

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D) ÉRTEKEZÉS

**In vitro gyógyszerérzékenységi vizsgálat az
individualizált daganatellenes kemoterápiában**

Dr. Márkász László

**Témavezető: Dr. Oláh Éva
egyetemi tanár**

**Debreceni Egyetem
Orvos és Egészségtudományi Centrum
Gyermecklinika
2007**

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés.....	5
1.1. A daganatos betegségek epidemiológiája	5
1.1.1. Felnőttkori daganatok	5
1.1.2. Gyermekkori daganatos betegségek.....	6
1.2. A daganatterápia célja	7
1.3. Célkitűzések.....	9
2. Irodalmi áttekintés	11
2.1. A daganatellenes kemoterápia fejlődésének története	11
2.1.1. Első lépések.....	11
2.1.2. Fólsav antagonisták	11
2.1.3. Antimetabolitok, vinca alkaloidok.....	12
2.1.4. Kemoterápiás protokollok	12
2.1.5. Kemoterápia szerepe az adjuváns terápiában	13
2.1.6. Taxánok, camptotecinek	13
2.1.7. Platina alapú gyógyszerek.....	13
2.1.8. Egyéb vegyületek.....	14
2.1.9. Célzott terápiák.....	14
2.1.10. Várható újabb gyógyszerek.....	15
2.2. A citosztatikumok hatásmechanizmusa és mellékhatásaik	16
2.3. Hogyan választották ki a citosztatikumokat a különböző daganattípusok kezelésére?	17
2.4. Daganatsejtek tulajdonságai és gyógyszerérzékenységük változása a terápia alatt	18
2.5. Prognosztikai faktorok és rizikócsoportok.....	19
2.6. In vitro gyógyszerérzékenységi vizsgálatok.....	20
2.6.1 In vitro gyógyszerérzékenységi tesztek	20
2.6.2. Az in vitro gyógyszerkoncentrációk kiválasztása	22
2.7. A poszttranszplantációs lymphoproliferatív betegség (PTLD) és kezelési lehetőségei.....	23
2.7.1. A PTLD etiológiája	23
2.7.2. A PTLD in vitro kísérletes modellje	24
2.7.3. PTLD kialakulási kockázata és kezelése	24
2.8. NK sejtek alkalmazása a citosztatikummal kombinált daganatellenes immunterápiában.....	26
2.8.1. NK sejtek tulajdonságai és működése	26
2.8.2. Az NK sejtek szerepe az immunterápiában.....	26
2.9. Kolónia stimuláló faktorok alkalmazása az adjuváns terápiában	27
2.9.1. A G-CSF klinikai alkalmazása és hatásmechanizmusa.....	27
2.9.2. G-CSF receptor előfordulása lymphoid blasztokon.....	28
3. Anyagok és módszerek	30
3.1. Lymphoblastoid sejtvonalak gyógyszerérzékenységének vizsgálata.....	30
3.1.1. Sejtvonalak és tenyésztési körülmények.....	30
3.1.2. Gyógyszerek	30
3.1.3. Fluoreszcens in vitro gyógyszerérzékenységi teszt	31
3.2. NK vonalak citotoxicitásának vizsgálata citosztatikumok jelenlétében.....	33
3.2.1. Humán poliklonális NK sejtkultúrák nyerése perifériás vérből, az alkalmazott tenyésztési körülmények.....	33

3.2.2. Sejtvonalak és tenyésztési körülmények.....	33
3.2.3. <i>In vitro</i> citotoxicitás teszt (standard ⁵¹ Cr citotoxicitás teszt)	34
3.2.4. <i>In vitro</i> citotoxicitás teszt (új fluoreszcensen jelölt citotoxicitás teszt)	34
3.2.5. Gyógyszerek	36
3.3. G-CSF előkezelés hatása a leukémiás sejtek daunorubicin érzékenységére	39
3.3.1. Sejtvonal és tenyésztési körülmények	39
3.3.2. Flow cytometria	39
3.3.3. Immunoblot analízis	40
3.3.4. MTT teszt	40
4. Eredmények	42
4.1. A lymphoblastoid sejtvonalak gyógyszerérzékenysége.....	42
4.1.1. A különböző LCL vonalak gyógyszerérzékenységi mintázata	42
4.1.2. A hatástalan és kifejezetten hatásos gyógyszerek kiválasztása	44
4.2. Citosztatikumok hatása NK sejtek citotoxikus működésére	47
4.2.1. Az új fluoreszcens citotoxicitás teszt összehasonlítása a standard ⁵¹ Cr citotoxicitás teszttel	47
4.2.2 A gyógyszerek hatása a különböző NK vonalak ölképességére	48
4.2.3 A hatástalan és kifejezetten hatásos gyógyszerek meghatározása.....	51
4.3. KG-1 sejtvonal daunorubicin érzékenységének változása G-CSF előkezelést követően.....	52
4.3.1. A G-CSF receptor jelenléte és aktiválódása a KG-1 sejteken	52
4.3.2. A daunorubicin és G-CSF hatása a KG-1 sejtekre	53
4.3.3. A felszíni markerek expressziójának változása G-CSF és daunorubicin kezelést követően	55
5. Megbeszélés	56
5.1. Az epirubicin és paclitaxel hatásos gyógyszerek lehetnek a PTLD és egyéb EBV indukálta lymphoproliferatív betegségek kezelésében.....	57
5. 2. Az NK sejt alapú immunterápiával kombinálható citosztatikumok	60
5.3. G-CSF csökkentheti a myeloid markereket hordozó leukémiasejtek daunorubicin érzékenységét.....	62
5.4. Új megállapítások.....	65
6. Összefoglalás	66
Summary	67
7. Irodalomjegyzék.....	69
8. Tárgyszavak	85
Keywords.....	85
9. Köszönetnyilvánítás	85
10. Függelék.....	86
10.1. Táblázatok	86
10.2. Közlemények	92
10.2.1. A tézisekhez kapcsolódó in extenso dolgozatok (IF az ISI 2005 alapján)	92
10.2.2. A tézisek támogatásában tartott előadások.....	92
10.2.3. A tézisek témájában bemutatott poszterek	93

Rövidítések jegyzéke

ABL: Abelson protoonkogén	HTCA: human tumor cloning assay
ADCC: antibody-dependent cellular toxicity	IFN- γ : γ -interferon
AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome	IL-2: interleukin-2
ALL: akut lymphoid leukémia	IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium
AML: akut myeloid leukémia	KE: killing effectiveness
ARL: AIDS related immunoblastic lymphoma	KIVIF: Karolinska Institute Visualisation Core Facility
ATP-teszt: adenosine triphosphate bioluminescence assay	LAK: lymphokine activated killer
AUC: area under the curve	LCL: lymphoblastoid cell line
BCR: breakpoint cluster region	LFA: lymphocyte function-associated antigen
BFM: Berlin-Frankfurt Münster	LMP: latent membrane protein
BSA: bovine serum albumin	MAP: mitogen-activated protein
CCS: capillary cloning system	MCS: mean cell survival
CD: cluster of differentiation	MDR: multidrug resistance protein
CE: cytotoxic effect	MKE: mean killing efficacy
CHOP: cyclophosphamid, doxorubicin, vincristin, prednison protokoll	MOPP: mustárnitrogén, vincristin, procarbazin, prednison protokoll
CML: krónikus myeloid leukémia	MP-teszt: monolayer proliferation assay
CSFs: colony stimulating factors	MTT: metil-thiazol-tetrazolium
DEOEC: Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum	NCCSC: National Cancer Chemotherapy Service Center
DHAP: cisplatin, citozin-arabinozid, dexamethason	NCI: National Cancer Institute
DiSC: differential staining toxicity	NK: natural killer
DMSO: dimethyl sulfoxid	OD: optikai denzitás
EBNA: EBV encoded nuclear antigen	PBS: phosphate buffered saline
EBV: Epstein-Barr vírus	PDGF-R: platelet-derived growth factor receptor
ECL: electrogenerated chemiluminescence	POMP: methotrexat, vincristin, 6-mercaptopurin, prednison protokoll
EDR: extreme drug resistance	PTLD: posttransplant lymphoproliferative disorder; poszttranszplantációs lymphoproliferatív betegség
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay	RAUC: ratio of area under the curve
Epo: erythropoetin	RIPA: radioimmunoprecipitation assay
ERK: extracellular signal-regulated kinase	RMAPC: ratio of maximum achieved plasma concentration
FCS: fetal calf serum	SCID: severe combined immunodeficiency disease
G-CSF: granulocyta-kolónia stimuláló faktor	SDS: sodium dodecyl sulfate
G-CSFR: granulocyta-kolónia stimuláló faktor receptor	TBS: tris buffered saline
GFs: growth factors	TCD: T cell depletion
GM-CSF: granulocyta-monocyta-kolónia stimuláló faktor	VAPEC-B: doxorubicin, etopozid, cyclophosphamid, methotrexat, bleomycin, vincristin protokoll
HDRA: histoculture drug-response assay	XLP: X-linked lymphoproliferative disorder
HDRT: high density replicator tool	
HLA: human leukocyte antigen	
HRP: horseradish peroxidase	

1. Bevezetés

1.1. A daganatos betegségek epidemiológiája

1.1.1. Felnőttkori daganatok

A daganatos betegségek minden korcsoportban a vezető halálokok között szerepelnek. 1995-ös adatok szerint Európában a tüdőrák volt a leggyakoribb, ezt a vastag és végbélrák, majd az emlőrák követte. Férfiakban a tüdőrák állt az első helyen (22%), majd a vastag- és végbélrák (12%), valamint a prosztatarák (11%) következett. A nők esetében az emlőrák (26%), a vastag- és végbélrák (14%) végül a gyomorrák (7%) volt a sorrend. A daganatos halálokok listáját a tüdőrák vezeti a daganatos összhalálozás 20%-át adva, ezt a vastag- és végbélrák, a gyomorrák és az emlőrák követi. [1].

Az Európai Unióban a daganatos betegségek mortalitása 1980-1988 között emelkedést mutatott, majd 1988-1999 között 10%-os csökkenés következett be [2], ami nagyrészt a férfiak tüdőrák okozta halálozásának csökkenésével hozható összefüggésbe [3]. A teljes mortalitás csökkenésében szerepet játszik továbbá a gyomorrák [4], az intestinális daganatok [5], a női emlőrák [6] és cervix carcinoma [7], a leukémiák [8], a Hodgkin lymphoma [9], és a hererák [10] okozta halálozás csökkenése is, ami a diagnosztika és a kezelési protokollok fejlődésének köszönhető. 2004-ben a tíz új tagállam, köztük Magyarország európai uniós csatlakozása kedvezőtlenül befolyásolta a daganatos betegségek európai uniós mortalitási adatait, mivel a daganatos betegségek aránya a csatlakozó országok többségében jelentősen magasabb volt, mint a korábbi uniós tagországokban [11].

A magyarországi rákincidencia mindkét nemben messze felülmúlja nemcsak az uniós hanem a kelet-európai átlagot is [1]. Európai és nemzetközi halálozási statisztikák szerint mind a férfiak, mind a nők esetében első helyen állunk a daganatos halálozásban [12]. Magyarországon ma minden negyedik ember rosszindulatú betegségben hal meg [13]. A magyarországi daganatos halálozás számának folyamatos emelkedése 1999-2000-ben megtörni látszott [13]. A rákincidenciát a táplálkozási szokások, a dohányzás és töményszeszfogyasztás mértéke, a környezetszennyezettség, a népesség korösszetétele befolyásolhatja. Jelentős meghatározó tényező - a diagnosztikus eljárások és a terápiás beavatkozások fejlettsége mellett - a rákszűrés minősége és szervezettsége is.

1.1.2. Gyermekkori daganatos betegségek

A daganatos betegségek abszolút száma gyermekkorban nem nagy, jelentőségüket mégis az adja, hogy második helyen állnak a halálozási statisztikában a balesetek mögött. Incidenciájuk a 14 év alatti korosztályban 14-15/100 ezer. Az egyes korcsoportokat tovább vizsgálva jelentős incidencia különbségek figyelhetők meg. Nemzetközi adatok szerint 1-4 éves és a 15-19 éves korosztályban a daganatok kétszer gyakrabban fordulnak elő, mint az 5-14 évesek között [14]. Az összes daganatos betegség 30,2%-át a leukémiák adják, ezt az agydaganatok követik (21,7%). Kisebb a Hodgkin és non-Hodgkin lymphomás esetek aránya (10,9%). A 8-10%-ban megjelenő solid tumorok közül gyermekkorban a Wilms tumor, a neuroblastoma, az osteosarcoma és a Ewing sarcoma a gyakoribbak. A többi solid tumor előfordulása gyermekkorban ritka [14]. Az egyes daganatos *betegségcsoportok* gyakorisága is eltérést mutat a különböző korosztályokban.. Közvetlenül születést követően a neuroblastoma fordul elő leggyakrabban, az akut lymphoid leukémia incidenciája 1-4 éves között, az agydaganatoké 5-9 éves kor között a legmagasabb. A carcinomák csak 15 éves kor után jelennek meg számottevő mértékben [15]. A gyermekkori carcinomák, lymphomák, csírasejtes daganatok incidenciája Európában 1970 és 1990 között lassú emelkedést mutatott [16], míg ugyanebben az időszakban a leukémiák incidenciája nem változott [17].

Magyarországon a 0-18 éves korosztályban évente kb. 300-320 új rosszindulatú daganatos betegséget diagnosztizálnak. A nemzetközi incidenciához hasonlóan a betegek közel 30%-a akut leukémiában szenved; ehhez hasonló sőt újabban ezt meghaladó arányban jelentkeznek a központi idegrendszer daganatai. Kelet-Magyarországon végzett epidemiológiai felmérés szerint 1986-tól a daganatok korcsoportra standardizált incidenciája lassú, de szignifikáns emelkedést mutat [18]. A környezeti hatások patogenetikai szerepére utal, hogy az egyes daganattípusok előfordulásában földrajzi régióként eltérések figyelhetők meg (pl. radioaktív sugárzás, vegyi szennyeződés) [19]. Bizonyos területi halmozódások hazánkban is megfigyelhetők [20]. A tumorok többsége a felnőttkori daganatokhoz hasonlóan sokkal rövidebb latencia idő után jelenik meg. Kezelés nélkül gyorsabban progrediálnak, jellemző rájuk a gyors proliferációs készség. Egyes formáik, főleg a korán manifesztálódó esetek gyakran veleszületett genetikai rendellenességekkel vagy embrionális fejlődési zavarokkal társulnak. Az eltérő genetikai háttér mellett ezzel is magyarázható, hogy a kemoterápiás kezelésre általában jobban reagálnak, mint a felnőttkori formák. Magyarországon 1971 óta működik a

gyermekonkológiai hálózat, nyolc regionális központtal: három a fővárosban, öt vidéki nagyvárosokban. Valamennyi hazai leukémiás és daganatos beteg kezelése- egységes diagnosztikus és terápiás elvek alapján- az említett centrumokban történik. A kezelésben az Európai Gyermekonkológiai Munkacsoport (BFM) által javasolt protokollokat követjük. A kemoterápiás szerek fejlődésének és az összetett terápiás protokolloknak köszönhetően, ma már a gyermekkori daganatok kb. 60%-a gyógyítható. A túlélők aránya egyes betegségeknél ennél is jobb: Wilms tumorban, Hodgkin lymphomában kb. 80%-os, akut lymphoid leukémiában (ALL) 75%-os a túlélés [14]. Az ALL alacsony kockázatú csoportjában (kedvező genetikai jellemzők mellett) a túlélők aránya a 90%-ot is meghaladhatja [21]. Az ALL-es betegek 5 éves túlélésében a 70-es évekhez viszonyítva 40%-os javulás következett be [14, 22].

1.2. A daganatterápia célja

Az agresszív, kombinált kemoterápia, az irradiációs kezelés, a megfelelő indikáció alapján elvégzett csontvelőtraszplantáció, a javuló szupportív terápia, a biológiai modulátorok alkalmazása eredményeképpen az utóbbi évtizedekben a daganatos betegségek kezelési eredményeiben jelentős javulás következett be. Mégis a daganatos betegek egy jelentős csoportját ma is elveszítjük egyrészt a terápiára nem reagáló alapfolyamat, másrészt az agresszív kemoterápia okozta csontvelő depresszió, s a következményes cytopenia okozta infekciók (bakteriális, gombás) és vérzések miatt. Emellett az irradiáció és a kemoterápia késői toxikus mellékhatásaival, az életminőséget és társadalmi beilleszkedést nehezítő hormonális zavarokkal, fertilitási problémákkal, kognitív és pszichés zavarokkal, s nem utolsósorban a szekunder daganatok fellépésével is számolnunk kell. A korszerű daganatellenes terápia célja ezért a túlélők számának további növelése és a túlélők életminőségének javítása egy hatásosabb, de kevésbé toxikus kezeléssel. A terápia hatásossága a kezelés agresszivitásának növelésével már nem fokozható. A megoldást a kockázathoz adoptált, differenciált, individuális kezelés lehetőségének megteremtése jelentheti. E cél eléréséhez két lehetőség kínálkozik:

1. **A tumorsejtek gyógyszerérzékenységének meghatározása, hatásos citosztatikumok és citosztatikum-kombinációk kiválasztása.** Ebben nyújt segítséget a tumorsejtek *in vitro* gyógyszerérzékenységének vizsgálata, amelynek eredménye prognosztikai faktorként használható.

2. **A másik lehetőség a terápia alatt jelentkező cytopenia kivédése, vagy a cytopeniás fázis lerövidítése, azaz a csontvelői regeneráció elősegítése.** E téren kedvező tapasztalatokat szereztünk a csontvelői növekedési faktorok (G-CSF, granulocyta-kolónia stimuláló faktor; GM-CSF granulocyta-monocyta-kolónia stimuláló faktor) használatával, de a megfelelő betegségek körének kiválasztása, a növekedési faktorok adásának optimális ideje és dózisének pontos meghatározása még vizsgálatokat igényel.

A daganatsejtek biológiai jellemzői és genetikai eltérései alapvetően befolyásolják a daganatok citosztatikum érzékenységét. Az azonos fenotípusú daganatok esetében is jelentős biológiai, genetikai különbségek, így gyógyszerrezisztencia különbségek is lehetnek [23-25]. Ez a differenciált kezelés bevezetésének fontosságát húzza alá és előre vetíti, hogy a jövő daganatterápiájában a kezelési módok további differenciálódása várható. A végső célt a beteg adott daganatának egyedi tulajdonságai alapján összeállított, egyénileg megválasztott, individualizált terápia jelentheti.

A jelen munkám célkitűzéseit az alábbiakban foglalom össze:

1.3. Célkitűzések

1. Új, nagyérzékenységű, automatizálható gyógyszerérzékenységi teszt kifejlesztése, amelynek segítségével nagyszámú citosztatikum hatását tudjuk egyszerre vizsgálni kevés sejt felhasználásával.
2. Vizsgálni kívántuk az Epstein-Barr vírus (EBV) által transzformált lymphoblastoid sejtek *in vitro* gyógyszerérzékenységét.
3. A tesztelt 28 citosztatikum között EBV indukálta lymphoproliferatív betegségek kezelésére eddig még nem használt, *in vitro* hatásosnak bizonyuló gyógyszereket kerestünk.
4. Vizsgálni kívántuk, hogyan befolyásolja a klinikumban leggyakrabban használt 29 citosztatikum a daganatok immunterápiájában is alkalmazott NK (natural killer) sejtek tumorsejt-ölő képességét.
5. Olyan kemoterápiás szereket kerestünk, amelyek – NK sejtés immunterápiával kombinálva - a lehető legkisebb mértékben befolyásolják az NK sejtek ölképességét.
6. A G-CSF-citosztatikum kölcsönhatás tanulmányozása céljából a KG-1 myeloid leukémiás sejt vonalon vizsgáltuk, befolyásolja-e, s ha igen, hogyan befolyásolja a G-CSF előkezelés a leukémiás sejtek daunorubicin érzékenységét.

Egyetemi tanulmányaim befejezése után a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum Gyermekklinikájának Hematológiai/Onkológiai Osztályára kerültem. Itt szembesültem naponta a gyermekkori rosszindulatú betegségek, elsősorban a leukémiák, valamint az agydaganatok és a különböző lágyrészes és csontdaganatok diagnosztikai és terápiás kérdéseivel. Követtem a kezelésre jól reagáló ALL-es gyermekek gyógyulási folyamatát, s azt a küzdelmet, amit a betegség, vagy a kezelés szövődményei, a cytopenia okozta infekciók, vérzések leküzdése érdekében folytatnunk kellett. Megfigyeltem, hogy a neutropeniás fázis lerövidítésére alkalmazott csontvelői növekedési faktor, a granulocita kolónia stimuláló faktor (G-CSF) hatása rendszerint csak néhány nap elteltével jelentkezett, s hogy a sejtszám emelkedését alkalmanként a leukémiás alapfolyamat romlása, a blasztok számának egyidejű emelkedése kísérte. A terápiára eltérően reagáló betegek láttán fogalmazódott meg bennem annak az igénye, hogy a hatásosabb, de kevésbé toxikus kezelés megválasztása érdekében szükséges lenne előre

tájékozódni a daganatsejtek citosztatikumra adott válaszáról. Felmerült bennem az a kérdés is, vajon befolyásolja-e az alkalmazott G-CSF a normál sejtek mellett az ALL-es blasztsejtek proliferációját is? Nem befolyásolja-e ez a növekedési faktor a következő citosztatikum-terápia hatásosságát? A kérdés vizsgálatára alkalmasnak látszott a blasztsejtek *in vitro* gyógyszerérzékenységének vizsgálata a már laboratóriumunkban is alkalmazott MTT teszt segítségével. Első kísérleteimben a KG-1 sejtvonalon vizsgáltam a G-CSF és a daunorubicin együttes hatását. Az MTT teszt azonban nem tette lehetővé nagyszámú gyógyszer egyidejű pontos vizsgálatát, ezért kerestük a módot egy korszerűbb módszer kidolgozására. Erre a stockholmi Karolinska Intézetben kaptam lehetőséget, ahol Dr. Székely László munkacsoportjában módomban volt résztvenni egy új fluoreszcens *in vitro* gyógyszerérzékenységi módszer beállításában. Az új módszer birtokában több lehetőség is kínálkozott speciális daganat-ellenes terápiás kérdések tanulmányozására: vizsgálni kívántuk az Epstein-Barr vírus (EBV) által transzformált lymphoblastoid B sejtek gyógyszerérzékenységi profilját, illetve a leggyakrabban használt citosztatikumok hatását az NK sejtek tumorsejt –ölő képességére. Az általam használt módszer itthoni alkalmazását a jövőben nemzetközi együttműködés teszi lehetővé.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A daganatellenes kemoterápia fejlődésének története

2.1.1. Első lépések

A daganatellenes kemoterápia első próbálkozását az 1940-es évek közepén a mustárnitrogén használata jelentette. A világháborúban vegyi fegyverként használt *mustárgázz*ról és *származékairól* kiderült, hogy alkiláló ágensként megfelelő dózisban adva a gyorsan osztódó csontvelői leukémiás sejteket képesek elpusztítani úgy, hogy az egészségeseket kevésbé károsítják. Az Egyesült Államok Védelmi Minisztériuma kérte fel Louis Goodman és Alfred Gilman gyógyszerészeket, hogy vizsgálják a vegyifegyverek terápiás alkalmazásának lehetőségét a humán gyógyításban. Mivel korábban a mustárgáz hatásának kitett emberek szövettani mintáiban kifejezett lymphoid és myeloid szuppressziót figyeltek meg, Goodman és Gilman felvetette annak a lehetőségét, hogy a szer alkalmas lehet lymphoma kezelésére. Feltételezésüket először állatkísérletekkel erősítették meg, majd egy non-Hodgkin lymphomában szenvedő betegnél figyeltek meg drámai tumortömeg csökkenést a rokonvegyület *mustin* alkalmazását követően. Annak ellenére, hogy a hatás csak átmeneti volt, ez a megfigyelés vezetett annak a felismeréséhez, hogy daganatos betegségek kezelhetővé válhatnak kémiai anyagok segítségével [26-28].

2.1.2. Fólsav antagonisták

A második világháborút követően Sidney Faber patológus a fólsav hatását tanulmányozta leukémiás betegeken. Megfigyelte, hogy a fólsav adása ALL-ben szenvedő gyermekekben serkenti a leukémiás blasztok szaporodását. Faber olyan fólsav analógokat állított elő (aminopterint majd később az amethopterint, ami a ma ismert methotrexatnak felel meg), amelyek antagonistaként gátolták a fólsavat igénylő enzimek működését. Az 1940-es évek végén ezek a szerek voltak az elsők, amelyekkel ALL-es gyermekekben a betegség remisszióját tudták előidézni. Ez képviselte azt az első gyógyszerce csoportot, amelyet nem véletlenül fedeztek fel, hanem már tudatosan állítottak elő [29]. 1958-ban Roy Hertz és Min Chiu Li közölte, hogy a methotrexat monoterápiában alkalmazható choriocarcinoma gyógyítására [30, 31]. A methotrexat alkalmazásával egyes solid tumorok kemoterápiás kezelése is lehetségessé vált.

2.1.3. Antimetabolitok, vinca alkaloidok

Joseph Burchenal sejtosztódáshoz szükséges metabolitok szerkezetének változtatásával -Faber példáját követve- antimetabolitokat próbált kifejleszteni. George Hitchings és Gertrude Elion segítségével purin analógok tesztelése során fedezték fel a *6-mercaptopurint*, amely hatásos leukémia ellenes gyógyszernek bizonyult [32]. Az Eli Lilly vállalat diabetes gyógyítására keresett természetes növényi kivonatokat, amikor azt észlelték, hogy a Madagaszkáron honos télizöld meténg (*Vinca rosea*) alkaloidja gátolja a tumorsejtek szaporodását. Később bizonyították, hogy a *vinca alkaloidok* (pl. vincristin, vinblastin) daganatellenes hatásukat a microtubulusok polimerizációjának, ezáltal a sejtosztódásnak a gátlásával fejtik ki [33].

A korai sikereken felbuzdulva alapították meg 1955-ben az Egyesült Államok Kongresszusa támogatásával az NCCSC-t (National Cancer Chemotherapy Service Center) az NCI (National Cancer Institute) részeként, amely elsőként alkalmazott sejtvonalakat és állatkísérleti modelleket a tumorelleses szerek tanulmányozásához [34].

2.1.4. Kemoterápiás protokollok

1965-ben a gyógyszer-kombinációk alkalmazásával nagy áttörés következett be a daganatellenes gyógyszeres kezelésben. James Holland, Emil Freireich és Emil Frei javasolták először, hogy a kemoterápiában a tuberkulózis antibiotikum kezelésének mintájára a gyógyszerek eltérő hatásmechanizmusát feltételezve gyógyszer-kombinációkat használjanak. Úgy gondolták, hogy a daganatsejtek számos mutációjuk révén rezisztenssé válhatnak a monoterápiában alkalmazott szerekkel szemben, míg a rezisztencia gyógyszer-kombinációkkal szemben sokkal nehezebben fejlődhet ki. Methotrexat, vincristin, 6-mercaptopurin és prednison (POMP) egyidejű alkalmazásával hosszútávú remissziót értek el ALL-es gyermekekben, megalkotva az első ALL-es protokollt [35]. Ez képezi az alapját a randomizált klinikai tanulmányokkal tovább fejlesztett ma is használatos protokolloknak, amelyek segítségével a gyermekkori ALL az esetek nagy részében gyógyíthatóvá vált (pl. UK-ALL protokoll: Medical Research Council, Egyesült Királyság [36]; ALL-BFM protokoll: Berlin-Frankfurt-Münster Group, Németország [37]). A gyógyszer-kombinációk alkalmazásának gondolatát Vincent DeVita és George Canellos vitte tovább az 1960-as évek végén a Hodgkin és non Hodgkin lymphomás betegek kezelésére használt MOPP kombináció (mustárnitrogén, vincristin, procarbazin, prednison) használatával [38]. Napjaink daganatellenes kezelésének többségében ma is gyógyszer-kombinációkat

használnak a korábbi tapasztalati úton összeállított protokollok gyógyszereinek felhasználásával.

2.1.5. *Kemoterápia szerepe az adjuváns terápiában*

Állatkísérletek már korábban jelezték, hogy a kemoterápia a kis tumortömeggel rendelkező betegekben a leghatásosabb. Ez a felismerés vezetett ahhoz, hogy a kemoterápiát adjuváns terápiaként, a tumor sebészi eltávolítását követően is alkalmazzák. Emil Frei számolt be először arról, hogy az osteosarcoma primer sebészi eltávolítását követően a methotrexat preventív alkalmazása megakadályozta a tumor relapszusát [39]. A DNS szintézist gátló 5-fluorouracil használata coloncarcinomával kezelt betegek hosszabb túlélését eredményezte [40]. A daganat típusától függően egy másik kezelési alternatíva a preoperatív kemoterápia alkalmazása is.

2.1.6. *Taxánok, camptotecinek*

1964-ben fedezték fel a csendes-óceáni tiszafa kérgéből (*Taxus brevifolia*) kivont új antimitotikumot, a *paclitaxelt*. Négy éves klinikai tanulmányt követően kezdték használni 1987-ben az ovariumcarcinoma terápiájában [41]. Az ugyancsak az NCI-ban kifejlesztett új gyógyszercsoportot, a *camptothecineket* a kínai díszfából (*Camptotheca acuminata*) vonták ki. A szer a topoizomeráz I gátlása révén a DNS molekulában okoz egyszálú töréseket. Az alapmolekula camptothecin módosításával csökkenteni tudták a szer vesetoxicitását. Így a camptothecin derivátumait, a *topotecant* és az *irinotecant* (CPT-11) alternatív szerként alkalmazni kezdték a colorectalis carcinoma [42], a kissejtes tüdőrák [43] és a metasztatizált ovariumcarcinoma [44] terápiájában.

2.1.7. *Platina alapú gyógyszerek*

A platina alapú *cisplatint* 1965-ben Barnett Rosenberg fedezte fel, aki eredetileg az elektromos erőter baktériumok növekedésére kifejtett hatását kívánta vizsgálni. Kísérletében a baktériumok váratlanul megálltak az osztódásban, ha elektromos erőterbe tette őket. Hónapok után csalódottan tapasztalta, hogy az eredmény kísérleti műtermék, mivel a jelenség a platina elektród elektrolízise során keletkező anyag hatásával volt magyarázható [45]. Ez a véletlen felfedezés vezetett a platina tartalmú vegyületek sejtosztódásra gyakorolt hatásának további vizsgálatához. A cisplatint hererák kezelésére

vezették be [46]. A kisebb nephrotoxicitással bíró *carboplatin* a cisplatin továbbfejlesztett analógjaként került forgalomba enyhébb nephrotoxicitással [47].

2.1.8. Egyéb vegyületek

John Montgomery által kifejlesztett *nitrozoureák* révén a kemoterápia újabb alkiláló szerekkel gazdagodott. A *carmustin* főleg lymphomákban [48], az antibiotikumként felfedezett *streptozotocin* pancreas carcinomában nyert alkalmazást [49]. Az *antraciklineket* ugyancsak antibiotikumoknak szánt szerek közül választották ki (doxorubicin, daunorubicin, epidoxorubicin, idarubicin, mitoxantron). A krónikus lymphoid leukémiában használt *purin analógok* közé tartozó fludarabin felfedezése is Montgomery nevéhez fűződik [50]. Az *epipodofilotoxinokat* (etopozid) Podophyllum peltatum gyökeréből állították elő. Mindkét csoport, mint topoizomeráz II gátlók az 1970-es éveket követően kerültek be a klinikai gyakorlatba és ma számos kemoterápiás protokoll bázis szereként szerepelnek.

A kombinált kemoterápia alkalmazásával elért sikerek és a nagyszámú kemoterápiás szer felfedezése azt a reményt keltette, hogy minden daganat kezelhető, ha a *megfelelő gyógyszerkombinációkat hatásos dózisban és megfelelő időben és ideig* alkalmazzák. A gyógyszeripar a továbbiakban is nagy energiát fektetett a daganatellenes terápiában használható új hatóanyagok kifejlesztésébe: klinikai randomizált tanulmányok alapján összetettebb kombinációkat és intenzívebb kezeléseket vezettek be. A dózisok további emelésének a citosztatikumok mellékhatásai szabtak határt. Ezt a korlátot kerülte meg a letális dózisú kemoterápiát követő *autológ csontvelőtranszplantáció* bevezetése. Felismerésre került egyes tumortípusok (pl. emlő és prostata carcinoma) proliferációjának hormonális (pl. ösztrogén) függése. *Antiösztrogének* klinikai alkalmazásával már az 1960-as évektől kezdve voltak próbálkozások. A *tamoxifen* szelektív ösztrogén receptor modulátorként az emlőrák gyógyításában kapott fontos szerepet [51].

