

**Doktori (PhD) értekezés**

**Dr. Mezei Gabriella Anna**

**A krónikus mieloid leukémia tirozinkináz-gátló kezelése,  
a terápia okozta mellékhatások laboratóriumi  
és klinikai vizsgálata, különös tekintettel a vaszkuláris  
hematológiai eltérésekre**

**DEBRECENI EGYETEM**  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

**Debrecen, 2024**

**Doktori (PhD) értekezés**

**A krónikus mieloid leukémia tirozinkináz-gátló kezelése,  
a terápia okozta mellékhatások laboratóriumi  
és klinikai vizsgálata, különös tekintettel a vaszkuláris  
hematológiai eltérésekre**

Dr. Mezei Gabriella Anna

Témavezető: Dr. Batár Péter István



DEBRECENI EGYETEM  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2024

# Tartalomjegyzék

|   |    |
|---|----|
| Tartalomjegyzék.....  | 3  |
| Rövidítések jegyzéke.....   | 4  |
| 1. Bevezetés.....   | 6  |
| 2. Irodalmi áttekintés.....   | 8  |
| 2.1. Krónikus mieloid leukémia (CML).....   | 8  |
| 2.1.1. A kezelés során szükséges teendők.....   | 8  |
| 2.1.2. Tirozinkináz-gátló (TKI) rezisztencia és intolerancia.....   | 9  |
| 2.1.3. Első vonalban választható kezelések.....   | 10 |
| 2.1.4. Második, valamint többedik vonalban alkalmazható kezelések.....  | 12 |
| 2.1.5. A kezelés felfüggesztése.....  | 14 |
| 2.2. A primer hemosztázis és a "coated"-vérlemezkék vaszkuláris hematológiai jelentősége.....                       | 15 |
| 2.2.1. Prokoaguláns vérlemezkék.....  | 17 |
| 2.2.2. A "coated"-vérlemezkék laboratóriumi vizsgálata.....   | 19 |
| 2.2.3. A "coated"-vérlemezkék klinikai jellemzői.....   | 19 |
| 3. Célkitűzések.....  | 22 |
| 4. Betegek és módszerek.....  | 23 |
| 4.1. A vérlemezke funkció rutin laboratóriumi vizsgálata.....   | 23 |
| 4.2. A vérlemezkében gazdag plazma előkészítése, és az <i>in vitro</i> és <i>ex vivo</i> vizsgálatok tervezése..... | 24 |
| 4.3. Gélfiltrált vérlemezkék előállítása.....   | 24 |
| 4.4. Áramlási citometriai vizsgálatok.....  | 24 |
| 4.5. Alkalmazott statisztikai módszerek.....  | 25 |
| 5. Eredmények.....  | 26 |
| 5.1. CML-es betegcsoport klinikai vizsgálata.....   | 26 |
| 5.2. A TKI kezelés során észlelt mellékhatások értékelése.....  | 27 |
| 5.3. Primer hemosztázis eltérések vizsgálata TKI kezelés során.....   | 32 |
| 5.3.1. A dazatinib hatásának vizsgálata a primer hemosztázisra.....   | 32 |
| 5.3.2. A ponatinib hatásának vizsgálata a primer hemosztázisra.....   | 35 |
| 6. Megbeszélés.....   | 40 |
| 6.1. A TKI kezelés okozta mellékhatások.....  | 40 |
| 6.2. Primer hemosztázis eltérések a TKI kezelés során.....  | 49 |
| 6.2.1. A dazatinib <i>in vitro</i> és <i>ex vivo</i> hatása a primer hemosztázisra.....                             | 49 |
| 6.2.2. A ponatinib <i>in vitro</i> és <i>ex vivo</i> hatása a primer hemosztázisra.....                             | 51 |
| 7. Új megállapítások.....   | 54 |
| 8. Összefoglalás.....   | 55 |
| 9. Summary.....   | 57 |
| 10. Irodalomjegyzék.....  | 59 |
| 11. Kulcsszavak/ Keywords.....  | 74 |
| 12. Köszönetnyilvánítás.....  | 75 |
| 13. Publikációs lista.....  | 76 |
| 14. Függelék - A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények gyűjteménye.....                                       | 79 |

## Rövidítések jegyzéke

|                         |              |  |
|-------------------------|--------------|--|
| $\alpha$ II- $\beta$ I: | alpha2-beta1 | integrin kollagén receptor   |
| AA                      |              | arachidon sav  |
| ABL1                    |              | Abelson tirozin-kináz fehérje  |
| <i>ABL1</i>             |              | Abelson tirozin-kináz gén  |
| ADP                     |              | adenozin difoszfát   |
| allo-SCT                |              | allogén őssejt transzplantáció   |
| ATP                     |              | adenozin trifoszfát  |
| BCR:: <i>ABL</i>        |              | Breakpoint cluster region:: <i>Abelson tirozin-kináz fehérje</i>         |
| <i>BCR&gt;::ABL1</i>    |              | Breakpoint cluster region:: <i>Abelson tirozin-kináz fúziós gén</i>      |
| BID                     |              | naponta kétszer  |
| BSGC                    |              | pufferelt NaCl-glükóz-citrát oldat                                       |
| C/ADP                   |              | kollagén/ADP   |
| C/Epi                   |              | kollagén/epinefrin   |
| <i>C-KIT</i>            |              | proto-onkogén (CD117)  |
| CML                     |              | krónikus myeloid leukémia  |
| CRP                     |              | kollagén receptor specifikus agonista ( <i>collagen related peptid</i> ) |
| CT                      |              | PFA-100 készülék által mért záródási idő ( <i>closure time</i> )         |
| CCyR                    |              | teljes citogenetikai remisszió   |
| DMR                     |              | mély molekuláris válasz  |
| EKG                     |              | elektrokardiográfia  |
| ELN                     |              | European LeukemiaNet   |
| ELTS                    |              | European Treatment and Outcome Study of CML long term survival           |
| EphA2                   |              | ephrin type-A receptor 2   |
| EphB4                   |              | ephrin type-B receptor 4   |
| EUTOS                   |              | European Treatment and Outcome Study of CML                              |
| FV                      |              | faktor V   |
| FVa                     |              | aktivált faktor V  |
| FVIIIa                  |              | aktivált faktor VIII   |
| FIXa                    |              | aktivált faktor IX   |
| FXIII                   |              | faktor XIII  |
| Fbg                     |              | fibrinogén   |
| FISH                    |              | fluoreszcens in situ hibridizáció  |
| FITC                    |              | fluoreszcein izotiocianát  |
| FYN                     |              | az SRC tirozinkináz családba tartozó jelátviteli fehérje                 |
| g                       |              | nehézségi gyorsulás  |
| GFP                     |              | gélfiltrált vérlemezke   |
| G-protein               |              | guaninnukleotidok (GTP illetve GDP) megkötésére képes fehérjék           |
| GPVI                    |              | glycoprotein VI  |
| GP Ib-IX-V              |              | glycoprotein Ib-IX-V   |
| GP IIb-IIIa             |              | glycoprotein IIb-IIIa  |
| HgbA1C                  |              | hemoglobin A1c   |
| HUVEC                   |              | humán köldökvéna endothel sejt   |
| ICAM-1                  |              | intercellular adhesion molecule 1 (CD54)                                 |
| ICVE                    |              | iszkiás kardiovaszkuláris esemény  |

|                  |  |
|------------------|--|
| IHD              | iszkémiás szívbetegség   |
| IS               | international score  |
| LCK              | az SRC tirozinkináz családba tartozó jelátviteli fehérje         |
| LGL              | lethal giant larvae fehérje                                      |
| LYN              | az SRC tirozinkináz családba tartozó jelátviteli fehérje         |
| MAP              | mitogen activated protein kináz                                  |
| MCyR             | major citogenetikai válasz                                       |
| MMR              | major molekuláris válasz   |
| mPTP             | mitokondriális permeabilitás átmeneti pórus                      |
| Ncx              | Na <sup>+</sup> /Ca <sup>++</sup> exchanger fehérje              |
| NEAK             | Nemzeti Egészségbiztosítási Alapkezelő                           |
| OS               | teljes túlélés   |
| PAC1             | aktivált GPIIb/IIIa konformáció specifikus monoklonális antitest |
| PAOD             | perifériás artériás érelzáródás                                  |
| PAR1             | proteáz aktivált receptor-1                                      |
| PAR4             | proteáz aktivált receptor-4                                      |
| PBS              | foszfáttal puffereelt sóoldat                                    |
| PCR              | polimeráz láncreakció  |
| PDGF             | platelet-derived growth factor                                   |
| PDGFR            | platelet-derived growth factor receptor                          |
| PE               | fikoeritrin  |
| PF4              | platelet factor 4  |
| PFA-100          | platelet function analyzer                                       |
| PFS              | progresszió mentes túlélés                                       |
| PLCβ             | foszfolipáz-C béta   |
| PKC              | protein kináz-C  |
| PPP              | vérlemezke-szegény plazma  |
| PRP              | vérlemezke-gazdag plazma   |
| PS               | foszfatidil-szerin   |
| PSGL-1           | P-selectin glikoprotein ligand-1                                 |
| QD               | naponta egyszer  |
| RT-qPCR          | reverz transzkriptáz kvantitatív polimeráz láncreakció           |
| SRC              | sarcoma tirozinkináz proto-onkogén                               |
| SFK              | SRC tirozinkináz család  |
| TCR              | T-sejt receptor  |
| TFR              | kezelésmentes remisszió  |
| TGFβ             | transforming growth factor beta 1                                |
| TIA              | tranzitórikus iszkémiás esemény                                  |
| TKD              | tirozinkináz domén   |
| TKI              | tirozinkináz-gátló   |
| TRAP             | trombin receptor aktiváló peptid                                 |
| TXA <sub>2</sub> | tromboxán A <sub>2</sub>   |
| VEGF             | vascular endothelial growth factor                               |
| vWF              | von-Willebrand faktor  |

