA, Stevens DA (1992) Effect of cyclodextrin on the pharmacology of antifungal oral azoles. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 477-480.
 66. Huijgens PC, Simoons-Smit AM, Loenen AC, Prooy E, van Tinteren H, Ossenkoppele GJ, Jonkhoff AR (1999) Fluconazole versus itraconazole for prevention of fungal infections in haemato-oncology. *J Clin Pathol* 52: 376-380.
 67. Janoff AS, Perkins WR, Saletan SL, Swenson CE (1993) Amphotericin B lipid complex (ABLIC) a molecular rationale for the attenuation of amphotericin B related toxicities. *J Liposome Res* 3:451-471.ehn U (1988) Managing fungal and viral infection in the immunocompromised host. *Recent Results in Cancer Research* 108:61-70.
 68. Jehn, U. (1988). Managing fungal and viral infection in the immunocompromised host. *Recent Results in Cancer Research* 108: 61-70.
 69. Jubinsky PT, Laurie AS, Nathan DG, Yetz-Aldepe J, Sieff CA (1994) Expression and function of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha subunit. *Blood* 84: 4174-4185.
 70. Kauffman CA, Frame PT (1977) Bone marrow toxicity associated with 5-fluorocytosine therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 11: 244-247.
 71. Kauffman CA, Carver PL (1997) Use of azoles for systemic antifungal therapy. *Advances in Pharmacology* **39**. 143-89.
 72. Kinsky SC, Avruch J, Permutt M, Rogers HB, Schonder AA (1962) The lytic effects of polyene antifungal antibiotics on mammalian erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*

9:503-507.

73. Kiss C, Cesano A, Zsebö KM, Clark SC, Santoli D (1993) Human stem cell factor (c-kit ligand) induces an autocrine loop of growth in a GM-CSF-dependent megakaryocytic leukemia cell line. *Leukemia* 7:235-240.
74. Kiss C, Surrey S, Schreiber AD, Schwarz E, McKenzie SE (1996) Human c-kit ligand (stem cell factor) induces platelet Fc receptor expression in megakaryoblastic cells. *Exp Hematol* 24:1232-1237 .
75. Kissling M, Keller, P., Fernex, M. (1988). Effect of 5-fluorocytosine in comparison with amphotericin B and/or 5-fluorouracil on the formation of human mature bursts/colonies of haemopoietic progenitor cells. *Mycoses* **31**, 107-112.
76. Knapp W, Strobl H, Majdic O (1994) Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry* 18:187-198.
77. Koeffler HP, Golde DW (1977). Amphotericin inhibition of hematopoiesis *in vitro*. *Am J Hematol* 3: 57-62.
78. Koeffler HP, Golde DW (1979). 5-fluorocytosine: Inhibition of hematopoiesis *in vitro* and reversal of inhibition by uracil. *J Infect Dis* 139: 438-443.
79. Kobbe G, Bauser U, Rieth G, Hunterlitorkuglu A, Söhngen D, Aivado M, Aul C, Heyll A (1998) Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mediated mobilization of leukemic cells in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia expressing myeloid antigens (my+Ph+ALL). *Am J Hematol* 58:330-333.
80. Komada Y, Zhou Y-W, Zhang S-L, Azuma E, Sakurai M (1993) Role in growth regulation of cytokines and cytokine receptors in acute lymphoblastic leukaemia expressing myeloid markers. *Br J Haemat* 84: 408-415.

81. Kubota A, Okamura S, Shimoda K, Harada M, Niho Y (1994) The c-kit molecule and the surface immunophenotype of human acute leukemia. *Leuk Lymphoma* 14:421-428.
82. Lajtha LG (1981) Which are the leukaemic cells ? *Blood Cells* 7: 45-62.
83. Lauria F, Bagnara GP, Rondelli D, Raspadori D, Strippoli P, Bonsi L, Ventura MA, Montanaro LL, Bubola G, Tura S, Broudy VC (1995) Cytofluorimetric and functional analysis of c-kit receptor in acute leukemia. *Leuk Lymphoma* 18: 451-455.
84. Lavrijsen APM, Balmus KJ, Nugteren-Huying WM, Roldaan AC, Van't Wout JW, Stricker BHCh (1992) Hepatic injury associated with itraconazole. *The Lancet* 340:251-252.
85. Lowry PA, Deacon D, Whitefield P, McGrath HE, Quesenberry PJ (1992) Stem cell factor induction of in vitro murine hematopoietic colony formation by "subliminal" cytokine combinations: The role of "Anchor factors". *Blood* 80:663-669.
86. Lin AC, Goldwasser E, Bernard EM, Chapman SW (1990) Amphotericin B blunts erythropoietin response to anemia. *J Infect Dis* 161:348-351.
87. Löwenberg B, Touw IP (1993) Hematopoietic growth factors and their receptors in acute leukemia. *Blood* 81: 281-292.
88. Maksymiuk AW, Levine HB, Bodey GP (1982) Pharmacokinetics of ketoconazole in patients with neoplastic diseases. *Antimicrob Agents Chemother* 22: 43-46 .
89. Marmer DJ, Fields BT, France GL, Steele RW (1981) Ketoconazole, amphotericin B and amphotericin B methyl ester: comparative in vitro and in vivo toxicological effects on neutrophil function. *Antimicrob Agents Chemother* 20: 660-665.
90. Matsumoto M, Matsubara S, Yokota T (1991) Effect of combination therapy with recombinant