2.1.9. Célzott terápiák

A tumorbiológia fejlődésével, a sejtproliferáció és a differenciáció, a túlélést befolyásoló sejtszignalizációs utak megismerésével újabb terápiás támadási pontok lehetősége rajzolódott ki. Mivel a kemoterápiás szerek a tumorsejtek proliferációjához szükséges anyagcsere-, vagy szignalizációs útvonalakat nem specifikusan blokkolják, a kutatók olyan molekulákat kerestek, amelyek a daganatsejtek szignalizációs útvonalait

specifikusan képesek blokkolni. Ennek a törekvésnek az eredménye az *imatinib mesylat* (STI-571) sikertörténete. A krónikus myeloid leukémiában (CML) használt gyógyszer specifikusan gátolja az ABL (Abelson protoonkogén), c-kit, PDGF-R (platelet-derived growth factor receptor) tirozin kinázokat [52]. CML-ben a Philadelphia kromoszóma, a t(9,22)(q34;q11) az ABL/BCR génátrendeződéshez, az abl/bcr fúziós protein megjelenéséhez, és ennek kóros tirozinkináz aktivitása révén a betegség kialakulásához vezet. Az imatinib mesylat ezt a leukémiás sejtek kontrollálatlan proliferációját fenntartó, állandóan aktív tirozin kinázt gátolja, kompetitív módon kötődve az enzim ATP kötő helyéhez. Több munkacsoport is igazolta, hogy az STI-571 hatására az eddig nehezen kezelhető krónikus fázisú CML 90%-a nem csak hematológiai, hanem citogenetikai remisszióba is kerül. [53]. A daganatok célzott terápiájában a másik lehetőséget a *monoklonális antitestek* alkalmazása jelenti. *Monoklonális antitestek* előállítása technikailag már évtizedek óta lehetséges, az egérben előállított antitestek azonban nem működtek megfelelően: egyrészt humán alkalmazásukkor allergiás reakciókat okoztak, másrészt gyorsan kivonódtak a keringésből. A klinikai alkalmazást az antitestek humanizálása tette lehetővé (trastuzumab, rituximab, bevacizumab, alemtuzumab, cetuximab [54-57].

2.1.10. Várható újabb gyógyszerek

A gyermekkori leukémiát és a Hodgkin lymphomát korábban a gyógyíthatatlan betegségek között tartották számon. Jelenleg e betegek 70-80%-a kemoterápiával gyógyítható. Ez azoknak a multicentrikus tanulmányoknak köszönhető, amelyek a kezelésre használt kombinációs protokollokat több évtized alatt úgy fejlesztették tovább, hogy a bizonyítottan hatásos gyógyszer-kombinációkat megtartva, azok alkalmazási dózisát módosították, vagy a protokollokat újabb gyógyszerekkel egészítették ki. A citosztatikumok továbbfejlesztésének feladatát (a kezdetben döntő szerepet vállaló NCI-től) napjainkban fokozatosan a gyógyszergyárak veszik át. A mesterségesen előállított specifikus tumor-ellenes szerek mellett a ma használt gyógyszerek nagy része a természetben is megtalálható vegyületekből származik.

A terápiás sikerek ellenére a daganatos betegségek még mindig a halálozás legfőbb okai közé tartoznak. Ennek egyik oka, hogy az előrehaladott és metasztatizált daganatok kemoterápiás kezelése még ma sem megoldott. Ezekben az esetekben a malignus betegségek molekuláris biológiájának ismerete, az adott egyén adott tumorának, egyénre

szabott, célsejt-specifikus terápiája, a génterápia, a daganat terjedésében szerepet játszó enzimek, angiogenetikus faktorok gátlása, valamint különböző daganatellenes vakcinák alkalmazása jelenthetnek eredményes megoldást.

A következő évtizedben az imatinibhez hasonlóan, más kisméretű gátló molekulák megjelenése és az adoptív immunterápia fejlődése megoldást hozhat a klasszikus kemoterápiára nem reagáló daganatok terápiájában, de a citosztatikumok alkalmazásától teljesen eltekinteni várhatóan ekkor sem lehet. Összességében azonban elmondható, hogy a malignus betegségek ma már krónikus betegségnek tekinthetők, mivel a jelenleg alkalmazott protokollok eredményeképpen a betegek várható élettartama jelentősen megnőtt.

2.2. A citosztatikumok hatásmechanizmusa és mellékhatásai

A citosztatikumok nagyrésze nem specifikus az adott daganat-típusra. Ezt a klinikai gyakorlat is alátámasztja, hiszen ugyanazt a citosztatikumot egymástól teljesen eltérő szövettani eredetű és viselkedésű daganatokban használjuk. Jó példa erre az antraciklinek csoportja, amelyeket a legkülönbözőbb tumoros betegségekben alkalmazunk: így pl. a doxorubicin egyaránt része a leukémiák [58], a Hodgkin [59] és non-Hodgkin lymphoma [60], emlőcarcinoma [61], gyermekkori kis kereksejtes tumorok [62, 63], csont- és lágyrészsarcomák kezelési protokolljainak [64].

A citosztatikumok hatásukat döntően az osztódó sejteken fejtik ki. Nagy részük a DNS károsítása révén állítja le a sejtosztódást, és a sejtek apoptózisát indukálja [65]. A hatásban szerepet játszik a daganatsejtek károsodott DNS repair mechanizmusa is [66].

A DNS-t károsíthatja a citosztatikumnak a DNS kettős lánc közé interkalálódása, a keletkező szabadgyökök károsító hatása (antraciklinek [65]), a topoizomeráz I vagy II működésének gátlása (antraciklinek [65], camptotecinek [67], epipodofilotoxinok [68]), a gyógyszer okozta törések, DNS szálon belül, vagy azok között létrehozott keresztkötések (platinaszármazékok [69], alkiláló ágensek [70]). A citosztatikumok másik csoportja a DNS szintézist gátolja (purin- [71], pirimidin analógok [72]). Több szer hatásmechanizmusa csak részben ismert (*streptozotocin*: DNS károsítás és szintézisgátlás [73], *bleomycin*: DNS ligáz gátlás, DNS károsítás [74, 75], *hydroxyurea*: feltételezett ribonukleotid reduktáz inhibitor [76], *actinomycin-D*: feltételezett RNS szintézis gátlás, DNS-hez kötődés [77-79]). A vinca alkaloidok a mikrotubulus polimerizációját gátolják [80], a taxánok viszont stabilizálják a felépült mikrotubulusokat [81]. A gyógyszerek

beavatkozhatnak a daganatsejtek metabolizmusába (*metotrexat*: dihidrifolát reduktáz inhibitor [82]; *aszparagináz*: a daganatsejtek aszparaginsav-szintézis defektusa esetén hat [83]). A bortezomib reverzibilisen gátolja a 26S proteaszóma kimotripszin-szerű aktivitását [84]. Hatásmechanizmusuktól függően a kemoterápiás szerek egy része a sejtciklus bizonyos fázisában hat: **metafázis**: vinca alkaloidok [85], etopozid [86], taxánok [87]; **S fázis**: hydroxyurea [76] 5-fluorouracil [88], citozin-arabinozid (cytarabin) [89]; **G1-S fázis átmenet**: citozin-arabinozid [90] **G2 fázis**: bleomycin [74], míg mások nem sejtciklus-specifikusak (pl. daunorubicin [89]).

A citosztatikumok hatása abban az értelemben sem specifikus, hogy *nemcsak a daganatsejteket, hanem az egészséges sejteket is károsítják*. Toxikus hatásuk miatt alkalmazásuk súlyos mellékhatásokkal járhat. Az alkalmazható dózis nagyságát a jelentkező mellékhatások korlátozzák. A fenti gyógyszerek többsége *csontvelőszuppressziót* okoz. A kezelést követően a betegek csontvelőfunkciójának visszatérése alatt, a szupportív terápia részeként elengedhetetlen vörösvérsejt szuszpenzió és thrombocytákon koncentráció adása, fertőzések esetén szélesspektrumú antibiotikumok, antimikotikumok alkalmazása. Az antraciklinek *kardiotoxicitása* [65], a platinaszármazékok *vesetoxicitása* ismert [91]. Az alkiláló ágensek közül a cyclophosphamid, ifosfamid súlyos *haemorrhagiás cystitist, proteinuriát* okozhat [92]. A rövidtávú mellékhatások mellett későiak is megjelenhetnek: a vinca alkaloidok késői *neurotoxicitásáról*, a platinaszármazékok, antraciklinek, alkiláló ágensek *nephrotoxicitásáról* számoltak be [93, 94]. A gyógyszer-toxicitások mértékét és az individuális különbségeket az egyén gyógyszermetabolizáló képessége és farmakogenetikai különbségek is befolyásolhatják.

2.3. Hogyan választották ki a citosztatikumokat a különböző daganattípusok kezelésére?

A klinikai használatba került citosztatikumok nagy része a korábban NCI által létrehozott 60 ezer vegyületet tartalmazó gyűjteményből származik. A protokollokban ma is használt citosztatikumokat azok közül a vegyületek közül választották ki és olyan daganattípusokon kerültek kipróbálásra, amelyek két napos kultúrában az NCI által használt 60 különböző sejtvonal közül, az adott szövettani típuson növekedésgátlást indukáltak [95, 96]. Ezek közül a gyógyszerek közül került ki a jelenleg használt protokollok bázisszereinek többsége. Az egykor alkalmazott módszer ma már támadható.

Mivel az *in vitro* körülmények között tartott sejtvonalak tulajdonságai sok esetben és számos tekintetben eltérhetnek (akár gyógyszerérzékenységükben is) az eredeti daganatétól, elképzelhető, hogy olyan citosztatikumok bizonyultak *in vitro* hatástalannak, amelyek *in vivo* egyébként hatásosak lehetnek. Vannak továbbá olyan gyógyszerek, amelyek *in vivo* metabolizmus során alakulnak át hatásos szerré. Valószínűsíthető az is, hogy vannak citosztatikumok, amelyek jóllehet nem szerepelnek egyetlen daganat terápiás protokolljában sem, alkalmasak lehetnek egyes betegségek kezelésére. E lehetőség figyelembevétele különösen azoknál a daganatoknál bír jelentőséggel, ahol még a mai kezelési sémák sem biztosítanak megfelelő túlélési esélyt a beteg számára. Jó példa a fentiekben leírtakra, hogy coloncarcinoma kezelése során első vonalban az 5-fluorouracil, az oxaliplatin, és az irinotecan szerepelnek, pedig a leggyakrabban használt vegyület az 5-fluorouracil a betegek 90%-ában nem hatásos [97]. A klinikusok azonban rendszerint szigorúan követik a terápiás protokollokat.

2.4. Daganatsejtek tulajdonságai és gyógyszerérzékenységük változása a terápia alatt

A daganatos sejtek az egészséges sejtektől több tulajdonságban is eltérnek. Kontrollálatlanul osztódnak, rezisztensek az apoptosissal szemben, képesek „önellátóan” autokrin túlélési szignálokat adó növekedési faktorokat termelni, vagy függetlenné válni tőlük. A kontrollálatlan szaporodáshoz legalább 4-7 kulcsfontosságú szabályozó gén mutációja szükséges [98]. Az osztódó daganatsejtek klonális evolúciójuk következtében folyamatosan és gyorsan termelnek olyan sejteket, amelyeknek a tulajdonságai, így gyógyszerérzékenységük is változik. A daganatsejtek gyógyszerrezisztenciája a baktériumokéhoz hasonló mechanizmusok segítségével alakul ki: a *gyógyszerpumpák* működése a sejten belüli citosztatikum-koncentrációt csökkenti [99], a daganatsejtek képesek lehetnek a *gyógyszer enzimatis deaktivációjára* (glutathion konjugáció) [100, 101] vagy *megváltozhatnak a daganatsejt metabolikus útvonalai* [102, 103]. A fentiekből következik, hogy a gyógyszerérzékenység nagymértékben függ a daganatsejtek genetikai tulajdonságaitól. A kemoterápia során a daganatsejtek folyamatos szelekciós nyomásnak vannak kitéve. Ez vezet ahhoz, hogy a tumor recidiva során a korábban még hatásos kemoterápiás protokollokkal szemben is rezisztencia figyelhető meg. Ez a rezisztencia a hatásmechanizmustól függően érinthet addig még nem használt citosztatikumokat is [104].

2.5. Prognosztikai faktorok és rizikócsoporthok

A napjainkban alkalmazott intenzív kemo- és radioterápia segítségével a malignus betegségek egyre növekvő hányada gyógyítható, ami a széleskörű klinikai vizsgálatok alapján kidolgozott kockázat-specifikus terápiás protokollok kedvező hatását igazolja. A kérdést, hogy mely esetekben szükséges az agresszív kemoterápia kockázatát vállalni, illetve mikor lehet eredményes egy enyhébb kezelési kombináció is, a prognosztikai faktorok segítségével dönthetjük el.

A prognosztikai faktorokat nagy betegszámú csoportokat magukban foglaló multicentrikus tanulmányok segítségével állapítják meg, a betegség jellemzőit a betegség kimenetelével vetve össze. A daganatos betegségek típusától függően különböző faktoroknak tulajdonítanak prognosztikai jelentőséget. A prognosztikai faktorok állhatnak a tumor tulajdonságával kapcsolatban (pl. differenciáltság, kromoszóma transzlokációk, mutációk, immunfenotípus, metasztázisok jelenléte, tumorvolumen, tumorlokalizáció), kapcsolódhatnak a szervezet tulajdonságaihoz (pl. életkor, nem, immunválasz, veleszületett betegség, pl. Down kór, immundeficiencia), illetve összefügghetnek magával a kezeléssel (pl. alkalmazott beavatkozások, terápiára adott válasz: mint pl. az *in vivo* prednisolonválasz ALL-ben).

Más megközelítéssel a prognosztikai faktorok tartozhatnak *klinikai vizsgálatokkal bizonyított* (I. kategória), *valószínűsíthető* (II. kategória) és *vizsgálatok alatt álló* (III. kategória) csoportba. A colorectalis carcinoma példáján szemléltetve I. kategóriába tartozik a daganat TNM besorolása (T: tumor helyi kiterjedtsége, N: nyirokcsomóérintettség, M: metasztázis), és az érinvázió. A szövettani differenciáltság, szövettani altípus a II-es kategóriába tartozik. III. kategóriába pl. a tumorsejtek DNS tartalma sorolható [105].

A prognosztikai faktorok alapján kidolgozott differenciált terápiát már közel 30 éve alkalmazzák gyermekkori ALL-ben. Ennek a betegségnek az egyes rizikócsoporthokba történő besorolása (alacsony, standard vagy magas rizikócsoporthok) szigorúan függ a prognosztikai faktoroktól (pl. nem, kor, kezdeti fehérvérsejtszám, blaszt arány, immunfenotípus, DNS index, specifikus transzlokációk) [106]. A fentiekben leírt, mesterségesen megállapított kritériumok alapján eltérő rizikócsoporthokba sorolt betegek eltérő intenzitású terápiában részesülnek. Ugyan a prognosztikai faktorokat több ezer eset tulajdonságának „átlagából” állapítják meg, előfordulhatnak olyan esetek, amikor a korrekt besorolás ellenére a betegség terápiára adott válasza rosszabb, mint ahogyan azt a

rizikócsoporthoz eseteitől egyébként várnánk. Ilyen esetben a beteget azért veszíthetjük el, mert betegségét „alulkezeljük”. Előfordulhat olyan eset is, amikor a beteget magasabb rizikócsoporthoz sorolják, viszont a daganatsejtek gyógyszerérzékenysége jobb, a terápiás válasz kedvezőbb, mint a csoport többi esetéé. Ezeket a betegeket „túlkezeljük” és feleslegesen tesszük ki az intenzívebb kezelés súlyos és olykor életveszélyes mellékhatásainak. Egyes malignus betegségekben, ahol a kombinált kemoterápiás protokollok segítségével ma már az esetek akár 80-90%-a gyógyítható (pl. alacsony rizikójú gyermekkori ALL akár 90%), a maradék 10-20 %-ot azért veszítjük el, mert a fentiek szerint vagy alul- vagy túlkezeljük. Ezeknek a betegcsoportoknak a túlélési rátája csak egy, az eddiginél differenciáltabb, individualizált terápiával növelhető.

2.6. In vitro gyógyszerérzékenységi vizsgálatok

Az eddiginél differenciáltabb terápia több módon is megvalósítható. Kivitelezhető a prognosztikai faktorok számának, és így az egyes rizikócsoporthoz számának növelésével: új prognosztikai faktorként szerepelhetnek bizonyos génexpressziós mintázatok, illetve génpolimorfizmusok, amelyeknek nagy jelentőséget tulajdonítanak a jövőben, és amelyek nemcsak kiegészíthetik a prognosztikai faktorok eddigi skáláját, de teljes egészében fel is válthatják azokat [106]. Példaként említhető McLeod és munkatársai tanulmánya, amely szerint gyermekkori ALL-ben a tioguaninok metabolizmusában szerepet játszó thiopurin-metiltranszferáz enzim mutáns fenotípusával rendelkező betegeknél alacsony relapszus ráta figyelhető meg [107]. Több vizsgálat összefüggést talált a citosztatikumokkal szembeni rezisztencia és a génexpressziós mintázatok között [23-25].

Az egyénreszabott terápia kidolgozásának másik lehetősége, hogy a daganatsejtek gyógyszerérzékenységét direkt módon vizsgáljuk. Több próbálkozás történt erre alkalmas *in vitro* módszer kialakítására. Minden esetben az volt a cél, hogy olyan *in vitro* vizsgálati körülményeket alakítsanak ki, ahol a kapott eredmény jól korrelál az *in vivo* hatással [108].

2.6.1 In vitro gyógyszerérzékenységi tesztek

MP-teszt (Monolayer proliferation assay) esetében a solid tumorból sejtszuspenziót készítve a proliferációt vizsgálják citosztatikumok jelenlétében [109].

HTCA (human tumor cloning assay) [110] és **CCS (capillary cloning system)** [111] végzésekor a betegek solid tumorából egyedi sejtekből álló szuszpenziót készítenek és *in vitro* körülmények között néhány hétig tenyésztik a sejteket különböző gyógyszerek

jelenlétében. A gyógyszerérzékenységet a kolóniaképző képességük alapján határozzák meg. Mindkét módszer lassan osztódó kolóniákat képző daganatok vizsgálatára a legalkalmasabb.

A **DiSC (differential staining toxicity) teszt** [112, 113] lényege, hogy a tumorsejteket citosztatikumokkal együtt inkubálják *hat* napig, majd az élő sejtek azonosításához és a gyógyszerérzékenység meghatározásához megkülönböztető sejtfestést használnak. Az analízis mikroszkóppal történik. Előnye, hogy nagyszámú gyógyszert lehet tesztelni egyszerre, de az analízis személyfüggő és fáradtságos.

Az **MTT (metil-thiazol-tetrazolium) teszt** [114] széleskörben elterjedt és egyszerűen kivitelezhető eljárások közé tartozik. A tumorsejtek *négy* napos inkubációját követően MTT festéket adnak a sejtekhez, amit az élő sejtek mitokondriális enzimekkel kék színű formazánná alakítanak. A kapott színintenzitás korrelál az élő sejtek számával. A módszer előnye, hogy könnyen kivitelezhető, eszközigénye nem nagy, és a kevésbé költséges eljárások közé tartozik. Hátránya, hogy nagyszámú sejtet igényel, egy betegmintából csak néhány gyógyszer hatása vizsgálható.

ATP (adenosine triphosphate bioluminescence) teszt [115] alkalmazásakor a tumorsejteket a gyógyszerekkel történt inkubációt követően lizálják. A lizátumban az élő sejtekből felszabaduló ATP mennyiségét mérik (ami korrelál a túlélő sejtek számával) luciferin hozzáadását követően. Azokon a sejtmintákon működnek hatásosan a gyógyszerek, ahol alacsony a lumineszcencia, tehát alacsony az ATP szint.

EDR (extreme drug resistance) teszt [116, 117] esetében a daganatsejteket friss biopsziás mintákból szeparálják, majd gyógyszerkezelést követően a sejtek radioaktívan jelölt timidin felvételét mérik. Extrém rezisztensnek értékelik a daganatsejteket a citosztatikummal szemben, ha a sejtek timidin inkorporációjának mértéke kevesebb, mint egy standard deviációval tér el a több száz rezisztens referencia tumorminta értékének átlagától. A módszer segítségével azokat a gyógyszereket választják ki, amelyet nem javasolnak a beteg terápiájában. A módszer *in vitro* kapott eredményei jól korrelálnak a későbbi klinikai kimenetellel. Hátránya, hogy nem a hatásos gyógyszer használatára tesz javaslatot [118].

HDRA (histoculture drug-response teszt) [119] végzésekor kollagén-szivacs vázon vizsgálják a sejtek gyógyszerérzékenységét. A szivacs váz szövetszerkezetet utánozva solid tumorok vizsgálatára teszi alkalmassá a japánok által kifejlesztett módszert.

Az **1. Táblázat** különböző *in vitro* gyógyszerérzékenységi tesztek paramétereit hasonlítja össze. A bemutatott módszerek nagy részénél az *in vitro* eredmények jól korrelálnak az *in vivo* gyógyszerválasszal [115-117, 119]. A módszertől függően alkalmasak solid vagy szuszpenzióban növekvő tumorok vizsgálatára. A rövid sejtciklusidejű daganatsejtek vizsgálatára 3-4 napos rövid idejű tesztek, a hosszabb sejtciklussal rendelkező daganatok vizsgálatára a hosszabb időtartamú kolónia tesztek alkalmasak.

Az *in vitro* tesztek széleskörű elterjedését és az *in vitro* eredmények klinikai felhasználását több tényező korlátozza:

1. A módszerek többsége költséges, a sikeres vizsgálathoz nagyszámú tumorsejt szükséges, ami a vizsgálható gyógyszerek számát korlátozza.
2. A daganatok nagy részében már vannak bizonyítottan hatásos protokollok, így a még nem kezelt betegek esetében a klinikusok elsősorban a nagy betegszámon hatásosnak bizonyult kezelési formá(ka)t alkalmazzák.

Kérdés, mikor térhet el a klinikus, vagy mikor kell eltérnie a megszokott kezelési sémától? Azaz mikor lehet hasznos egy *in vitro* gyógyszerérzékenységi teszt?

- Elsősorban a *recidiváló daganat* kezelésében. A tumor recidívjakor ugyanis a klinikus már egy sokkal agresszívabb kezelést igénylő betegséggel áll szemben. A primer daganat/betegség kezelésére előírt protokollok recidíva esetén már rendszerint hatástalanok. Vannak ugyan recidíva esetén alkalmazható protokollok, ezekkel azonban általában a gyógyulási esély igen csekély. Ilyen esetekben az *in vitro* gyógyszerérzékenység meghatározása, s az eredmény alapján megválasztott individualizált terápia alkalmazása kifejezetten javíthatja a túlélést.

Az általunk kidolgozott, új in vitro gyógyszerérzékenységet meghatározó módszerünk segítségével kevés sejt felhasználásával nagyszámú citosztatikumot vizsgálhatunk egyszerre. A vizsgálat ismertetésére a „Módszer” fejezetben kerül sor.

2.6.2. Az *in vitro* gyógyszerkoncentrációk kiválasztása

Az *in vitro* gyógyszerérzékenységi vizsgálatokban használt gyógyszerdózisok kiválasztásakor segítséget nyújthat a szervezetben elérhető maximális plazmakoncentráció értékének ismerete (C_{max}), aminek nagysága egyénenként változhat és az adagolási módtól is függhet (pl. intravénás vagy orális adagolás). Kisebb a variabilitás, ha a görbe alatti terület (AUC, area under the curve) értékét használjuk. A farmakokinetikában az

AUC érték a gyógyszer beadott teljes dóziséra utal, ami az idő függvényében ábrázolt plazmakoncentráció görbéje alatti területnek felel meg. Az AUC-t akkor alkalmazzák, ha két különböző adagolási formát akarnak összehasonlítani [120]. Az *in vitro* AUC értéket a gyógyszer koncentráció és az inkubációs idő szorzata adja meg (ha feltételezzük, hogy a citosztatikum koncentrációja nem változik a kísérlet során).

2.7. A poszttranszplantációs lymphoproliferatív betegség (PTLD) és kezelési lehetőségei

2.7.1. A PTLD etiológiája

A transzplantációt követően kialakuló malignus B-sejtes lymphomák a graft túléléséhez szükséges immunszuppresszív kezelés mellékhatásaként fejlődhetnek ki. Létrejöttükben az Epstein-Barr vírus (EBV) szerepelhet etiológiai faktorként. A poszttranszplantációs lymphoproliferatív betegségben (posttransplant lymphoproliferative disorder; PTLD), és az AIDS-hez társuló immunoblasztos lymphomában (AIDS related immunoblastic lymphoma; ARL) az esetek 90%-ában igazolható a vírus szerepe [121]. A PTLD mortalitása gyakran eléri az 50%-ot [122, 123]. A ritka öröklődő X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív szindróma (XLP) férfi betegeiben EBV fertőzés talaján a specifikus immundefektus miatt gyakran fejlődik ki EBV indukálta malignus lymphoma [124].

Az EBV a herpesvírusok családjába tartozik, fertőzést követően az egyén egész élete során perzisztál. A primer EBV fertőzés fiatalokban és felnőttekben mononucleosist okozhat, amely masszív B-lymphocyta expansióban maifestálódik. Mononucleosisban, PTLD-ben és ARL-ben az EBV által kódolt vírustranszformációval kapcsolt fehérjék vezetnek a B lymphoblastok proliferációjához. Az EBV által transzformált sejtek kilenc latenciával kapcsolt vírusfehérjét expresszálnak: EBNA1-6, LMP-1, -2A és -2B. Ezt a latencia programot hívják III-as típusú latenciának. A vírusfehérjék expressziója alapján még másik két latencia típust is megkülönböztetünk. A Burkitt lymphomára jellemző I-es típusú latencia az EBNA-1 jelenlétével jellemezhető a többi látens virális antigén megjelenése nélkül. A II-es típusú latenciában csak az LMP-1 és az LMP-2 expresszálódik. Ez a forma EBV-vel asszociált Hodgkin lymphomában és nasopharyngealis carcinomában fordul elő [125, 126].

2.7.2. A PTLD *in vitro* kísérletes modellje

Az *in vitro* proliferáló lymphoblastoid sejtvonalakban (lymphoblastoid cell lines; LCLs), amelyeket humán B-lymphocyták EBV fertőzésével hoznak létre, a III-as típusú latencia program működik. *In vitro* fertőzést követően és a primer fertőzés alatt *in vivo* maga az EBV felelős a humán B lymphocyták proliferációjáért. Az EBV által kódolt látens fehérjék ellen azonban *in vivo* erős T-sejt mediált immunválasz lép fel [127-129]. Az EBV asszociált lymphoproliferatív betegség csak a cytotoxikus T-sejtek kompetens immunválaszának hiányakor alakulhat ki. Az EBV asszociált lymphoproliferatív betegség ugyanakkor visszafejlődhet, ha a szervezet EBV-vel fertőzött B sejtek elleni immunválasza visszaáll. Az LCL-eket immunszupprimált egérbe intraperitonealisan beoltva, több szervet érintő generalizált lymphoma fejlődik ki. EBV szeropozitív donorok perifériás lymphocytáit vagy humán LCL-eket intraperitonealisan SCID egerekbe oltva néhány hét alatt EBV indukálta humán lymphoproliferáció alakul ki. Az így keletkező lymphomák morfológiailag immunoblastos lymphomának felelnek meg [130]. Ezek a lymphomák nagyon hasonlítanak az immunszupprimált betegekben kialakuló EBV pozitív nagy sejt lymphomákhoz [131]. Az immunszupprimált egyéneken kifejlődő EBV asszociált lymphomák, a kísérletesen SCID egérben fentiek szerint létrehozott lymphomák és az *in vitro* körülmények között tenyésztett LCL-ek fenotípusa hasonló. Mindhárom típus ugyanazokat a feszíni markereket, B sejt aktivációs antigéneket és adhéziós molekulákat hordozza. Mindhárom normál kariotípussal rendelkezik és ugyanazt a vírus-génexpressziós mintázatot mutatja.

2.7.3. PTLD kialakulási kockázata és kezelése

A PTLD kialakulásának kockázata függ a transzplantált szerv típusától, az immunszuppresszív kezeléstől, a beteg korától és az átültetési EBV státusztól. A PTLD előfordulási gyakorisága solid szervtranszplantáció esetén 1-4% és 19% százalék között változik. Csontvelőátültetettek között viszonylag ritka (1%) [132, 133]. A szervkilökődés lehetősége szempontjából magas rizikó csoportba sorolt betegek esetében alkalmazott eljárások mellett (pl. *in vitro* T sejt depléción, TCD) a PTLD kialakulásának kockázata a 30%-ot is elérheti [134, 135]. A betegség kialakulásának esélye nagyobb, ha a recipiens EBV szeronegatív az átültetéskor és/vagy eltérés van a donor és a recipiens HLA antigénjei között [121]. A PTLD kezelésével kapcsolatban nincsenek multicentrikus kontrollált tanulmányok [121]. A betegség terápiájában a következő eljárásokat

alkalmazzák: immunszuppresszió csökkentése [136], antivirális terápia és kemoterápia. Az immunszuppresszió csökkentésével a PTLD-vel kezelt betegek 23-50 %-a komplett és tartós remisszióba kerül, ez a módszer azonban a csontvelőátültetettek esetében nem hatékony [137].

A csontvelőátültetést követően kialakuló EBV asszociált lymphomák egyik fenti kezelési móddal sem kezelhetők kielégítően, kivéve, ha a szervezet EBV specifikus immunitása visszaáll [136]. A B-sejt ellenes monoklonális antitestek használata nagy fordulatot jelentett a PTLD terápiájában. Anti-CD21 és anti-CD24 antitestek kombinációjával már korábban történtek próbálkozások, de mivel ezek az antitestek gyógyszerformában nem hozzáférhetők, az érdeklődés a CD20 ellenes humanizált monoklonális antitest, a *rituximab* felé fordult. A terápiás válasz a rituximabbal szemben 65%, ugyanakkor a relapszus ráta 18% [138, 139]. Azokban az esetekben, ahol a beteg nem reagál a fenti kezelési módokra, a kemoterápiát alkalmazzák. A leggyakrabban használt kemoterápiás sémák az antraciklint tartalmazó CHOP (cyclophosphamid, doxorubicin, vincristin és prednison) és a VAPEC-B (doxorubicin, etopozid, cyclophosphamid, methotrexat, bleomycin és vincristin) [140]. Egy tanulmányban 40 PTLD-vel kezelt beteg közül 17-nél az immunszuppresszív terápia csökkentése mellett kemoterápiát alkalmaztak (CHOP, VACOP-B – cyclophosphamid, vincristin, bleomycin, prednison, növekvő dózisú doxorubicinnal és etopoziddal - vagy DHAP -cisplatin, citozin-arabinozid, dexamethason) [141].

Az antraciklin alapú kombinált kemoterápiában részesültek 69%-a kerül remisszióba. A PTLD esetén végzett kemoterápia mortalitása azonban a kezelés során jelentkező toxicitások miatt nagy, mivel azok a graft túlélését is hátrányosan befolyásolják [121]. A gyógyszer mellékhatásai korlátozzák az adott gyógyszer alkalmazható dózisát, mivel a dózis növelésével a mellékhatások is gyakrabban jelentkeznek. Azok gyógyszerek, amelyek alacsonyabb koncentrációban is hatásosak, kevesebb mellékhatást okoznak és a graft túlélését is kevésbé csökkentik.

A fentiek alapján indokoltnak láttuk in vitro gyógyszerérzékenységi vizsgálatok végzését a PTLD modelljéül szolgáló lymphoma sejtvonalakon. Olyan gyógyszert kerestünk, amellyel a jelenlegi protokollokat kiegészítve a terápiás eredmények javíthatók lennének.

2.8. NK sejtek alkalmazása a citosztatikummal kombinált daganatellenes immunterápiában

Az adjuváns immunterápia célja, hogy az effektor immunsejteket stimulálva, azok malignus sejteket pusztítsanak el, ezáltal javítva a gyógyulási esélyeket. Solid tumorokban az infiltráló gyulladásos sejtek jelenléte jól ismert jelenség [142-144]. Több tanulmány is kimutatta, hogy a malignus tumorok NK (natural killer) sejt infiltrációja kedvezőbb betegségkimenettel társul [145, 146].

2.8.1. NK sejtek tulajdonságai és működése

Az NK sejtek nagy szemcsés lymphocyták, amelyek a veleszületett immunitás részeként működnek [147]. Az érett NK sejtek többnyire a perifériás vérben keringenek, ahol a lymphocyták 10-15 %-át adják. Az NK sejtek abban térnek el a többi lymphocytától, hogy hiányzik a felszínükről a CD3 T-sejt specifikus antigén, viszont expresszálják a CD56 felszíni antigént, amelynek funkciója az NK sejteken nem ismert [148].