## 1. Bevezetés

A krónikus mieloid leukémia (CML) a krónikus mieloproliferatív neopláziák családjának a tagja. A CML ritka betegség, Magyarországon 100.000 lakosra évente 1-2 új eset adódik, de a betegek egységes szakmai és tudományos nyilvántartása hazánkban még nem megoldott. A magyar társadalombiztosító adatai alapján 2021-ben Magyarországon mintegy 1600 beteg részesült TKI kezelésben. Amíg a szolid tumorok és a malignus hematológiai kórképek többségének a genetikai háttere rendkívül összetett, addig a CML etiopatogenezise egyetlen, pontosan körülírt genetikai hibára vezethető vissza [1]. A 9-es és a 22-es kromoszómák hosszú karjai között létrejött reciprok transzlokáció (Philadelphia kromoszóma) egy fúziós gén kialakulásához vezet (*BCR::ABL1*), ami egy szabályozatlan tirozinkináz aktivitással bíró fehérjét kódol. A kórosan fokozott tirozinkináz aktivitás következtében a sejtsztódás, az adhézió, illetve a programozott sejthalál jelátviteli útvonalainak szigorúan szabályozott egyensúlya felbomlik, ami a *BCR::ABL1* pozitív sejtek malignus transzformációjához vezet, és a betegségre jellemző klinikai képet alakítja ki. A malignus genetikai transzformáció molekuláris szintű megismerése segítette a célzott daganatellenes terápia kidolgozásához, amihez a *BCR::ABL1* fehérje kóros tirozinkináz aktivitásának gátlása kiváló célpontot jelentett. Druker és munkatársai az 1990-es évek végén fejlesztették ki az STI571 néven ismertté vált, majd imatinib néven törzskönyvezett molekulát, ami a *BCR::ABL1* fehérje kináz „zsebében” elfoglalja az ATP helyét, így akadályozva meg a szubsztrát foszforilációját [2]. A korábban alkalmazott  $\alpha$ -interferon kezelésre nem reagáló vagy intoleráns, krónikus fázisú betegeknél napi 300 mg feletti dózis esetén 90%-ban komplett hematológiai, 50%-ban pedig komplett vagy major citogenetikai válasz alakult ki [3]. A klinikai vizsgálatok tapasztalatai az évek során minden várakozást felülmúlva erősítették meg a tirozinkináz-gátló (TKI) kezelés kezdeti kiváló eredményeit [4]. Az imatinib igen kedvező gyógyszer-tulajdonságokkal rendelkezik, szájon át alkalmazható, nagymértékben specifikus, jól tolerálható gyógyszernek bizonyult, és a mellékhatások is minimálisak voltak. Az elmúlt két évtized folyamán a célzott molekuláris terápia a malignus hematológiai betegségek gyógyításának egyik ígéretes eszközévé vált. A második (nilotinib, dasatinib, bosutinib) és harmadik (ponatinib) generációs tirozinkináz-gátlók kifejlesztésével az imatinibre nem megfelelően reagáló vagy intoleráns esetek is kezelhetővé váltak [5-8]. A második generációs TKI-kezelések mellett azonban jóval nagyobb arányban alakulhatnak ki súlyos mellékhatások is. A nilotinib és a ponatinib kezelések kapcsán kardiovaszkuláris események (artériás és vénás tromboembólia, akut koronária szindróma, stroke, perifériás érbetegség, hipertónia), dasatinib kezelés mellett pedig mellkasi folyadék gyülem és vérzékenység (gyomor-bél traktust, központi idegrendszer) gyakoribb előfordulását észlelték.

A CML felismerésekor a betegek több mint fele 65 évnél idősebb. Ennek megfelelően a kardiovaszkuláris megbetegedések előfordulása is gyakoribb. A kezelés megkezdése előtt ezért részletes kardio-metabolikus szűrővizsgálatok elvégzése javasolt, melyeket a folyamatos TKI terápia mellett adott időpontokban rendszeresen ellenőrizni kell. A szűrővizsgálatok elvégzése az iszkémiás szívbetegséghez, az iszkémiás cerebrovaszkuláris eseményekhez, vagy a perifériás artériás elzáródásos betegséghez vezető vaszkuláris események idő előtti, valamint a magasvérnyomás betegség időben történő felismerését és megelőzését segíti. A dazatinibbel végzett korábbi *in vitro* és *ex vivo* vizsgálatok a primer hemosztázis elégtelen működését igazolták. A nilotinib és a ponatinib kezelések mellett észlelt gyakori kardiovaszkuláris mellékhatások háttere ugyanakkor kevésbé tisztázott.

A primer hemosztázis érzékeny indikátorai a kettős agonista (kollagén és trombin) aktiváció kapcsán képződő "*coated*"-vérlemezkék (**collagen and thrombin activated**), melyek aktivált vérlemezkék egy speciális alcsoportját alkotják. A "*coated*"-vérlemezkék egy igen jelentős prokoaguláns aktivitással bíró aktivált trombocita alpopulációt jelentenek. Közös jellemzőjük a mitokondriális depolarizáció, a tartós citoplazmatikus kalcium-szint emelkedés, a foszfatidil-szerin (PS) sejtfelszíni expressziója, és a fibrinogén (GPIIb/IIIa) receptorok inaktiválódása. Felszínükön számos funkcionálisan aktív prokoaguláns fehérje, köztük fibrinogén, V-ös faktor és von Willebrand faktor mutatható ki. Ezeknek a prokoaguláns "*coated*"-vérlemezkéknek a túltermelődése korábban számos trombotikus folyamatban igazolható volt. Ugyanakkor a "*coated*"-vérlemezkék csökkent aránya mutatható ki spontán agyvérzés, lacunáris stroke, illetve súlyos hemofília A eseteiben.

## **2. Irodalmi áttekintés**

### **2.1. Krónikus mieloid leukémia**

A TKI kezelés radikális változást hozott a CML terápiájában. Az 1970-es években - amikor csak citotoxikus szerek álltak rendelkezésre - a 10 éves túlélési arány 20% volt. Ez 50%-ra emelkedett az allogén csontvelő-átültetés és az  $\alpha$ -interferon terápia bevezetésével. Az igazán jelentős változás az elmúlt 25 évben, a tirozinkináz-gátló kezeléssel következett be. Ma a 10 éves túlélés közel 90%; a betegek túlélése az egészséges felnőttekével közel egyező. Jelenleg a betegek jelentős részénél a TKI kezelés folyamatos, életfogytig tartó terápiát jelenthet. A diagnóziskor rögzített beteg- és betegség-specifikus jellemzők (életkor, lép mérete, vérlemezke szám, a periférián észlelt blasztok, eozinofília és bazofília mértéke) alapján a kórleflyás megijósolható. A prognózis meghatározására számos pontrendszer ajánlott [9-12]. Ezek közül a Sokal index a legrégebben használt, ezt alkalmazták a legtöbb klinikai vizsgálatban is. Az egyes pontrendszerek kockázati tényezőit a TKI kezelésre adott válasz [9,10], és a túlélés [11] közötti összefüggések megítélésére határozták meg. Mivel a betegek többsége ma már a leukémiás progressziótól független okok miatt hal meg - miközben a CML tartós és mély molekuláris remisszióban van - újabb kockázatbecslő pontrendszereket is kidolgoztak a CML-hez köthető halálozás valószínűségének előrejelzésére [12]. Ezek a EUTOS (European Treatment and Outcome Study for CML) és az EUTOS hosszú távú túlélési (EUTOS long term survival: ELTS) pontszámok [12]. Az ELTS pontszám ugyanazokat az egyszerű vérkép adatokat, a lép méretet, valamint a kort használja, mint a Sokal index. A fő különbség az életkor prognosztikai értékében van, mivel a TKI-vel kezelt betegeknél a kor a teljes túlélést kevésbé befolyásolja (ELTS pontszám), mint a hagyományos kemoterápiával kezelt betegek esetén (Sokal pontszám).

A CML kezelésében jelenleg elfogadott rizikó-adaptált kezelési stratégia alkalmazása során előbb mindig a terápiás célt kell megválasztanunk. A fiatal betegeknél, egyéb társbetegség hiányában a minél gyorsabban elért, minél mélyebb molekuláris válasz (DMR), és a kezelésmentes remisszió (TFR) az elsődleges cél. Az idősebb, számos társbetegségben is szenvedő betegeknél pedig önmagában a túlélés, az életminőség javítása, az akcelerált és a blasztos fázis megelőzése a kitűzött cél. A beteg életkora, általános állapota és a kísérő betegségek értékelése mellett a választott TKI mellékhatás profilja is kiemelkedően fontos jelentőséggel bír.

#### **2.1.1. A kezelés során szükséges teendők**

A TKI kezelés során, az European Leukemia Network (ELN) legújabb (2020) ajánlásai alapján meghatározott időpontokban ellenőrizni kell a hematológiai, citogenetikai és a molekuláris

válaszokat (1. táblázat), majd a kapott eredmények alapján kell dönteni a további teendők (kezelés folytatása, terápia módosítás, allogén őssejt transzplantáció, stb.) felől [13]. A kórképet meghatározó genetikai instabilitás miatt a citogenetikai státusz megállapítása a diagnóziskor, majd annak követése a kezelés során elengedhetetlenül fontos, ugyanis a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) és a PCR vizsgálatok az esetleges egyéb kromoszóma eltéréseket nem tudják kimutatni. Bizonyos kromoszóma aberrációk CML-ben nagyobb gyakorisággal fordulnak elő, és befolyásolják a betegség kimenetelét is [14]. A *BCR::ABL1* fúziós gén mennyiségi meghatározása (reverz transzkriptáz quantitaív PCR módszer, RT-qPCR) a TKI kezelés követésének alapja [13]. A módszer sztenderdizálása (international score, IS) lehetővé tette az egyes molekuláris laboratóriumok által kiadott eredmények összehasonlíthatóságát és ennek megfelelően egységes, nemzetközi irányelvek kialakítását [13]. Kontrollált klinikai vizsgálatok igazolták, hogy a kezelés 3. hónapjában mért 10% alatti *BCR::ABL1* [IS] érték a progresszió mentes túlélést (PFS) megbízhatóan előrejelzi [15-17]. A TKI kezelés 6. hónapjában mért 1% feletti vagy 12. hónapjában mért 0,1% feletti *BCR::ABL1* [IS] értékek a kezelés elégtelenségét jelentik és ilyen esetekben terápia váltás szükséges [13]. Az RT-qPCR érzékenységének növelésével a mély molekuláris válaszok is értékelhetővé váltak, lehetőséget teremtve az esetleges későbbi terápia mentes időszak pontos monitorozására is.