- human granulocyte colony-stimulating factor (rG-CSF) and antibiotics in neutropenic mice unresponsive to antibiotics alone. *J Antimicrob Chemother* 28:447-453.
91. Meeker TC, Siegel MS, Shiota FM, Crowley JJ, McGuffin RW (1983) Toxicity of amphotericin B, miconazole and ketoconazole to human granulocyte progenitor cells in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 23: 169-171.
 92. Mehta RT, Hopfer RL, Juliano RL, Lopez-Berestein G (1989) A comparison of in vitro toxicity and antifungal efficacy of membrane-active drugs after liposome encapsulation. *Selective Cancer Therapeutics* 5:113-117.
 93. Metcalf D (1992) Hemopoietic regulators. *Trends Biochem Sci* 17:286-289.
 94. Meunier F (1994) Future directions of antimycotic therapy. *Mycoses* 37:77-82.
 95. Miller RP, Bates JH (1969) Amphotericin B toxicity. A follow-up report of 53 patients. ??? 71:1089-1095.
 96. Mire-Sluis AR, Thorpe R (eds) (1998) Cytokines. Academic Press Inc., San Diego
 97. Mirro J, Hurwitz CA, Behm FG, Head DR, Raimondi SC, Crist WM, Ihle JN (1993) Effects of recombinant human hematopoietic growth factors on leukemic blasts from children with acute myeloblastic or lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 7:1026-1033 .
 98. Mitelman F (ed) (1995) ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature. S. Karger, Basel
 99. Murayama T, Imoto S, Natazuka T, Chihara K, Matsui T (1998) Proliferative reaction of myelogenous leukemia cells with cytokines G-CSF, GM-CSF, M-CSF, SCF and TPO. *Leuk Res* 22:557-560.

100. Muroi K, Nakamura M, Amemiya Y, Suda T, Miura Y (1995) Expression of c-kit receptor (CD117) and CD34 in leukemic cells. *Leuk Lymphoma* 16:297-305.
101. Natarajan U, Brummer E, Stevens DA (1997) Effect of granulocyte colony-stimulating factor on the candidacidal activity of polymorphonuclear neutrophils and their collaboration with fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 41:1575-1578.
102. Neftel KA, Hauser SP, Müller MR (1985) Inhibition of granulopoiesis in vivo and in vitro by β -lactam antibiotics. *J Inf Dis* 152:90-98.
103. Neftel KA, Hübscher U (1987) Effects of β -lactam antibiotics on proliferating eucaryotic cells. *Antimicrob Agents Chemother* 31:1657-1661.
104. Negroni R, Arechavala AI (1993) Itraconazole: Pharmacokinetics and indications. *Arch Med Res* 24: 387-393.
100. Niitsu N, Umeda M (1996) Fungemia in patients with hematologic malignancies: therapeutic effects of concomitant administration of fluconazole and granulocyte-colony-stimulating factor. *Chemotherapy* 42:215-219.
101. Nishii K, Kita K, Miwa H, Kawakami K, Nakase K, Masuya M, Morita N, Omay SB, Otsuji N, Fukumoto M, Shirakawa S (1992) C-kit gene expression in CD7-positive acute lymphoblastic leukemia: close correlation with expression of myeloid-associated antigen CD13. *Leukemia* 6: 662-668.
102. Odds FC (1989) Antifungal activity of saperconazole (R 66905) *in vitro*. *Antimicrob Chemother* 24: 533-537.
103. Ohno R (1994) Use of Filgrastim (r-metHuG-CSF) in acute myeloid leukemia. In: Morstyn G, Dexter TM (eds) Filgrastim (r-metHuG-CSF) in clinical practice. Marcel Dekker, New York, pp 231-252