Az NK sejtek a szervezetben közvetlenül képesek elpusztítani a daganatsejteket és a vírussal fertőzött sejteket [149]. γ -interferon termelésükkel (IFN- γ) és egyéb immunregulációs citokineikkel szabályozzák az adaptív immunválaszt, valamint az Fc γ RIII-on (CD16) keresztül képesek antitest dependens celluláris citotoxicitásra (ADCC; antibody-dependent cellular toxicity) [147, 150-152]. Az NK sejt-célsejt közötti interakciók kimenetelét a gátló és aktiváló szignálok finoman összehangolt egyensúlya határozza meg [153].

2.8.2. Az NK sejtek szerepe az immunterápiában

Mivel az NK sejtek spontán módon képesek a tumor sejtek lízisére, nagy erőfeszítéseket tettek, a vizsgálók azért, hogy az NK sejtek e hatását a daganat ellenes terápiában használhatóvá tegyék. Az NK sejtek fejlődésének és működésének megismerése vezetett az NK sejtek ölképességén alapuló immunterápiás próbálkozásokhoz.

Ígéretesnek tűnt az az eljárás, amikor *in vitro* felszaporított allogén NK sejt klónok szuszpenzióját juttatták leukémiás betegekbe [154-156]. Kimutatták, hogy egértumor metasztázisokban az NK sejtek *in vivo* akkumulációja az IL-2 adás dózisától és gyakoriságától függ [157]. Primer tüdő- és veserák terápiájában alkalmaztak magas vagy alacsony dózisu IL-2 kezelést magában vagy a szervezeten kívül IL-2 vel aktivált -

perifériás vérből szeparált- lymphocyttakkal és tisztított NK sejtekkel kombinálva [158, 159]. Más szerzők solid tumoros és leukémiás betegekben kemoterápiával kombináltan adtak alacsony dózisu IL-2-t az NK sejtek aktiválására [160, 161]. Harker IL-2 indukált LAK sejtek (limphokin activated killer) használatát javasolta kemoterápia rezisztens tumorok kezelésére [162].

A daganatellenes kemoterápia elnyomja az immunrendszer hatásos működését és szignifikánsan csökkenti az NK sejtek szintjét a vérben [163]. Vannak olyan citosztatikumok, amelyek befolyásolják az NK sejtek aktivitását [164]. Topoizomeráz gátlók esetében figyelték meg, hogy a targetsejteket e szerrel kezelve, megnövekedett az NK sejt mediálta citotoxicitás [165]. Ezzel szemben, mivel az NK sejtek működéséhez szükség van ép mikrotubulus hálózatra, a mikrotubulus működése ellen ható szerek az NK sejtek aktivitását gátolhatják [166].

Fontos ezért ismerni a kemoterápiás szerek NK sejtekre gyakorolt hatását, ha a kemoterápiát és az NK sejt-mediálta immunterápiát együttesen kívánjuk alkalmazni.

2.9. Kolónia stimuláló faktorok alkalmazása az adjuváns terápiában

2.9.1. A G-CSF klinikai alkalmazása és hatásmechanizmusa

Gyermekkorban a daganatos betegségek közül a leukémia a leggyakoribb, az összes gyermekkori malignus betegség 30%-át adja.. A két leggyakoribb formája az akut lymphoid (ALL) és az akut myeloid leukémia (AML). Az AML a ritkább forma, előfordulási gyakorisága körülbelül a gyermekkori ALL-es esetek egyötöde [167]. Eltérő genetikai tulajdonságainak köszönhetően az ALL kedvezőbb prognózisú betegség mint az AML. Az agresszív kemoterápia és a javuló szupportív terápia mellett a különböző biológiai modulátorok alkalmazásának és a csontvelő átültetésnek köszönhetően a gyermekkori ALL-es betegek 80%-a gyógyul [168]. Ugyanakkor az ALL-es betegek 20 %-át illetve az AML-es betegek 50%-át ma is elveszítjük a kialakult gyógyszerrezisztencia és/vagy az agresszív kemoterápia mellékhatásai miatt [168]. A halálozás leggyakrabban a cytopenia okozta vérzésekre és infekciókra vezethető vissza. A lázas neutropenia a jelenlegi kemoterápiás kezelés életveszélyes mellékhatása [169].

Több tanulmány vizsgálta a kolónia stimuláló faktorok (CSF) hatását ALL-es, solid tumoros és egyes AML-es gyermekek neutropeniás időszakának lerövidítésében és a lázas időszak kivédésében. Azt azonban nem sikerült bizonyítani, hogy a betegek teljes túlélését

a növekedési faktorok (growth factors; GFs) alkalmazása növelte volna [169-172]. A hemopoetikus őssejteknek a differenciálódás és proliferáció megfelelő egyensúlyának biztosításához specifikus növekedési szignálokra van szüksége. E növekedési faktorok közé tartoznak a kolónia stimuláló faktorok és az interleukinek, amelyek fontos szerepet játszanak a sejtek életképességének fenntartásában és segítik a sejtek meghatározott irányba történő differenciálódását [173, 174]. A hemopoetikus növekedési faktorokat, mint a granulocyta-monocyta kolónia stimuláló faktort (GM-CSF), az erythropoetint (Epo), és a granulocyta-kolónia stimuláló faktort (G-CSF) széleskörben alkalmazzák a klinikai gyakorlatban [175-177]. A G-CSF egy 174 aminosav hosszúságú glikoprotein, amely a normál myeloid előalakok differenciálódását és proliferációját indukálja [178]. A G-CSF receptor (G-CSFR), egy 813 aminosavból álló transzmembrán domént tartalmazó fehérje, a normál myeloid vonalakon expresszálódik [179]. A G-CSF a granulocyta irányba elkötelezett myeloid előalakok proliferációját, differenciálódását segíti, apoptosist gátolja, emellett fertőzésekben az érett granulocyták funkcióját is serkenti [180]. Az AML-es sejtek in vitro válasza G-CSF-re bizonyítottan tekinthető [181]. Ennek alapján a G-CSF használatát a gyermekkori myeloid leukémiában kontraindikálnak tartották. Kettős vak klinikai vizsgálatok azonban azt igazolták, hogy a G-CSF adása AML-es betegekben nem indukálta a leukémiás blasztok proliferációját [181]. E megfigyelésekre támaszkodva a klinikai gyakorlatban alkalmazzák AML-ben a G-CSF-et neutropenia kivédésére [170] és az úgynevezett „priming”-ra (a leukémiás sejtek szinkronizációja S-fázisban), hogy fokozzák a leukémiás sejtek S-fázis-specifikus gyógyszerek (cytarabin és fludarabin) iránti érzékenységet [182-184]. A G-CSF stimuláló hatása leukémiás lymphoblastokon elméletileg nem várható, mivel a lymphoid sejtek felszínén G-CSFR nem lévén, azok proliferációját és differenciálódását e növekedési faktor nem befolyásolja [185].

2.9.2. G-CSF receptor előfordulása lymphoid blasztokon

Noha a növekedési faktorok hatása sejtszinten nem teljesen tisztázott, a G-CSF használata a kemoterápia indukálta mieloszuppresszió kivédésére gyermekkori ALL-ben széles körben elterjedt [186]. Néhány tanulmány arra világít rá, hogy egyes T-, és B-sejtes ALL-es esetek [187, 188], vagy bifenotípusos leukémia sejtek [189] G-CSF receptorokat expresszálnak és reagálnak a külsőleg adott G-CSF-re [187, 188, 190-192]. deLau és munkatársai mutatták ki, hogy a G-CSF receptort kódoló gén specifikusan upregulált (1;19)(q23;p13.3) transzlokációval rendelkező pre-B sejtes leukémia sejteken, amely nem

tekinthető random kromoszóma eltrérésnek, mivel a gyermekkori pre-B sejtés ALL-ek 25 - 30%-ában megtalálható [193, 194]. Egy másik vizsgálat azt bizonyította, hogy a G-CSF proliferációt indukálhat fenőttkori T-sejtés lymphoma sejteken [195]. Azt is kimutatták, hogy a citozin-arabinozid (cytarabin) növekedést gátló hatása függ attól, hogy az ALL-es sejteket G-CSF-el vagy anélkül tenyésztették [192]. E.-J. Oh és munkatársai [196] figyelték meg, hogy a G-CSF receptor expressziója fokozott relapszusos ALL-es esetek leukémia sejtjein, továbbá összefüggést találtak a G-CSFR és a GM-CSFR expressziója között [196]. A fentiekben leírtak alapján felmerül a kérdés, hogy a gyermekkori ALL lázas neutropeniájának szupportív kezelésében alkalmazott G-CSF kizárólag a normál myeloid sejtek szaporodásához vezet, vagy képes a myeloid markereket és G-CSFR-t expresszáló ALL-es blasztsejtek szaporodásának indukciójára is [192]. Az, hogy a G-CSF kezelés befolyásolja-e a blaszt sejtek gyógyszerérzékenységét, ugyancsak megválaszolendő kérdés marad.

Ex vivo ALL-es és AML-es sejtek nem, vagy nehezen tarthatók fent *in vitro* kultúrában, a betegmintákból végzett kísérletek pedig nehezen ismételhetők. Jóllehet néhány akut lymphoblastos leukémiás sejt vonal hozzáférhető, nem ismert azonban, hogy ezek a sejtek felszínükön expresszálnak-e G-CSFR-t, mivel a legtöbb ALL esetében a blasztok felszínén nem mutathatók ki myeloid markerek. Mivel a KG-1 leukémiás sejt vonal myeloid markereket és G-CSFR-t egyaránt expresszál, jó *in vitro* modellként szolgálhat az AML és a G-CSFR-t expresszáló ALL G-CSF receptor funkciójának tanulmányozására [197]. Ezért vizsgáltuk ezen a sejt vonalon a leukémiás sejtek daunorubicin érzékenységének változását G-CSF előkezelést követően. A G-CSF-citosztatikum kölcsönhatás vizsgálatára a daunorubicin azért látszott megfelelő választásnak, mert ez az antraciklin egyaránt része az ALL-es és AML-es kezelési protokolloknak és kifejezett apoptotikus hatással bír [65, 198].

3. Anyagok és módszerek

A táblázatok a szöveg folytonosságának megtartása érdekében a Függelék fejezetben kerülnek bemutatásra.

A vizsgált sejtvonalakat és módszereket a három fő témakörnek megfelelően ismertetem:

3.1. Lymphoblastoid sejtvonalak gyógyszerérzékenységének vizsgálata

3.1.1. Sejtvonalak és tenyésztési körülmények

Az első tanulmányban 17 LCL (lymphoproliferative cell line) sejtvonalat használtunk. A 980215, 031016, 040113, 051018, JAK, LP, MIN, AF, GK, FUR, HA, VMB sejtvonalakat egészséges donorok normál B sejteinek *in vitro* fertőzésével hoztuk létre EBV B95.8 vírustörzset használva. A sejtek tenyésztéséhez 10% borjúsavóval (FCS) kiegészített IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) tápfolyadékot (Sigma) használtunk. Az LS sejtvonal egy EBV hordozó egészséges donor szeparált B sejtjeiből spontán kinőtt LCL volt. Az IARC171-et egy Burkitt lymphomás beteg normál B lymphocytáinak fertőzésével hozták létre ugyancsak B95.8 vírustörzset használva. A TR LCL egy, a SAP gén mutációját hordozó XLP-ben szenvedő beteg B lymphocytáiból származott. Az IB4 LCL integrált EBV genomot tartalmazott.

A vizsgálatok alatt az LCL sejtvonalakat 20% borjúsavóval (FCS, Sigma), 100 mmol L-glutaminnal (Sigma) és 80µg/mL gentamicinnel (Sigma) kiegészített IMDM tápfolyadékban (Sigma) tenyésztettük. A sejtszuszpenziókat párásított inkubátorban 37°C-on 5% széndioxidot tartalmazó légkörben tartottuk. A sejteket hetente két alkalommal etettük, hogy a tenyésztés alatt a sejtkoncentráció 1×10^6 sejt/mL legyen. A mycoplasma fertőzés kizárására a kultúrákat Hoechst 33258 festéssel rendszeresen ellenőriztük.

3.1.2. Gyógyszerek

Az *in vitro* gyógyszerérzékenységi vizsgálat elvégzéséhez 28 gyógyszert használtunk (**2. Táblázat**). A gyógyszereket 50% dimethyl sulfoxidban (DMSO) oldottuk fel és 50 nL mennyiségben tettük a 384 lyukú lemezre HDRT (high density replicator tool) fejen elhelyezett rozsdamentes acéltűk segítségével Biomek 2000 robotot (Beckman) használva. Ugyanezt a robotot használtuk a triplikátumokat és a gyógyszerenként négy

koncentrációt tartalmazó törzslamezek elkészítéséhez, egy-, és nyolccsatornás pipettafejek alkalmazásával. A lemezen a legmagasabb gyógyszerkoncentrációkat a fizikai és kémiai szempontból maximálisan elérhető gyógyszerkoncentrációk 600-szoros hígításai adták meg. (50nL gyógyszeroldat 30μL kísérleti végtérfogatban). Az *in vitro* használt koncentrációk és a klinikailag elérhető legmagasabb plazmakoncentráció (Cmax) összehasonlítására az elérhető legmagasabb plazmakoncentrációk hányadosát (Ratio of Maximum Achieved Plasma Concentration, RMAPC) használtuk. Az általunk használt RMAPC a következő képlettel számolható ki:

$$\text{RMAPC} = \text{in vitro alkalmazott gyógyszerkoncentráció} / \text{Cmax}$$

3.1.3. Fluoreszcens *in vitro* gyógyszerérzékenységi teszt

Az LCL vonalak *in vitro* gyógyszerérzékenységeinek meghatározását *három napos* kultúrákon végeztük 384 lyukú lemezek (Greiner) felhasználásával. 28 gyógyszert vizsgáltunk *négy koncentrációban* triplikátumokat alkalmazva. Minden lyuk 3000 sejtet tartalmazott 30μL térfogatban. Három napos inkubálást követően az élő és elpusztult sejtek megkülönböztetéséhez VitalDye (Biomarker, Magyarország) fluoreszcens festéket használtunk. Az élő és elpusztult sejtek pontos számának meghatározásához egy, a stockholmi Karolinska Intézetben (Karolinska Institute Visualization Core Facility; KIVIF) egyedileg összeállított automatizált lézer fluoreszcens konfokális mikroszkópot alkalmaztunk (módosított Perkin-Elmer UltraView LCI). A képeket a QuantCapture 4.0 számítógépes program segítségével rögzítettük, a képeken az élő és elpusztult sejtek számát a Count 3.0 számolóprogram segítségével határoztuk meg. Mindkét programot OpenLab (Improvision) programhátteret használva a Karolinska Intézetben fejlesztették ki (KIVIF). Tizenöt kontrollként használt lyuk csak sejteket tartalmazott tápfolyadékkal és 50nL DMSO-val, öt lyuk csak tápfolyadékot és sejteket DMSO nélkül. A kéttípusú kontrollt összehasonlítva DMSO által okozott toxikus hatást nem tapasztaltuk. Az átlag túlélést (mean cell survival; MCS) a 17 LCL sejtvonal túlélési átlagából határoztuk meg.

Saját munka:

- sejtvonalak kultúrában tartása,
- gyógyszeres lemezek készítése,
- gyógyszerkoncentrációk kiválasztása,

- a gyógyszerérzékenységi teszt módszerének beállítása, kísérleti lemezek készítése a sejtekkel és
- az optimális sejtszám, inkubációs idő beállítása,
- a kísérleti lemezek mikroszkópos mérése,
- eredmények analizálása.

3.2. NK vonalak citotoxicitásának vizsgálata citosztatikumok jelenlétében

3.2.1. Humán poliklonális NK sejt-kultúrák nyerése perifériás vérből, az alkalmazott tenyésztési körülmények

A poliklonális NK sejteket egészséges donorok teljes véréből kivont fehérvérsejt szuszpenzióból (buffy coat) nyertük (Karolinska Sjukhuset, Vérbank, Stockholm). A mononukleáris sejteket (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) Lymphoprep™-en (Axis-Shield, Oslo, Norway) történt centrifugálással választottuk el. Az NK sejteket a többi mononukleáris sejttől mágneses gyöngyök (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) felhasználásával negatív szelekcióval különítettük el a gyártó leírása szerint. A tisztított NK sejtek több mint 95%-a CD3⁺CD56⁺ fenotípusú volt. Az NK sejteket egy éjszakán át vagy egy héten keresztül 10% humán szérumot („AB”, Karolinska Sjukhuset, Vérbank, Stockholm), 2 mM L-glutamint, 1mM natriumpiruvátot, 50 U/mL penicillin-streptomycint, 50μM 2-mercaptoetanolt (a tápfolyadékot és a kiegészítő anyagokat Gibco-tól BRL, Maryland, USA szereztük be) és 100 U/mL IL-2-t (Peprotech Inc, NJ, USA) tartalmazó IMDM tápfolyadékban tartottuk.

A kísérletekben *nyolc* primer NK sejt-izolátumot vizsgáltunk. *Öt* NK sejt-izolátumot 3-4 naponta IL-2-vel újból stimuláltunk összesen egy hétig, *három* NK sejt-izolátumot csak egy alkalommal stimuláltunk IL-2-vel *24 órán* keresztül. A kísérlet előtt minden izolátumot teszteltünk a CD3⁺CD56⁺ fenotípusra nézve.

3.2.2. Sejtvonalak és tenyésztési körülmények

A Nishi [199], NKL [200], NK92 [201], KHYG-1 [202] citotoxikus NK tumorsejtvonalakat különböző IL-2 koncentrációkkal kiegészített (Nishi, NK92: 100 U/mL; NKL: 200 U/mL; KHYG-1: 450 U/mL) IMDM tápfolyadékban tartottuk. Az *in vitro* citotoxicitási tesztben targetsejtként K562 sejtvonalat használtunk. A targetsejteket 10% borjúsérummal (FCS, Sigma; UK), 100mM L-glutaminnal (Sigma, UK) és 80μg/mL gentamicinnel (Sigma, UK) kiegészített IMDM tápfolyadékban (Sigma, UK) tartottuk. A sejtuszuszpenziók párásított inkubátorban 37°C-on 5% széndioxidot tartalmazó környezetben nőttek. A sejteket heti két alkalommal etettük 1 x 10⁶/mL sejtszámot fenntartva. Mycoplasma fertőzés kizárásához a sejteket rendszeresen ellenőriztük Hoechst 33258 festéssel.

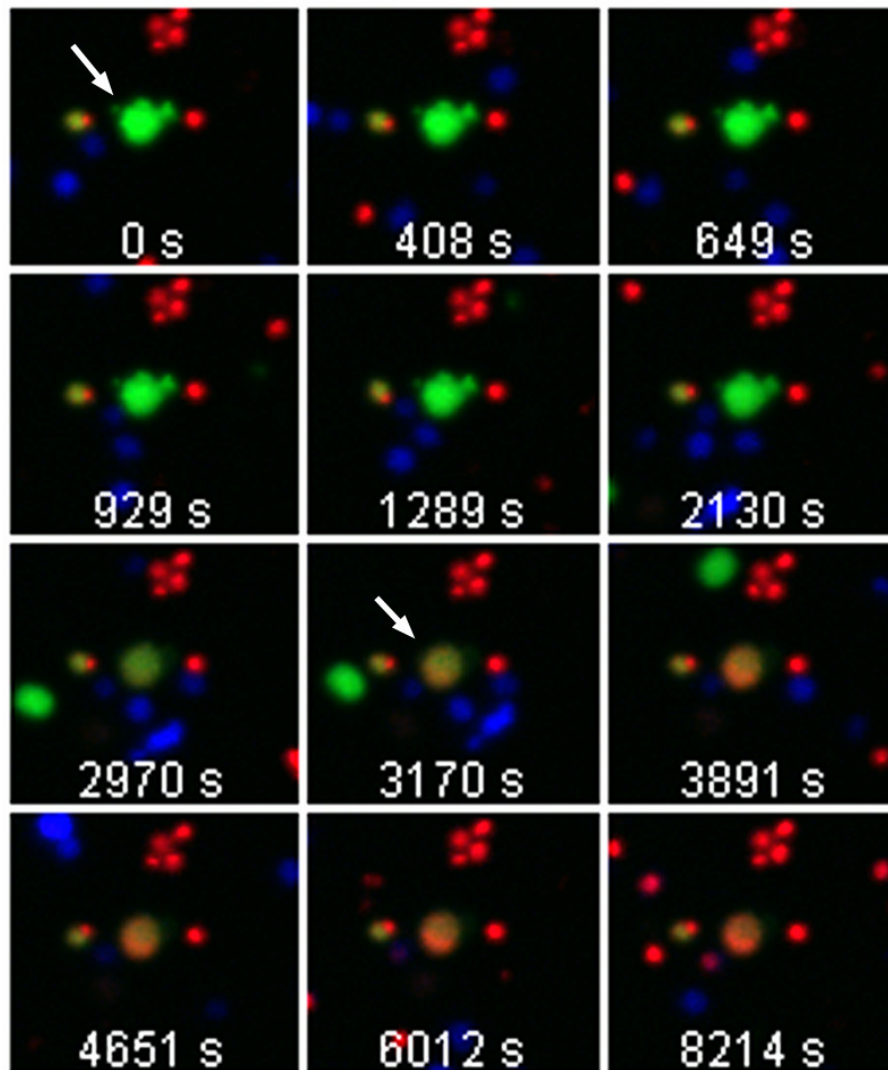
3.2.3. *In vitro* citotoxicitás teszt (standard ^{51}Cr citotoxicitás teszt)

A targetsejteket 1 órán keresztül inkubáltuk (37°C , 5% CO_2) $100\mu\text{Ci}$ $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -vel (Amersham Biosciences). Radióktívan jelölt targetsejteket háromszor mostuk RPMI-ben (Sigma; UK) és 96 lyukú lapos aljú ELISA lemezre $1,5 \times 10^4$ targetsejtet és $7,5 \times 10^4$ NK sejtet tettünk lyukanként. Így az effector-target (E:T) arány/lyuk % 5:1 lett (teljes térfogat $200\mu\text{L}$ /lyuk). Öt óra inkubálást követően (37°C , 5% CO_2) a spontán felszabaduló ^{51}Cr aktivitást (jelölt targetsejtek egyedül) és a maximálisan felszabaduló ^{51}Cr aktivitást (a jelölt targetsejtek 10% SDS-sel történő lízisét követően) határoztuk meg. A spontán felszabaduló ^{51}Cr aktivitása a maximális aktivitás kevesebb, mint 15%-a volt. A scintillációs mérés $100\text{-}100\mu\text{L}$ felülúszó gyűjtése után γ -sugárzás mérővel történt. Mindegyik mérést triplikátumokban végeztük és a specifikus sejtlízist (**ölőképesség; killing effectiveness; KE**) a három mérés átlagaként adtuk meg. A specifikus sejtlízist a következő képlet alapján számoltuk ki:

$$\text{KE\%} = (\text{cpm } ^{51}\text{Cr aktivitás; kísérleti lyuk} - \text{cpm spontán } ^{51}\text{Cr aktivitás}) / (\text{cpm maximális } ^{51}\text{Cr aktivitás} - \text{cpm spontán } ^{51}\text{Cr aktivitás}) \times 100.$$

3.2.4. *In vitro* citotoxicitás teszt (új fluoreszcensen jelölt citotoxicitás teszt)

Huszonkilenc gyógyszer különböző NK vonalak *in vitro* citotoxicitására kifejtett hatását vizsgáltuk 384 lyukú lapos aljú lemezek felhasználásával. A gyógyszerek négy koncentrációjával triplikátumokban végeztük a vizsgálatot. Minden lyukat $20\mu\text{L}$ térfogattal 15000 NK sejtet tartalmazó sejtsuszpenzióval töltöttünk meg, majd 20 órán keresztül inkubáltuk (37°C , 5% CO_2) a gyógyszerek jelenlétében. A target sejteket (K562) CMFDA-val (CellTracker green CMFDA; Invitrogen, Sweden) jelöltük a gyártó utasításai szerint. Következő lépésként $20\mu\text{L}$ 3000 target sejtet tartalmazó szuszpenziót adtunk ugyanannak a lemeznek a lyukaihoz (E:T arány 5:1 volt). Az NK sejtekkel együtt öt órán át történő inkubációt követően az elpusztult sejteket megkülönböztetően pirosra festettük etidium-bromiddal. A mérés és az értékelés a korábban leírtakhoz hasonló módon történt annyi különbséggel, hogy a rögzített képeken az elpusztult és élő targetsejtek pontos számát a CytotoxCount 3.0. programmal (KIVIF) határoztuk meg. Az NK sejtek citotoxicitását a targetsejteken az **1. ábra** mutatja.



1. ábra

Az NK sejtek megölnék egy K562 sejtet

A targetsejteket fluoreszcensen zöld színűre festettük (CellTracker green; CMFDA; Invitrogen, Sweden). Az NK sejteket fluoreszcens kék festéssel jeöltük (CellTracker blue ; CMAC; Invitrogen, Sweden). Az elpusztult sejteket az etidium-bromid pirosra festi. A képeket automatizált lézer konfokális mikroszkóppal (módosított Perkin-Elmer UltraView LCI) készítettük. A nyilak egy zöld targetsejtre mutatnak, miközben a körülötte látható NK sejtek a targetsejtet lizálják. Ezt követően a target sejt pirossá válik. Az időskála másodpercben van megadva.

A targetsejtet akkor számoltuk elpusztultnak, ha pirosan és zölden is festődött egyszerre. A lemezen nyolc kontroll lyukat használtunk az alap citotoxikus aktivitás meghatározására. Ezek a lyukak csak NK sejteket és K562 sejteket tartalmaztak gyógyszerek nélkül. Egy másik kontrollban - hasonló körülmények között - csak NK sejteket tettünk. Ahhoz, hogy ellenőrizhessük a gyógyszerek lehetséges rövidtávú hatását a targetsejteken, a targetsejteket a gyógyszerekkel magukban is inkubáltuk öt órán keresztül. Az NK sejtek ölképességét (**killing effectiveness; KE**) a következő képlet segítségével határoztuk meg:

Az elpusztult targetsejtek száma (ha ugyanaz a sejt piros és zöld egyszerre) / a targetsejtek összesített száma (zöld sejtek) x 100 %.

Ahhoz, hogy összehasonlíthatóvá tehesük az egyes NK vonalak mérési értékeit, a következő képletet alkalmaztuk:

KE gyógyszer jelenlétében / a kontroll lyukak KE értékének átlaga x 100 %.

Az átlagos ölképességet (mean killing efficacy; MKE) az összes NK vonal ölési képességének átlagából határoztuk meg. Azokat a sejteket, amelyek pirosra festődtek, de nem voltak zöldek, elpusztult NK sejteknek értékeltük. A gyógyszerek NK sejteken megfigyelhető citotoxikus hatásának mértékét (**cytotoxic effect; CE%**) a következő képlettel számoltuk ki:

elpusztult NK sejtek száma a gyógyszerrel kezelt lyukban / a kontroll lyukakban elpusztult NK sejtek számának átlaga x 100 %

3.2.5. Gyógyszerek

Az *in vitro* citotoxicitási tesztben 29 gyógyszert használtunk (**3. Táblázat**). A gyógyszerek közül 28-at rendszeresen használnak a humán gyógyászatban. A gyógyszeres lemezek a fentiekben bemutatott módon készültek. A legtöbb alkalmazott gyógyszerkoncentráció a betegekben elérhető koncentrációknak megfelelő tartományban volt [203-225]. A hígítási sorok (1x, 5x, 25x, 125x) kezdőkoncentrációit a gyógyszerek oldhatósága határozta meg. A **3. Táblázat** 5. oszlopa azokat a gyógyszerkoncentrációkat tartalmazza, amelyekkel az NK sejteket kezeltük egyedül, a 6. azokat, amelyek 20µL targetsejt szuszpenzió hozzáadása után alakultak ki. A gyógyszeres lemezeket nagyszámú tumorvonalon teszteltük, annak bizonyítására, hogy minden gyógyszer hatásosan működik. (ezek az adatok itt nem kerülnek bemutatásra).

Az egyes gyógyszerek AUC (area under the curve) értékeit *in vitro* és *in vivo* használt gyógyszerdózisok összehasonlításához használhatjuk. Az erre a célra létrehozott **RAUC (ratio of area under the curve)** értéket az *in vitro* és *in vivo* AUC értékek hányadosaiból kaptuk meg:

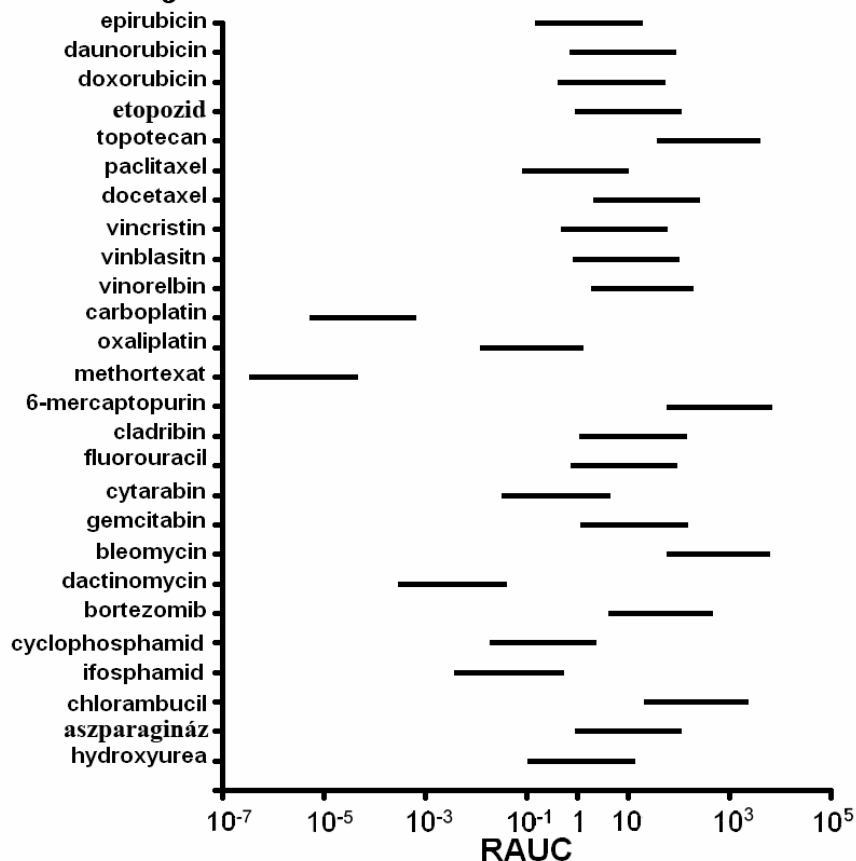
$\text{in vitro használt koncentráció } (\mu\text{g/mL}) \times 20 \text{ h} / \text{AUC } (\mu\text{gxh/mL}) \text{ in vivo.}$

Az egynél nagyobb RAUC érték azt jelzi, hogy az *in vitro* alkalmazott gyógyszerdózis magasabb, mint amit a klinikai gyakorlatban használnak. Ha a RAUC érték egy, az *in vitro* dózis megfelel az *in vivo* gyógyszerdózisnak. Az *in vivo* AUC értékeket, klinikai dózisokat és a számolt RAUC értékeket a **3.Táblázat** tartalmazza. A RAUC értékek a **2. ábrán** is láthatók..

Saját munka:

- gyógyszeres lemezek készítése,
- kísérleti lemezek készítése a sejtekkel (fluoreszcens citotoxicitás teszt alkalmazása és a fluoreszcens festés módszerének beállítása, optimális sejtszám beállítása),
- a kísérleti lemezek mikroszkópos mérése az új fluoreszcens citotoxicitási teszt segítségével,
- eredmények analízálása.

NK sejtekre számolt RAUC értékek



2. ábra

Az NK sejtekre kiszámolt RAUC (ratio of area under the curve) értékek

Az *in vitro* használt gyógyszerdózisok *in vivo* értékekkel történő összehasonlításához a RAUC értékeket a következő képlet segítségével határoztuk meg:

$$\text{in vitro használt koncentráció } (\mu\text{g/ml}) \times 20 \text{ h} / \text{in vivo AUC érték } (\mu\text{g} \times \text{h/ml})$$

$RAUC > 1$: az *in vitro* használt gyógyszerdózis magasabb, mint a klinikai dózis

$RAUC < 1$: az *in vitro* dózis alacsonyabb, mint az *in vivo* dózis

$RAUC = 1$: az *in vitro* dózis megfelel a klinikai dózisnak

3.3. G-CSF előkezelés hatása a leukémiás sejtek daunorubicin érzékenységre

3.3.1. Sejtvonal és tenyésztési körülmények

A KG-1 sejtvonalat a DEOEC Immunológia Intézetéből kaptuk. A sejt kultúrát IMDM tápfolyadékban (Gibco, BRL, Grand Island, NY, USA) tenyésztettük 20% borjúsérummal (Gibco), 100 mmol L-glutammal (Gibco), 80mg/mL gentamicinnel (Chinoin, Budapest, Magyarország) kiegészítve. A sejtszuspenziót párásított inkubátorban 37°C-on 5% CO₂-t tartalmazó légkörben tartottuk. Tenyésztés alatt a sejtkoncentrációt 1×10^5 sejt/mL-ben határoztuk meg, a sejteken másnaponta cseréltük a tápfolyadékot.