**1. táblázat: A TKI kezelésre adott válaszok típusai és kritériumai**

| A TKI kezelésre adott válasz | Kritérium   |
|------------------------------|---|
| <b>Hematológiai válasz</b>   |   |
| Komplett hematológiai        | fehérvérsejt-szám < 10 x 10 <sup>9</sup> /l                         |
|                              | trombocita-szám < 450 x 10 <sup>9</sup> /l                          |
|                              | a perifériás vérben nincs promielocita, mielocita, vagy blaszt sejt |
|                              | a lép nem tapintható  |
| <b>Citogenetikai válasz</b>  |   |
| Parciális citogenetikai      | 1-35% Philadelphia kromoszóma                                       |
| Komplett citogenetikai       | 0% Philadelphia kromoszóma  |
| <b>Molekuláris válasz</b>    |   |
| Major molekuláris            | <i>BCR::ABL1</i> [IS] < 0,1% (= MMR vagy MR3)                       |
| Mély molekuláris             | <i>BCR::ABL1</i> [IS] < 0,01% (= DMR vagy MR4)                      |
|                              | <i>BCR::ABL1</i> [IS] < 0,0032% (= DMR vagy MR4.5)                  |
|                              | <i>BCR::ABL1</i> [IS] < 0,001% (= DMR vagy MR5)                     |

TKI: tirozinkináz-gátló, MMR: major molekuláris válasz, DMR: mély molekuláris válasz, IS: international scale

### 2.1.2. TKI rezisztencia és intolerancia

Az első vonalban választott kezelés során alkalmazott TKI-vel szemben 30-40%-ban rezisztencia vagy intolerancia alakulhat ki [15-17]. A rezisztencia leggyakoribb oka a *BCR::ABL1* fúziós gén

szomatikus pontmutációja, amely a kórkép genetikai instabilitásából adódik. Jelenleg több mint 100 különböző mutáció ismert [18,19]. Előfordulásuk az akcelerált és blasztos fázisban a gyakoribb, és rossz prognózist jelentenek [20]. A pontmutáció a BCR::ABL1 fehérje térszerkezetében olyan konformáció változást hozhat létre, amely megakadályozza a TKI molekula specifikus kapcsolódását az ABL1 tirozin-kináz doménjéhez (TKD), és a kezelés eredménytelenségéhez vezethet. A kórlefolyás során egyszerre több mutáció is kialakulhat, amely érinthet több BCR::ABL1 pozitív sejtklont (poliklonális mutáció), vagy egy adott klón BCR::ABL1 génszakaszán belül alakul ki ("compound" mutáció). Két vagy több mutáció esetén ez utóbbi jóval gyakoribb és egyszerre több TKI-vel szemben is rezisztenciát okozhat [19]. A T315I mutáció jelenléte a ponatinib és aszcinib kivételével az összes jelenleg rendelkezésre álló TKI terápiával szembeni rezisztenciát okoz ("gatekeeper" mutáció).

A TKI rezisztencia kialakulhat a TKI nem megfelelő plazma koncentrációja miatt is. Ennek oka leggyakrabban az elégtelen beteg *compliance*, valamint a terápiahűség (*adherencia*) hiánya. Az *adherenciát* leginkább a TKI kezelés okozta mellékhatások befolyásolják (intolerancia). A korai, általában hematológiai mellékhatások (hematológiai toxicitás) a TKI átmeneti elhagyásával, a dózis csökkentésével, vagy másik TKI-ra való váltással jól uralhatóak. Az elhúzódó, nem súlyos (grade 1-2), de az életminőséget tartósan negatívan befolyásoló mellékhatások jelentős *adherencia* gondot jelentenek és a *compliance* romlásával elégtelen terápiás válaszhoz vezetnek. Ilyenkor szükséges lehet a TKI plazma szintjének ellenőrzése. TKI rezisztencia gyanúja esetén a gyógyszer bevitelének pontosságát és a beteg terápiahűségét ellenőrizni kell. Megfelelő *compliance* mellett észlelt elégtelen válasz esetén terápia váltás, és ezzel egyidőben a BCR::ABL1 TKD mutáció analízis végzése javasolt [13].

### 2.1.3. Első vonalban választható kezelések

Jelenleg Magyarországon első terápiás vonalban az Nemzeti Egészségbiztosítási Alapkezelő (NEAK) három TKI-t támogat (imatinib, nilotinib, dasatinib). Amíg az első vonalban alkalmazott imatinib kezelés a legkevesebb mellékhatás mellett (a második generációs TKI kezeléshez hasonlóan) javítja a teljes túlélést, addig az első vonalban alkalmazott második generációs TKI terápia a gyorsabban kialakuló és mélyebb molekuláris válasz révén elérhetővé teheti a betegek számára a kezelésmentes túlélés, a teljes gyógyulás elvi lehetőségét is.

#### *Imatinib*

A BCR::ABL1 hatékony gátlásán túl *in vitro* sejtkultúrában a PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) és a C-KIT fehérjék tirozin-kináz aktivitását is blokkolja. Ez a nem BCR::ABL1

specifikus gátlás okozza az úgynevezett "off-target" mellékhatásokat (ödéma hajlam, izomfájdalom, hasmenés). Naponta 1x400 mg adagban alkalmazva hatékony és igen jól tolerálható gyógyszer. Az IRIS vizsgálat 10. évében a betegek 91,8%-a volt teljes citogenetikai remisszióban (CCyR). A teljes túlélés (OS) a CML-hez köthető halálozást figyelembe véve 83,3% volt. Imatinib rezisztencia a betegek 32%-ban, míg intolerancia 8%-ban alakult ki [15]. Nagyobb (600 vagy 800 mg) napi dózis alkalmazása esetén tapasztalt eredmények ellentmondásosak, a mindennapi gyakorlatban rutinszerű alkalmazásuk nem ajánlott [21,22].

### ***Nilotinib***

Az imatinibbel összevetve - *in vitro* sejtkultúrában vizsgálva – a BCR::ABL1 tirozin-kinázt 10-50x erősebben gátló hatású molekula. A T315I kivételével az összes imatinibre rezisztens BCR::ABL1 TKD mutációval szemben hatékony. Első vonalban alkalmazva napi dózisa 2x300 mg. Felszívódását az étkezés jelentősen befolyásolja, ezért bevétele előtt 2 órával, illetve azt követően még egy órán át éhgyomorra kell maradni. Az ENESTnd vizsgálat során korábban még nem kezelt krónikus fázisú CML-es betegek napi 1x400 mg imatinibet, illetve 2x300 mg és 2x400 mg nilotinibet kaptak. Bár az 5. évben mért molekuláris válaszok az imatinibbel szemben mindkét nilotinib karban mélyebbek voltak, valamint az akcelerált és a blasztos fázis is ritkábban alakult ki, az 5 éves adatok alapján a teljes túlélésben (OS) a nilotinib nem jelentett előnyt az első generációs TKI kezeléssel szemben [23]. Az imatinib kezelés kapcsán is jelentkező hematológiai toxicitáson (neutropénia, anémia, trombocitopénia) túl a nilotinib terápia során gyakran észlelhető hasmenés, bőrkiütés, emelkedett éhgyomri vércukor érték, amiláz- és lipáz-emelkedés, QT idő megnyúlás és progresszív érbetegség (akut koronária szindróma, stroke, perifériás artériás érszűkület). Ezen utóbbi kardiovaszkuláris rizikó az elmúlt években a nilotinib kezelés széleskörű elterjedése kapcsán jelentős mértékben meghatározó tényezővé vált, és egyértelműen felhívta a figyelmet a TKI kezelés, valamint a betegek egyéb kardiovaszkuláris rizikóinak (vérnyomás, boka-kar index, lipid profil, vércukor, stb.) körültekintő mérlegelésére, ellenőrzésére, szükség esetén megfelelő korrekciójára.

### ***Dazatinib***

Valódi multikináz inhibitor molekula, az BCR::ABL1 specifikus gátlásán túl az SRC kináz családot is gátolja. Az ABL1 kináz ATP kötő doménjének mindkét konformációjához (aktivált és nyugalmi) képes kapcsolódni. Az imatinibnél 325x erősebb BCR::ABL1 tirozin-kináz gátló hatása van *in vitro*. A T315I kivételével az összes imatinibre rezisztens BCR::ABL1 TKD mutációval szemben hatékony. Első vonalban alkalmazva napi dózisa 1x100 mg. Felszívódását az étkezés nem befolyásolja.

A DASISION vizsgálat során korábban még nem kezelt krónikus fázisú CML-es betegek napi 1x400 mg imatinibet, illetve 1x100 dazatinibet kaptak [5]. A vizsgálat 5. évében az imatinib karban 64%-ban, míg a dazatinib karban 76%-ban alakult ki major molekuláris válasz (*BCR::ABL1* [IS]<0,1%, MMR) [16]. Az dazatinib terápia során, a hematológiai toxicitáson túl, mellkasi folyadékgyülem szindróma, vérzékenység és pulmonális hipertónia előfordulását észlelték. A vaszkuláris események előfordulása 5% volt [16].

#### **2.1.4. Második, valamint többedik vonalban alkalmazható kezelések**

Az első vonalban alkalmazott TKI kezelések kapcsán kialakuló rezisztencia, vagy a betegek életminőségét hosszú távon negatívan befolyásoló mellékhatások (intolerancia) esetén a terápia módosítására van szükség. Primer vagy szekunder rezisztencia esetén minden esetben csontvelő és citogenetikai vizsgálat elvégzése szükséges az esetleges klonális evolúció (szerzett kromoszóma aberrációk) felismerése és a betegség fázisának (akceleráció?, blasztos transzformáció?) pontos meghatározása miatt. Jelenleg Magyarországon második vonalban a NEAK három második generációs TKI kezelést támogat (nilotinib, dazatinib, bozutinib). A második generációs TKI kezelés evidenciái ugyanakkor elmaradnak az imatinib kezelés kapcsán nyert tapasztalatoktól, és a második generációs TKI-k okozta mellékhatások is jóval gyakoribbak, valamint számos szervrendszert érinthetnek.