104. Ohno R (1998) Granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor in the treatment of acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 22: 1143-1154.
105. Orazi A, Gordon MS, John K, Sledge G, Neiman RS, Hoffman R (1995) In vivo effects of recombinant human stem cell factor treatment. *Am J Clin Pathol* 103: 177-184.
106. Ottmann OG, Hoelzer D (1998) Growth factors in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 22:1171-1178.
107. Park LS, Waldron PE, Friend D, Sassenfeld HM, Price V, Anderson D, Cosman D, Andrews RG, Bernstein ID, Urdal DL (1989) Interleukin-3, GM-CSF, and G-CSF receptor expression on cell lines and primary leukemia cells: receptor heterogeneity and relationship to growth factor responsiveness. *Blood* 74:56-65.
108. Piao YF, Okabe T (1990) Receptor binding of human granulocyte colony-stimulating factor to the blast cells of myeloid leukemia. *Cancer Res* 50:1671-1674.
109. Pietsch T, Kyas U, Steffens U, Yakisan E, Hadam MR, Ludwig WD, Zsebo K, Welte K (1992) Effects of human stem cell factor (c-kit ligand) on proliferation of myeloid leukemia cells: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood* 80:1199-1206.
110. Pike BL, Robinson WA (1970) Human bone marrow colony growth in agar-gel. *J Cell Physiol* 76:77-84.
111. Pontvert-Delucq S, Hibner U, Vilmer E, Baillou C, Rochrlich P, Heymann D, Najman A, Guigon M, Lemoine FM (1996) Heterogeneity of B lineage acute lymphoblastic leukemias (B-ALL) with regard to their *in vitro* spontaneous proliferation, growth

- factor response and BCL-2 expression. *Leuk Lymphoma* 21: 267-280.
112. Powderly WG, Saag MS, Cloud GA, Robinson P, Meyer RD, Jacobson JM, Graybill JR, Sugar AM, McAuliffe VJ, Follansbee SE, Tuason CU, Stern JJ, Feinberg J, Hafner R, Dismukes WE (1992) Controlled trial on fluconazole or amphotericin B to prevent relapse of cryptococcal meningitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *New Engl Med* 326:793-798.
113. Prentice, A. G., Warnock, D. W., Johnson, S. A. N., Phillips, M. J., Oliver, D. A. (1994). Multiple dose pharmacokinetics of an oral solution of itraconazole in autologous bone marrow transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* 34: 247-252.
114. Rapoport AP, Abboud CN, Dierschke JF (1992) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): Receptor biology, signal transduction, and neutrophil activation. *Blood Rev* 6: 43-57.
115. Rogers, KM (1992) Topics in clinical pharmacology: Filgrastim, a myeloid colony stimulating factor. *Am J Med Sciences* 303: 429-431.
116. Rochlitz, CF, Damon, LE, Russi, MB, Geddes, A, Cadman EC (1988) Cytotoxicity of ketoconazole in malignant cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 21: 319-322.
117. Roilides, E., Walsh, JT, Rubin, M, Venzon, D, Pizzo, PA (1989). Effects of antifungal agents on the function of human neutrophils *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 196-201.
118. Rowan-Kelly, B., Ferrante, A., Thong, Y. H. (1984). Modification of polymorphonuclear leucocyte function by imidazoles. *Int J Immunopharmacol* 6: 389-393.

- 119.Saarinen-Pihkala UM, Lanning M, Perkkiö M, Mäkipernaa A, Salmi TT, Hovi L, Vettenranta K (2000) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor support in therapy of high-risk acute lymphoblastic leukemia in children. *Med Pediatr Oncol* 34:319-327.
- 120.Sallerfors B, Olofsson T (1991) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in serum during induction treatment of acute leukaemia. *Br J Haematol* 78:343-351.
- 121.Schaffner A (1989) Experimental basis for the clinical epidemiology of fungal infections. A review. *Mycoses* 32: 499-515.
- 122.Schrapppe M, Reiter A, Henze G, Niemeyer C, Bode U, Kuhl J, Gadner H, Havers W, Pluss H, Kornhuber B, Zintl F, Ritter J, Urban C, Niethammer D, Riehm H (1998) Prevention of CNS recurrence in childhood ALL: results with reduced radiotherapy combined with CNS-directed chemotherapy in four consecutive ALL-BFM trials. *Klin Pädiatr* 210: 192-199.
- 123.Singh N, Yu VL, Miele LA, Wagener MM (1993) β -Lactam antibiotic-induced leukopenia in severe hepatic dysfunction: Risk factors and implications for dosing in patients with liver disease. *Am J Med* 94:251-256.
- 124.Sheehan HL, Storey GW (1947) Improved method of staining leukocyte granules with Sudan black B. *Br J Path Bact* 59:336-
- 125.Shimoda K, Okamura S, Harada N, Ikematsu W, Kondo S, Kawasaki C, Tanaka T, Etou T, Akashi K, Okamura T, Shibuya T, Harada M, Niho Y (1992) Granulocyte colony-stimulating factor receptors on human acute leukemia: biphenotypic leukemic cells possess granulocyte colony-stimulating factor receptors. *Cancer Res* 52: 3052-3055.