3.3.2. Flow cytometria

Miután a KG-1 sejteket 16 órán keresztül AIM-V szérummentes lymphocytá tápfolyadékban tartottuk (Gibco, BRL, Grand Island, NY, USA) 10ng/mL koncentrációban G-CSF-el (Neupogen, AMGEN Europe B.V., Breda, Holland) stimuláltuk 48 órán keresztül, vagy a 48 órás G-CSF előkezelést követően 6 óráig daunorubicinnel (2µg/mL) kezeltük. A kontroll mintákat 64 óráig tartottuk AIM-V tápfolyadékban. Az AIM-V tápfolyadék használatára az IMDM helyett a növekedési faktorok konstans szintjének biztosítása miatt volt szükség. (Az IMDM tápfolyadékot felhasználás előtt szérummal kell kiegészíteni, s a hozzáadott szérumadagokban a növekedési faktorok szintje változhat. Az AIM-V tápfolyadék felhasználásra kész, összetétele állandó.) A 16 órás inkubálást AIM-V tápfolyadékban a sejtek G-CSF iránti érzékenyítésére használtuk. A sejteket két alkalommal mostuk fiziológiás sóoldattal, majd 0.5% BSA-val és 0.05% nátrium-aziddal (Sigma-Aldrich) kiegészített PBS-ben reszuszpendáltuk (8.06mM Na₂HPO₄, 1.47mM KH₂PO₄, 2.7mM KCl, 137.9mM NaCl, pH 7.4). A sejteket (3×10^5 /mL) fluoreszcens monoklonális antitest konjugátumokkal jelöltük, amelyek az alábbi felszíni markerekre voltak specifikusak: CD11a, CD11c, CD34, CD58, CD86, HLA-DR (Immunotech), CD11b, CD114 (G-CSF-R) (BD Pharmingen; San Diego, CA, USA). Az MDR-1 (multidrug resistance protein-1) specifikus antitestért Dr. Szabó Gabor professzornak (Biofizika és Sejtbiológia Intézet, DEOEC) mondunk köszönetet. A kontroll mintákat ugyanazzal a fluorochrommal jelölt, izotípusukban egyező antitestekkel jelöltük (BD Pharmingen). A felszíni markerek expressziójának szintjét direkt vagy indirekt immunfluoreszcens jelölést követően FACSCalibur flow cytométerrel mértük (BD

Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Mintánként tízezer sejtet számoltunk le és analizáltunk a CellQuest programmal. A sejtméret alatti részecskéket az előre és oldalra szórás alapján szűrtük ki, a “list-mode” adatokat a WinMDI programmal analizáltuk [226].

3.3.3. Immunoblot analízis

A KG-1 sejtek 16 órás AIM-V tápfolyadékban történt tartást követően (Gibco, BRL, Grand Island, NY, USA) a sejteket 3, 6, 12 órában keresztül 10ng/mL G-CSF-el (Neupogen) újra stimuláltuk. A kontroll mintákat 16 órában keresztül tartottuk AIM-V-ben. Az inkubációkat követően a sejteket 4°C -os PBS-sel mostuk és 100µL RIPA pufferben (1% (v/v) Nonidet P-40, 1% (w/v) nátrium-deoxikolát, 0.1% (w/v) SDS, 0.15 M NaCl, 0.01 M nátrium-foszfát, pH 7.2, 2mM EDTA, 50mM NaF, és proteáz inhibitorok) lizáltuk jégen, majd szonikáltuk.

A sejtlizátumok egészét felhasználtuk a Western blot analízisekhez. A sejtlizátumok fehérjekoncentrációit BCA módszerrel határoztuk meg ELISA readert (Labsystems Multiscan MS) használva 540nm-en BSA standard alapján. Ahhoz, hogy a fehérjekoncentrációkat mg/mL-ben meghatározhassuk az adatokat GraphPad Prism programmal analizáltuk lineáris regressziót használva. A fehérjéket nátrium dodecil sulfate-polyacrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) választottuk szét egymástól BioRad MiniProtean 10% vagy 12% acrilamidot tartalmazó géleken, a Laemmli által leírt módszer szerint [227]. A Western blot analízishez a mintákat RIPA pufferben oldottuk fel és 5x SDS mintapuffer hozzáadása után felforraltuk. A fehérjeminták Western blot analíziséhez a gélre lyukanként 70µg fehérjét tettünk. A gél nitrocellulóz membránra blottoltuk (BioRad transfer unit segítségével 100V-on 90 percig BioRad hűtő egységet használva) [228]. A membrán blokkolására 5% vagy 0,1% zsírszegény tejport és 0,05% Tween 20-at tartalmazó PBS-t használtunk. A blokkolást követően a membránokat az első antitestekkel (anti-p44/p42 és anti-P-p44/42) együtt inkubáltuk 90 percig szobahőmérsékleten vagy 4°C-on egy éjszakán át, ezt követték a HRP konjugált második antitestek. Az immunreakciókat felerősített kemiluminescenciával (ECL) detektáltuk. A PBS-t TBS-re cseréltük, ha fotospecifikus antitesteket használtunk.

3.3.4. MTT teszt

A KG-1 sejteket 16 órában keresztül AIM-V tápfolyadékban (Gibco, BRL, Grand Island, NY, USA) tartottuk, ezt követően a sejteket 48 órában keresztül 10, 100, 1000ng/mL G-CSF-

el (Neupogen, AMGEN Europe B.V., Breda, Holland) egyedül, vagy a G-CSF kezelést daunorubicin (0,002-2 μ g/mL) kezeléssel kiegészítve stimuláltuk. A kontroll mintákat *64 órán* keresztül éhezettük AIMV-ben. A sejtek gyógyszerrezisztenciáját az MTT (methyl-thiazol tetrazolium) teszttel mértük. A KG-1 sejteket *16 órán* keresztül AIM-V tápfolyadékban tartottuk, majd 96 lyukú lemezre tettük ki (80 μ L/lyuk, sejtkoncentráció 5x10⁵/mL) és 10, 100 vagy 1000ng/mL G-CSF-el (Neupogen, AMGEN Europe B.V., Breda, Holland) magában, daunorubicinnel (0,002-2 μ g/mL; Daunoblastina, Pfizer) magában vagy a kettőt együtt kombinálva *48 óráig* inkubáltuk. A kontroll mintákat *64 órán* keresztül tartottuk AIM-V tápfolyadékban. A daunorubicint hat koncentrációban duplikátumokban használtuk. A kontroll sejttúlélés (control cell survival; CCS) meghatározásához hat lyuk csak tápfolyadékot, a másik hat lyuk sejteket tartalmazott tápfolyadékban. A lyukakhoz *48 órát* követően MTT-t adtunk, amit az élő sejtek színes formazánná alakítottak. A színintenzitást spektrofotométerrel 562nm-en mértük. Az optikai denzitás (OD) mértéke egyenesen arányos az élő sejtek számával. A citotoxicitást a lyukak háttér OD korrekciója után minden egyes gyógyszerkoncentrációban az alábbi képlet alapján határoztuk meg:

$$(OD \text{ kezelt lyuk} / a \text{ kontroll lyuk átlag OD értéke}) \times 100\%.$$

Saját munka:

- KG-1 sejtvonal tartása,
- KG-1 sejtvonal kezelése G-CSF-el és daunorubicinnel,
- 96 lyukú kísérleti lemezek készítése a sejtekkel,
- a kísérleti lemezek mérése MTT teszt segítségével,
- eredmények analízálása

4. Eredmények

4.1. A lymphoblastoid sejtvonalak gyógyszerérzékenysége

4.1.1. A különböző LCL vonalak gyógyszerérzékenységi mintázata

A 17 tesztelt különböző LCL sejtvonal eltérő eredetű sejteket tartalmazott. Vizsgáltunk olyan sejtvonalakat, amelyeket már több éve folyamatosan *in vitro* kultúrában tartottak, valamint olyan transzformálódott B-sejt kultúrákat is, amelyeket *három héttel* a kísérlet előtt hoztak létre *in vitro* EBV fertőzéssel. A fertőzés a sejtvonalak nagy részében a B95.8 EBV törzzsel történt, néhány azonban spontán kinőtt sejtvonal volt a donor saját vírusát hordozva. A sejtvonalak nagy része egészséges donorok normál B sejteiből származott, de használtuk egy XLP-ben szenvedő és egy Burkitt lymphomás beteg B-sejteiből transzformálódott LCL-t is. Az LCL-ek között volt episzómális, valamint integrált EBV genomot hordozó sejtvonal. A különböző eredetű LCL-ek nagyon hasonló gyógyszerérzékenységi mintázatot mutattak. Ezt szemlélteti az epirubicin példája (**3. ábra**), amelyben négy különböző gyógyszerkoncentrációban a 17 LCL túlélési görbéjét együtt láthatjuk.

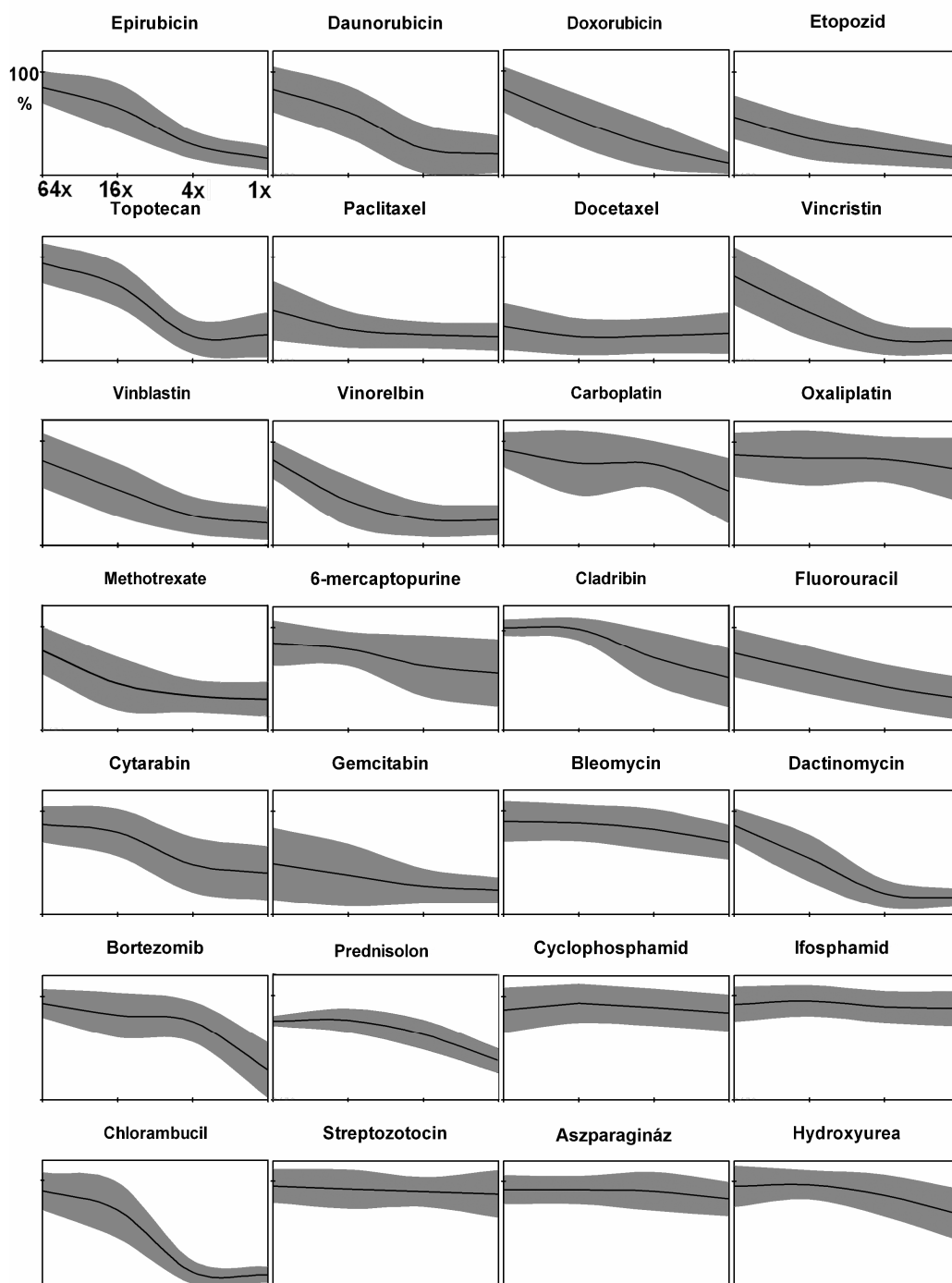


3. ábra

A 17 LCL gyógyszerérzékenységi mintázata epirubicin esetében

A vékony görbék három független mérés átlagát (mean cell survival; MCS) mutatják. Az LCL-ek túlélési görbéinek átlagát jelöli a vastag fekete vonal, $\pm$ SD értéket a szürke terület ábrázolja; 1x : legmagasabb koncentráció; 16x: a legmagasabb koncentráció 16-szoros hígítása stb.

A **4. ábra** mutatja a sejttúlélés átlaggörbéit (MCS) a standard deviációkkal gyógyszerenként a 28 gyógyszer esetében. Az MG132-hoz tartozó értékek a **4. Táblázat**ban olvashatók.



4. ábra

A 17 lymphoblastoid sejt vonal gyógyszerérzékenységének átlag értékei és a standard deviációk 28 citosztatikum esetében

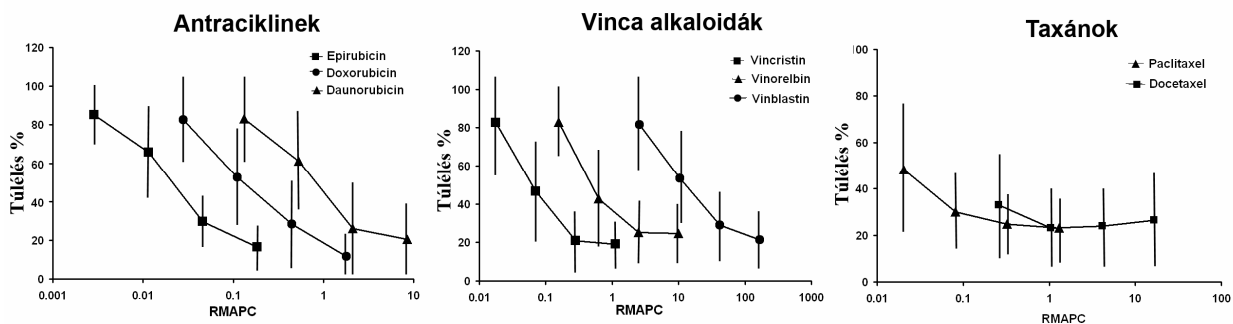
y tengely: a túlélő sejtek %-os aránya 0-100%

x tengely: gyógyszerhígítások (1x: legmagasabb koncentráció)

4.1.2. A hatástalan és kifejezetten hatásos gyógyszerek kiválasztása

A gyógyszerek hígítási sorainak legmagasabb koncentrációit (1x, 4x, 16x, 64x) azok oldhatósága határozta meg. Az *in vitro* gyógyszerérzékenységi adatok összehasonlíthatóvá tételéhez két módszert használtunk: egyik a gyógyszerek C_{max} értékeinek összehasonlítása az *in vitro* gyógyszerkoncentrációkkal, másik a klinikai gyógyszerdózis (AUC érték) összehasonlítása az *in vitro* alkalmazott gyógyszerdózissal.

Kigyűjtöttük gyógyszerenként az irodalomban hozzáférhető maximálisan elérhető plazmakoncentrációkat (Maximum Achieved Plasma Concentration; C_{max}) (**2. Táblázat 1-5. oszlop**). A hígítási sorok gyógyszerkoncentrációit elosztva az adott gyógyszer C_{max} értékével a maximálisan elérhető plazmakoncentráció hányadosát kaptuk meg (Ratio of Maximum Achieved Plasma Concentration; RMAPC). A gyógyszerenként és koncentrációkként kiszámolt RMAPC, MCS és $\pm$ SD értékeket a **4. Táblázat** tartalmazza. A sejtvonalak túlélési görbéinek átlagát az RMAPC értékek függvényében ábrázolva lehetővé vált az egyes gyógyszerek hatásosságának összehasonlítása. A **5. ábrán** három hatóanyagcsoport tagjainak hatásosságát hasonlítjuk össze: az antraciklineket, a vinca alkaloidokat és a taxánokat.



5. ábra

Az LCL-ek gyógyszerérzékenysége antraciklinek, vinca alkaloidok és taxánok esetében

A **6. ábrán** egy közös RMAPC tengelyen gyógyszerenként ábrázoljuk a túlélési görbék átlagát (MCS). Hatásosságuk alapján az LCL-eken vizsgált gyógyszereket három csoportba osztottuk:

- 1. csoport:** Kifejezetten hatásosnak ítéltük a gyógyszert, ha az MCS 30% alatt, az RMAPC érték 0,3 vagy ez alatt volt. (MCS <30%, RMAPC ≤ 0,3)
- 2. csoport:** A gyógyszer részlegesen volt hatásos, ha az MCS 60% alatt volt és az RMAPC érték 0,3 és egy közé esett. (MCS < 60%, RMAPC: 0,3-1)
- 3. csoport:** A gyógyszert hatástalannak tartottuk, vagyis az LCL-ek rezisztensek voltak a szerre, ha az MCS 60% fölé esett és az RMAPC érték nagyobb volt mint 1. (MCS > 60%, RMAPC > 1)

Vizsgálataink szerint az LCL-ek kifejezetten érzékenyek bizonyultak: **vincristinnel, paclitaxellel, methotrexattal, epirubicinnel** szemben (1. csoport). A gemcitabint, doxorubicint, fluorouracilt, dactinomycint, docetaxelt, daunorubicint, etopozidot, vinorelbint csak részlegesen tartottuk hatásosnak (2. csoport). A legtöbb LCL rezisztens volt cyclophosphamidra, aszparaginázra, topotecanra, oxaliplatinra, bleomycinre, 6-mercaptopurinra, hydroxyureára, cladribinre, chlorambucilra, carboplatinra, bortezomibra, cytarabinra, prednisolonra és vinblastinra (3. csoport). Alig észleltünk gyógyszerhatást oxaliplatin, bleomycin, cyclophosphamid, aszparagináz, hydroxyurea és ifosfamid esetében, míg vinblastin, chlorambucil, prednisolon és topotecan hatásosnak bizonyultak, de csak nagyon magas koncentrációban. Ugyan a 3. csoportba tartozó gyógyszerek nem tűntek hatásosnak LCL-eken, más sejtvonalakon és primer tumorokon esetünkben dózisfüggő növekedésgátlást észleltünk (ezeket az adatokat itt nem szemléltetjük). Streptozotocin esetében nem tudtunk meghatározni RMAPC értéket, mivel nem találtunk Cmax értéket meghatározó farmakokinetikai tanulmányt. RMAPC ugyancsak nem volt meghatározható MG132 esetében, mivel ezt a szert nem használják a klinikai gyakorlatban. A streptozotocin - a kísérletekben alkalmazott koncentrációban - nem befolyásolta a sejtek túlélését. Míg az MG132 a legmagasabb koncentrációkban hatásosan csökkentette a sejtek túlélését, a hasonló hatásmechanizmusú és klinikailag használt bortezomib nem bizonyult hatásosnak.

A másik lehetőség, az *in vitro* gyógyszerkoncentrációk *in vivo* értékekkel történő összehasonlítására az AUC értékek használata. Ehhez az összehasonlításhoz a következő egyenletet használtuk:

$\text{in vitro alkalmazott koncentráció } (\mu\text{g/mL}) \times 72 \text{ h} / \text{in vivo AUC } (\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}) \text{ érték}$
--

[illegible]

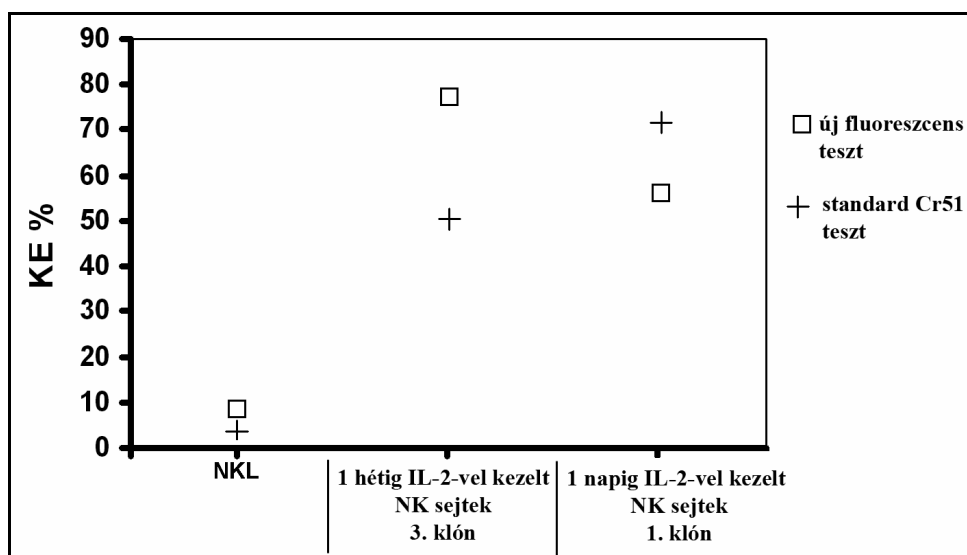
A 17 lymphoblastoid sejtvonal gyógyszerérzékenységének átlagértékei az RMAPC (Ratio of Maximum Achieved Plasma Concentration) értékek függvényében ábrázolva

1. csoport: kifejezetten hatásos gyógyszerek; 2. csoport: részben hatásos gyógyszerek; 3. csoport : hatástalan gyógyszerek

4.2. Citosztatikumok hatása NK sejtek citotoxikus működésére

4.2.1. Az új fluoreszcens citotoxicitás teszt összehasonlítása a standard ^{51}Cr citotoxicitás teszttel

Az új fluoreszcens és standard ^{51}Cr citotoxicitási tesztet azonos kísérleti körülmények között (inkubációs idő, effektor-target arány, lapos aljú lemezek használata V aljú lemezek helyett) gyógyszerek jelenléte nélkül hasonlítottuk össze. Az NK vonalak vizsgálata során az általunk kifejlesztett fluoreszcens módszer eredményei jól korreláltak a standard ^{51}Cr citotoxicitás teszt eredményeivel. A **7. ábra** egy NK tumorvonal (NKL) és két NK sejt klón öləképességét szemlélteti a két módszer alkalmazásával.



7. ábra

Az új fluoreszcens citotoxicitás teszt és a standard Cr^{51} citotoxicitás teszt összehasonlítása

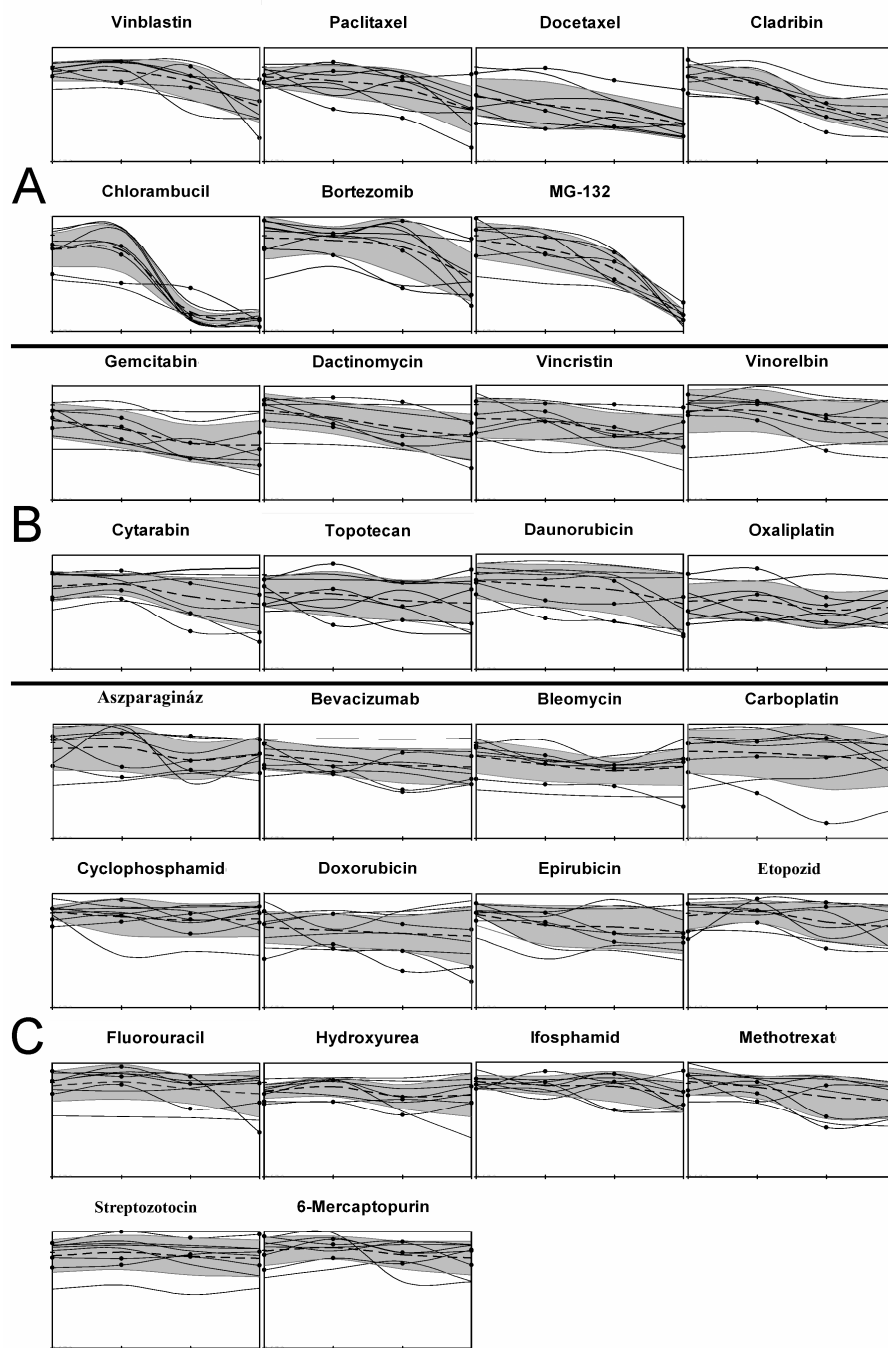
Az NKL sejtvonalat és két IL-2 aktivált primer poliklonális NK sejt preparátumot inkubáltunk együtt 5 órán keresztül a K562 targetsejtekkel. E:T arány minden esetben 5:1
KE (killing effectiveness): az NK sejtek tumorsejttölő képessége

4.2.2 A gyógyszerek hatása a különböző NK vonalak ölképességére

Nyolc különböző egészséges donortól származó poliklonális NK sejt preparátumot és négy NK tumorvonalat vizsgáltunk az új fluoreszcens módszer segítségével. A különböző vonalak különböző eredetűek voltak és különböző korú *in vitro* kultúrákból származtak. A vizsgálat egészséges donoroktól származó IL-2-vel stimulált *egyhetes in vitro* kultúraidejű NK vonalakat és frissen szeparált csak 24 órás kultúraidejű NK vonalakat is tartalmazott.

Az NK tumorvonalak az általunk használt új módszerrel mérve viszonylag alacsony ölképességet mutattak ($\leq 10\%$), emiatt a tumorvonalak eredményeit a továbbiakban nem tudtuk felhasználni. A mikroszkópos kiértékeléshez a módszer alkalmazásakor szükségszerűen lapos aljú lemezeket használtunk az általánosságban elterjedt V aljú lemezek helyett. Mivel a tumorvonalak spontán mozgása lassú volt, a hatásos működésükhöz nagy sejtsűrűséget igényeltek volna. A vizsgált NK vonalak kontroll KE értékei az **5. Táblázatban** találhatók. A különböző eredetű NK sejtek ölképessége gyógyszerenként nagyon hasonlóan változott meg. Ezt a jelenséget a **8. ábra** szemlélteti, amely az összes NK vonal ölképességét (killing effectiveness; KE) ábrázolja a 29 gyógyszer esetében négy különböző koncentrációban. A **9. ábra** a gyógyszerek NK sejtekre gyakorolt citotoxikus hatását (cytotoxic effect; CE%) mutatja be. Az MKE értékeket a **6. Táblázat** tartalmazza. Az *ötórás* inkubációs idő alatt vizsgált gyógyszerek egyike sem befolyásolta a K562 targetsejtek életképességét (nincs szemléltetve).

Az elpusztult NK sejtek száma magasabb volt azokban a gyógyszerkezelt kultúrákban, amelyeket *egy napig* kezeltünk IL-2-vel, mint azokban, amelyeket *egy hétig* tartottunk IL-2 jelenlétében. Egyik NK populáció sem mutatott az elpusztult sejtek számában dóziszfüggő növekedést. Ebből következik, hogy gyógyszerenként az NK sejtek ölképességének dóziszfüggő csökkenése nem magyarázható az NK sejtek gyógyszer indukálta pusztulásával. (**8-9. ábra**)



8. ábra

A fluoreszcens teszttel vizsgált NK sejtek ölési képessége (KE; killing effectiveness)

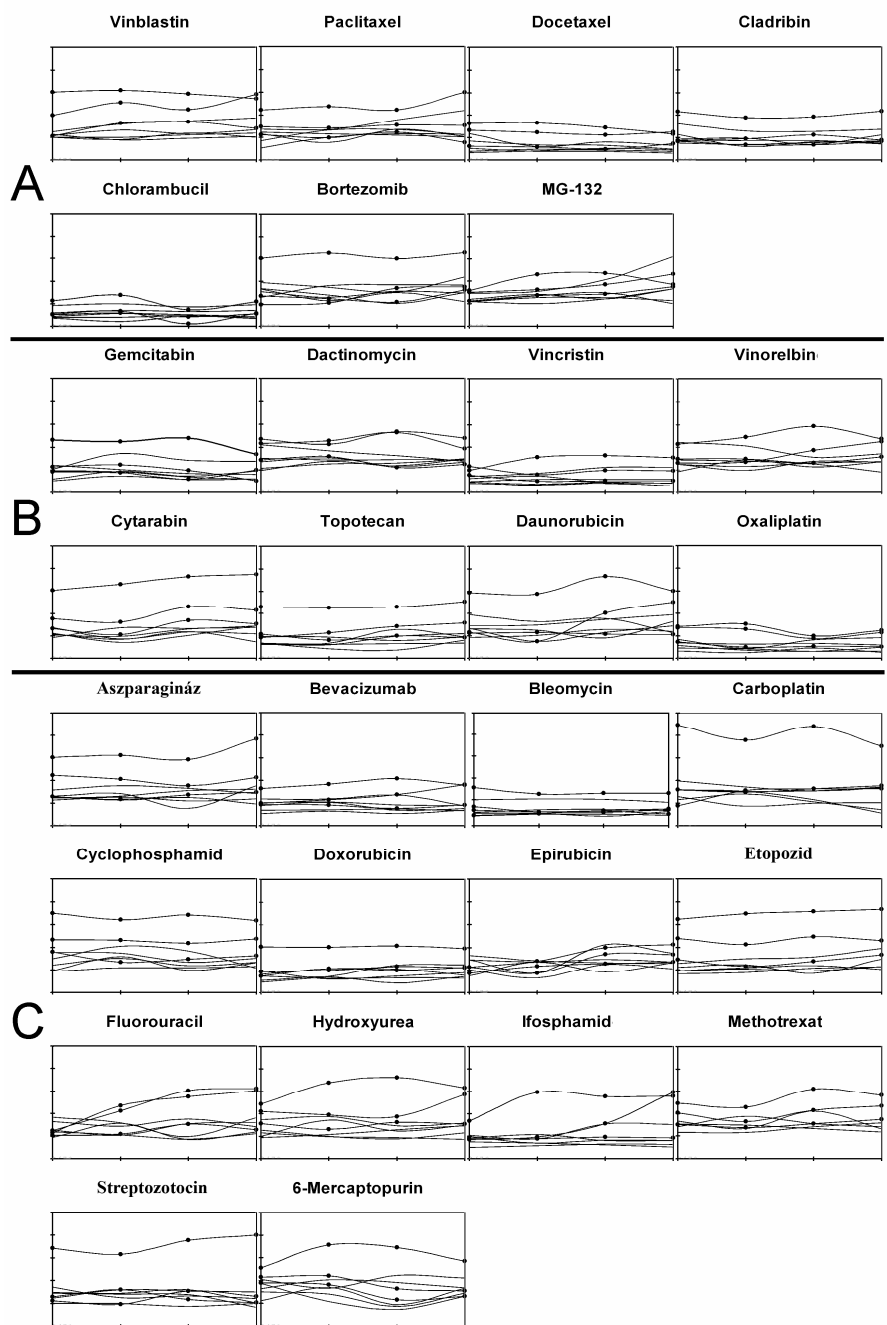
Az ábra az NK populációk ölési képességét ábrázolja 29 különböző gyógyszer 4 koncentrációja jelenlétében. Mindegyik vékony görbe 3 független mérés átlagát jelöli. A vastag szaggatott vonal a görbék átlagát mutatja (MKE; Mean Killing Efficacy). A fekete pontokkal jelölt görbék IL-2-vel 1 napig kezelt NK sejtek ölési képességét mutatja. A szürke területek a $\pm$ standard deviációkat adják (SD).