A TKI kezeléssel szembeni rezisztencia esetén javasolt a *BCR::ABL1* gén mutációs analízise is, ugyanis T315I mutáció esetén ponatinib vagy aszcininib kezelés, vagy allogén őssejt transzplantáció (allo-SCT) elvégzése szükséges.

#### ***Bozutinib***

Multikináz aktivitású molekula, amely a *BCR::ABL1* mellett az SRC kináz családot is specifikusan gátolja, de nincs hatása a PDGFR és a C-KIT tirozin-kinázok aktivitására. Az imatinibbel szembeni rezisztenciát okozó *BCR::ABL1* mutációk jelentős részével szemben hatékony, kivéve a V299L és a T315I mutációkat. Krónikus fázisú, korábban imatinibbel kezelt, és arra rezisztens, vagy intoleráns betegeknél napi 1x500 mg dózisban alkalmazva 2 éves követés után a PFS 79%, az OS 92% volt [24]. Hasonló dózisban, első vonalban napi 1x400 mg imatinibbel összehasonlítva 24 hónapnál hasonló volt a teljes citogenetikai remisszió aránya (bozutinib 79%; imatinib 80%), míg a kumulatív MMR arány a bozutinib esetén 59%, az imatinibnél pedig 49% volt [7]. Leggyakoribb mellékhatás a hasmenés, a hányinger és az emelkedett májfunkciós értékek voltak. Jelentősebb mértékű kardiovaszkuláris mellékhatás a vizsgált időszakban nem alakult ki [25].

### ***Dazatinib***

Krónikus fázisú, korábban imatinibbel kezelt, és arra rezisztens, vagy intoleráns betegeknél klinikai tanulmányban eltérő dazatinib dózisokat (1x100 mg, 2x50 mg, 1x140 mg, 2x70 mg) alkalmaztak. 6 éves követés után a betegek 28%-a részesült a kezdeti dazatinib kezelésben. A PFS 40-51%, az OS 70-77% volt, míg MMR a betegek 40-43%-ában alakult ki. A 3. hónapnál mért molekuláris válaszok ( $BCR::ABL1$  [IS]  $\leq 1\%$ , 1-10%,  $> 10\%$ ) alapján a PFS 68%, 58% és 26% volt [26].

### ***Nilotinib***

Krónikus fázisú, korábban imatinibbel kezelt és arra rezisztens vagy intoleráns betegeknél napi 2x400 mg dózisban alkalmazva 2 éves követés után a PFS 64%, az OS 87% volt. Teljes citogenetikai válasz a betegek 44%-ban, míg MMR 28%-ban alakult ki [27].

### ***Ponatinib***

A ponatinib harmadik generációs tirozinkináz-gátló, amely minden vizsgált  $BCR::ABL1$  mutációval szemben hatékony. Azok a betegek, akik korábban két vagy több tirozin-kináz inhibitor kaptak, 60%-ban major citogenetikai választ értek el ponatinib kezelés mellett [8]. A terápiás válasz gyorsan alakult ki, és tartósnak bizonyult. A major citogenetikai válaszig eltelt medián idő 2,8 hónap, a major molekuláris válaszig eltelt medián idő pedig 5,5 hónap volt. A major citogenetikai válasz 5 évig tartó fennmaradásának valószínűsége 82% volt a reagálók körében [8].

### ***Aszcininib***

Az aszcininib (Scemblix) orálisan adagolható, kis molekulájú, szelektív  $BCR::ABL1$  allosztérikus inhibitor, amely a  $BCR::ABL1$  mirisztoil zsebét célozza meg. A gyógyszer számos TKD mutáció ellen is aktív, köztük a T315I mutáció esetén is. Fázis 3 klinikai vizsgálatban tapasztalt hatékonysága és biztonságossága alapján az aszcininib kezelést olyan krónikus fázisú Philadelphia pozitív krónikus fázisú CML-ben hagyták jóvá, melynél megelőzően legalább két vonalban sikertelen TKI kezelés volt [30].

### ***Allogén őssejt transzplantáció (allo-SCT)***

A betegek kis részénél az első krónikus fázisban tapasztalt, több TKI-vel szemben is fennálló intolerancia, vagy rezisztencia eseteiben, a diagnóziskor észlelt, vagy a TKI kezelés során kialakuló, rossz prognózist jelző kromoszóma rendellenességek [14] és T315I mutáció esetén, allo-SCT elvégzése javasolt [13]. Első vagy második vonalban alkalmazott második generációs TKI kezeléssel szemben kialakuló intolerancia vagy rezisztencia eseteiben szintén időben meg kell fontolni az allo-SCT lehetőségét. Ilyenkor (3. vagy 4. vonal) ugyanis az alternatívan választható

TKI kezelés már nem minden esetben képes a megfelelő citogenetikai és molekuláris választ fenntartani. Ebben az esetben a választott második generációs TKI kezelést  $\alpha$ -interferonnal lehet kiegészíteni, illetve ponatinib, vagy lehetőség szerint vizsgálati fázisban lévő egyéb TKI kezelés (pl. vodobatinib) elindítása mérlegelendő, és a beteget fel kell készíteni az allogén őssejt transzplantációra. Diagnóziskor észlelt akcelerációra utaló eltérések esetén a beteget nagy rizikójúnak kell tekinteni, és elégtelen terápiás válasz esetén allo-SCT elvégzése javasolt. Ellenőrzött TKI terápiahűség ellenére kialakuló akcelerált fázis az allo-SCT mielőbbi megszervezését indokolja. Blasztos fázis kialakulásakor a TKI kezelés eredményei kiábrándítóak, az átlagos túlélés 1,4 év [28]. Ilyenkor a második krónikus fázis elérése rendkívüli jelentőségű, mivel azok a betegek, akiknél az allo-SCT akcelerált, vagy blasztos fázisban történik, a teljes túlélés alig éri el a 6 hónapot [29].

### ***Újabb terápiás lehetőségek***

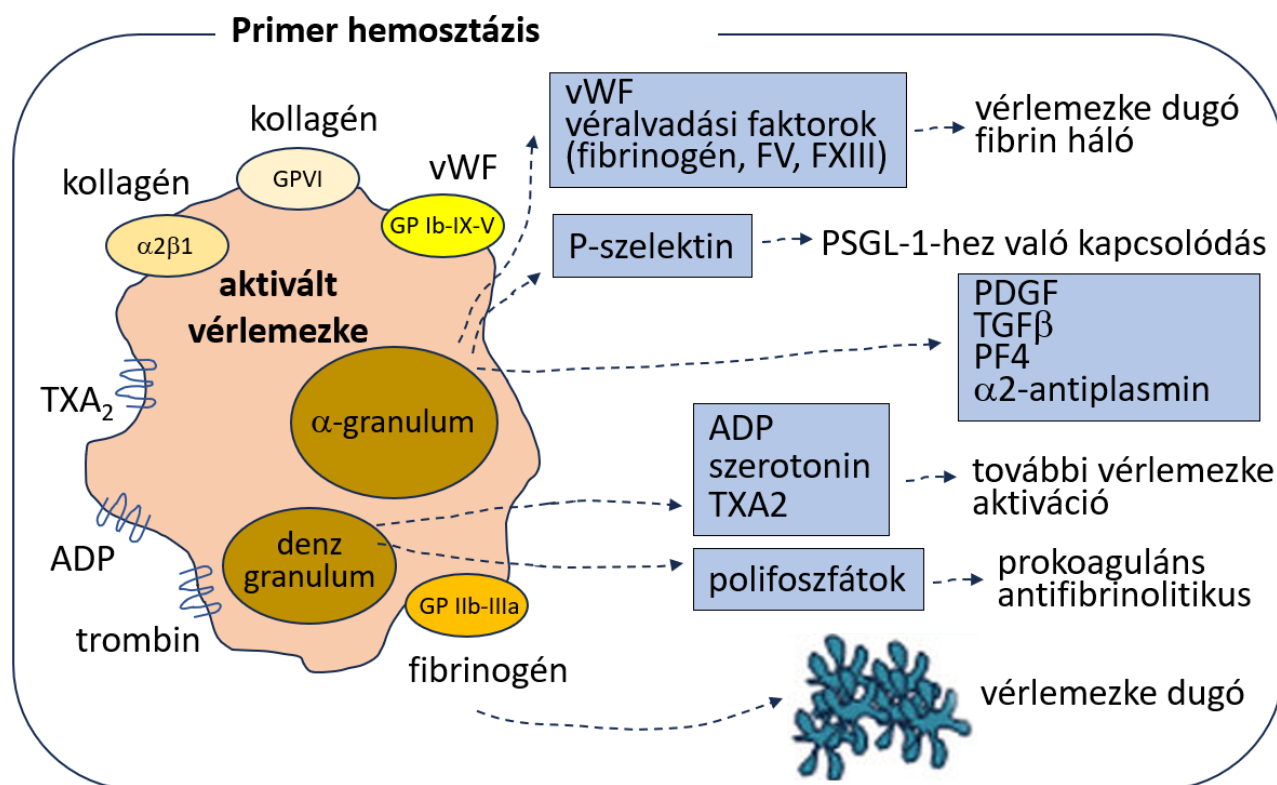
A vodobatinib (K0706) egy új harmadik generációs TKI, amely a legtöbb *BCR::ABL1* TKD mutáció ellen hatásos, a T315I ellen azonban nem. A vodobatinibet 16 ponatinibbel előzetesen már kezelt és 15 ponatinib-naív krónikus fázisú CML-es betegnél értékelték [31]. A ponatinibbel előzetesen kezeltéknél a CCyR arány 50%-os, a nem kezeltéknél pedig 67%-os volt [31].