126. Shinjo K, Takeshita A, Ohnishi K, Ohno R (1997) Granulocyte colony-stimulating factor receptor at various differentiation stages of normal and leukemic hematopoietic cells. *Leuk Lymphoma* 25:37-46.
127. Shirley SF, Little R (1979) Immunopotentiating effects of amphotericin B: Enhanced contact sensitivity in mice. *J Immunol* 123: 2878-2882.
128. Spielberger RT, Falleroni MJ, Coene AJ, Larson RA (1992) Concomittant amphotericin B therapy, granulocyte transfusions, and GM-CSF administration for disseminated infection with *Fusarium* in a granulocytopenic patient. *Clin Infectious Dis* 16: 528-530.
129. Stamm AM, Diasio RB, Dismukes WE, Shadomy S, Cloud GA, Bowles CA, Karam GH, Espinel-Ingroff A (1987) Toxicity of amphotericin B plus flucytosine in 194 patients with cryptococcal meningitis. *Am J Med* 83: 236-242.
130. Stevens DA, Levine HB, Deresinski SC (1976) Miconazole in coccidioidomycosis: Therapeutic and pharmacologic studies in man. *Am J Med* 60:191-202.
131. Stevens DA (1998) Combination immunotherapy and antifungal chemotherapy. *Clin Infect Dis* 26:1266-1269.
132. Summers KK, Hardin TC, Gore SJ, Graybill JR (1997) Therapeutic drug monitoring of systemic antifungal therapy. *Antimicrob Chemother* 40: 753-764.
133. Sung JP, Grendahl JG (1977) Side effects of miconazole for systemic mycoses. *New Engl J Med* 297:786-787.
134. Sugar AM, Saunders C (1988) Oral fluconazole as suppressive therapy of disseminated cryptococcosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *American J Med* 85:481-489.

- 135.Swenson CE, Perkins WR, Roberts P, Ahmad I, Stevens R, Stevens DA, Janoff AS (1998) In vitro and in vivo antifungal activity of amphotericin B lipid complex: Are phospholipases important ?. *Antimicrob Agents Chemother* 42:767-771.
- 136.Sykora KW, Tomeczkowski J, Reiter A (1997) c-kit receptors in childhood malignant lymphoblastic cells. *Leuk Lymphoma* 25: 201-216.
- 137.Takács FJ, Tomkiewitz ZM, Merrill JP, (1963) Amphotericin B nephrotoxicity with irreversible renal failure. *Annals Int Med* 59:716-724.
- 138.Tomeczkowski J, Yakisan E, Wieland B, Reiter A, Welte K, Sykora KW (1995) Absence of G-CSF receptors and absent response to G-CSF in childhood Burkitt's lymphoma and B-ALL cells. *Br J Haemat* 89: 771-779.
- 139.Touw I, Groot-Loonen J, Broeders L, van Agthoven T, Hählen K, Hagemeyer A, Löwenberg B (1989) Recombinant hematopoietic growth factors fail to induce a proliferative response in precursor B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 3:356-362.
- 140.Tricot G, Joosten E, Boogaerts A, Vande Pitte J, Cauwenbergh G (1987) Ketoconazole vs. itraconazole for antifungal prophylaxis in patients with severe granulocytopenia: Preliminary results of two nonrandomized studies. *Rev Infectious Diseases* 9:S94-S99.
- 141.Troke PF (1987) Efficacy of fluconazole in animal models of superficial and opportunistic systemic fungal infection. A következõ könyvben: Fromtling R.A. (1987) Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents. J.R. Prous Science Publishers, 103-112.
- 142.Trujillo MA, Galgiani JN, Sampliner RE (1994) Evaluation of hepatic injury arising