A csoport: effektív gyógyszerek (MKE min. < 60%)

B csoport: részben hatásos gyógyszerek (70% > MKE min > 60%)

C csoport: nem hatásos gyógyszerek (MKE min. > 70%)

X tengely: növekvő gyógyszerkoncentrációk; Y tengely: NK sejtek KE értékei 0-120%



9. ábra

A gyógyszerek citotoxikus hatása (cytotoxic effect; CE%) az NK sejteken

Mindegyik vékony görbe három független mérés átlagát jelöli. A fekete pontokkal jelölt görbék az IL-2-vel egy napig kezelt NK sejtekhez tartozó adatokat jelölik. A gyógyszerek okozta citotoxikus hatást (CE%) a következő képlettel számoltuk:

$\frac{\text{elpusztult NK sejtek száma a gyógyszeres lyukakban}}{\text{elpusztult NK sejtek száma a kontroll lyukakban}} \times 100\%$

A csoport: hatásos gyógyszerek; B csoport: mérsékelten hatásos gyógyszerek; C csoport: nem hatásos gyógyszerek

X tengely: növekvő gyógyszerkoncentrációk; Y tengely: a gyógyszer citotoxikus hatása (CE%) a kontrollhoz viszonyítva 0-500 % (a kontroll az NK sejtek pusztulását jelenti gyógyszerek nélkül, értéke 100%)

4.2.3 A hatástalan és kifejezetten hatásos gyógyszerek meghatározása

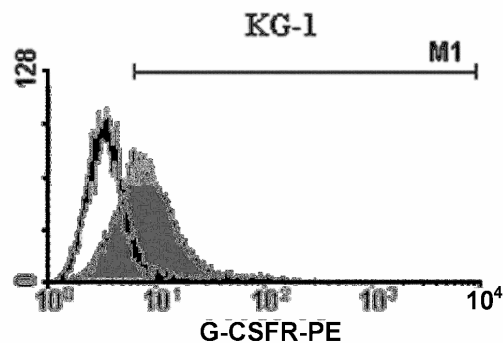
Vizsgálataink alapján az NK mediált citotoxicitást legkifejezettebben a következő gyógyszerek gátolták: chlorambucil, MG-132, docetaxel, cladribin, paclitaxel, bortezomib, gemcitabin, vinblastin **(8. ábra A csoport)**. MG132 esetében nem lehet RAUC értéket meghatározni, mivel ezt a gyógyszert nem alkalmazzák a klinikai gyakorlatban.

Az oxaliplatin, dactinomycin, cytarabin, daunorubicin, vincristin, topotecan kevésbé bizonyult hatásosnak. A legtöbb NK vonal öléképességét nem befolyásolták a következő szerek: bevacizumab, bleomycin, doxorubicin, epirubicin, vinorelbin, carboplatin, methotrexat, ifosfamid, etopozid, hydroxyurea, azparagináz, fluorouracil, 6-mercaptopurin, streptozotocin, cyclophosphamid.

4.3. KG-1 sejtvonal danunorubicin érzékenységének változása G-CSF előkezelést követően

4.3.1. A G-CSF receptor jelenléte és aktiválódása a KG-1 sejteken

Flow cytometria segítségével igazolni tudtuk a G-CSF receptor jelenlétét a KG-1 myeloid sejteken. (10. ábra) Ismert, hogy a G-CSF az ERK/MAP kináz útvonal aktiválódását idézi elő, amelyre a ERK/MAP kinázok izoformáinak foszforiláltságából következtethetünk. Azt, hogy a KG-1 sejteken található G-CSF receptorokat a G-CSF aktiválja-e, az ERK-1 (p44/p42 MAP kináz) foszforiláltsági szint változásának követésével (Western blot analízissel) ítéltük meg. G-CSF kezelést követően az ERK-1 összmenyisége lecsökkent. A kezeletlen mintában a foszforilált ERK-1 nem volt detektálható, de három órás G-CSF kezelést követően a foszforilált ERK-1 (P-ERK-1) megjelent. Hat órás G-CSF kezelést követően a P-ERK-1 szintje tovább növekedett és a megnövekedett foszforiláltsági állapot 12 órát követően is megmaradt (11. ábra).

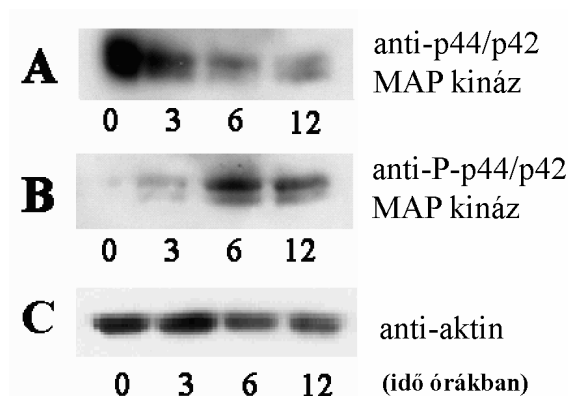


10. ábra

A G-CSF receptor jelenlétének igazolása KG-1 sejteken flow cytometria segítségével

Fekete vonal: izotípus kontroll

Fekete vonallal határolt szürke terület: KG-1 sejtek G-CSF receptorral



11. ábra

A p44/p42 MAP kináz foszforilációjának indukciója KG-1 sejtekben G-CSF adását követően

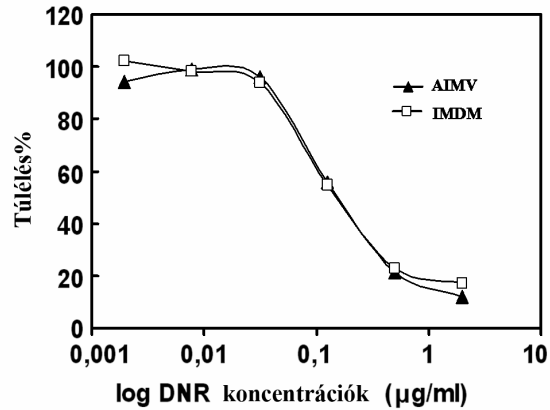
A: p44/p42 MAP kináz (ERK-1) szintje

B: foszforilált p44/p42 MAP kináz (phosphorylated ERK-1) szintje

C: kontroll

4.3.2. A daunorubicin és G-CSF hatása a KG-1 sejtekre

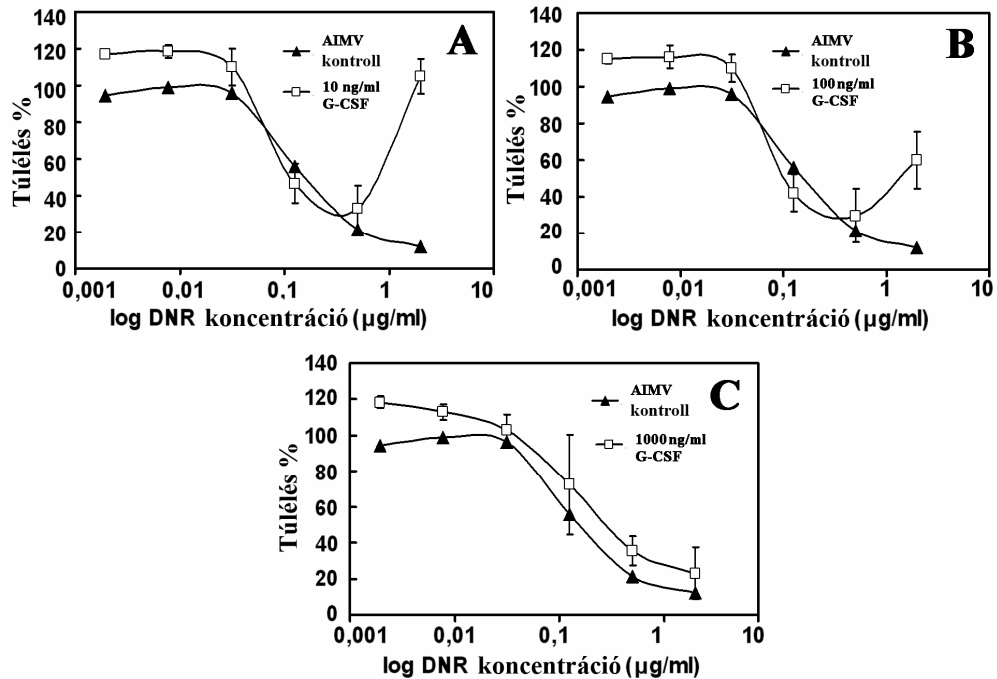
A G-CSF önmagában egyik koncentrációban (10, 100, 1000ng/mL) sem változtatta meg a KG-1 sejtek túlélését, (nincs bemutatva), a sejtek viszont érzékenyek bizonyultak a daunorubicin alkalmazott koncentrációival szemben (**12. ábra**). Az AIMV vagy az IMDM táfolyadékok használatakor nem észleltünk különbséget az érzékenységi mintázatban (**12. ábra**). A sejteket G-CSF-el és daunorubicinnel együtt kezelve dóziszfüggő jelenséget észleltünk: a KG-1 sejtek G-CSF-el történt előkezelését követően *túlélésnövekedést* figyeztünk meg a legmagasabb daunorubicin koncentráció esetében (2μg/mL) (**13. ábra**). Érdekes, hogy a túlélésnövekedés a legalacsonyabb koncentrációjú G-CSF előkezelést (10ng/mL) követően sokkal kifejezettebb volt. A sejtek G-CSF előkezelését követően az alacsony koncentrációjú daunorubicin kezelés eredményeként az élő sejtek száma kb. 20%-al több volt a kontrollénál. (**13. ábra**).



12. ábra

KG-1 sejtek daunorubicin érzékenysége, AIMV vagy IMDM tápfolyadékban tartva

Daunorubicin (DNR) koncentrációk: 0.002-2 μg/ml



13. ábra

A KG-1 sejtek daunorubicin érzékenysége különböző koncentrációjú G-CSF előkezelést követően

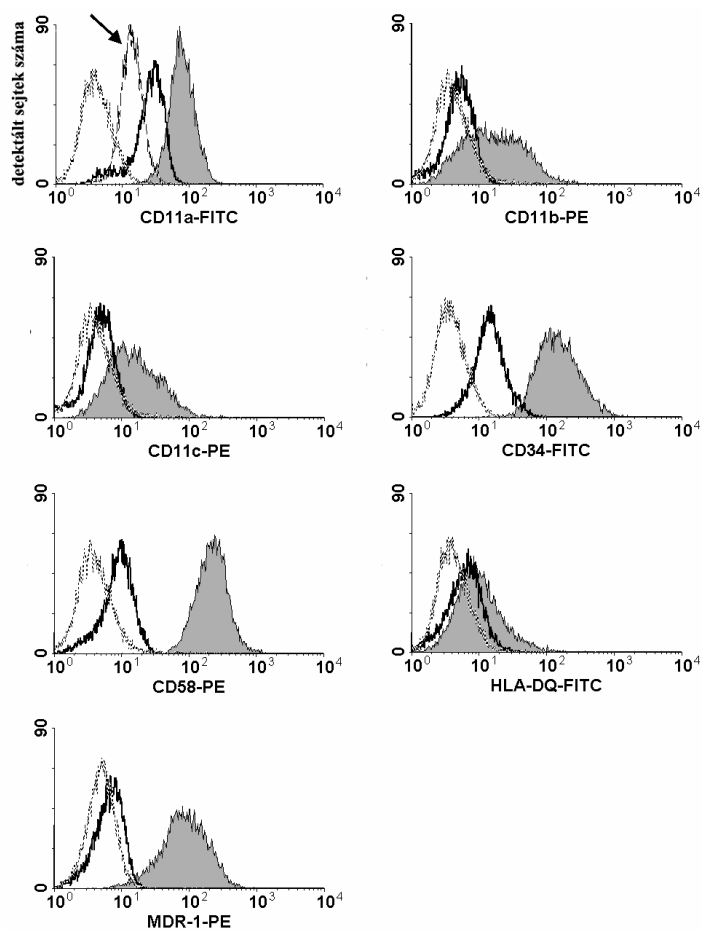
A: 10 ng/ml G-CSF előkezelés

B: 100 ng/ml G-CSF előkezelés

C: 1000 ng/ml G-CSF előkezelés

4.3.3. A felszíni markerek expressziójának változása G-CSF és daunorubicin kezelést követően

Flow cytometriával vizsgáltuk a különböző felszíni markerek expressziójának változását annak az eldöntésére, hogy a G-CSF jelenlétében megfigyelhető daunorubicin rezisztencia magyarázható-e a leukémiás sejtek differenciálódásával. A hatásos G-CSF koncentráció (10ng/mL) önmagában egyik vizsgált marker expressziójának szintjét sem változtatta meg (CD11a, CD11b, CD11c, CD34, CD58, CD86, HLA-DR). A magas koncentrációjú daunorubicin (2 μ g/mL) kezelés azonban minden vizsgált marker expresszióját lecsökkentette. G-CSF előkezelést követően a daunorubicin hatására a CD11a expressziójának szintje a többinél sokkal kifejezettebben csökkent (**14. ábra**).



14. ábra

A differenciálódási markerek expressziós szintjének csökkenése G-CSF és daunorubicin kezelést követően

Kezelések: árnyékolt: G-CSF önmagában (10ng/mL); vastag vonal: daunorubicin önmagában (2 μ g/mL); pontozott vonal: izotípus kontroll; szaggatott vonal: G-CSF daunorubicinnal együtt (csak a CD11a esetében ábrázoltuk, nyíllal jelölve). A kezelés nélkül AIM-V-ben tartott sejtek hisztogramjai nincsenek feltüntetve.

5. Megbeszélés

A terápiás lehetőségek javulása ellenére a daganatos betegek egy részét ma is elveszítjük, a kezeléssel dacoló alapfolyamat, vagy az agresszív kemoterápia súlyos mellékhatásai miatt. Az öröndetesen egyre növekvő számú túlélő esetében viszont számolnunk kell a terápia toxikus mellékhatásaival: növekedési retardáció, hormonális problémák, fertilitási gondok, kognitív zavarok, kardiotoxicitás és legfőképpen a második tumor veszélye fenyeget. Mindezen tünetek negatívan befolyásolják a gyermekkori daganatokból gyógyultak életminőségét, a társadalomba való beilleszkedésüket, a családalapítást, korlátozzák pályaválasztásukat. A kérdés jelentőségét növeli az érintettek nagy száma: egyes előrejelzések szerint 2010-re minden ötszázadik felnőtt gyermekkori daganatból gyógyult lesz.

Egyre sürgetőbben merül fel az igény a mainál hatásosabb, de kevésbé toxikus terápia kidolgozására. A hatékonyság ma már a terápia agresszivitásának növelésével a toxicitás egyidejű növekedése miatt tovább nem fokozható. Differenciált, egyénre szabott kezelési módok kidolgozására van szükség. Ehhez nyújt segítséget a daganatos sejtek *in vitro* gyógyszerérzékenységi vizsgálata. Az általánosan használt MTT teszt alkalmazása gyermekkori ALL-ben Veerman és Pieters által vezetett holland munkacsoport nevéhez fűződik [229]. Különböző citosztatikumok hatását vizsgálták *ex vivo* leukaemiás blasztokon, és korrelációt figyeltek meg az egyes betegségcsoportok és a blasztsejtek *in vitro* gyógyszerérzékenysége között [230, 231].

Magunk is MTT tesztel kezdtek el vizsgálatainkat, ami jól használható és reprodukálható eredményeket adott a G-CSF myeloid blasztok daunorubicin érzékenységeire gyakorolt hatásának vizsgálatakor. További betegségcsoportok *in vitro* gyógyszerérzékenységeinek vizsgálatát is terveztük nagyszámú citosztatikum alkalmazásával. Az MTT teszt azonban ilyen méretű munkára alkalmatlannak bizonyult a vizsgálathoz szükséges nagy sejtszám, valamint a módszer munka-, és időigényessége miatt. Az MTT teszt korlátainak leküzdésére munkacsoportunk a stockholmi Karolinska Intézetben kifejlesztett egy új gyógyszerérzékenységi vizsgálati módszert, amelynek során fluoreszcens automatizált lézer konfokális mikroszkópot alkalmazunk, a vizsgálat kiértékeléséhez pedig Openlab alapú egyedileg tervezett programokat használunk. A 384 lyukú lemezek használata egyszerre 30 különböző gyógyszer tesztelését teszi lehetővé triplikátumokban, négy különböző koncentrációban. A módszer nagy érzékenysége

köszönhetően a 30 különböző gyógyszer hatásának vizsgálatához mindössze 1,2 millió sejt szükséges. A mikroszkóppal rögzített képek tárolhatók, így később is újra analizálhatók. A módszer lehetőséget nyújt a sejtszám megadása mellett a sejtenként megállapítható nagyság, körfogat, fluoreszcens intenzitás mérésére is. A lemezek készítése Biomek robot segítségével automatizált, és nagyszámú (akár 100) vizsgálati lemez készíthető egyszerre, ami a vizsgálatok reprodukálhatóságát biztosítja. A fentiek alapján a módszer előnye, hogy kiválóan alkalmazható különböző primer daganatokon a hatásos gyógyszerek gyors és pontos kiválasztására nagyszámú szóbajövő citosztatikum egyidejű vizsgálatával. További két in vitro modellt dolgoztunk ki annak tanulmányozására, hogy az új in vitro gyógyszerérzékenységi teszt eredményei hogyan hasznosíthatók a klinikai protokollok továbbfejlesztésében. A lymphoblastoid sejt vonalakat jó in vitro modellnek gondoltuk az EBV asszociált lymphoproliferációk gyógyszerérzékenységének tanulmányozására. Az NK sejtek ölképességét pedig azért kívántuk vizsgálni citosztatikumok jelenlétében, hogy megállapítsuk, mely citosztatikumok befolyásolják az NK sejtet alkalmazó immunterápiás módszerek hatásosságát, ha azt kemoterápiával kombináltan alkalmazzák.

5.1. Az epirubicin és paclitaxel hatásos gyógyszerek lehetnek a PTLD és egyéb EBV indukálta lymphoproliferatív betegségek kezelésében

A PTLD kezelésével kapcsolatban nem végeztek multicentrikus kontrollált tanulmányokat [121]. E betegség terápiájában az immunszuppresszió csökkentése [136], az antivirális terápia és az anti-CD20 humanizált monoklonális antitestek használata terjedt el [138, 139], a betegség kezelésében azonban egyik említett mód sem bizonyult kellően hatásosnak, kivéve ha a szervezet EBV-specifikus immunitása visszaáll [136]. A fenti kezelési formákra nem reagáló esetekben napjainkban a non-Hodgkin lymphoma kezelésére használt kemoterápiás protokollokat alkalmazzák [140] annak ellenére, hogy az EBV asszociált lymphomák a többi non-Hodgkin lymphomától eltérő etiológiai csoportot képviselnek. Ezért a túlélő betegek számának növeléséhez új kemoterápiás protokollok kialakítása, vagy az eddigi protokollok kiegészítése szükséges a PTLD kezelésében eddig még nem használt, de várhatóan hatásos citosztatikumokkal. Azok gyógyszerek ugyanis, amelyek alacsonyabb koncentrációban is hatásosak, kevesebb mellékhatást okoznak és kevésbé csökkentik a graft túlélését.

Eredményeink azt mutatják, hogy az **EBV transzformált lymphoblastoid sejtvonalak gyógyszerérzékenységi mintázata a sejtek eredetétől függetlenül megegyezik**. Ez a mintázat nem változik több éves *in vitro* kultúrában tartást követően sem. Úgy tűnik, hogy az EBV nemcsak *szükséges* hanem *elegendő* etiológiai tényező ahhoz, hogy az immunszupprimált egyénekben a malignus immunoblastos B-sejtes lymphoproliferatív betegség megjelenjen. Ezen esetek mindegyikében az EBV által kódolt latencia-asszociált vírusfehérjék irányítják a sejtprolifrációt anélkül, hogy egyéb nyilvánvaló genetikai változás szükséges lenne. Ezeknek a daganatoknak a fenotípusa nagyon hasonlít az *in vitro* növvő LCL-ekéhez, és azokhoz a kísérletesen létrehozott tumorokhoz, amelyeket LCL-ek SCID egerekbe történő intraperitoneális inokulációjával kapunk [130]. Figyelembe véve az EBV transzformált B-sejtek kariotípusának és fenotípusának stabilitását, eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a *PTLD-k*, az *AIDS-hez társuló központi idegrendszeri lymphomák* és az *X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegségek* hasonló gyógyszerérzékenységi mintázatot mutathatnak az általunk vizsgált nagyszámú és különféle LCL-ekkel. Sugimoto és munkatársai szerint az EBV mediált transzformáció kétféle folyamat, ahol az LCL-ek passzálását követően a sejtek aneuploidokká válhatnak, p53 mutációkat halmozhatnak fel, gátlódik a p16/retinoblastoma útvonal és csupasz egerekbe subcutan oltva azokat tumorképzőkké válnak [232]. Ezzel szemben magunk azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált sejtvonalak közül azok, melyeket öt éven keresztül folyamatosan kultúrában tartottak (IARC171, LS, 980215), továbbra is euploidok maradtak és lágyagaron csekély klónképzési képességet mutattak. A legidősebb sejtvonal, a IARC171 vad típusú p53-mal rendelkezik és subcutan oltva nem tumorképző, de intraperitonealisan SCID egérbe oltva generalizált immunoblastos lymphomát indukál. Az a tény, hogy a PTLD transzplantáción átesett betegekben nagyon gyorsan kialakulhat, azzal a megfigyeléssel együtt, hogy az EBV-vel frissen fertőzött B sejtek néhány hét alatt generalizált immunoblastos lymphomát hozhatnak létre, arra utal, hogy a *PTLD kifejlődéséhez nem szükségesek aneuploid sejtek*. Sawada és munkatársai közölték, hogy negatív vagy alacsony telomeráz aktivitású és normál kariotípusú LCL-ek sokkal érzékenyebbek egyes gyógyszerekre, mint a magas telomeráz aktivitású és kóros kariotípussal bírók [233]. Ezek az adatok az általunk bemutatott eredményekkel összhangban alátámasztják azt, hogy a gyorsan progrediáló PTLD eltérő gyógyszerérzékenységi mintázatot mutathat azoktól az EBV pozitív, aneuploid, diffúz nagysejtes B-sejtes lymphomáktól, amelyek például a dél-szaharai

Afrikában AIDS-es betegekben jelentkeznek. **Vizsgálataink szerint az euploid LCL-ek különösen érzékenyek a mikrotubulus ellenes szerekre és az antraciklinekre.** Noha mindkét említett csoport gyógyszerei mindegyik LCL-en dóziszfüggő sejtpusztulást okoztak, csak a vincristin, a paclitaxel, az epirubicin illetve a doxorubicin bizonyult hatásosnak, ha az *in vitro* használt gyógyszerkoncentrációkat a legmagasabb elérhető plazmakoncentráció értékekkel (RMAPC) hasonlítottuk össze.

Az alkiláló szerek, mint a cyclophosphamid és ifosphamid nem okoztak sejtpusztulást az LCL-eken. Ez azzal a ténnyel magyarázható, hogy önmagában egyik gyógyszer sem aktív és mindkét gyógyszert *in vivo* a máj konvertálja aktív metabolittá. A prednisonon okozott ugyan sejtpusztulást, de csak igen magas koncentrációkban.

Következtetés:

A vincristin és a methotrexat részei a lymphomák kezelésében használt CHOP és VAPEC protokolloknak, de nincs irodalmi adat az *epirubicin* és a *paclitaxel* PTLD-ben vagy egyéb EBV indukálta lymphoproliferatív betegségben való alkalmazásáról. **Eredményeink alapján javasoljuk az epirubicin és a paclitaxel beépítését a PTLD kezelésére használt protokollokba.**

5. 2. Az NK sejt alapú immunterápiával kombinálható citosztatikumok

Korábbi tanulmányokban az NK mediált citotoxicitás mértékét a *targetsejtek citosztatikummal történt előkezelését követően* tanulmányozták [165] vagy az *NK sejteket kemoterápiás szerekkel kezelve* vizsgálták azok tumorsejtölő képességét [164, 166]. Nem végeztek azonban nagyszámú citosztatikumra kiterjedő vizsgálatokat. **Kísérletünkben különböző citosztatikum jelenlétében vizsgáltuk az NK sejtek ölképességét.** Kísérleti elrendezésünkben az NK sejteket 20 órán keresztül előkezeltük a gyógyszerekkel annak érdekében, hogy a citosztatikumok hatását csak az NK sejteken teszteljük. Ezt követően az NK sejteket a targetsejtekkel inkubáltuk öt órán keresztül. A targetsejtek túlélését a gyógyszeres előkezelés nem befolyásolta, de az NK sejt targetsejteken bekövetkező ölképességére gyakorolt hatás nem zárható ki. A kísérleti eredményeink azt igazolják, hogy az IL-2 aktivált NK sejtvonalak azonos gyógyszerérzékenységi profilt mutatnak. Ez a mintázat nem változik az *in vitro* IL-2 kezelés tartamának változtatása esetén sem. A topotecan, a 6-mercaptopurin és a bleomycin nem gátolták hatásosan az NK sejtek ölképességét még nagyon magas AUC értékeknél sem. Carboplatin, methotrexat és dactinomycin esetében nem észleltünk hatást, aminek az lehet a magyarázata, hogy a sejtkultúrák viszonylag alacsony RAUC értékű kezelésnek voltak kitéve. A chlorambucil viszont hatásosan gátolta az NK sejtek ölképességét, ugyanakkor más alkiláló szer esetében (cyclophosphamid, ifosfamid) ez a hatás nem volt megfigyelhető. Ez azzal függhet össze, hogy az utóbbi két szer önmagában inaktív, *in vivo* a májenzimek alakítják át őket aktív metabolittá. A chlorambucil hatásosságát részben magyarázhatják a magas *in vitro* RAUC értékek. **(2. ábra, 3. Táblázat)** A többi hatásos gyógyszer *in vitro* dózisa (*in vitro* AUC értékek) megközelítette a klinikailag alkalmazott dózisokat. Reiter és munkatársai nem észlelték az NK sejtek ölképességének csökkenését *cladribine* kezelést követően [234]. Ezzel ellentétben saját kísérleti elrendezésünkben *ez a szer volt az egyetlen a bázisanalógok közül, amely szignifikánsan csökkentette az IL-2 aktivált NK sejtek ölképességét.* Sikerült kimutatnunk, hogy az *NK sejtek kifejezetten érzékenyek a mikrotubulus ellenes szerekre és a proteaszóma gátlókra.* Az NK sejt-mediált citotoxicitás mikrotubulus hálózattól függése jól ismert [164, 166]. Megfigyeltük, hogy a *különböző típusú mikrotubulus gátlók különböző mértékben gátolják az NK sejtek ölképességét.* A vinorelbinnek és a vincristinnek sokkal kisebb hatása volt az NK sejtek közvetítette sejtölésre, mint a vinblastinnak, docetaxelnek vagy paclitaxelnek. Több tanulmány beszámolt arról, hogy az NK sejtek proteaszómainak kimotripszin aktivitása szerepet

játszhat a sejt mediált citotoxicitásukban [235-237]. Kitson és munkatársai kimutatták, hogy a szintetikus proteaszóma gátlók, mint a CEP-1508, CEP-1612 és CEP-3117 dózisfüggően képesek gátolni a patkány NK sejtek proteaszómáit és 50%-os gátlást mértek az IL-2 aktivált NK mediált citotoxicitásban [235]. Lu és munkatársai tanulmányozták, hogy az MG132 képes csökkenteni a patkány NK sejtjeinek ölképességét, de ezt a gyógyszer apoptózist indukáló tulajdonságával magyarázták [238]. Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a *proteaszóma inhibitorok még apoptózis indukció hiányában is képesek hatásosan gátolni az NK sejtek ölképességét*. A bortezomib klinikai gyakorlatban is használt citosztatikum, amely a 26S proteaszóma kimotripszinszerű aktivitását reverzibilisen gátolja. Egy tanulmány igazolta, hogy a bortezomib érzékenyítheti a tumorsejteket a dendritikus sejt-aktivált immun effektor sejtek (NK sejtek, CD8+ lymphocyták) általi sejtlyízisre [239], de nem találtunk közleményt a bortezomib közvetlen NK mediált citotoxicitást gátló hatásáról. **Eredményeink arra utalnak, hogy azok a kemoterápiás protokollok, amelyek proteaszóma inhibitorokat vagy mikrotubulus gátló szereket tartalmaznak, egyidejű alkalmazás esetén csökkenthetik az NK sejt immunterápia hatásosságát.**

Következtetés:

Mivel az aszparagináz, bevacizumab, bleomycin, doxorubicin, epirubicin, etopozid, 5-fluorouracil, hydroxyurea, streptozotocin és 6-mercaptopurin esetében még magas RAUC értékek mellett sem észleltünk az NK mediált ölképességre kifejtett kifejezett hatást, véleményünk szerint ezek hatásosan kombinálhatók az NK sejt adjuváns terápiával. Néhány daganatellenes gyógyszer esetében beszámoltak arról, hogy azok a tumorsejteken az NK receptorokat aktiváló ligandok expresszióját indukálják, kifejezetten növelve a tumorsejtek elleni NK mediált citotoxicitást. Ez az információ az általunk bemutatott eredményekkel együtt segítséget nyújthat a jövőben az NK sejt alapú adjuváns immunterápiás protokollok megtervezésében.

5.3. G-CSF csökkentheti a myeloid markereket hordozó leukémiasejtek daunorubicin érzékenységét

A kolónia stimuláló faktorokat, a mieloszuppresszív gyógyszerekkel kezelt betegek lázas neutropeniájának és fertőzéseinek megelőzésére, illetve (a csontvelői regeneráció stimulálásával) azok kezelésére használják. A klinikai gyakorlatban bizonyítást nyert, hogy a daganat ellenes kezelésben részesülő solid tumoros betegekben a myeloid citokinek biztonságosan alkalmazhatók. *In vitro* tanulmányok kimutatták, hogy a G-CSF AML-ben a blasztsejtek proliferációját okozza, ezért a klinikusok féltek attól, hogy használata e betegségben felgyorsíthatja a betegségfolyamatot [240-242]. Ezzel ellentétben kettős vak klinikai tanulmányokban igazolták, hogy a G-CSF adása AML-es betegekben nem okozza a leukémiás sejtek proliferációját [181]. Napjainkban a G-CSF-et mind akut myeloid (AML), mind akut lymphoid (ALL) leukaemiában – bizonyos fókig eltérő indikációval alkalmazzák. Mivel AML-ben a G-CSFR expresszálódik a sejtfelszínen, a G-CSF hasznos a daganatsejtek szinkronizálására, a blasztsejtek S-fázisban ható kemoterápiás szerek iránti érzékenységének fokozására [182]. Emellett az AML-es betegek indukciós terápiáját követően a lázas neutropeniás időszak lerövidítésére is szolgál [170, 183]. Gyermekkori ALL-ben a G-CSF adás indikációja az utóbbi. Alkalmazása széleskörben elterjedt, mivel élettani körülmények között nem befolyásolja a lymphoid vonal proliferációs és differenciálódási útvonalait, ezért feltételezhető, hogy a G-CSF nem hat az ALL-es blasztokra sem [169]. E feltételezéssel szemben azonban több tanulmány bizonyította, hogy a B-, vagy T-sejtes leukémiák, bifenotípusos leukémia sejtek vagy specifikus traszlokációkat hordozó lymphoid leukémia sejtek G-CSF receptorokat expresszálhatnak és képesek exogén G-CSF-re reagálni [187, 188, 190-192]. **Munkánk során azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a G-CSF sejtszuszpenzióban a KG-1 leukémia sejtek citosztatikumérzékenységét.** Azok az akut lymphoblastos leukémia sejtek, amelyek G-CSF receptort hordoznak a felszínükön, gyakran myeloid markereket is expresszálnak. Ezért a KG-1 myeloid leukémiás sejtvonal jó modellnek tűnt a G-CSF hatásának tanulmányozására nemcsak AML, hanem a fent említett speciális ALL-ek szempontjából is.