#### **2.1.5. A kezelés felfüggesztése**

A korai és mély molekuláris válasz elérése egyértelműen javítja mind a betegségmentes, mind pedig a teljes túlélést. Mindezek eléréséhez azonban a TKI kezelés folyamatos és pontos molekuláris biológiai ellenőrzése, ezen laboratóriumi módszerek sztenderdizált alkalmazása (laboratóriumon belüli és az egyes laboratóriumok közötti), az elért terápiás válaszok egységes irányelvek alapján történő, gondos mérlegelése, szükség esetén pedig a kezelés megfelelő módosítása szükségesek. A kezelésre adott válasz pontos molekuláris monitorozásával a betegek egyre nagyobb hányada érheti el a megfelelően mély molekuláris választ és kaphat reményt a tartós gyógyszer- és betegségmentes túlélésre. Legalább 5 éves folyamatos TKI kezelés és megfelelően mély (MR4.5 vagy MR5) és tartós (legalább 2 év) molekuláris válasz esetén, amennyiben terápia váltásra korábban csak TKI intolerancia miatt volt szükség, úgy a TKI kezelés felfüggesztése megpróbálható. Imatinib esetén a betegek 40%-a [32], míg második generációs TKI esetén 50%-a [33] marad kezelés nélkül tartósan mély molekuláris válasz mellett kezelésmentes remisszióban. A kezelésmentes időszak első 6 hónapjában a molekuláris válasz szoros (minimum 4 hetente végzett) ellenőrzése indokolt. A TKI terápiát újból el kell kezdeni abban az esetben, ha a molekuláris válasz MMR (MR3) vagy rosszabb értéket mutat [34].

## 2.2. A primer hemosztázis és a "coated"-vérlemezkék vaszkuláris hematológiai jelentősége

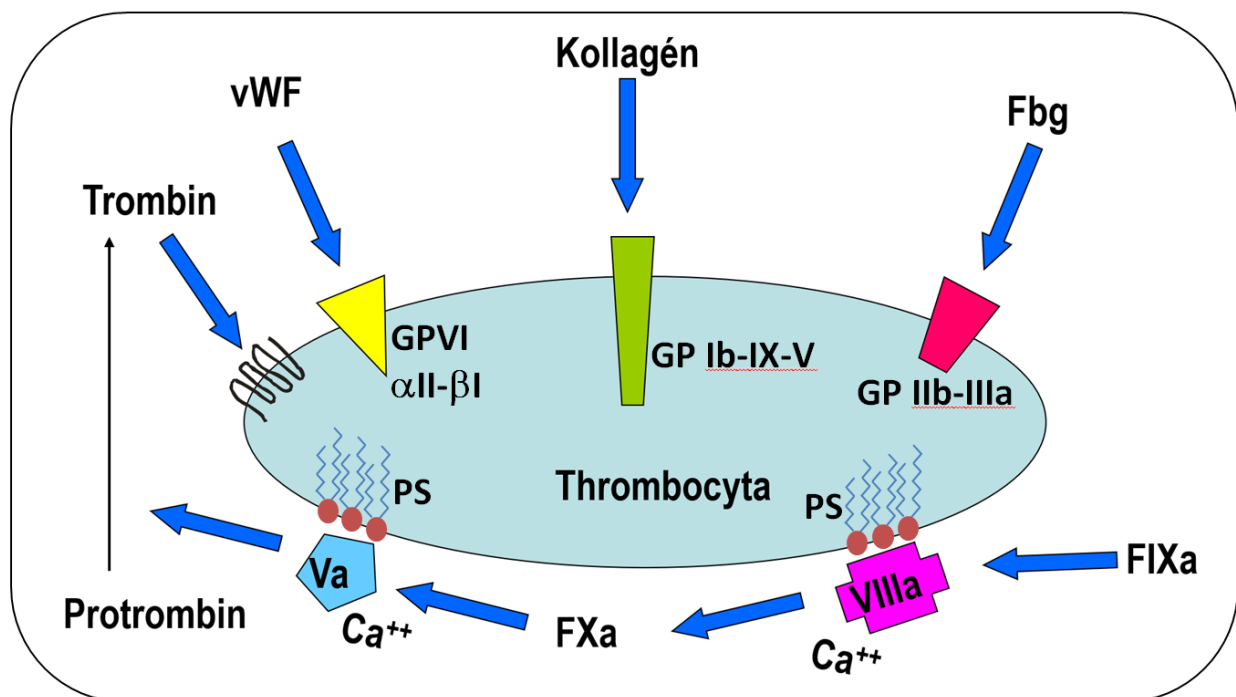
A vérlemezkék csontvelői képződése során a trombociták előalakja (proplatelet) a megakariociták fragmentálódásával jön létre. Az érett vérlemezkék felszínén számos különböző ligand-specifikus glikoprotein receptor található, melyek fontos szerepet játszanak a vérlemezkék aktivációjában, illetve adhéziós és aggregációs reakcióiban. A legtöbb trombocita agonista a sejtfelszíni receptorok stimulálása révén fejt ki hatását, majd a jelátvitel intracellulárisan, G-fehérjék által szabályozott jelátviteli útvonalon valósul meg. A létrejött intracelluláris válasz alapján megkülönböztetünk erős (trombin, kollagén) és gyenge (ADP, adrenalin) agonistákat. A vérlemezkék fontosabb receptorai közé sorolható a proteáz aktivált receptor-1 (PAR1), melynek a legpotensebb aktivátora a trombin. Trombin hatására a vérlemezkék alakja megváltozik, megindul az aktiváció, aggregáció és az intracitoplazmatikus  $\alpha$ -granulumok szekréciója. A glikoprotein VI (GPVI) receptoron keresztüli aktivációt az érfal sérülés helyén szabadabbá váló szubendoteliális kollagén váltja ki, mely a vérlemezkék adhéziójához,  $\alpha$ -granulum szekrécióhoz, és végső soron trombocita aggregációhoz vezet [39,42].



**1. ábra: A vérlemezkék összetett szerepe a primér hemosztázis folyamataiban**

ADP: adenzin difoszfát, vWF: von-Willebrand faktor, TXA<sub>2</sub>: tromboxán A<sub>2</sub>, FV: faktor V, FXIII: faktor XIII, PDGF: platelet-derived growth factor, PSGL-1: P-selectin glikoprotein ligand-1, PF4: platelet factor 4, TGFβ: transforming growth factor beta 1,  $\alpha$ II- $\beta$ I: alpha 2 beta 1 integrin kollagén receptor, GP Ib-IX-V: Von Willebrand factor receptor, GP IIb-IIIa: fibrinogén receptor, GPVI: kollagén receptor

Trombocita aktivációt követően a citoskeleton átrendeződik (*shape change*), és a fibrinogén receptor (GPIIb/IIIa vagy  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 integrin) konformáció változáson keresztül aktivált állapotba kerül. A receptor ebben az aktivált állapotban képes a fibrinogén megkötésére. Az aktivált GPIIb/IIIa részt vesz a vérlemezke aggregációban és az alvadék kontrakciójában. A vérlemezke  $\alpha$ -granulumok szekréciója során V-ös faktor (FV), fibrinogén (Fbg), von Willebrand faktor (vWF), fibronectin (Fn),  $\alpha$ 2-antiplazmin ( $\alpha$ 2-AP) és thrombospondin (Tsp) szabadul fel. Ezek a fehérjék tovább stimulálják a vérlemezke aktivációt, prokoaguláns hatásukkal szerepet játszanak az adhézió szabályozásában és a vérlemezke aktiváció erősítésében [35]. Érsérülést követően, a trombocita aktiváció és aggregáció következtében megkezdődik a primer vérlemezke dugó (trombocita-dús vérrög, fehér trombus) formálódása. A sérülés helyén a vérlemezkék aktiválódnak, funkcionális válaszreakcióik az adhézió, aggregáció, szekréció és a koaguláció összehangolt folyamata révén mechanikus akadályt kialakítva hatékonyan akadályozzák meg a vérvesztést.



**2. ábra: Az aktivált vérlemezkék receptorai és a primer hemostázis során kialakuló sejtfelszíni komplexei**

FIXa: aktivált faktor IX,  $Ca^{++}$ : kalcium ion, (F)VIIIa: aktivált faktor VIII, (F)Va: aktivált faktor V, PS: foszfatidil-szerin, vWF: Von Willebrand faktor,  $\alpha$ II- $\beta$ I: alpha 2 beta 1 integrin kollagén receptor, GP Ib-IX-V: Von Willebrand factor receptor, GP IIb-IIIa: fibrinogén receptor, GPVI: kollagén receptor, Fbg: fibrinogén

A vérlemezkék prokoaguláns aktivitása több tényezőben is megnyilvánul. Az aktivált vérlemezkék felszínére negatív töltésű foszfolipidek (foszfatidilszerin, PS) kerülnek, melyek olyan enzim komplexek kialakulását segítik elő, melyek a koagulációs kaszkád hatékony működésében elengedhetetlenek (protrombináz és tenáz). A koagulációs kaszkád láncreakciók sorozatából áll,

melyek során inaktív proenzimekből, prekursor fehérjékből aktív enzimek képződnek. A keletkező enzimek egymás hatását amplifikálva, valamint makromolekuláris komplexekbe rendeződve (protrombináz és tenáz komplexek) a vérlemezke aggregáción túl a véralvadás humorális (koagulációs) folyamatait erősítik. A protrombináz komplex részét képezi a X-es faktor, egy kofaktor fehérje (V-ös faktor), az enzim szubsztrátja (protrombin), a trombocita sejtmembrán anionos foszfolipid felszíne (PS), valamint a mindezek kötődéséhez feltétlenül szükséges kalcium. A komplexek létrejöttének előnye, hogy a trombin generáció lényegesen hatékonyabban mehet végbe az aktivált vérlemezkék felszínén, amely így közvetlenül az érfalsérülés helyére lokalizálódik [35-37].