- during fluconazole therapy. *Archives of Internal Medicine* 154:102-104.
143. Tsuchiya H, Adachi N, Asou N, Takatsuki K, Matsuda I, Kawano F, Murakami T, Mizutani S, Watanabe M (1991) Responses to granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage CSF in Ph¹-positive acute lymphoblastic leukemia with myeloid surface markers. *Blood* 77: 411-413.
144. Tucker RM, Haq Y, Denning DW, Stevens DA (1990) Adverse events associated with itraconazole in 189 patients on chronic therapy. *J Antimicrob Chemother* 26:561-566.
145. Ulich TR, del Castillo J, McNiece IK, Yi ES, Alzona CP, Yin S, Zsebo KM (1991) Stem cell factor in combination with granulocyte colony-stimulating factor (CSF) or granulocyte-macrophage CSF synergistically increases granulopoiesis *in vivo*. *Blood* 78:1954-1962.
146. Utz JP, Bennett JE, Brandriss MW, Butler WT (1964) Amphotericin B toxicity. *Annals Int Med* 61:334-354.
147. Valverde LR, Matutes E, Farahat N, Heffernan A, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Catovsky D (1996) C-kit receptor (CD117) expression in acute leukemia. *Ann Hematol* 72:11-15.
148. Van Vlem B, Vanholder R, De Paepe P, Vogelaers D, Ringoir S (1996) Immunomodulating effects of antibiotics: Literature review. *Infection* 24:275-291.
149. Visani G, Tosi P, Zinzani PL, Manfroi S, Ottaviani E, Cenacchi A, Carrara P, Clavio M, Gobbi M, Tura S (1996) FLAG (fludarabine, cytarabine, G-CSF) as a second line therapy for acute lymphoblastic leukemia with myeloid antigen expression: in vitro and in vivo effects. *Eur J Haematol* 56: 308-312.
150. Viscoli C, Castagnola E, Fioredda F, Ciravegna B, Barigione G, Terragna A (1991)

- Fluconazole in the treatment of candidiasis in immunocompromised children. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 365-367.
151. Vose JM, Armitage JO (1995) Clinical applications of hematopoietic growth factors. *J Clin Oncol* 13:1023-1035.
152. Vuddhakul, V, Mai, GT, McCormack, Seow, WK, Thong, YH (1990) Suppression of neutrophil and lymphoproliferative responses *in vitro* by itraconazole but not fluconazole. *Int J Immunopharmacol* 12: 639-645.
153. Wang C, Curtis JE, Geissler EN, McCulloch EA, Minden MD (1989) The expression of the proto-oncogene C-kit in the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 3: 699-702.
154. Weaver A, Ryder D, Crowther D, Dexter TM, Testa NG (1996) Increased numbers of long-term culture-initiating cells in the apheresis product of patients randomized to receive increasing doses of stem cell factor administered in combination with chemotherapy and a standard dose of granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 88: 3323-3328.
155. Welte K, Reiter A, Mempel K, Pfetsch M, Schwab G, Schrappe M, Riehm H (1996a) A randomized phase-III study of the efficacy of granulocyte colony-stimulating factor in children with high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 87: 3143-3150.
156. Welte K, Gahrilove J, Bronchud MH, Platzer E, Morstyn G (1996b) Filgrastim (r-metHuG-CSF): The first 10 years. *Blood* 88:1907-1929.
157. Wong-Beringer A, Shriner K (2000) Fluconazole-induced agranulocytosis with eosinophilia. *Pharmacotherapy* 20:484-486.

9. FÜGGELÉK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

01. **Benkő I.**, Megyeri A., Hernádi F., Kovács P.
Antifungális hatású imidazol-származékok hatása egér csontvelősejtek *in vitro* kolóniaképzésére.
Acta Pharm. Hung. **66**, 241-245, 1996.
02. **Benkő I.**, F. Hernádi, A. Megyeri, A. Kiss, G. Somogyi, Z. Tegyei, F. Kraicsovits, P. Kovács,
Comparison of toxicity of fluconazole and other azole antifungal drugs to murine and human granulocyte-macrophage progenitor cells (CFU-GM) *in vitro*.
J. Antimicrob. Chemother. **43**, 675-681, 1999.
IF: 3,296
03. Gál, Zs., Á. Koncz, I. Szabó, E. Deák, **I. Benkő**, Gy. Barabás, F. Hernádi, P. Kovács, A
synthetic γ -lactone group with β -lactamase inhibitory and sporulation effects.
J. Chemother. **12**, 274-279, 2000.
IF: 0,921
04. **Benkő I.**, P. Kovács, I. Szegedi, A. Megyeri, A. Kiss, É. Oláh, J. Kappelmayer, C.
Kiss, Effect of myelopoietic and pleiotropic cytokines on colony formation of blast
cells of children with acute lymphoblastic leukemia.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. **363**, 499-508 2001.
IF: 2,869