Litvinova és munkatársai [243] a G-CSF hatását citozin-arabinoziddal (cytarabin), etopoziddal és doxorubicinnal kombinálva tanulmányozták ALL-es és AML-es blasztokon, de nem figyeltek meg a sejteken G-CSF hatásával magyarázható szignifikáns túlélésnövekedést. Kísérletünkben a KG-1 sejtek G-CSF és viszonylag magas

koncentrációjú daunorubicin kombinált kezelését követően a sejtek túlélésnövekedését figyeltük meg. **A G-CSF önmagában nem változtatta meg a leukémiás sejtek túlélését, azonban alacsony koncentrációjú daunorubicin jelenlétében az élő sejtek száma szignifikánsan több volt a kontrolhoz képest, ami a sejtek életképességének megnövekedését jelzi.** A sejtek gyógyszerérzékenységének csökkenését az MDR pumpa aktiválódása is okozhatja. Korábban kimutatták, hogy AML-es betegekben az ATP-dependens efflux pumpák (például MDR-1) expressziójának növekedése kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztenciával és a betegség kedvezőtlen kimenetelével társulhat [244]. Kísérletünkben a daunorubicin az MDR-1 fehérje jelentős sejtfelszíni csökkenését okozta, ami azt sugallja, hogy az esetünkben észlelt gyógyszerrezisztencia nem magyarázható az említett efflux pumpa hatásával.

A G-CSF molekula G-CSF receptorhoz kötődése granulocyta irányú differenciálódást okoz és az ERK-1/2 enzimek gyors és tartós aktiválódását eredményezi [245]. A KG-1 sejtek G-CSF kezelését követően a foszforilált ERK-1/2 szint emelkedését figyeltük meg, amely a G-CSF receptorok aktiválódását bizonyította. Annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk a G-CSF kezelés eredményeképpen létrejövő feltételezett sejt differenciálódást, a KG-1 sejteken további felszíni markerek expresszióját is vizsgáltuk. A KG-1 myeloid sejtek felszínén általunk vizsgált molekulák expressziója bizonyítottan a monocyták makrofággá történő differenciálódása alatt változik [246]. Kísérleti rendszerünkben a daunorubicin önmagában minden vizsgált marker expresszióját csökkentette. **A sejteket G-CSF-el és daunorubicinnel együttesen kezelve a CD11a expressziós szintjének még kifejezettebb csökkenését mértük.** A CD11a a lymphocyta funkcióhoz kötött antigén-1 α -nak felel meg (lymphocyte function-associated antigen-1 α : LFA-1 α vagy CD11a), az egyetlen integrin, amely mindegyik leukocyta vonalon expresszálódik. Kulcsfontosságú adhéziós molekulaként az immun és gyulladásos folyamatokban vesz részt, és egyben jelátvivő molekulaként is működik [247]. Az LFA-1 expressziója és funkciója a sejtaktiválódás és a differenciálódás stádiumától függ [248]. Ismert, hogy a c-myc B lymphoblastoid sejteken az LFA-1 transzkripció és poszttranszkripció faktor downregulálódását okozza [249]. Monocyták makrofágokká differenciálódása a CD11a molekula expressziójának csökkenésével jár [246]. Azt is kimutatták, hogy a G-CSF túlélési szignálokat biztosít a sejt számára az apoptotikus útvonalak szuppressziójával a p21ras/MAP kináz szignalizációs útvonalon keresztül és a BCL-2 antiapoptotikus fehérje szintjének emelésével [186, 250]. Eredményeink azt

mutatják, hogy a *G-CSF* és a *daunorubicin* együtt *szinergista módon csökkenthetik a CD11a szintjét*.

Következtetés:

Összegezve a fentieket elképzelhető, hogy a *daunorubicin* által okozott differenciálódási hatás a *G-CSF* által előidézett antiapoptotikus szignállal párosulva a sejtek túlélését és gyógyszerrezisztenciáját fokozhatja. **Eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy a *G-CSF* alkalmazása potenciális veszélyt jelenthet azon lázas neutropeniás ALL-es betegek számára, akiknek az ALL-es blasztjai myeloid markereket és *G-CSFR*-t is hordoznak felszínükön, és akiket egyidejűleg *daunorubicinnel* kezelnek. A fentiek értelmében a *G-CSF* klinikai alkalmazása ALL-ben individuális megítélést tesz szükségessé. Másrészt (annak ellére, hogy az indukciós terápiát követően adott *G-CSF* AML-es betegekben nem okoz blaszt proliferációt) számolnunk kell azzal a lehetőséggel, hogy az AML-es betegek adjuváns terápiájában alkalmazott *G-CSF* *daunorubicinnel* szembeni rezisztenciát okozhat.**

Munkánk során rámutattunk arra, hogy a daganatos betegek túlélésének javítása a jövőben leginkább az egyénre és betegségére szabott terápia alkalmazásával valósítható meg. A daganatos betegségek terápia érzékenységüket tekintve ugyanis sokkal heterogénebbek, mint ahány mesterségesen kialakított terápiás csoportba besoroljuk azokat. Az ideális terápiát az *in vitro* gyógyszerérzékenységi válasz alapján egyedileg kiválasztott citosztatikum kombináció alkalmazása jelentené. Nem szabad azonban elfelejtenünk, hogy az *in vitro* végzett gyógyszerérzékenységi vizsgálatok eredményei eltérhetnek a klinikailag észlelt terápiás választól. Ez azzal magyarázható, hogy az alkalmazott *in vitro* rendszerek csak részben vagy alig képesek utánozni a szervezetben lezajló farmakokinetikai, farmakodiamikai folyamatokat, amelyek a citosztatikumok hatását jelentős mértékben befolyásolhatják. Olyan esetben viszont, amikor a citosztatikum aktív formája nem hatásos *in vitro* nagy valószínűséggel nem várhatunk hatást *in vivo* sem. Az általunk bemutatott módszerrel nagyszámú gyógyszer közül választhatjuk ki az *in vitro* hatásokat, s ennek alapján kevesebb gyógyszerrel próbálkozhatunk *in vivo*, amelyek között a klinikailag hatásosak is megtalálhatóak lesznek. Az *in vitro* gyógyszerérzékenységi vizsgálatok így ma már lehetőséget kínálhatnak új kezelési sémák kialakítására, elsősorban olyan ritkán előforduló daganatos betegségekben és tumor recidívák esetén, amelyek kezelésére a kis betegszám miatt nem rendelkezünk

multicentrikus tanulmányokkal alátámasztot hatásos terápiás protokollokkal, vagy amelyekben a jelenleg alkalmazott kezelési módok nem járnak kellő eredménnyel.

5.4. Új megállapítások

1. Lymphoid sejtvonalakon végzett *in vitro* gyógyszerérzékenységi vizsgálataink eredménye alapján javasoljuk az *in vitro* hatásosnak bizonyult és napjaink gyakorlatában nem használt **epirubicin és paclitaxel** beépítését a PTLT kezelésére használt protokollokba.
2. Megállapítottuk, hogy a **proteaszóma inhibitorok** és a **mikrotubulus gátló szerek** - egyidejű alkalmazás esetén - csökkenthetik az NK sejttes immunterápia hatásosságát. Mivel az aszparagináz, bevacizumab, bleomycin, doxorubicin, epirubicin, etopozid, 5-fluorouracil, hydroxyurea, streptozotocin és 6-mercaptopurin esetében még magas RAUC értékek mellett sem észleltünk az NK mediált ölképességre kifejtett kifejezett hatást, úgy véljük, hogy ezek a gyógyszerek hatásosan kombinálhatók az NK sejttes adjuváns immunterápiával.
3. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a G-CSF alkalmazása potenciális veszélyt jelenthet azon lázas neutropeniás ALL-es betegek számára, akiknek ALL-es blasztjai myeloid markereket is hordoznak felszínükön, amennyiben a beteget ezalatt daunorubicinnel kezelik. A fentiekben leírtak értelmében a **G-CSF klinikai alkalmazása ALL-ben individuális megítélést tesz szükségessé**. Ugyancsak felmerül a lehetősége annak, hogy az AML-es betegek adjuváns terápiájában alkalmazott G-CSF daunorubicinnel szembeni rezisztenciát okozhat

6. Összefoglalás

A malignus betegségben szenvedők kezelési eredményeinek további javítása a jövőben a terápia agresszivitásának növelése helyett egyre inkább az egyénre szabott, individualizált terápiától várható. A daganatos betegségek ugyanis sokkal heterogénebbek annál, ahogy azt a jelenlegi terápiás besorolásuk tükrözi. Az in vitro gyógyszerérzékenységi vizsgálatok segítségével meghatározott hatásos citosztatikumok alkalmazása javíthatja a betegség kimenetelét. Az EBV által indukált lymphoproliferatív betegségek kemoterápiájára leggyakrabban non-Hodgkin lymphoma protokollokat alkalmaznak és nincsenek erre a betegségcsoportra specifikusan kiválasztott citosztatikumok. Mivel a lymphoblastoid sejtvonalak (LCL) a poszttranszplantációs lymphoproliferatív betegség (PTLD) jó in vitro modelljéül szolgálhatnak, 17 LCL sejtvonal in vitro gyógyszerérzékenységét vizsgáltuk. Az élő és elpusztult sejtek pontos számát automatizált lézer konfokális fluoreszcens mikroszkóp segítségével határoztuk meg. Az LCL-ek eredetüktől függetlenül nagyon hasonló gyógyszerérzékenységi mintázatot mutattak a 29 gyakran használt citosztatikummal szemben. Az LCL-ek kifejezetten érzékenyek bizonyultak vincristinnel, methotrexattal, epirubicinnel és paclitaxellel szemben. Eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy a PTLD kezelésére használt kemoterápiás protokollokban az epirubicin és paclitaxel alkalmazása indokolt lehet. Meghatároztuk 28 gyakran alkalmazott citosztatikum esetében az NK sejtek ölképességére kifejtett hatást. Azt találtuk, hogy a következő citosztatikumok csökkentették az NK sejtek tumorsejt ölképességét azok életképességének csökkenése nélkül: vinblastin, paclitaxel, docetaxel, cladribin, chlorambucil, bortezomib, MG-132. Más gyógyszerek viszont az in vivo maximálisan elérhető gyógyszerdózisnál magasabb értékek esetén sem befolyásolták az NK sejtek ölképességét. Eredményeink arra utalnak, hogy az aszparagináz, a bevacizumab, a bleomycin, a doxorubicin, az epirubicin, az etopozid, az 5-fluorouracil, a hydroxyurea, a streptozocin és a 6-mercaptopurin hatásosan kombinálhatók az NK sejt-alapú adjuváns immunterápiával. MTT tesztet alkalmazva vizsgáltuk a G-CSF hatását a leukémiás sejtek daunorubicin érzékenysége. A KG-1 myeloid leukémiás sejtek G-CSF előkezelését követően a sejtek daunorubicinnel szembeni rezisztenciája kifejezett növekedést mutatott. Ez az AML és a gyermekkori ALL adjuváns terápiájaként alkalmazott G-CSF használatának kockázatára hívja fel a figyelmet. Értekezésemben az in vitro gyógyszerérzékenységi teszt klinikai alkalmazásának néhány módját kívántam bemutatni. A ritka malignus betegségekben és az előrehaladott tumoros

betegségekben - az esetek kis száma miatt – nem állnak rendelkezésünkre multicentrikus randomizált tanulmányokkal alátámasztott hatásos kemoterápiás protokollok. Az *in vitro* gyógyszerérzékenységi teszt alkalmazása ezen daganatos betegségek esetében új citosztatikum megválasztásában, hatásos protokollok kifejlesztésében nyújthat segítséget.

Summary

The survival of patients with malignant diseases can be increased in the future using a more individualized therapy. Malignancies are more heterogenous in their drug sensitivity than they are rated into different subgroups for cytostatic treatment. Using of effective drugs determined by *in vitro* drug sensitivity test might result in a better clinical outcome. The most frequently used chemotherapy regimes originate from the non-Hodgkin lymphoma protocols and there are no specific cytotoxic drugs that would have been specifically selected against EBV induced lymphoproliferative disorders. As lymphoblastoid cell lines (LCLs) are well established *in vitro* models for posttransplant lymphoproliferative disorders (PTLD), we have assessed 17 LCLs for cytotoxic drug sensitivity. The precise number of living and dead cells was determined using a custom made automated laser confocal fluorescent microscope. Independently from their origin, LCLs showed very similar drug sensitivity patterns against 29 frequently used cytostatic drugs. LCLs were highly sensitive for vincristine, methotrexate, epirubicin and paclitaxel. Our data suggest that the inclusion of epirubicin and paclitaxel into chemotherapy protocols against PTLD may be justified. We characterized the effect of 28 frequently used chemotherapeutic agents on the capacity of NK cells to kill target cells. We found that treatment of NK cells with the following drugs: vinblastine, paclitaxel, docetaxel, cladribine, chlorambucil, bortezomib, MG-132 effectively inhibited NK mediated killing, without affecting the viability of NK cells. On the other hand we found drugs that permitted efficient NK-mediated killing even at concentrations comparable to or higher than the maximally achieved therapeutic concentration *in vivo*, in humans. We suggest that these drugs could be combined effectively with NK based adjuvant immunotherapy: asparaginase, bevacizumab, bleomycin, doxorubicin, epirubicine, etoposide, 5-fluorouracil, hydroxyurea, streptozocin and 6-mercaptopurine. Using MTT assay we also investigated how G-CSF might influence the sensitivity of leukemic cells to daunorubicin induced cell death.. After pretreatment of KG-1 leukaemic cells with G-CSF a moderate increase in the resistance of the cells to daunorubicin could be observed. This may draw attention to the

risk of G-CSF application as an adjuvant therapy of AML and childhood ALL. In this thesis the author wanted to show possible ways to use the in vitro drug sensitivity assay for the clinical practice. In some patients where no effective protocols proved by multicentric randomized studies are available, in case of rare malignant diseases or in advanced tumors our new in vitro drug sensitivity assay may give a good possibility to develop novel cytostatic protocols against these malignancies.

7. Irodalomjegyzék

1. Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM: Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 2002, 38(1):99-166.
2. Levi F, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C: Cancer mortality in Europe, 1995-1999, and an overview of trends since 1960. *Int J Cancer* 2004, 110(2):155-169.
3. Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C: The end of the tobacco-related lung cancer epidemic in Europe. *J Natl Cancer Inst* 2003, 95(8):631-632.
4. Levi F, Lucchini F, Gonzalez JR, Fernandez E, Negri E, La Vecchia C: Monitoring falls in gastric cancer mortality in Europe. *Ann Oncol* 2004, 15(2):338-345.
5. Fernandez E, Bosetti C, La Vecchia C, Levi F, Fioretti F, Negri E: Sex differences in colorectal cancer mortality in Europe, 1955-1996. *Eur J Cancer Prev* 2000, 9(2):99-104.
6. Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C: The fall in breast cancer mortality in Europe. *Eur J Cancer* 2001, 37(11):1409-1412.
7. Levi F, Lucchini F, Negri E, Franceschi S, la Vecchia C: Cervical cancer mortality in young women in Europe: patterns and trends. *Eur J Cancer* 2000, 36(17):2266-2271.
8. Levi F, Lucchini F, Negri E, Barbui T, La Vecchia C: Trends in mortality from leukemia in subsequent age groups. *Leukemia* 2000, 14(11):1980-1985.
9. Levi F, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C: Trends in mortality from Hodgkin's disease in western and eastern Europe. *Br J Cancer* 2002, 87(3):291-293.
10. Levi F, La Vecchia C, Boyle P, Lucchini F, Negri E: Western and eastern European trends in testicular cancer mortality. *Lancet* 2001, 357(9271):1853-1854.
11. Janssens JP, Giacosa A, Stockbrugger R: The European Community expansion and cancer burden. *Eur J Cancer Prev* 2003, 12(5):353-354.
12. Levi F, Lucchini F, Negri E, Zatonski W, Boyle P, La Vecchia C: Trends in cancer mortality in the European Union and accession countries, 1980-2000. *Ann Oncol* 2004, 15(9):1425-1431.
13. Otto S, Kasler M: Rákmortalitás és -incidencia hazánkban, az európai adatok tükrében. *Magy Onkol* 2002, 46(2):111-117.
14. Linet MS, Wacholder S, Zahm SH: Interpreting epidemiologic research: lessons from studies of childhood cancer. *Pediatrics* 2003, 112(1 Pt 2):218-232.
15. Kramarova E, Stiller CA: The international classification of childhood cancer. *Int J Cancer* 1996, 68(6):759-765.
16. Steliarova-Foucher E, Stiller C, Kaatsch P, Berrino F, Coebergh JW, Lacour B, Parkin M: Geographical patterns and time trends of cancer incidence and survival among children and adolescents in Europe since the 1970s (the ACCISproject): an epidemiological study. *Lancet* 2004, 364(9451):2097-2105.
17. Kaatsch P, Haaf G, Michaelis J: Childhood malignancies in Germany--methods and results of a nationwide registry. *Eur J Cancer* 1995, 31A(6):993-999.
18. Jakab Z, Balogh E, Kiss C, Olah E: Epidemiologic studies in a population-based childhood cancer registry in Northeast Hungary. *Med Pediatr Oncol* 2002, 38(5):338-344.
19. Pallapies D: Trends in childhood disease. *Mutat Res* 2006, 608(2):100-111.

20. Sandor J, Szerencse P, Szucs M, Nemeth A, Kiss I, Ember I: Kornyezeti eredetu daganatos megbetegedések területi halmazodasainak vizsgalata. *Magy Onkol* 2003, 47(2):177-183.
21. Tzortzatou-Stathopoulou F, Papadopoulou AL, Moschovi M, Botsonis A, Tsangaris GT: Low relapse rate in children with acute lymphoblastic leukemia after risk-directed therapy. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001, 23(9):591-597.
22. Muller J, Kovacs G, Jakab Z, Renyi I, Galantai I, Bekesi A, Kiss C, Nagy K, Kajtar P, Bartyik K *et al*: Az ALL-bFM-95 protokollal szerzett hazai eredmények akut lymphoblastos leukaemias gyermekek kezeleseben. *Orv Hetil* 2005, 146(2):75-80.
23. Andre F, Mazouni C, Hortobagyi GN, Pusztai L: DNA arrays as predictors of efficacy of adjuvant/neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients: current data and issues on study design. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1766(2):197-204.
24. Gyorffy B, Serra V, Jurchott K, Abdul-Ghani R, Garber M, Stein U, Petersen I, Lage H, Dietel M, Schafer R: Prediction of doxorubicin sensitivity in breast tumors based on gene expression profiles of drug-resistant cell lines correlates with patient survival. *Oncogene* 2005, 24(51):7542-7551.
25. Gyorffy B, Surowiak P, Kiesslich O, Denkert C, Schafer R, Dietel M, Lage H: Gene expression profiling of 30 cancer cell lines predicts resistance towards 11 anticancer drugs at clinically achieved concentrations. *Int J Cancer* 2006, 118(7):1699-1712.
26. Goodman LS, Wintrobe MM, Dameshek W, Goodman MJ, Gilman A, McLennan MT: Landmark article Sept. 21, 1946: Nitrogen mustard therapy. Use of methyl-bis(beta-chloroethyl)amine hydrochloride and tris(beta-chloroethyl)amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. By Louis S. Goodman, Maxwell M. Wintrobe, William Dameshek, Morton J. Goodman, Alfred Gilman and Margaret T. McLennan. *Jama* 1984, 251(17):2255-2261.
27. Papac RJ: Origins of cancer therapy. *Yale J Biol Med* 2001, 74(6):391-398.
28. Gilman A: The initial clinical trial of nitrogen mustard. *Am J Surg* 1963, 105:574-578.
29. Meyer LM, Miller FR, Rowen MJ, Bock G, Rutzky J: Treatment of acute leukemia with amethopterin (4-amino, 10-methyl pteroyl glutamic acid). *Acta Haematol* 1950, 4(3):157-167.
30. Li MC, Hertz R, Bergenstal DM: Therapy of choriocarcinoma and related trophoblastic tumors with folic acid and purine antagonists. *N Engl J Med* 1958, 259(2):66-74.
31. Yarris JP, Hunter AJ: Roy Hertz, M.D. (1909-2002): the cure of choriocarcinoma and its impact on the development of chemotherapy for cancer. *Gynecol Oncol* 2003, 89(2):193-198.
32. Burchenal JH: Recent advances and perspectives in the chemotherapy of acute leukemia. *Proc Natl Cancer Conf* 1964, 5:651-657.
33. Pearce HL, Alice Miller M: The evolution of cancer research and drug discovery at Lilly Research Laboratories. *Adv Enzyme Regul* 2005, 45:229-255.
34. Hartwell JL: Types of anticancer agents isolated from plants. *Cancer Treat Rep* 1976, 60(8):1031-1067.
35. Leventhal BG, Levine AS, Graw RG, Jr., Simon R, Freireich EJ, Henderson ES: Long-term second remissions in acute lymphatic leukemia. *Cancer* 1975, 35(4):1136-1140.

36. Durrant IJ, Richards SM, Prentice HG, Goldstone AH: The Medical Research Council trials in adult acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000, 14(6):1327-1352.
37. Riehm H, Gadner H, Henze G, Kornhuber B, Lampert F, Niethammer D, Reiter A, Schellong G: Results and significance of six randomized trials in four consecutive ALL-BFM studies. *Haematol Blood Transfus* 1990, 33:439-450.
38. Schein PS, Chabner BA, Canellos GP, Young RD, Berard C, DeVita VT: Results of combination chemotherapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer Suppl* 1975, 2:465-473.
39. Jaffe N, Link MP, Cohen D, Traggis D, Frei E, 3rd, Watts H, Beardsley GP, Abelson HT: High-dose methotrexate in osteogenic sarcoma. *Natl Cancer Inst Monogr* 1981(56):201-206.
40. Weiss RB, DeVita VT, Jr.: Multimodal primary cancer treatment (adjuvant chemotherapy): current results and future prospects. *Ann Intern Med* 1979, 91(2):251-260.
41. Wiernik PH, Schwartz EL, Strauman JJ, Dutcher JP, Lipton RB, Paietta E: Phase I clinical and pharmacokinetic study of taxol. *Cancer Res* 1987, 47(9):2486-2493.
42. Willson JK: Topoisomerase-I inhibitors in the management of colon cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1996, 803:256-263.
43. Rowinsky EK, Grochow LB, Hendricks CB, Ettinger DS, Forastiere AA, Hurowitz LA, McGuire WP, Sartorius SE, Lubejko BG, Kaufmann SH *et al*: Phase I and pharmacologic study of topotecan: a novel topoisomerase I inhibitor. *J Clin Oncol* 1992, 10(4):647-656.
44. Runowicz CD, Fields AL, Goldberg GL: Promising new therapies in the treatment of advanced ovarian cancer. *Cancer* 1995, 76(10 Suppl):2028-2033.
45. Rosenberg B, Renshaw E, Vancamp L, Hartwick J, Drobnik J: Platinum-induced filamentous growth in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1967, 93(2):716-721.
46. Higby DJ, Wallace HJ, Jr., Albert DJ, Holland JF: Diaminodichloroplatinum: a phase I study showing responses in testicular and other tumors. *Cancer* 1974, 33(5):1219-1215.
47. Calvert AH, Harland SJ, Newell DR, Siddik ZH, Jones AC, McElwain TJ, Raju S, Wiltshaw E, Smith IE, Baker JM *et al*: Early clinical studies with cis-diammine-1,1-cyclobutane dicarboxylate platinum II. *Cancer Chemother Pharmacol* 1982, 9(3):140-147.
48. Marsh JC, DeConti RC, Hubbard SP: Treatment of Hodgkin's disease and other cancers with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU; NSC-409962). *Cancer Chemother Rep* 1971, 55(5):599-606.
49. Pearson MJ, Larkins RG, Martin FI: "Big" insulin and the treatment of an islet cell carcinoma with streptozotocin. *Metabolism* 1972, 21(6):551-558.
50. Grever MR, Kopecky KJ, Coltman CA, Files JC, Greenberg BR, Hutton JJ, Talley R, Von Hoff DD, Balcerzak SP: Fludarabine monophosphate: a potentially useful agent in chronic lymphocytic leukemia. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988, 30(5-6):457-459.
51. Cole MP, Jones CT, Todd ID: A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. *Br J Cancer* 1971, 25(2):270-275.
52. Vigneri P, Wang JY: Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat Med* 2001, 7(2):228-234.
53. Ishikawa I, Kato C, Harigae H, Sugawara T, Tomiya Y, Yamada M, Ishizawa K, Kameoka J, Miyamura K, Sasaki T: Dose modification of imatinib by monitoring

- the level of BCR-ABL transcript in chronic myelogenous leukemia. *Tohoku J Exp Med* 2006, 210(4):355-363.
54. Cerea G, Ricotta R, Schiavetto I, Maugeri MR, Sartore-Bianchi A, Moroni M, Artale S, Siena S: Cetuximab for treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2006, 17 Suppl 7:vii66-vii67.
 55. Mellstedt H: Monoclonal antibodies in human cancer. *Drugs Today (Barc)* 2003, 39 Suppl C:1-16.
 56. Holliger P, Bohlen H: Engineering antibodies for the clinic. *Cancer Metastasis Rev* 1999, 18(4):411-419.
 57. Mohindru M, Verma A: Engineered antibodies act as targeted therapies in cancer treatment. *Indian J Pediatr* 2005, 72(11):943-947.
 58. Garcia-Manero G, Kantarjian HM: The hyper-CVAD regimen in adult acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000, 14(6):1381-1396, x-xi.
 59. Gospodarowicz MK, Meyer RM: The management of patients with limited-stage classical hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:253-258.
 60. Coiffier B: Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma: A Look over the Past Decade. *Clin Lymphoma Myeloma* 2006, 7 Suppl 1:S7-S13.
 61. Nabholz JM, Cantin J, Chang J, Guevin R, Patel R, Tkaczuk K, Vodvarka P, Lindsay MA, Reese D, Riva A *et al*: Phase III trial comparing granulocyte colony-stimulating factor to leridistim in the prevention of neutropenic complications in breast cancer patients treated with docetaxel/doxorubicin/cyclophosphamide: results of the BCIRG 004 trial. *Clin Breast Cancer* 2002, 3(4):268-275.
 62. Bowman LC, Hancock ML, Santana VM, Hayes FA, Kun L, Parham DM, Furman WL, Rao BN, Green AA, Crist WM: Impact of intensified therapy on clinical outcome in infants and children with neuroblastoma: the St Jude Children's Research Hospital experience, 1962 to 1988. *J Clin Oncol* 1991, 9(9):1599-1608.
 63. Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, Juergens H: Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist* 2006, 11(5):503-519.
 64. Muggia FM, Green MD: New anthracycline antitumor antibiotics. *Crit Rev Oncol Hematol* 1991, 11(1):43-64.
 65. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L: Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004, 56(2):185-229.
 66. Fox M, Roberts JJ: Drug resistance and DNA repair. *Cancer Metastasis Rev* 1987, 6(3):261-281.
 67. Pommier Y: Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 2006, 6(10):789-802.
 68. Hartmann JT, Lipp HP: Camptothecin and podophyllotoxin derivatives: inhibitors of topoisomerase I and II - mechanisms of action, pharmacokinetics and toxicity profile. *Drug Saf* 2006, 29(3):209-230.
 69. Malinge JM, Giraud-Panis MJ, Leng M: Interstrand cross-links of cisplatin induce striking distortions in DNA. *J Inorg Biochem* 1999, 77(1-2):23-29.
 70. Colvin OM: An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. *Curr Pharm Des* 1999, 5(8):555-560.
 71. Robak T, Korycka A, Kasznicki M, Wrzesien-Kus A, Smolewski P: Purine nucleoside analogues for the treatment of hematological malignancies: pharmacology and clinical applications. *Curr Cancer Drug Targets* 2005, 5(6):421-444.

72. Sigmond J, Peters GJ: Pyrimidine and purine analogues, effects on cell cycle regulation and the role of cell cycle inhibitors to enhance their cytotoxicity. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2005, 24(10-12):1997-2022.
73. Blasiak J, Sikora A, Wozniak K, Drzewoski J: Genotoxicity of streptozotocin in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers. *Cell Biol Toxicol* 2004, 20(2):83-96.
74. Dorr RT: Bleomycin pharmacology: mechanism of action and resistance, and clinical pharmacokinetics. *Semin Oncol* 1992, 19(2 Suppl 5):3-8.
75. Chen J, Stubbe J: Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2005, 5(2):102-112.
76. Yarbrow JW: Mechanism of action of hydroxyurea. *Semin Oncol* 1992, 19(3 Suppl 9):1-10.
77. Brown SC, Shafer RH: Kinetic studies of actinomycin D binding to mono-, oligo-, and polynucleotides. *Biochemistry* 1987, 26(1):277-282.
78. Bailey SA, Graves DE, Rill R: Binding of actinomycin D to the T(G)_nT motif of double-stranded DNA: determination of the guanine requirement in nonclassical, non-GpC binding sites. *Biochemistry* 1994, 33(38):11493-11500.
79. Koba M, Konopa J: Actinomycin D and its mechanisms of action. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2005, 59:290-298.
80. Zhou XJ, Rahmani R: Preclinical and clinical pharmacology of vinca alkaloids. *Drugs* 1992, 44 Suppl 4:1-16; discussion 66-19.
81. Blagosklonny MV, Fojo T: Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review). *Int J Cancer* 1999, 83(2):151-156.
82. Longo-Sorbello GS, Bertino JR: Current understanding of methotrexate pharmacology and efficacy in acute leukemias. Use of newer antifolates in clinical trials. *Haematologica* 2001, 86(2):121-127.
83. Pagliardi GL, Gabutti V, Gavosto F: Mechanism of action of L-asparaginase on the cell cycle and growth in acute lymphoblastic leukemia. *Acta Haematol* 1973, 50(5):257-268.
84. Goy A, Gilles F: Update on the proteasome inhibitor bortezomib in hematologic malignancies. *Clin Lymphoma* 2004, 4(4):230-237.
85. Camplejohn RS: A critical review of the use of vincristine (VCR) as a tumour cell synchronizing agent in cancer therapy. *Cell Tissue Kinet* 1980, 13(3):327-335.
86. Rello-Varona S, Gamez A, Moreno V, Stockert JC, Cristobal J, Pacheco M, Canete M, Juarranz A, Villanueva A: Metaphase arrest and cell death induced by etoposide on HeLa cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2006, 38(12):2183-2195.
87. Noguchi S: Predictive factors for response to docetaxel in human breast cancers. *Cancer Sci* 2006, 97(9):813-820.
88. McGinn CJ, Kinsella TJ: The experimental and clinical rationale for the use of S-phase-specific radiosensitizers to overcome tumor cell repopulation. *Semin Oncol* 1992, 19(4 Suppl 11):21-28.
89. Tafuri A, Lemoli RM, Chen R, Gulati SC, Clarkson BD, Andreeff M: Combination of hematopoietic growth factors containing IL-3 induce acute myeloid leukemia cell sensitization to cycle specific and cycle non-specific drugs. *Leukemia* 1994, 8(5):749-757.
90. Colly LP, van Bekkum DW, Hagenbeek A: Cell kinetic studies after high dose Ara-C and adriamycin treatment in a slowly growing rat leukemia model (BNML) for human acute myelocytic leukemia. *Leuk Res* 1984, 8(6):945-952.
91. Arany I, Safirstein RL: Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol* 2003, 23(5):460-464.