Ezek az események kulcsfontosságúak a vérvesztés hatékony megakadályozása szempontjából. Ugyanakkor a folyamat pontos szabályozásának felborulása érelzáródást okozhat, ami iszkémiához, és a létfontosságú szervek infarktushoz vezet. Az artériás trombózis az egyik legjelentősebb klinikai halálok, amelyet az ateroszklerotikus plakkok repedése vagy eróziója okoz, ami trombocita adhézióhoz, aggregációhoz, majd a koszorúerekben és az agyi artériákban szívizominfarktust, illetve stroke-ot okozó trombus-képződéshez vezet. Az artériás trombózis kialakulásának hátterében álló összetett hemosztatikus folyamatok vizsgálata fontos az iszkémiás szív- és érrendszeri betegségek patofiziológiájának megismerése érdekében.

### **2.2.1. Prokoaguláns vérlemezkék**

A vérlemezkék aktivációjuk során eltérő módon kerülhetnek aktivált állapotba, ezáltal heterogén sejtfelszíni tulajdonságokkal rendelkező, két különböző funkciójú alosztályt hoznak létre. A két alosztályt az aggregáló és a prokoaguláns vérlemezkék képezik. A prokoaguláns vérlemezkék alcsoportjára az jellemző, hogy aktivációjukat követően az intracelluláris kalcium szint tartósan megemelkedik. Ennek következtében a vérlemezkék membránjának külső felszínén megnövekszik a PS expozíció. Ez a tenáz és protrombináz komplexek aktivitásának fokozódásához vezet, melyek a trombin- és fibrinképződést segítik elő. A prokoaguláns vérlemezkék a primer vérrög kialakulása során a trombus felszínére kerülnek, így a legérzékenyebb helyen (érfal sérülés) megfelelő mennyiségű trombin és a fibrin képződést biztosítanak [35-37].

A prokoaguláns vérlemezkék egyik alcsoportja a "*coated*"-vérlemezkék, melyek két különböző, erős agonista (pl. trombin és kollagén) egyidejű aktiváló hatására jönnek létre. Jellemző rájuk, hogy felszínükön nagy mennyiségben található PS, és képesek irreverzibilisen megkötni az  $\alpha$ -granulumokból felszabaduló prokoaguláns fehérjéket is, melynek eredményeként fokozott hemosztatikus aktivitással bírnak. A prokoaguláns vérlemezkék létrejötté főleg a GPVI receptoron

keresztüli jelátviteli utakon történik. A PS-t expresszáló vérlemezkéken a GPIIb/IIIa többnyire inaktív. Ezzel szemben az aggregáló vérlemezke populációra az jellemző, hogy PS expressziót alig mutatnak, aktivációjukat követően kialakuló intracelluláris kalcium-szint növekedés gyorsan lecseng, és a GPIIb/IIIa receptor aktív konformációban van jelen a felszínükön, ami nagy affinitással köti meg a fibrinogént, mely vérlemezke aggregációhoz vezet [36,37].

Vérlemezke aktivációt követően az aktivált vérlemezkék prokoaguláns csoportjának felszínén kialakuló PS-dús közeg rendkívül hatékonyan képes fenntartani a vérrög környezetében a folyamatos trombin képződést. Ezt a folyamatot már az 1990-es évek végén leírták, és azóta ezeket a trombocitákat számos névvel illették [38,39], mint például a kollagén és trombin aktivált (collagen and thrombin activated) "coat"-vérlemezkék [40,41], "befedett"-vérlemezkék [42,43], ballonos és prokoaguláns vérlemezkék (BAPS) [44], szuperaktivált vérlemezkék [45], szuper vérlemezkék [46]. A változatos besorolás ellenére kialakulásukban ugyanazok a sejt-szintű apoptotikus (nekrotikus) intracelluláris jelátviteli folyamatok állnak [47,48], amelyek a PS expressziója révén a vérlemezkék prokoaguláns aktivitásához vezetnek [39]. Erős (pl. trombin) agonistával történő aktiválást követően a vérlemezkékben egy kezdeti, gyors citoplazmatikus kalcium-szint növekedés, valamint GPIIb/IIIa aktiváció alakul ki [49]. Az aggregáció folyamata során, bizonyos idő elteltét követően (1-2 perc) azonban az intracelluláris kalcium-szint csökken. A prokoaguláns vérlemezkék esetében azonban a citoplazmatikus kalcium koncentráció növekedni kezd [49-51]. A kalcium mobilizációja nem csak az intracelluláris raktárakból, hanem a nátrium-kalcium cserét működtető fehérje (NCX) reverz működése révén valósul meg. Az így tartósan megnövekedett intracelluláris kalcium koncentráció szükséges ugyanis a mitokondriális permeabilitás átmeneti pórus (mPTP) kialakulásához, ami ciklofilin-D-függő mitokondriális depolarizációhoz vezet [50-52]. A folyamat eredményként az intracelluláris kalcium-szint tartósan emelkedett marad, ami a GPIIb/IIIa receptorok fokozatos inaktiválásához [49,53], speciális transzmembrán ion-csatornák (TMEM16F) aktiválódásához [54], valamint PS externalizációhoz [44,55] vezet. Mindezek végső soron az aktivált vérlemezkék kifejezett prokoaguláns aktivitását, és a hemosztatikus szempontból szintén hiperaktív mikropartikulumok képződését idézik elő [41,44,56]. A PS-expozíció által közvetített prokoaguláns aktivitáson túl, a "coated"-vérlemezkék prokoaguláns aktivitása még tovább növekszik azért, hogy a felszínükön  $\alpha$ -granulum eredetű fehérjéket, például V-ös faktort, fibrinogént, VWF-t, trombospondint, valamint fibronektint kötnék meg transzglutamináz-függő folyamat révén [40].

### 2.2.2. A "coated"-vérlemezkék laboratóriumi vizsgálata

Az áramlási citometriai vizsgálat könnyen hozzáférhető, egyszerű és gyors hematológiai diagnosztikai eszköz. A prokoaguláns vérlemezkék könnyen kimutathatók, és *in vitro* fluoreszcens vizsgálatokkal jellemezhetőek áramlási citometriai vizsgálatok során. Az áramlási citometriai vizsgálatok lehetővé teszik a prokoaguláns vérlemezkék termelődési-képességének vagy hiányának számszerűsítését, valamint kiválóan alkalmasak a fenotípus szempontjából különböző trombocita alpopulációk elemzésére is. A prokoaguláns aktivitás más vizsgálatokkal is értékelhető, mint például az *ex vivo* trombocita-aktiváció függő trombin képződés és az áramlási kamrában végzett dinamikus vizsgálatok. Azonban ezek az utóbbi technikák egyelőre kísérleti stádiumban vannak, és diagnosztikai alkalmazhatóságuk további sztenderdizációs vizsgálatokat igényel. Az állatmodellekkel végzett *in vivo* vizsgálatok szintén segíthetnek a prokoaguláns vérlemezkék kialakulásának tanulmányozásában, valamint élettani vagy patológiai jellemzésben.

### 2.2.3. A "coated"-vérlemezkék klinikai jellemzői

Egészséges donorokban kettős agonista aktivációt követően az összes aktivált trombocita 15-57%-a mutat prokoaguláns vérlemezkékre jellemző tulajdonságokat. [42,57-59]. Az egyes személyek közötti széles variabilitás ellenére az egyéni értékek ugyanakkor stabilak [42]. Az elmúlt két évtized klinikai kutatásai egyre nagyobb figyelmet fordítottak a prokoaguláns vérlemezkék esetleges patofiziológiai jelentőségére a fokozott érlemeszesedéssel járó állapotok kialakulásában.

Számos vizsgálatban igazolták protrombotikus állapotú betegekben a fokozott "coated"-vérlemezke képződést. A prokoaguláns vérlemezkék átlagos arányát nagyobbak találták stroke [60] és átmeneti agyi keringési zavar (TIA) esetén [61] az egészséges kontrollcsoportéhoz képest. A vizsgálatok szerint a stroke vagy a TIA bekövetkezésének időpontjában mért nagyobb "coated"-vérlemezke szám prognosztikai jelentőséggel bír az agyi keringészavar kiújulásának gyakorisága szempontjából [62,63]. Ütőérszűkület esetén a legnagyobb prokoaguláns vérlemezke aránnyal jellemzett (>50%) csoportba tartozó betegeknél a korai iszkémiás események kialakulásának kockázata nagy [64]. Hasonlóképpen, a tünetmentes fő nyaki ütőér szűkületben szenvedő betegeknél a "coated"-vérlemezkék nagy aránya (45%) előrejelezte a stroke vagy a TIA kialakulásának kockázatát [65]. Továbbá nagyobb prokoaguláns trombocita-aránnyal (42,6%) rendelkező betegeknél gyakrabban jelentkeztek ismétlődő iszkémiás események lakunáris stroke után [66].

Az agyi infarktuson kívül koszorúér-betegségben és szívelégtelenségben is megfigyelték a prokoaguláns vérlemezkék emelkedett arányát [67-69]. Az akut vaszkuláris események kapcsán

végzett "coated"-platelet vérlemezke-potenciál meghatározás a súlyosabb kórelfolyás előrejelzésében is segítséget nyújthat. Agyi aneurizma ruptúra kapcsán kialakuló subarachnoidális vérzés esetén a prokoaguláns vérlemezke-képződés növekedése összefüggést mutatott a késleltetett agyi iszkémia kialakulásával és a kongnitív funkciók szignifikáns romlásával [70,71]. A "coated"-vérlemezkek nagyobb átlagos aránya volt igazolható dohányozók esetén a nemdohányzókhoz képest [58,66,72]. Ez különösen fontos megfigyelés, mivel a dohányzás széles körben elterjedt és összefüggésben áll a szív- és érrendszeri betegségek fokozott kockázatával. A prokoaguláns vérlemezke-szám változását megvizsgálták olyan dohányos, stroke-on átesett betegeknél, akiknek egy része a stroke után leszokott a dohányzásról. Esetükben a "coated"-vérlemezke-képződés mértékének csökkenését észlelték [73].

A Scott-szindróma volt az első olyan felismert és klinikailag jelentős vérzési rendellenesség, amelyhez károsodott vérlemezke prokoaguláns-aktivitás társul [74]. Ebben a nagyon ritka, veleszületett vérzékenységgel járó rendellenességben a betegek trombocitáinak membránjában, a scramblase nevű enzim nem megfelelő működése miatt a vérlemezkek aktivációjakor a PS externalizáció elmarad [75,76]. A PS-expozíció hiányában csökken a vérlemezkek prokoaguláns aktivitása, amely növeli a vérzés kockázatát.