92. Shanholtz C: Acute life-threatening toxicity of cancer treatment. *Crit Care Clin* 2001, 17(3):483-502.
93. Bardi E, Olah AV, Bartyik K, Endreffy E, Jenei C, Kappelmayer J, Kiss C: Late effects on renal glomerular and tubular function in childhood cancer survivors. *Pediatr Blood Cancer* 2004, 43(6):668-673.
94. Schuler D, Kardos G, Koos R, Polcz A, Gacs G, Revesz T: Late effects of therapy in children previously treated for leukaemia or malignant tumour. *Acta Paediatr Hung* 1983, 24(3):255-261.
95. Weinstein JN: Searching for pharmacogenomic markers: the synergy between omic and hypothesis-driven research. *Dis Markers* 2001, 17(2):77-88.
96. Brown JM: NCI's anticancer drug screening program may not be selecting for clinically active compounds. *Oncol Res* 1997, 9(5):213-215.
97. Tegze B, Tulassay Z, Gyorffy B: Kemoterapeutikumok, terápiás válasz és rezisztencia-mechanizmusok a colorectalis carcinoma kezelésében. *Magy Onkol* 2006, 50(4):315-323.
98. Sarasin A: An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 2003, 544(2-3):99-106.
99. Rosell R, Cuello M, Cecere F, Santarpia M, Reguart N, Felip E, Taron M: Usefulness of predictive tests for cancer treatment. *Bull Cancer* 2006, 93(8):E101-108.
100. Friedman HS, Colvin OM, Kaufmann SH, Ludeman SM, Bullock N, Bigner DD, Griffith OW: Cyclophosphamide resistance in medulloblastoma. *Cancer Res* 1992, 52(19):5373-5378.
101. Colvin OM, Friedman HS, Gamcsik MP, Fenselau C, Hilton J: Role of glutathione in cellular resistance to alkylating agents. *Adv Enzyme Regul* 1993, 33:19-26.
102. Richards NG, Kilberg MS: Asparagine Synthetase Chemotherapy. *Annu Rev Biochem* 2006.
103. Luqmani YA: Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract* 2005, 14 Suppl 1:35-48.
104. Longley DB, Johnston PG: Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 2005, 205(2):275-292.
105. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hutter RV, Nagle RB *et al*: Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000, 124(7):979-994.
106. Silverman LB, Sallan SE: Newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors and treatment. *Curr Opin Hematol* 2003, 10(4):290-296.
107. McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV, Evans WE: Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000, 14(4):567-572.
108. Blumenthal RD: An overview of chemosensitivity testing. *Methods Mol Med* 2005, 110:3-18.
109. Dietel M, Bals U, Schaefer B, Herzig I, Arps H, Zabel M: In vitro prediction of cytostatic drug resistance in primary cell cultures of solid malignant tumours. *Eur J Cancer* 1993, 29A(3):416-420.
110. von Hoff DD: Human tumor cloning assays: applications in clinical oncology and new antineoplastic agent development. *Cancer Metastasis Rev* 1988, 7(4):357-371.
111. Lathan B, Kerkhoff K, Scheithauer W, Diehl V: In vitro drug sensitivity testing with agar-containing glass capillaries. *Anticancer Res* 1990, 10(4):1075-1078.

112. Bosanquet AG, Bell PB: Enhanced ex vivo drug sensitivity testing of chronic lymphocytic leukaemia using refined DiSC assay methodology. *Leuk Res* 1996, 20(2):143-153.
113. Weisenthal LM, Kern DH: Prediction of drug resistance in cancer chemotherapy: the Kern and DiSC assays. *Oncology (Williston Park)* 1991, 5(9):93-103; disc 104, 111-104, 117-108.
114. Sargent JM: The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples. *Recent Results Cancer Res* 2003, 161:13-25.
115. Bellamy WT: Prediction of response to drug therapy of cancer. A review of in vitro assays. *Drugs* 1992, 44(5):690-708.
116. d'Amato TA, Landreneau RJ, McKenna RJ, Santos RS, Parker RJ: Prevalence of in vitro extreme chemotherapy resistance in resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2006, 81(2):440-446; discussion 446-447.
117. Parker RJ, Fruehauf JP, Mehta R, Filka E, Cloughesy T: A prospective blinded study of the predictive value of an extreme drug resistance assay in patients receiving CPT-11 for recurrent glioma. *J Neurooncol* 2004, 66(3):365-375.
118. Holloway RW, Mehta RS, Finkler NJ, Li KT, McLaren CE, Parker RJ, Fruehauf JP: Association between in vitro platinum resistance in the EDR assay and clinical outcomes for ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* 2002, 87(1):8-16.
119. Furukawa T, Kubota T, Hoffman RM: Clinical applications of the histoculture drug response assay. *Clin Cancer Res* 1995, 1(3):305-311.
120. AlGaai E, AlDigither S, Lockyer M, Hammami MM: Bioequivalence study of two amoxicillin formulations. *Arzneimittelforschung* 2006, 56(1):48-51.
121. Bower M: The management of lymphoma in the immunosuppressed patient. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002, 15(3):517-532.
122. Leblond V, Sutton L, Dorent R, Davi F, Bitker MO, Gabarre J, Charlotte F, Ghossoub JJ, Fourcade C, Fischer A *et al*: Lymphoproliferative disorders after organ transplantation: a report of 24 cases observed in a single center. *J Clin Oncol* 1995, 13(4):961-968.
123. Opelz G, Dohler B: Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant* 2004, 4(2):222-230.
124. Andersson JP: Clinical aspects on Epstein-Barr virus infection. *Scand J Infect Dis Suppl* 1991, 80:94-104.
125. Straathof KC, Bollard CM, Rooney CM, Heslop HE: Immunotherapy for Epstein-Barr virus-associated cancers in children. *Oncologist* 2003, 8(1):83-98.
126. German P, Beck Z, Semsei I, Kiss S, Gorog B, Balogh E, Toth F, Nemes Z, Pajor L, Olah E: Az Epstein-Barr virus patogenetikai szerepenek tanulmányozása magyarországi B-sejtes non-Hodgkin lymphomas betegekben *Orv Hetil* 2002, 143(47):2619-2624.
127. Rickinson AB, Murray RJ, Brooks J, Griffin H, Moss DJ, Masucci MG: T cell recognition of Epstein-Barr virus associated lymphomas. *Cancer Surv* 1992, 13:53-80.
128. Masucci MG, Gavioli R, de Campos-Lima PO, Zhang QJ, Trivedi P, Dolcetti R: Transformation-associated Epstein-Barr virus antigens as targets for immune attack. *Ann N Y Acad Sci* 1993, 690:86-100.
129. Masucci MG, Ernberg I: Epstein-Barr virus: adaptation to a life within the immune system. *Trends Microbiol* 1994, 2(4):125-130.
130. Lacerda JF, Ladanyi M, Louie DC, Fernandez JM, Papadopoulos EB, O'Reilly RJ: Human Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes home preferentially to and induce selective regressions of autologous EBV-induced B cell

- lymphoproliferations in xenografted C.B-17 scid/scid mice. *J Exp Med* 1996, 183(3):1215-1228.
131. Rowe M, Young LS, Crocker J, Stokes H, Henderson S, Rickinson AB: Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disease in the SCID mouse model: implications for the pathogenesis of EBV-positive lymphomas in man. *J Exp Med* 1991, 173(1):147-158.
 132. Gross TG, Steinbuch M, DeFor T, Shapiro RS, McGlave P, Ramsay NK, Wagner JE, Filipovich AH: B cell lymphoproliferative disorders following hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, treatment and outcome. *Bone Marrow Transplant* 1999, 23(3):251-258.
 133. Curtis RE, Travis LB, Rowlings PA, Socie G, Kingma DW, Banks PM, Jaffe ES, Sale GE, Horowitz MM, Witherspoon RP *et al*: Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. *Blood* 1999, 94(7):2208-2216.
 134. Orazi A, Hromas RA, Neiman RS, Greiner TC, Lee CH, Rubin L, Haskins S, Heerema NA, Gharpure V, Abonour R *et al*: Posttransplantation lymphoproliferative disorders in bone marrow transplant recipients are aggressive diseases with a high incidence of adverse histologic and immunobiologic features. *Am J Clin Pathol* 1997, 107(4):419-429.
 135. Zutter MM, Martin PJ, Sale GE, Shulman HM, Fisher L, Thomas ED, Durnam DM: Epstein-Barr virus lymphoproliferation after bone marrow transplantation. *Blood* 1988, 72(2):520-529.
 136. Gustafsson A, Levitsky V, Zou JZ, Frisan T, Dalianis T, Ljungman P, Ringden O, Winiarski J, Ernberg I, Masucci MG: Epstein-Barr virus (EBV) load in bone marrow transplant recipients at risk to develop posttransplant lymphoproliferative disease: prophylactic infusion of EBV-specific cytotoxic T cells. *Blood* 2000, 95(3):807-814.
 137. Armitage JM, Kormos RL, Stuart RS, Fricker FJ, Griffith BP, Nalesnik M, Hardesty RL, Dummer JS: Posttransplant lymphoproliferative disease in thoracic organ transplant patients: ten years of cyclosporine-based immunosuppression. *J Heart Lung Transplant* 1991, 10(6):877-886; discussion 886-877.
 138. Milpied N, Vasseur B, Parquet N, Garnier JL, Antoine C, Quartier P, Carret AS, Bouscary D, Faye A, Bourbigot B *et al*: Humanized anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab) in post transplant B-lymphoproliferative disorder: a retrospective analysis on 32 patients. *Ann Oncol* 2000, 11 Suppl 1:113-116.
 139. Savoldo B, Rooney CM, Quiros-Tejeira RE, Caldwell Y, Wagner HJ, Lee T, Finegold MJ, Dotti G, Heslop HE, Goss JA: Cellular immunity to Epstein-Barr virus in liver transplant recipients treated with rituximab for post-transplant lymphoproliferative disease. *Am J Transplant* 2005, 5(3):566-572.
 140. Taylor AL, Marcus R, Bradley JA: Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after solid organ transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005, 56(1):155-167.
 141. Muti G, Cantoni S, Oreste P, Klersy C, Gini G, Rossi V, D'Avanzo G, Comoli P, Baldanti F, Montillo M *et al*: Post-transplant lymphoproliferative disorders: improved outcome after clinico-pathologically tailored treatment. *Haematologica* 2002, 87(1):67-77.
 142. Menon AG, Morreau H, Tollenaar RA, Alphenaar E, Van Puijenbroek M, Putter H, Janssen-Van Rhijn CM, Van De Velde CJ, Fleuren GJ, Kuppen PJ: Down-regulation of HLA-A expression correlates with a better prognosis in colorectal cancer patients. *Lab Invest* 2002, 82(12):1725-1733.

143. Jackson PA, Green MA, Marks CG, King RJ, Hubbard R, Cook MG: Lymphocyte subset infiltration patterns and HLA antigen status in colorectal carcinomas and adenomas. *Gut* 1996, 38(1):85-89.
144. Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, Vecchiato N, Macri E, Fornasarig M, Boiocchi M: High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol* 1999, 154(6):1805-1813.
145. Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, Martos JA, Moreno M: The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1997, 79(12):2320-2328.
146. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T: Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 2000, 88(3):577-583.
147. Trinchieri G: Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989, 47:187-376.
148. Robertson MJ, Ritz J: Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990, 76(12):2421-2438.
149. Cerwenka A, Lanier LL: Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 2001, 1(1):41-49.
150. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H: "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 1975, 5(2):117-121.
151. Davies SM, Ruggieri L, DeFor T, Wagner JE, Weisdorf DJ, Miller JS, Velardi A, Blazar BR: Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. *Blood* 2002, 100(10):3825-3827.
152. Ruggeri L, Mancusi A, Perruccio K, Burchielli E, Martelli MF, Velardi A: Natural killer cell alloreactivity for leukemia therapy. *J Immunother* 2005, 28(3):175-182.
153. Lanier LL: NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005, 23:225-274.
154. Caligiuri MA, Velardi A, Scheinberg DA, Borrello IM: Immunotherapeutic approaches for hematologic malignancies. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2004:337-353.
155. VanDeusen JB, Caligiuri MA: New developments in anti-tumor efficacy and malignant transformation of human natural killer cells. *Curr Opin Hematol* 2003, 10(1):55-59.
156. Klingemann HG: Cellular therapy of cancer with natural killer cells: will it ever work? *J Hematother Stem Cell Res* 2001, 10(1):23-26.
157. Basse PH, Goldfarb RH, Herberman RB, Hokland ME: Accumulation of adoptively transferred A-NK cells in murine metastases: kinetics and role of interleukin-2. *In Vivo* 1994, 8(1):17-24.
158. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, Matory YL, Skibber JM, Shiloni E, Vetto JT *et al*: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985, 313(23):1485-1492.
159. Kimura H, Yamaguchi Y: A phase III randomized study of interleukin-2 lymphokine-activated killer cell immunotherapy combined with chemotherapy or radiotherapy after curative or noncurative resection of primary lung carcinoma. *Cancer* 1997, 80(1):42-49.
160. Farag SS, George SL, Lee EJ, Baer M, Dodge RK, Becknell B, Fehniger TA, Silverman LR, Crawford J, Bloomfield CD *et al*: Postremission therapy with low-

- dose interleukin 2 with or without intermediate pulse dose interleukin 2 therapy is well tolerated in elderly patients with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B study 9420. *Clin Cancer Res* 2002, 8(9):2812-2819.
161. Meropol NJ, Barresi GM, Fehniger TA, Hitt J, Franklin M, Caligiuri MA: Evaluation of natural killer cell expansion and activation in vivo with daily subcutaneous low-dose interleukin-2 plus periodic intermediate-dose pulsing. *Cancer Immunol Immunother* 1998, 46(6):318-326.
 162. Harker WG, Tom C, McGregor JR, Slade L, Samlowski WE: Human tumor cell line resistance to chemotherapeutic agents does not predict resistance to natural killer or lymphokine-activated killer cell-mediated cytotoxicity. *Cancer Res* 1990, 50(18):5931-5936.
 163. Komada Y, Zhang SL, Zhou YW, Hanada M, Shibata T, Azuma E, Sakurai M: Cellular immunosuppression in children with acute lymphoblastic leukemia: effect of consolidation chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 1992, 35(4):271-276.
 164. Ujhazy P, Babusikova O: NK-cell activity affected by some cytostatic drugs and their additives. *Neoplasma* 1991, 38(3):303-312.
 165. Utsugi T, Demuth S, Hanna N: Synergistic antitumor effects of topoisomerase inhibitors and natural cell-mediated cytotoxicity. *Cancer Res* 1989, 49(6):1429-1433.
 166. Katz P, Zaytoun AM, Lee JH, Jr.: Mechanisms of human cell-mediated cytotoxicity. III. Dependence of natural killing on microtubule and microfilament integrity. *J Immunol* 1982, 129(6):2816-2825.
 167. Licht JD, Sternberg DW: The molecular pathology of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005:137-142.
 168. Kager L, Evans WE: Pharmacogenomics of acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Hematol* 2006, 13(4):260-265.
 169. Sasse EC, Sasse AD, Brandalise S, Clark OA, Richards S: Colony stimulating factors for prevention of myelosuppressive therapy induced febrile neutropenia in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Cochrane Database Syst Rev* 2005(3):CD004139.
 170. Lehrnbecher T, Zimmermann M, Reinhardt D, Dworzak M, Stary J, Creutzig U: Prophylactic human granulocyte colony-stimulating factor after induction therapy in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2007, 109(3):936-943.
 171. Timmer-Bonte JN, Tjan-Heijnen VC: Febrile neutropenia: highlighting the role of prophylactic antibiotics and granulocyte colony-stimulating factor during standard dose chemotherapy for solid tumors. *Anticancer Drugs* 2006, 17(8):881-889.
 172. Heath JA, Steinherz PG, Altman A, Sather H, Jhanwar S, Halpern S, Pieters R, Shah N, Steinherz L, Tannous R *et al*: Human granulocyte colony-stimulating factor in children with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol* 2003, 21(8):1612-1617.
 173. Sachs L: The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to the clinic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93(10):4742-4749.
 174. Lopez AF, Williamson DJ, Gamble JR, Begley CG, Harlan JM, Klebanoff SJ, Waltersdorff A, Wong G, Clark SC, Vadas MA: Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression, and survival. *J Clin Invest* 1986, 78(5):1220-1228.
 175. Dempke W, Von Poblozki A, Grothey A, Schmoll HJ: Human hematopoietic growth factors: old lessons and new perspectives. *Anticancer Res* 2000, 20(6D):5155-5164.

176. Frampton JE, Keating GM: Spotlight on pegfilgrastim in chemotherapy-induced neutropenia. *BioDrugs* 2005, 19(6):405-407.
177. Ravandi F: Role of cytokines in the treatment of acute leukemias: a review. *Leukemia* 2006, 20(4):563-571.
178. Asano S: Human granulocyte colony-stimulating factor: its basic aspects and clinical applications. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991, 13(4):400-413.
179. Fukunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Nagata S: Purification and characterization of the receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 1990, 265(23):14008-14015.
180. Glaspy JA, Golde DW: Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): preclinical and clinical studies. *Semin Oncol* 1992, 19(4):386-394.
181. Dombret H: Granulocytic colony-stimulating factors in the management of patients with acute myeloid leukemia. *Hematol Cell Ther* 1996, 38(3):231-240.
182. Becker PS: Growth factor priming in therapy of acute myelogenous leukemia. *Curr Hematol Rep* 2004, 3(6):413-418.
183. Buchner T, Hiddemann W, Wormann B, Zuhlsdorf M, Rottmann R, Innig G, Maschmeier G, Ludwig WD, Sauerland MC, Heinecke A: Hematopoietic growth factors in acute myeloid leukemia: supportive and priming effects. *Semin Oncol* 1997, 24(1):124-131.
184. Hubeek I, Litvinova E, Peters GJ, Broekhuizen R, Haarman EG, Huismans DR, Cloos J, Zwaan CM, Fleischhack G, Creutzig U *et al*: The effect of G-CSF on the in vitro cytotoxicity of cytarabine and fludarabine in the FLAG combination in pediatric acute myeloid leukemia. *Int J Oncol* 2004, 25(6):1823-1829.
185. Nicola NA, Metcalf D: Binding of 125I-labeled granulocyte colony-stimulating factor to normal murine hemopoietic cells. *J Cell Physiol* 1985, 124(2):313-321.
186. Liu WM, Powles T, Shamash J, Propper D, Oliver T, Joel S: Effect of haemopoietic growth factors on cancer cell lines and their role in chemosensitivity. *Oncogene* 2004, 23(4):981-990.
187. Handa A, Kashimura T, Takeuchi S, Yamamoto A, Murohashi I, Bessho M, Hirashima K: Expression of functional granulocyte colony-stimulating factor receptors on human B-lymphocytic leukemia cells. *Ann Hematol* 2000, 79(3):127-131.
188. Kita K, Nishii K, Ohishi K, Morita N, Takakura N, Kawakami K, Miwa H, Shirakawa S: Frequent gene expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor in CD7+ surface CD3- acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 1993, 7(8):1184-1190.
189. Shimoda K, Okamura S, Harada N, Niho Y: Detection of the granulocyte colony-stimulating factor receptor using biotinylated granulocyte colony-stimulating factor: presence of granulocyte colony-stimulating factor receptor on CD34-positive hematopoietic progenitor cells. *Res Exp Med (Berl)* 1992, 192(4):245-255.
190. Inukai T, Sugita K, Iijima K, Goi K, Tezuka T, Kojika S, Kagami K, Mori T, Kinoshita A, Suzuki T *et al*: Leukemic cells with 11q23 translocations express granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor and their proliferation is stimulated with G-CSF. *Leukemia* 1998, 12(3):382-389.
191. Benko I, Kovacs P, Szegedi I, Megyeri A, Kiss A, Balogh E, Olah E, Kappelmayer J, Kiss C: Effect of myelopoietic and pleiotropic cytokines on colony formation by blast cells of children with acute lymphoblastic leukemia. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2001, 363(5):499-508.
192. Higashigawa M, Kuwabara H, Cao DC, Hori H, Ohkubo T, Kawasaki H, Ido M, Komada Y, Sakurai M: Heterogeneous effects of G-CSF and GM-CSF on cell

- growth and ara-C cytotoxicity in childhood leukemias which express myeloid markers. *Leuk Lymphoma* 1996, 22(3-4):279-285.
193. de Lau WB, Hurenkamp J, Berendes P, Touw IP, Clevers HC, van Dijk MA: The gene encoding the granulocyte colony-stimulating factor receptor is a target for deregulation in pre-B ALL by the t(1;19)-specific oncoprotein E2A-Pbx1. *Oncogene* 1998, 17(4):503-510.
 194. Williams DL, Look AT, Melvin SL, Roberson PK, Dahl G, Flake T, Stass S: New chromosomal translocations correlate with specific immunophenotypes of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell* 1984, 36(1):101-109.
 195. Matsushita K, Arima N, Ohtsubo H, Fujiwara H, Hidaka S, Kukita T, Suruga Y, Fukumori J, Matsumoto T, Kanzaki A *et al*: Granulocyte-colony stimulating factor-induced proliferation of primary adult T-cell leukaemia cells. *Br J Haematol* 1997, 96(4):715-723.
 196. Oh EJ, Kahng J, Kim Y, Kim M, Lim J, Kang CS, Min WS, Cho B, Lee A, Lee KY *et al*: Expression of functional markers in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2003, 27(10):903-908.
 197. Koeffler HP, Golde DW: Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood* 1980, 56(3):344-350.
 198. Ravindranath Y: Recent advances in pediatric acute lymphoblastic and myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol* 2003, 15(1):23-35.
 199. Cerboni C, Mousavi-Jazi M, Wakiguchi H, Carbone E, Karre K, Soderstrom K: Synergistic effect of IFN-gamma and human cytomegalovirus protein UL40 in the HLA-E-dependent protection from NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2001, 31(10):2926-2935.
 200. Cerboni C, Achour A, Warnmark A, Mousavi-Jazi M, Sandalova T, Hsu ML, Cosman D, Karre K, Carbone E: Spontaneous mutations in the human CMV HLA class I homologue UL18 affect its binding to the inhibitory receptor LIR-1/ILT2/CD85j. *Eur J Immunol* 2006, 36(3):732-741.
 201. Standeven LJ, Carlin LM, Borszcz P, Davis DM, Burshtyn DN: The actin cytoskeleton controls the efficiency of killer Ig-like receptor accumulation at inhibitory NK cell immune synapses. *J Immunol* 2004, 173(9):5617-5625.
 202. Suck G, Branch DR, Smyth MJ, Miller RG, Vergidis J, Fahim S, Keating A: KHYG-1, a model for the study of enhanced natural killer cell cytotoxicity. *Exp Hematol* 2005, 33(10):1160-1171.
 203. Fogli S, Danesi R, Gennari A, Donati S, Conte PF, Del Tacca M: Gemcitabine, epirubicin and paclitaxel: pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions in advanced breast cancer. *Ann Oncol* 2002, 13(6):919-927.
 204. Andersson B, Andersson I, Beran M, Ehrsson H, Eksborg S: Liquid chromatographic monitoring of daunorubicin and daunorubicinol in plasma from leukemic patients treated with daunorubicin or the daunorubicin-DNA complex. *Cancer Chemother Pharmacol* 1979, 2(1):15-17.
 205. Toffoli G, Corona G, Cattarossi G, Boiocchi M, Di Gennaro G, Tirelli U, Vaccher E: Effect of highly active antiretroviral therapy (HAART) on pharmacokinetics and pharmacodynamics of doxorubicin in patients with HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2004, 15(12):1805-1809.
 206. Gruber A, Liliemark E, Tidefelt U, Paul C, Bjorkholm M, Peterson C, Liliemark J: Pharmacokinetics of mitoxantrone, etoposide and cytosine arabinoside in leukemic cells during treatment of acute myelogenous leukemia--relationship to treatment outcome and bone marrow toxicity. *Leuk Res* 1995, 19(10):757-761.

207. Gerrits CJ, Schellens JH, Burris H, Eckardt JR, Planting AS, van der Burg ME, Rodriguez GI, Loos WJ, van Beurden V, Hudson I *et al*: A comparison of clinical pharmacodynamics of different administration schedules of oral topotecan (Hycamtin). *Clin Cancer Res* 1999, 5(1):69-75.
208. Rischin D, Ackland SP, Smith J, Garg MB, Clarke S, Millward MJ, Toner GC, Zalcberg J: Phase I and pharmacokinetic study of docetaxel in combination with epirubicin and cyclophosphamide in advanced cancer: dose escalation possible with granulocyte colony-stimulating factor, but not with prophylactic antibiotics. *Ann Oncol* 2002, 13(11):1810-1818.
209. Desai ZR, Van den Berg HW, Bridges JM, Shanks RG: Can severe vincristine neurotoxicity be prevented? *Cancer Chemother Pharmacol* 1982, 8(2):211-214.
210. Bates SE, Bakke S, Kang M, Robey RW, Zhai S, Thambi P, Chen CC, Patil S, Smith T, Steinberg SM *et al*: A phase I/II study of infusional vinblastine with the P-glycoprotein antagonist valspodar (PSC 833) in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004, 10(14):4724-4733.
211. Freyer G, Delozier T, Lichinister M, Gedouin D, Bougnoux P, His P, Imadalou K, Trillet-Lenoir V: Phase II study of oral vinorelbine in first-line advanced breast cancer chemotherapy. *J Clin Oncol* 2003, 21(1):35-40.
212. Ghazal-Aswad S, Calvert AH, Newell DR: A single-sample assay for the estimation of the area under the free carboplatin plasma concentration versus time curve. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996, 37(5):429-434.
213. Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E: Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res* 2000, 6(4):1205-1218.
214. Crews KR, Liu T, Rodriguez-Galindo C, Tan M, Meyer WH, Panetta JC, Link MP, Daw NC: High-dose methotrexate pharmacokinetics and outcome of children and young adults with osteosarcoma. *Cancer* 2004, 100(8):1724-1733.
215. Chan GL, Erdmann GR, Gruber SA, Stock P, Chen S, Ascher NL, Canafax DM: Pharmacokinetics of 6-thiouric acid and 6-mercaptopurine in renal allograft recipients after oral administration of azathioprine. *Eur J Clin Pharmacol* 1989, 36(3):265-271.
216. Albertioni F, Lindemalm S, Reichelova V, Pettersson B, Eriksson S, Juliusson G, Liliemark J: Pharmacokinetics of cladribine in plasma and its 5'-monophosphate and 5'-triphosphate in leukemic cells of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 1998, 4(3):653-658.
217. Casale F, Canaparo R, Serpe L, Muntoni E, Pepa CD, Costa M, Mairone L, Zara GP, Fornari G, Eandi M: Plasma concentrations of 5-fluorouracil and its metabolites in colon cancer patients. *Pharmacol Res* 2004, 50(2):173-179.
218. Peng YM, Alberts DS, Chen HS, Mason N, Moon TE: Antitumour activity and plasma kinetics of bleomycin by continuous and intermittent administration. *Br J Cancer* 1980, 41(4):644-647.
219. Veal GJ, Cole M, Errington J, Parry A, Hale J, Pearson AD, Howe K, Chisholm JC, Beane C, Brennan B *et al*: Pharmacokinetics of dactinomycin in a pediatric patient population: a United Kingdom Children's Cancer Study Group Study. *Clin Cancer Res* 2005, 11(16):5893-5899.
220. Papandreou CN, Daliani DD, Nix D, Yang H, Madden T, Wang X, Pien CS, Millikan RE, Tu SM, Pagliaro L *et al*: Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumors with observations in androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol* 2004, 22(11):2108-2121.

221. Xie H, Griskevicius L, Stahle L, Hassan Z, Yasar U, Rane A, Broberg U, Kimby E, Hassan M: Pharmacogenetics of cyclophosphamide in patients with hematological malignancies. *Eur J Pharm Sci* 2006, 27(1):54-61.
222. Boddy AV, Yule SM, Wyllie R, Price L, Pearson AD, Idle JR: Intrasubject variation in children of ifosfamide pharmacokinetics and metabolism during repeated administration. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996, 38(2):147-154.
223. GlaxoSmithKline Research Triangle Park N: **Prescribing Information Leukeran®**. In.: http://us.gsk.com/products/assets/us_leukeran.pdf.
224. Ylikangas P, Mononen I: Serious neutropenia in ALL patients treated with L-asparaginase may be avoided by therapeutic monitoring of the enzyme activity in the circulation. *Ther Drug Monit* 2002, 24(4):502-506.
225. Yan JH, Ataga K, Kaul S, Olson JS, Grasela DM, Gothelf S, Kutlar A, Orringer E: The influence of renal function on hydroxyurea pharmacokinetics in adults with sickle cell disease. *J Clin Pharmacol* 2005, 45(4):434-445.
226. Hajas G, Zsiros E, Laszlo T, Hajdu P, Somodi S, Rethi B, Gogolak P, Ludanyi K, Panyi G, Rajnavolgyi E: New phenotypic, functional and electrophysiological characteristics of KG-1 cells. *Immunol Lett* 2004, 92(1-2):97-106.
227. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227(5259):680-685.
228. Muranyi A, Erdodi F, Ito M, Gergely P, Hartshorne DJ: Identification and localization of myosin phosphatase in human platelets. *Biochem J* 1998, 330 (Pt 1):225-231.
229. Pieters R, Huismans DR, Leyva A, Veerman AJ: Adaptation of the rapid automated tetrazolium dye based (MTT) assay for chemosensitivity testing in childhood leukemia. *Cancer Lett* 1988, 41(3):323-332.
230. Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, Hubeek I, van Drunen E, Beverloo HB, Slater RM, Harbott J, Seyfarth J, van Wering ER *et al*: TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000, 96(3):1094-1099.
231. Styczynski J, Pieters R, Huismans DR, Schuurhuis GJ, Wysocki M, Veerman AJ: In vitro drug resistance profiles of adult versus childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2000, 110(4):813-818.
232. Sugimoto M, Tahara H, Ide T, Furuichi Y: Steps involved in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Res* 2004, 64(10):3361-3364.
233. Sawada K, Noda K, Nakajima H, Shimbara N, Furuichi Y, Sugimoto M: Differential cytotoxicity of anticancer agents in pre- and post-immortal lymphoblastoid cell lines. *Biol Pharm Bull* 2005, 28(7):1202-1207.
234. Reiter Z, Tomson S, Ozes ON, Taylor MW: Combination treatment of 2-chlorodeoxyadenosine and type I interferon on hairy cell leukemia-like cells: cytotoxic effect and MHC-unrestricted killer cell regulation. *Blood* 1993, 81(7):1699-1708.
235. Kitson RP, Miller CA, Goldfarb RH: Non-granular proteolytic enzymes of rat interleukin-2-activated natural killer cells. III. Enhancement of A-NKP 1, 2, and 3 proteolytic activities (cleaving after Arg, Phe and Pro) in response to interleukin-2. *Nat Immun* 1995, 14(5-6):286-294.
236. Wasserman K, Kitson RP, Rivett AJ, Sweeney ST, Gabauer MK, Herberman RB, Watkins SC, Goldfarb RH: Nongranular proteolytic enzymes of rat IL-2-activated natural killer cells. II. Purification and identification of rat A-NKP 1 and A-NKP 2

- as constituents of the multicatalytic proteinase (proteasome) complex. *J Cell Biochem* 1994, 55(1):133-145.
237. Goldfarb RH, Wasserman K, Herberman RB, Kitson RP: Nongranular proteolytic enzymes of rat IL-2-activated natural killer cells. I. Subcellular localization and functional role. *J Immunol* 1992, 149(6):2061-2068.
 238. Lu M, Kitson RP, Xue Y, Goldfarb RH: Activation of multiple caspases and modification of cell surface fas (CD95) in proteasome inhibitor-induced apoptosis of rat natural killer cells. *J Cell Biochem* 2003, 88(3):482-492.
 239. Schumacher LY, Vo DD, Garban HJ, Comin-Anduix B, Owens SK, Dissette VB, Glaspy JA, McBride WH, Bonavida B, Economou JS *et al*: Immunosensitization of tumor cells to dendritic cell-activated immune responses with the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341, Velcade). *J Immunol* 2006, 176(8):4757-4765.
 240. Delwel R, Salem M, Pellens C, Dorssers L, Wagemaker G, Clark S, Lowenberg B: Growth regulation of human acute myeloid leukemia: effects of five recombinant hematopoietic factors in a serum-free culture system. *Blood* 1988, 72(6):1944-1949.
 241. Miyauchi J, Kelleher CA, Yang YC, Wong GG, Clark SC, Minden MD, Minkin S, McCulloch EA: The effects of three recombinant growth factors, IL-3, GM-CSF, and G-CSF, on the blast cells of acute myeloblastic leukemia maintained in short-term suspension culture. *Blood* 1987, 70(3):657-663.
 242. Vellenga E, Ostapovicz D, O'Rourke B, Griffin JD: Effects of recombinant IL-3, GM-CSF, and G-CSF on proliferation of leukemic clonogenic cells in short-term and long-term cultures. *Leukemia* 1987, 1(8):584-589.
 243. Litvinova E, Gurova K, Chimishkian K, Mentkevich G: Effects of CSFS and their combinations with chemotherapeutic agents (CH) on leukemic blasts (LB) in children (MTT-assay). *Adv Exp Med Biol* 1999, 457:585-592.
 244. van der Kolk DM, de Vries EG, Muller M, Vellenga E: The role of drug efflux pumps in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2002, 43(4):685-701.
 245. Miranda MB, Xu H, Torchia JA, Johnson DE: Cytokine-induced myeloid differentiation is dependent on activation of the MEK/ERK pathway. *Leuk Res* 2005, 29(11):1293-1306.
 246. Prieto J, Eklund A, Patarroyo M: Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophages. *Cell Immunol* 1994, 156(1):191-211.
 247. Kishimoto TK, Larson RS, Corbi AL, Dustin ML, Staunton DE, Springer TA: The leukocyte integrins. *Adv Immunol* 1989, 46:149-182.
 248. Larson RS, Springer TA: Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* 1990, 114:181-217.
 249. Inghirami G, Grignani F, Sternas L, Lombardi L, Knowles DM, Dalla-Favera R: Down-regulation of LFA-1 adhesion receptors by C-myc oncogene in human B lymphoblastoid cells. *Science* 1990, 250(4981):682-686.
 250. Bashey A, Healy L, Marshall CJ: Proliferative but not nonproliferative responses to granulocyte colony-stimulating factor are associated with rapid activation of the p21ras/MAP kinase signalling pathway. *Blood* 1994, 83(4):949-957.
 251. Blumenthal RD: Chemosensitivity *In Vitro Assays* 2005, 1.
 252. Minami H, Ando Y, Sakai S, Shimokata K: Clinical and pharmacologic analysis of hyperfractionated daily oral etoposide. *J Clin Oncol* 1995, 13(1):191-199.
 253. Terashi K, Oka M, Soda H, Fukuda M, Kawabata S, Nakatomi K, Shiozawa K, Nakamura T, Tsukamoto K, Noguchi Y *et al*: Interactions of ofloxacin and

- erythromycin with the multidrug resistance protein (MRP) in MRP-overexpressing human leukemia cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, 44(6):1697-1700.
254. Stewart DJ, Lu K, Benjamin RS, Leavens ME, Luna M, Yap HY, Loo TL: Concentration of vinblastine in human intracerebral tumor and other tissues. *J Neurooncol* 1983, 1(2):139-144.
 255. Zhou XJ, Bore P, Monjanel S, Sahnoun Z, Favre R, Durand A, Rahmani R: Pharmacokinetics of navelbine after oral administration in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991, 29(1):66-70.
 256. Gamelin E, Bouil AL, Boisdron-Celle M, Turcant A, Delva R, Cailleux A, Krikorian A, Brienza S, Cvitkovic E, Robert J *et al*: Cumulative pharmacokinetic study of oxaliplatin, administered every three weeks, combined with 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 1997, 3(6):891-899.
 257. Bacci G, Loro L, Longhi A, Bertoni F, Bacchini P, Versari M, Picci P, Serra M: No correlation between methotrexate serum level and histologic response in the pre-operative treatment of extremity osteosarcoma. *Anticancer Drugs* 2006, 17(4):411-415.
 258. DeAngelis LM, Kreis W, Chan K, Dantis E, Akerman S: Pharmacokinetics of ara-C and ara-U in plasma and CSF after high-dose administration of cytosine arabinoside. *Cancer Chemother Pharmacol* 1992, 29(3):173-177.
 259. Broughton A, Strong JE, Holoye PY, Bedrossian CW: Clinical pharmacology of bleomycin following intravenous infusion as determined by radioimmunoassay. *Cancer* 1977, 40(6):2772-2778.
 260. Wright JE, Elias A, Tretyakov O, Holden S, Andersen J, Wheeler C, Schwartz G, Antman K, Rosowsky A, Frel E, 3rd *et al*: High-dose ifosfamide, carboplatin, and etoposide pharmacokinetics: correlation of plasma drug levels with renal toxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995, 36(4):345-351.
 261. Ho DH, Yap HY, Brown N, Benjamin RS, Friereich EJ, Blumenschein GR, Bodey GP: Clinical pharmacology of intramuscularly administered L-asparaginase. *J Clin Pharmacol* 1981, 21(2):72-78.
 262. Gwilt PR, Manouilov KK, McNabb J, Swindells SS: Pharmacokinetics of hydroxyurea in plasma and cerebrospinal fluid of HIV-1-infected patients. *J Clin Pharmacol* 2003, 43(9):1003-1007.
 263. Rostin M, Barthe P, Houin G, Alvinerie M, Bouissou F: Pharmacokinetics of prednisolone in children with the nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 1990, 4(5):470-473.