A spontán intracerebrális vérzésben szenvedő betegeket vizsgálva, szignifikánsan kisebb prokoaguláns vérlemezke-arányt találtak egészséges kontrollhoz képest ( $24,8 \pm 9,7\%$  vs.  $32,9 \pm 12,6\%$ ) [77]. Hasonló betegcsoportot vizsgálva, azoknál a betegeknél alakult ki súlyosabb, nagyobb kiterjedésű vérzés, akiknél a legkisebb volt a "coated"-vérlemezke produkció [78]. Egy másik vizsgálatban azt találták, hogy a vérzéses események kimenetele, és az ehhez köthető 30 napon belüli halálozás azoknál a betegeknél volt a legrosszabb, akiknél 27% alatti "coated"-vérlemezke arányt mértek [79]. Hasonlóképpen, azoknál a subarachnoideális vérzésben szenvedő betegeknél volt a legnagyobb az egy hónapos mortalitás, akik 36.7%-nál kisebb "coated"-vérlemezke képződést mutattak [80].

Ugyanakkor ellentmondásos megfigyelésekről számoltak be a prokoaguláns vérlemezke képződéssel kapcsolatban hemofília A betegek két csoportjában. Mindkét tanulmány a "coated"-vérlemezkek csökkent számát igazolta a kontrollokhoz képest [81,82]. Míg azonban Saxena és munkársai [81] szignifikáns különbséget figyeltek meg a prokoaguláns trombocita-szám és a hemofília A fenotípus súlyossága között, ezt Lastrapes és munkatársai nem tudták igazolni. [82]. Esszenciális trombocitémia esetén azoknál a betegeknél, akik nem részesültek hidroxürea kezelésben, szignifikánsan kisebb "coated"-vérlemezke arányt észleltek. A hidroxürea kezelés alatt

álló betegek prokoaguláns vérlemezke termelődése közel megegyezett a kontroll csoportéval, függetlenül attól, hogy volt-e korábban tromboembóliás esemény a betegeknél [83].

### 3. Célkitűzések

Munkánk célja a Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Belgyógyászati Intézet, Hematológia Tanszékén gondozott CML-s betegek TKI kezelése során összegyűjtött beteg-, illetve betegség-specifikus adatok részletes feldolgozása, az eredmények értékelése, továbbá az adott TKI kezelés kapcsán észlelt mellékhatások vaszkuláris hematológiai hátterének *in vitro* és *ex vivo* vizsgálata az alábbiak szerint:

#### I.

A TKI kezelés megkezdése előtt, majd a kezelés során a társbetegségek, valamint az esetlegesen kialakuló mellékhatások pontos felmérése, rendszerezése. A nemkívánatos mellékhatások értékelése, és az alkalmazott TKI kezelés rizikó-adaptált módosítása, és az így elért eredmények prospektív módon való feldolgozása.

#### II.

A betegek részletes kardio-metabolikus szűrő vizsgálata a TKI kezelés kardiovaszkuláris mellékhatásának megelőzése céljából.

#### III.

A primer hemosztázis *in vitro* és *ex vivo* vizsgálata a dazatinib és ponatinib kezelés kiváltotta vaszkuláris hematológiai események laboratóriumi jellemzése céljából.

## 4. Betegek és módszerek

A Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Belgyógyászati Klinika, Hematológiai Tanszékén 2010. január 1. és 2020. május 31. között krónikus fázisú CML miatt TKI kezelésben részesülő 120 beteg adatait értékeltük, különös tekintettel a diagnóziskor már fennálló társbetegségekre, a kardiovaszkuláris rizikóra és az egyes TKI-kezelések mellett jelentkező szövődményekre.

A primer hemosztázis *in vitro* és *ex vivo* vizsgálatai során önkéntes, egészséges donorok, és különböző TKI kezelésben részesülő betegek citráttal alvadásgátolt mintáit vizsgáltuk klasszikus vérlemezke aggregációs módszerekkel (PFA-100, trombin generáció, kollagén indukálta aggregometria, ATP szekréció). Emellett gélfiltrált vérlemezkek (GFP) kettős agonistával (konvulxin + trombin) történő aktiválását követően a "coated"-vérlemezkek képződését határoztuk meg áramlási citometriai módszerrel TKI kezelés mellett, illetve annak hiányában.

A vizsgálati tervet és a betegdokumentumokat a Debreceni Egyetem helyi etikai bizottsága hagyta jóvá RKEB/IKEB 4875–2017 számú határozata alapján.

A vérlemezke aktivációs és aggregációs vizsgálatokhoz egészséges önkéntesek (n=11) (*in vitro* vizsgálatok), és krónikus fázisú CML (n=20) vagy Philadelphia kromoszóma pozitív akut limfoid leukémia (n=1) miatt dazatinib (n=10), ponatinib (n=5) vagy nilotinib (n=6) terápiában (*ex vivo* vizsgálatok) részesülő betegek GFP-jét használtuk. A trombocita-aggregáció-gátló kezelést (ha volt), a vizsgálat előtt 7 nappal felfüggesztettük, és mivel a diabetes mellitus is befolyásolhatja a "coated"-vérlemezke képződést [85], a cukorbetegeket kizártuk a vizsgálatból. A TKI kezelésben részesülő betegek a mintavétel időpontjában már legalább 4 hónapja folyamatos TKI kezelés alatt álltak.

A vizsgálatokhoz teljes vért vettünk a könyökhajlat vénájából 0,109 mol/L (3,2%) nátrium-citrátot tartalmazó csőbe (Becton Dickinson, San Jose, CA). A trombocita dús plazma (PRP) készítése során a mintát 10 percig 20°C-on 170 g-vel centrifugáltuk. A trombocita szegény plazma (PPP) készítésekor a vért 15 percig 20°C-on 1500 g-vel centrifugáltuk.

### 4.1. A vérlemezke funkció rutin laboratóriumi vizsgálata

A vérlemezke-funkció szűrése PFA-100 készülékkel (Siemens, Deerfield, IL, USA), kollagén/epinefrin (C/Epi) és kollagén/ADP (C/ADP) patronok használatával történt a berekesztési idő meghatározásával (closure time; CT). Az 1 µg/ml fibrilláris kollagén (Takeda, Linz, Ausztria) vagy 500 µg/ml AA (Labexpert Ltd., Debrecen, Magyarország) által kiváltott vérlemezke-

aggregációt és szekréción Chrono-Log 700 lumiaggregométerrel (Chrono) vizsgáltuk (Log Corp., Havertown, PA, USA). A vérlemezke-gazdag plazmában a vérlemezke számot  $250 \times 10^9/l$ -re állítottuk be trombocita-szegény plazma segítségével. Az aggregációs folyamatot 8 percig követtük, és az eredményeket a fényáteresztés maximális változásának százalékában fejeztük ki ( $\Delta T_{max} \%$ ). A trombocita aktiváció során felszabaduló ATP mennyiségét biolumineszcens módszerrel határoztuk meg luciferin-luciferáz reagenssel (Biotherma AB, Handen, Svédország). A maximális ATP szekréción  $\mu\text{mol ATP}/10^{11}$  vérlemezke-számban fejeztük ki.

#### **4.2. A vérlemezékben gazdag plazma előkészítése, és az *in vitro* és *ex vivo* vizsgálatok tervezése**

A fentebb leírt centrifugálást követően a PRP vérlemezke számát trombocita-szegény plazma hozzáadásával  $250 \times 10^9/l$ -re állítottuk be.

Egészséges önkéntesektől származó PRP-t használtunk a ponatinib hatásának *in vitro* vizsgálatához. A következő PRP mintákat állítottuk elő:

- nem előkezelt, kollagénnel vagy ADP-vel vagy konvulxinnal aktivált
- ponatinibbel előkezelt, kollagénnel vagy ADP-vel vagy konvulxinnal aktivált

Az előkezeléshez a ponatinibet 75, 150 és 1000 nM-os végkoncentrációban alkalmaztuk (10 perc, 37 °C). Az előkezelt vérlemezkéket aktiválására 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kollagén, vagy 5  $\mu\text{M}$  ADP-t vagy 125 ng/ml konvulxint használtunk. Az *ex vivo* vizsgálatok során dasatinib, ponatinib vagy nilotinib kezelésben részesülő betegek vérmintáiból készített PRP-kat 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kollagén, vagy 5  $\mu\text{M}$  ADP vagy 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  arahidonsav vagy 125 ng/ml konvulxin használatával aktiváltuk.

#### **4.3. Gélfiltrált vérlemezkek előállítása**

A PRP minták gélszűrését Sepharose CL-2B oszlopon (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) végeztük, és a tisztított vérlemezkéket  $40 \times 10^9/L$  sejtkoncentrációra állítottuk be BSGC-ben.

#### **4.4. Áramlási citometriai vizsgálatok**

Minden áramlási citometriás elemzést BD FACS-Canto II készüléken (Becton Dickinson, Mansfield, MA, USA) végeztünk, az adatokat pedig a BD FACSDiva szoftverrel (6.1.3 verzió) elemeztük.

#### **"Coated"-vérlemezkek értékelése**

A trombocita aktivációt 100  $\mu\text{l}$  ösztérfogóban értékeltük, amely Mix puffert (79  $\mu\text{l}$ ),  $40 \times 10^9/L$  koncentrációjú GFP-t (10  $\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  biotinizált fibrinogént (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Sigma-Aldrich) és 10  $\mu\text{l}$  agonistát tartalmazott. A konvulxin végső koncentrációja 125 ng/ml (Pentapharm, Basel, Svájc), a trombin koncentrációja 0,5 U/ml (szarvasmarha trombin; Sigma-Aldrich) volt. A Mix puffert a

következő komponensekből készítettük: 10 mM HEPES, 1 mg/ml BSA, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,25 mM MgCl<sub>2</sub> és 150 mM NaCl. A keveréket 10 percig 37°C-on inkubáltuk, majd a reakciót 200 µl 1%-os (tömeg/térfogat) paraformaldehiddel leállítottuk, és 20 percig szobahőmérsékleten fixáltuk. Fixálás után 3,5 ml 1 mg/ml BSA-t (PBS/BSA) tartalmazó PBS-t adtunk hozzá, és a mintát 1500 x g-vel 15 percig centrifugáltuk. A pelletet 200 µl anti-CD41a-PECy-vel és Streptavidin-PE-vel jelölt PBS/BSA-ban újra szuszpendáltuk, 20 percig szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk, majd PBS-sel történő mosás után ismét a fent említett módon centrifugáltuk, majd végül PBS-ben szuszpendáltuk. A "coated"-vérelemzések arányát százalékban (%) határoztuk meg.