8. Tárgyszavak

poszttranszplantációs lymphoproliferatív betegség, gyógyszerérzékenység, NK sejtek, akut leukémia, G-CSF, bortezomib, MG-132, paclitaxel, docetaxel, vinblastin, epirubicin, daunorubicin

Keywords

posttransplant lymphoproliferative disorder, drug sensitivity, NK cells, acute leukaemia, G-CSF, bortezomib, MG-132, docetaxel, vinblastine, epirubicin, paclitaxel, daunorubicin

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok témavezetőmnek Dr. Oláh Éva professzorasszonynak aki bevezetett a kutatómunka izgalmas világába, köszönöm a Karolinska Intézet professzorának Dr. Székely Lászlónak, aki stockholmi munkám közvetlen irányítójaként segített. Mindketten nélkülözhetetlen segítséget nyújtottak a munkaterv, a kéziratok és a Ph.D dolgozat megszületésében. Hálás vagyok Dr. Erdődi Ferenc, Dr. Rajnavölgyi Éva, Dr. Szöllősi János profeszoroknak, akik javaslataikkal, érdemi megjegyzéseikkel sokban hozzájárultak munkám sikeréhez. Köszönöm Dr. Kiss Csongornak Ph.D munkám kezdetén a DE OEC Gyermekklinika Hematológia Osztályán nyújtott segítségét. Továbbá köszönetet mondok szerzőtársaimnak, különösen Dr. Stuber Györgynek, Skribek Henriettnek, Emilie Flabergnek, a Gyermekklinika és a Genetika Laboratórium minden munkatársának, kiemelten Dr. Balogh Erzsébetnek, Dr. Ujfalusi Anikónak és Bessenyei Beátának, akik mindig támogattak kutatómunkámban. Végül köszönöm a kitartást feleségemnek, családomnak, akik a háttérrel biztosították munkám alatt.

10. Függelék

10.1. Táblázatok

In vitro gyógyszerérzékenységi tesztek összehasonlítása

Teszt neve / referencia	Prediktív érték %	Szenzitivitás %	Specificitás %
MP teszt [109]	86	94	75
DiSC teszt [251]	77	94	71
MTT teszt [251]	83	86	86
ATP teszt [251]	93	86	86

1. Táblázat

MP (monolayer proliferation assay); DiSC (differential staining toxicity); MTT (metil-thiazol-tetrazolium); ATP (adenosine triphosphate bioluminescence assay);

A prediktív érték, specificitás, szenzitivitás számolása:

VP(valódi pozitív): az a beteg, akinél a teszt in vitro szenzitívnek bizonyult, és akinél a gyógyszer hatásos in vivo;

VN (valódi negatív): in vitro rezisztens, in vivo nem hatásos;

ÁP(álpozitív): in vitro szenzitív, in vivo rezisztens;

ÁN(álnegatív): in vitro rezisztens, in vivo szenzitív

Prediktív érték = $VP/(VP+ÁP)$

szenzitivitás (klinikailag érzékeny esetek előre jelzése) = $VP/(VP+ÁN)$

specificitás (klinikailag rezisztens esetek előre jelzése) = $VN/(VN+ÁP)$

LCL-ek gyógyszerérzékenységének meghatározásához használt gyógyszerek, Cmax, AUC értékek

Gyógyszercsoportok		Gyógyszer neve	Gyári név, gyártó	<i>In vitro</i> koncentrációk (µg/mL)	Cmax érték (µg/mL)	<i>In vivo</i> dózis (Cmax)	AUC (µg x h/mL)	<i>In vivo</i> dózis (AUC)	Referencia
topoizomeráz gátló hatás	antraciklinek	epirubicin	Epirubicin Meda, Meda	0.026-1.66	9	120 mg/m ²	2.412	90 mg/m ²	(Fogli , 2002)[203]
		daunorubicin	Cerubidin®, Aventis Pharma	0.065-4.166	0.49	0.95 mg/kg/45 min	1.2786	1.5 mg/kg	(Andersson , 1979)[204]
		doxorubicin	Doxorubicin Teva, Teva	0.026-1.66	0.93	50 mg/m ²	0.82464	50 mg/m ²	(Toffoli , 2004)[205]
	epipodophyllotoxin	etopozid	Sigma	0.325-20.833	2.5	53 mg/m ² /nap	5.06	100mg/m ² /nap	(Minami , 1995)[252] (Gruber ,1995)[206]
	camptothecinek	topotecan	Hycamtin®, GlaxoSmithKline	0.052-3.33	0.0084	2.3 mg/m ² /nap	0.0196	1.2 mg/m ² /nap	(Gerrits , 1999)[207]
mikrotubulus gátlók	taxánok	paclitaxel	Taxol, Orifarm	0.078-5	3.38	175 mg/m ² /3h	13.49	175 mg/m ²	(Fogli , 2002)[203]
		docetaxel	Taxotere®, Aventis Pharma	0.52-33.33	2	60 mg/m ²	3.326	85 mg/m ²	(Rischin , 2002)[208]
	vinca alkaloidok	vincristin	Vincristine Mayne, Mayne Pharma	0.0065-0.416	0.37	1.4 mg/m ²	0.182	1.32 mg/m ²	(Terashi , 2000)[253] (Desai , 1982)[209]
		vinblastin	Velbe®, STADAPharm	0.013- 0.833	0.005	1.5 mg/m ² /24h	0.218	1.7 mg/m ²	(Stewart , 1983)[254] (Bates ,)[210]
		vinorelbin	Navelbine®, Pierre Fabre	0.13-8.33	0.83	200mg/hét	0.899	80 mg/m ² /hét	(Zhou , 1991)[255] (Freyer , 2003)[211]
antimetabolitok	platina analógok	carboplatin	Carboplatin Mayne, Mayne Pharma	0.13-8.33	0.046	360 mg/m ²	348000	360 mg/m ²	(Ghazal-Aswad , 1996)[212]
		oxaliplatin	Eloxatin, Sanofi-Synthelabo	0.065-4.166	3.2	130 mg/m ²	71.5	130 mg/m ²	(Gamelin , 1997)[256] (Graham , 2000)[213]
	fólsav antagonisa	methotrexat	Methotrexate Pharmacia, Pfizer	0.325-20.833	363	8-12 g/m ²	13200000	12 g/m ²	(Bacci , 2006)[257] (Crews , 2004)[214]
	purin antagonisták	6-mercaptopurin	Sigma	1.085-69.44	2	2.5 mg/kg orális dózis	0.2587	85 mg/m ²	(Chan , 1989)[215]
		cladribin	Leustatin, Janssen-Cilag	0.013-0.833	0.0356	5 mg/m ²	0.1541	5 mg/m ²	(Albertioni , 1998)[216]
	pirimidin antagonisták	fluorouracil	Fluorouracil Mayne, Mayne Pharma	0.65-41.66	55.4	400 mg/m ²	11.59	400 mg/m ²	(Casale , 2004)[217]
		cytarabin	Cytarabine Pfizer, Pfizer	1.302-83.33	10.8	3 g/m ²	523.4	1 g/m ²	(DeAngelis , 1992)[258] (Gruber , 1995)[206]
		gemcitabin	Gemzar, Orifarm	0.781-50	22.3	1000 mg/m ²	9.3	1000 mg/m ²	(Fogli , 2002)[203]
	antitumor antibiotikumok	bleomycin	Bleomycin Baxter, Baxter	0.39-25*	0.19*	30 IU/nap	0.089	8 IU/ kg/nap	(Broughton , 1977)[259] (Peng ,1980)[218]
		dactinomycin	Cosmegen®, MSD	0.006-0.416	0.1	1.5 mg/m ²	300	1.5 mg/m ²	(Veal , 2005)[219]
	proteaszóma inhibitorok	bortezomib	Velcade®, Janssen-Cilag	0.013-0.833	0.08	1.45 mg/m ²	0.0438	1.45 mg/m ²	(Papandreou , 2004)[220]
		MG132	Sigma	0.13-8.33	#				
	alkiláló szerek	cyclophosphamid	Sendoxan, Baxter	0.52-33.33	37.2	50 mg/kg	367	50 mg/kg	(Xie , 2006)[221]
		ifosphamid	Holoxan®, Baxter	0.52-33.33	56.63	16 g/m ² 96h alatt	1827.7	3g/m ² /day	(Wright , 1995)[260] (Boddy , 1996)[222]
		chlorambucil	Sigma	1.302-83.33	0.49	0.2 mg/m ²	0.883	0.2 mg/m ²	(GlaxoSmithKline Research Triangle Park)[223]
egyéb		streptozotocin	Sigma	0.65-41.66	∅				
		aszparagináz	Asparaginase Medac, Medac	0.065-4.166*	4.48*	10000 IU/m ²	0.943	30000 IU/m ²	(Ho , 1981)[261] (Ylikangas , 2002)[224]
		hydroxyurea	Sigma	0.65-41.66	21	18mg/kg	82.49	15 mg/kg	(Gwilt , 2003)[262] (Yan , 2005)[225]
		prednisolon	Di-Adreson F Aquosum, Organon	1.56-100	0.325	1 mg/kg/nap	1.33	1 mg/kg/nap	(Rostin , 1990)[263]

2. Táblázat,

Cmax: a gyógyszer beadása utáni legmagasabb plazmakoncentráció; *bleomycin és aszparagináz esetében a koncentrációk IU/mL-ben vannak feltüntetve

AUC: a gyógyszerkoncentráció időgörbe alatti területe; #: nem használják a klinikumban; ∅: nincs adat

A használt gyógyszerek AUC értékei és az NK sejtekre számolt RAUC értékek

Gyógyszercsoportok		Gyógyszer neve	Gyári név, gyártó	Koncentrációk az NK sejtekkel egyedül (µg/mL)	Koncentrációk targetsejtekkel együtt (µg/mL)	AUC <i>in vivo</i> (µg x h/mL)	<i>In vivo</i> dózis (AUC)	Referencia	RAUC értékek NK sejtekkel
Topoizoméráz inhibitor hatás	antraciklinek	epirubicin	Epirubicin Meda, Meda	0,02-2,5	0,01-1,245	2,412	90 mg/m ²	(Fogli , 2002)[203]	0,17-20,65
		daunorubicin	Cerubidin®, Aventis Pharma	0,05-6,25	0,02-3,125	1,2786	1,5 mg/kg	(Andersson , 1979)[204]	0,75-97,75
		doxorubicin	Doxorubicin Teva, Teva	0,02-2,5	0,01-1,245	0,82464	50 mg/m ²	(Toffoli , 2004)[205]	0,5-60,4
	epipodophyllotoxin	etopozid	Sigma	0,244-31,25	0,12-15,625	5,06	100mg/m ² /nap	(Gruber ,1995)[206]	0,97-123,52
	camptothecinek	topotecan	Hycamtin®, GlaxoSmithKline	0,04-5	0,02-2,5	0,0196	1,2 mg/m ² /nap	(Gerrits , 1999)[207]	39,85-5101
Mikrotubulus gátlók	taxánok	paclitaxel	Taxol, Orifarm	0,06-7,5	0,03-3,75	13,49	175 mg/m ²	(Fogli , 2002)[203]	0,08-11,12
		docetaxel	Taxotere®, Aventis Pharma	0,4-50	0,2-25	3,326	85 mg/m ²	(Rischin , 2002)[208]	2,35-301
	vinca alkaloidák	vincristin	Vincristine Mayne, Mayne Pharma	0,005-0,625	0,003-0,312	0,182	1,32 mg/m ²	(Desai , 1982)[209]	0,5-68,67
		vinblastin	Velbe®, STADApharm	0,001-1,25	0,005-0,625	0,218	1,7 mg/m ²	(Bates ,)[210]	0,9-114,6
		vinorelbin	Navelbine®, Pierre Fabre	0,098-12,5	0,05-6,25	0,899	80 mg/m ² /hét	(Freyer , 2003)[211]	2,17-277,94
	platina analógok	carboplatin	Carboplatin Mayne, Mayne Pharma	0,098-12,5	0,05-6,25	348000	360 mg/m ²	(Ghazal-Aswad , 1996)[212]	5,6x10 ⁻⁶ -0,0008
		oxaliplatin	Eloxatin, Sanofi-Synthelabo	0,05-6,25	0,025-3,125	71,5	130 mg/m ²	(Graham , 2000)[213]	0,02-1,75
antimetabolitok	fólsav antagonisták	methotrexat	Methotrexate Pharmacia, Pfizer	0,244-31,25	0,12-15,625	13200000	12 g/m ²	(Crews , 2004)[214]	3,7x10 ⁻⁷ -4,7x10 ⁻⁵
	purin antagonisták	6-mercaptopurin	Sigma	0,814-104,16	0,4-52,08	0,2587	85 mg/m ²	(Chan , 1989)[215]	62,8-8052,57
		cladribin	Leustatin, Janssen-Cilag	0,01-1,25	0,005-0,625	0,1541	5 mg/m ²	(Albertioni , 1998)[216]	1,26-162,17
	pirimidin antagonisták	5-fluorouracil	Fluorouracil Mayne, Mayne Pharma	0,488-62,5	0,244-31,245	11,59	400 mg/m ²	(Casale , 2004)[217]	0,85-107,83
		cytarabin	Cytarabine Pfizer, Pfizer	0,977-125	0,5-62,5	523,4	1 g/m ²	(Gruber , 1995)[206]	0,04-4,78
		gemcitabin	Gemzar, Orifarm	0,586-75	0,3-37,5	9,3	1000 mg/m ²	(Fogli , 2002)[203]	1,25-161,3
	antitumor antibiotikumok	bleomycin	Bleomycin Baxter, Baxter	0,293-37,5*	0,15-18,75*	0,089*	8 IU/ kg/nap	(Peng ,1980)[218]	65,5-8427
		dactinomycin	Cosmegen®, MSD	0,005-0,625	0,003-0,312	300	1,5 mg/m ²	(Veal , 2005)[219]	0,00033-0,0416
	proteaszóma inhibitorok	bortezomib	Velcade®, Janssen-Cilag	0,01-1,25	0,001-0,625	0,0438	1,45 mg/m ²	(Papandreou , 2004)[220]	4,45-571
		MG132	Sigma	0,098-12,5	0,05-6,25	#			□
	alkiláló ágensek	cyclophosphamid	Sendoxan, Baxter	0,4-50	0,2-25	367	50 mg/kg	(Xie , 2006)[221]	0,02-2,72
		ifosfamid	Holoxan®, Baxter	0,4-50	0,2-25	1827,7	3g/m ² /nap	(Boddy , 1996)[222]	0,005-0,55
		chlorambucil	Sigma	0,977-125	0,5-62,5	0,883	0,2 mg/m ²	(GlaxoSmithKline Research Triangle Park)[223]	22,12-2831
		streptozotocin	Sigma	0,488-62,5	0,24-31,245	□			□
	egyéb	aszparagináz	Asparaginase Medac, Medac	0,05-6,25*	0,025-3,125*	0,943*	30,000 IU/m ²	(Ylikangas , 2002)[224]	1,04-132,53
		hydroxyurea	Sigma	0,488-62,5	0,24-31,245	82,49	15 mg/kg	(Yan , 2005)[225]	0,12-15,15
		bevacizumab	Avastin®, Roche	0,244-31,25	0,122-15,625	□			□

3. Táblázat

Az *in vitro* és *in vivo* AUC értékek arányát (RAUC) az *in vitro* gyógyszerkoncentrációk és a klinikai dózisok összehasonlíthatósága miatt képeztük. Az *in vitro* AUC értékeket a következő képlettel számoltuk ki: *in vitro* használt koncentráció (µg/mL) x 20 h

*bleomycin és aszparagináz esetében a koncentrációk IU/mL-ben vannak feltüntetve, AUC: a gyógyszerkoncentráció időgörbe alatti területe; #: nem használják a klinikumban; □: nincs adat

A tizenhét LCL MCS (Mean Cell Survival) és RMAPC (Ratio of Maximum Achieved Plasma Concentration) értékei különböző gyógyszerkoncentrációk esetében

		64x hígítás	16x hígítás	4x hígítás	1x nincs hígítás		64x hígítás	16x hígítás	4x hígítás	1x nincs hígítás
1. csoport	Vincristin	RMAPC 0.018	0.071	0.282	1.128	Epirubicin	RMAPC 0.003	0.012	0.046	0.184
		MCS 81.498	46.541	20.776	18.995		MCS 85.206	65.736	29.435	16.306
		SD 27.995	25.737	15.258	12.209		SD 15.548	23.394	13.593	11.314
	Paclitaxel	RMAPC 0.020	0.081	0.326	1.303	Methotrexat	RMAPC 0.001	0.004	0.014	0.057
		MCS 48.119	29.999	24.653	23.148		MCS 76.618	44.824	32.924	29.314
		SD 28.435	17.418	12.869	13.364		SD 22.796	25.843	15.590	16.455
2. csoport	Gemcitabin	RMAPC 0.035	0.140	0.561	2.242	Dactinomycin	RMAPC 0.066	0.262	1.050	4.200
		MCS 49.354	38.411	27.808	23.784		MCS 86.206	54.700	20.520	16.465
		SD 34.718	30.034	16.945	12.153		SD 16.701	22.386	13.642	8.370
	5-Fluorouracil	RMAPC 0.012	0.047	0.188	0.752	Vinorelbin	RMAPC 0.156	0.625	2.501	10.005
		MCS 74.861	58.001	42.337	30.505		MCS 82.833	42.823	25.176	24.683
		SD 23.686	22.987	21.370	20.645		SD 18.131	23.930	16.506	14.634
3. csoport	Doxorubicin	RMAPC 0.028	0.112	0.447	1.789	Daunorubicin	RMAPC 0.133	0.531	2.126	8.502
		MCS 82.503	52.477	28.292	11.499		MCS 83.171	61.159	25.940	20.439
		SD 21.753	24.867	22.314	10.301		SD 21.886	25.402	23.933	17.961
	Etopozid	RMAPC 0.130	0.521	2.083	8.333	Docetaxel	RMAPC 0.260	1.042	4.166	16.665
		MCS 56.281	35.375	25.315	16.778		MCS 32.990	23.036	23.866	26.331
		SD 21.045	19.983	15.497	11.166		SD 22.690	17.587	16.810	19.810
	Cytarabin	RMAPC 0.121	0.482	1.929	7.716	6-Mercaptopurin	RMAPC 0.543	2.170	8.680	34.720
		MCS 87.321	79.450	48.255	40.124		MCS 84.450	78.834	62.325	55.419
		SD 17.396	22.850	26.423	26.315		SD 22.147	16.514	29.820	32.858
	Oxaliplatin	RMAPC 0.020	0.081	0.325	1.301	Cladribin	RMAPC 0.366	1.462	5.850	23.399
		MCS 87.951	84.477	83.331	73.511		MCS 102.832	101.241	72.497	52.237
		SD 21.010	26.545	21.839	30.744		SD 8.130	11.160	26.804	29.545
	Aszparagináz	RMAPC 0.015	0.058	0.232	0.930	Chlorambucil	RMAPC 2.646	10.586	42.342	169.37
		MCS 92.021	91.570	90.371	82.978		MCS 89.903	71.879	13.225	11.099
		SD 13.718	13.222	18.153	15.919		SD 17.578	26.506	10.994	7.527
	Cyclophosphamid	RMAPC 0.014	0.056	0.224	0.896	Topotecan	RMAPC 6.194	24.777	99.107	396.42
		MCS 86.670	93.412	89.498	84.041		MCS 93.897	72.802	23.250	24.784
		SD 21.910	18.833	17.832	17.920		SD 19.406	21.275	16.659	21.380
	Ifosfamid	RMAPC 0.009	0.037	0.147	0.588	Carboplatin	RMAPC 2.814	11.257	45.027	180.10
		MCS 92.729	95.906	90.101	88.518		MCS 91.805	79.175	77.962	52.322
		SD 16.694	14.965	15.299	16.677		SD 16.670	30.927	22.065	31.295
	Hydroxyurea	RMAPC 0.031	0.124	0.496	1.984	Bleomycin	RMAPC 2.078	8.311	33.245	132.97
		MCS 95.118	96.489	86.340	68.134		MCS 90.007	88.553	82.168	69.803
		SD 19.595	13.933	19.759	24.782		SD 19.294	17.678	19.720	16.686
	Vinblastin	RMAPC 2.603	10.413	41.650	166.60	Streptozotocin	RMAPC Cmax érték hiányzik			
		MCS 81.507	53.331	28.885	21.323		MCS 95.430	92.335	89.919	87.805
		SD 25.921	25.678	17.941	15.889		SD 15.828	18.710	14.094	22.637
	Bortezomib	RMAPC 0.162	0.648	2.590	10.361	MG-132	RMAPC klinikumban nem használt			
		MCS 93.119	81.671	75.498	28.700		MCS 87.345	96.374	88.097	27.045
		SD 13.779	21.572	19.617	26.948		SD 13.980	17.493	16.974	24.310
	Prednisolon	RMAPC 4.8	19.230	76.923	307.69					
		MCS 75.55	76.255	62.465	37.233					
		SD 4.64717	11.090	13.970	11.654					

4. Táblázat

1. csoport: kifejezetten hatásos gyógyszerek: RMAPC < 0.3; MCS < 30%
2. csoport: részben hatásos gyógyszerek RMAPC 0.3 és 1 között, MCS < 60%
3. csoport: hatástalan gyógyszerek RMAPC > 1 or MCS > 60% SD: az átlagtúlélés standard deviációja

A különböző NK vonalak ölképessége

		KE%	±SD
IL-2-vel 1 hétig kezelt NK sejtek	1. klón	27,93	5,01
	2.klón	64,16	8,49
	3.klón	77,47	14,27
	4. klón	20,92	2,5
	5.klón	24,61	4,92
IL-2-vel 1 napig kezelt NK sejtek	6. klón	55,99	4,67
	7. klón	41,05	3,56
	8.klón	31,83	7,01
NK tumorvonalak	Nishi	5,9	2,53
	NKL	8,55	1,54
	NK92	10,05	4,48
	KHYG-1	9,94	3,06

5. Táblázat

KE: Ölképesség (killing effectiveness %)

±SD: standard deviáció

Az NK sejtek átlagos ölképessége különböző gyógyszer jelenlétében

	125x hígítás	25x hígítás	5x hígítás	Hígítás nélkül		125x hígítás	25x hígítás	5x hígítás	Hígítás nélkül
Epirubicin					Paclitaxel				
MKE%	98,52	87,28	85,24	79,66	MKE%	89,43	85,03	77,36	54,97
SD	11,45	20,67	22,28	21,91	SD	9,87	16,00	19,37	24,69
Daunorubicin					Docetaxel				
MKE%	92,29	87,61	83,01	68,43	MKE%	68,49	60,11	51,97	39,85
SD	18,22	22,09	24,92	30,94	SD	19,35	24,56	18,40	16,46
Doxorubicin					Vincristin				
MKE%	84,77	81,47	78,30	75,29	MKE%	85,61	82,92	72,76	69,32
SD	16,55	17,25	18,15	30,55	SD	20,38	19,56	18,43	20,86
Etopozid					Vinblastin				
MKE%	97,15	101,54	90,41	85,49	MKE%	94,98	95,51	83,78	58,15
SD	13,66	11,38	19,18	20,52	SD	9,66	12,13	18,38	16,69
Topotecan					Vinorelbin				
MKE%	81,25	79,76	72,78	69,60	MKE%	92,91	93,43	82,14	79,76
SD	14,95	23,82	21,74	28,46	SD	22,12	21,90	21,63	21,96
Methotrexat					Carboplatin				
MKE%	101,79	95,65	85,15	80,89	MKE%	90,87	89,36	85,42	80,62
SD	14,39	11,99	23,38	18,75	SD	23,03	25,56	34,35	25,91
6-Mercaptopurin					Oxaliplatin				
MKE%	99,16	103,02	95,28	92,25	MKE%	71,79	72,72	62,47	65,78
SD	14,60	12,08	14,46	17,24	SD	18,56	20,61	19,54	18,20
Cladribin					Bleomycin				
MKE%	89,87	81,83	56,65	47,66	MKE%	85,54	76,67	70,38	74,41
SD	12,89	14,85	12,82	18,89	SD	17,85	16,97	13,54	19,01
Fluorouracil					Dactinomycin				
MKE%	96,24	100,34	92,61	87,67	MKE%	95,06	87,14	75,95	67,18
SD	15,90	18,31	15,49	25,05	SD	17,25	17,06	21,22	23,69
Cytarabin					Bortezomib				
MKE%	87,38	89,48	76,69	68,42	MKE%	97,76	94,86	88,10	56,40
SD	15,52	11,12	20,15	28,22	SD	22,20	14,83	29,71	25,26
Gemcitabin					MG-132				
MKE%	83,92	74,97	60,22	58,12	MKE%	94,95	85,47	64,43	15,79
SD	17,96	19,41	19,41	25,37	SD	18,81	20,96	17,03	6,67
Cyclophosphamid					Aszparagináz				
MKE%	100,39	95,74	91,91	93,40	MKE%	93,40	94,73	81,18	87,03
SD	6,79	19,12	17,13	18,21	SD	22,02	24,74	19,73	18,42
Ifosfamid					Hydroxyurea				
MKE%	99,42	95,93	94,26	83,80	MKE%	90,27	94,93	84,75	86,42
SD	7,06	9,50	15,95	16,78	SD	7,51	10,20	12,82	22,98
Chlorambucil					Bevacizumab				
MKE%	84,79	83,86	19,81	13,14	MKE%	86,96	80,60	75,82	74,41
SD	17,64	22,51	6,37	6,67	SD	15,19	14,59	18,07	18,46
Streptozotocin									
MKE%	96,02	99,77	95,52	93,34					
SD	16,86	17,94	19,45	19,09					

6. Táblázat

MKE%: Átlagos ölképesség (mean killing effectiveness %)

±SD: Standard deviáció

10.2. Közlemények

10.2.1. A tézisekhez kapcsolódó in extenso dolgozatok (IF az ISI 2005 alapján)

Márkász L, Stuber G, Flaberg E, Gustafsson Jernberg A, Eksborg S, Oláh É, Skribek H, Székely L: Cytotoxic drug sensitivity of Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid B cells. *BMC Cancer* 2006, 6(1):265. **IF: 1,99**

Márkász L, Stuber G, Vanherberghen B, Flaberg E, Oláh É, Carbone E, Eksborg S, Klein E, Skribek H, Székely L: Effect of frequently used chemotherapeutic drugs on the cytotoxic activity of human natural killer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 2007, 6:644-654. **IF: 5,17**

Márkász L, Hajas G, Kiss A, Lontay B, Rajnavölgyi É, Erdődi F, Oláh É: Granulocyte Colony Stimulating Factor increases drug resistance to daunorubicin and induces proliferation of leukaemic blast cells. *Pathology and Oncology Research* 2007, (elfogadva). **IF: 1,16**

10.2.2. A tézisek témájában tartott előadások

Márkász L, Hajas Gy, Bessenyei B, Balogh E, Rajnavölgyi É, Oláh É: Citokinek és citosztatikumok interakciójának meghatározására szolgáló in vitro módszer. *Magyar Gyermekorvosok Társasága Nagygyűlése*, Szeged, 2003.

Márkász L, Hajas Gy, Rajnavölgyi É, Oláh É: Citosztikum-G-CSF kombináció stimuláló és/vagy gátló hatásának vizsgálata myeloid sejtvonalon és ALL-es blasztokon. *Fiatal Gyermekgyógyászok Országos Találkozója*, Szeged, 2004.

Márkász L, Stuber Gy, Flaberg E, Skribek H, Oláh É, Székely L: In vitro gyógyszerérzékenységi vizsgálat alkalmazása az individualizált daganatellenes terápiában. *Fiatal Gyermekgyógyászok VII. Konferenciája*, Miskolc 2007.

Márkász L, Stuber Gy, Flaberg E, Skribek H, Oláh É, Székely L: In vitro gyógyszerérzékenységi vizsgálat alkalmazása az individualizált daganatellenes terápiában. *Magyar Gyermekorvosok Társasága országos Nagygyűlése*, Székesfehérvár 2007.

10.2.3. A tézisek témájában bemutatott poszterek

Márkász L, Jakab Zs, Kiss Cs, Balogh E, Hajas Gy, Rajnavölgyi É, Oláh É: Examination of stimulating and/or inhibiting effect of G-CSF on daunorubicin-sensitivity of KG-1 myeloid cell line. *6th International Symposium and Expert Workshops on Leukemia and Lymphoma*, Amsterdam, 2005.

Márkász L, Stuber Gy, Flaberg E, Gustafsson Jernberg A, Eksborg S, Oláh É, Skribek H, Székely L: Cytotoxic drug sensitivity of Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid B-cells measured by automated laser confocal microscopy. *GTCbio's Assay Development & High Throughput Screening conference*, San Francisco, 2006.