#### ***Az $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin aktív konformációjának kimutatása***

Az  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin aktív konformációját nem aktivált, illetve 20 µM trombin receptor aktiváló peptiddel (TRAP) vagy 25 ng/ml konvulxinnal (GPVI agonista) aktivált minták fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált PAC1 és fikoeritrin-cianin 5 (PECy5)-konjugált CD41a antitestek kötésével határoztuk meg.

#### ***Vérelemzke-monocita heterotípusos aggregátumok vizsgálata***

A vérelemzke-monocita aggregátumok meghatározásához egészséges donoroktól (n=6) származó teljes vért 75, 150 és 1000 nM ponatinibbel vagy vivőanyaggal (0,2% DMSO) inkubáltunk 10 percig 37 °C-on, majd a mintákat konvulxinnal aktiváltuk, vagy aktiválás nélkül hagytuk, majd CD14 fikoeritrinnel (PE) és CD42a FITC-vel inkubáltuk. A vörösvérsejteket lizáltuk, a mintákat kétszer mostuk foszfáttal pufferezt sóoldattal (PBS), majd paraformaldehiddel rögzítettük. A vérelemzke-monocita aggregátumok százalékos arányát fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált CD42a kötéssel határoztuk meg. Az eredményeket minden esetben izotípus kontrollként szolgáló "non-immun" immunglobulin G (IgG) kontroll mintákkal hasonlítottuk össze.

#### **4.5. Alkalmazott statisztikai módszerek**

A statisztikai elemzésekhez a GraphPad Prism 6.01-es verzióját használtuk. Az adatok eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel értékeltük. Az *in vitro* kísérleti csoportok közötti különbségek statisztikai szignifikanciáját Gauss-eloszlás esetén egytényezős ANOVA-val, nem Gauss-eloszlás esetén Kruskal Wallis teszttel elemeztük. A CML-es betegek gyógyszeradagolás előtti (0 óra), illetve a gyógyszeradagolás után 1 és 4 órával kapott eredményei között adódó különbségek statisztikai szignifikanciáját Gauss-eloszlás esetén páros Student-féle t-próbával, nem Gauss-eloszlás esetén Wilcoxon rangpróbával elemeztük. A különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p-értékek 0,05 alatt voltak. A TKI kezelésben részesülő CML-es betegek túlélését Kaplan-Meier becsléssel határoztuk meg.

## 5. Eredmények

### 5.1. A CML-es betegcsoport klinikai vizsgálata

2010. január 1. és 2020. május 31. között 120 krónikus fázisú CML miatt TKI kezelésben részesülő beteg adatait értékeltük (korábban diagnosztizált és gondozás alatt álló, illetve az ezen időszak alatt újonnan felismert betegek). Az átlagéletkor a diagnóziskor 49 év (15–82 év), a diagnózistól számított átlagos követési idő 110 hónap (3–353 hónap) volt. A betegek demográfiai jellemzőit, rizikó besorolását (n=73) és az első vonalban választott TKI-kezelést az 2. táblázatban ismertetjük. A TKI kezelés összesített ideje 14 303 hónap volt. A betegek jelentős része (78,3%) az első vonalban imatinib kezelésben részesült. Az első vonalban alkalmazott imatinib kezelés mellett 34,2%-ban alakult ki intolerancia vagy rezisztencia.

**2. táblázat: A vizsgált betegek nemek szerinti megoszlása, ELTS alapján megállapított rizikó megoszlása és az első vonalban alkalmazott TKI kezelés típusa**

|                                       |     |
|---------------------------------------|-----|
| Összes beteg                          | 120 |
| férfi                                 | 68  |
| nő                                    | 52  |
| ELTS szerinti rizikó besorolás (n=73) |     |
| kis                                   | 19  |
| közepes                               | 31  |
| nagy                                  | 23  |
| Első vonalban adott TKI               |     |
| imatinib                              | 88  |
| $\alpha$ -INF + imatinib              | 6   |
| dazatinib                             | 6   |
| nilotinib                             | 17  |
| bozutinib (klinikai tanulmány)        | 3   |

TKI: tirozinkináz-gátló, ELTS: EUTOS long term survival,  $\alpha$ -INF:  $\alpha$ -interferon

A második, illetve többedik vonalban alkalmazott, második és harmadik generációs TKI kezelés típusait a 3. táblázat ismerteti. Akcelerált, illetve blasztos fázis 3 esetben fordult elő. Mindhárom eset T315I-mutáció jelenlétében, valamint már ponatinib kezelés mellett alakult ki, és halálos kimenetelű volt. Allogén őssejt transzplantációra 2 beteg esetén az idős kor, 1 beteg esetén pedig megfelelő donor hiánya miatt nem kerülhetett sor. Egy beteg esetében TKI-rezisztencia (igazolt, többszörös *BCR::ABL1* mutáció) és intolerancia (súlyos és elhúzódó hematológiai toxicitás) miatt

összesen ötféle TKI kezelést követően aszcininib terápia indult, amely mellett megfelelően mély molekuláris válasz alakult ki, ám végül addicionális kromoszóma eltérések miatt testvér-donoros allogén őssejt transzplantációra került sor.

**3. táblázat: Második és többedik vonalban alkalmazott TKI kezelés típusai**

| Második vonalban adott TKI  | betegszám (n) |
|-----------------------------|---------------|
| nilotinib                   | 24            |
| dazatinib                   | 40            |
| bozutinib                   | 4             |
| ponatinib (T315I mutáció)   | 3             |
| Harmadik vonalban adott TKI |               |
| nilotinib                   | 17            |
| dazatinib                   | 5             |
| Negyedik vonalban adott TKI |               |
| bozutinib                   | 5             |
| ponatinib                   | 6             |

TKI: tirozinkináz-gátló

A vizsgált időszakban a CML-hez köthető mortalitás 2,5% volt. A PFS 81%, a teljes túlélés 87% volt. Az első vonalban alkalmazott imatinib kezelésről második generációs TKI-ra váltás oka 68%-ban intolerancia, 32%-ban rezisztencia (primer rezisztencia 5%) volt.

## 5.2. A TKI kezelés során észlelt mellékhatások értékelése

A vizsgált időszakban részletesen áttekintettük a TKI terápia során jelentkező mellékhatásokat, különös tekintettel a kardiometabolikus eltérésekre, melyek pontos felméréséhez a 4. táblázatban ismertetett szűrővizsgálatokat végeztük el. Értékeljük a nemkívánatos mellékhatások miatt alkalmazott terápia módosítások szükségességét, illetve a kialakult szövődmények kezelésének szakmaspecifikus klinikai gyakorlatát.

**4. táblázat: Az egyes TKI kezelések kapcsán javasolt kardiometabolikus szűrővizsgálatok**

|  | imatinib | dazatinib | nilotinib | bozutinib | ponatinib |
|--|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>kezelés megkezdése előtt</i>                        |          |           |           |           |           |
| vérnyomás  | ✓        | ✓         | ✓         | ✓         | ✓         |
| boka-kar index   | -        | -         | ✓         | -         | ✓         |
| lipid paraméterek                                      | ✓        | ✓         | ✓         | ✓         | ✓         |
| vércukor/HgbA1C  | ✓        | ✓         | ✓         | ✓         | ✓         |
| EKG  | ✓        | ✓         | ✓         | ✓         | ✓         |
| szív-ultrahang   | -        | ✓         | ✓         | -         | ✓         |
| <i>1 hónap TKI kezelést követően</i>                   |          |           |           |           |           |
| vérnyomás  | ✓        | ✓         | ✓         | ✓         |           |
| EKG (QT idő!)  | -        | ✓         | ✓         | ✓         | ✓         |
| vércukor   | -        | -         | ✓         | -         | ✓         |
| <i>3 és 6 hónap TKI kezelést követően, majd évente</i> |          |           |           |           |           |
| vérnyomás  | ✓        | ✓         | ✓         | ✓         | ✓         |
| boka-kar index   | -        | -         | ✓         | -         | ✓         |
| lipid paraméterek                                      | -        | -         | ✓         | -         | ✓         |
| vércukor/HgbA1C  | -        | -         | ✓         | -         | ✓         |
| EKG  | -        | ✓         | ✓         | -         | ✓         |
| szív-ultrahang   | -        | -         | ✓         | -         | ✓         |

TKI: tirozinkináz-gátló

***Hematológiai toxicitás***

Az egyes TKI kezelések kapcsán felismert hematológiai toxicitások típusát és előfordulásuk gyakoriságát a 5. táblázatban tüntettük fel. Dazatinib kezelés mellett észleltünk leggyakrabban vérkép eltérést (anémia, neutropénia vagy trombocitopénia), valamint a dazatinib terápia közben alakult ki legtöbbször (69%) grade 3-4 trombocitopénia is. A dazatinib dózisának csökkentésével vagy átmeneti kihagyásával, majd a citopénia rendeződését követően a gyógyszer csökkentett dózisban (napi 1x50 mg) való visszaadásával terápia váltásra egyetlen esetben sem volt szükség. Miután a csökkentett dazatinib dózis mellett a vérkép minden esetben tartósan stabil volt, a napi 100 mg dazatinib dózis visszaadható volt. Bozutinib kezelés mellett is gyakran észleltünk hematológiai toxicitást. Két esetben terápia váltásra volt szükség elhúzódó grade 3 neutropénia miatt. Napi 2x300 mg nilotinib kezelés mellett 35%-ban alakult ki súlyos (grade 3-4) hematológiai mellékhatás. Ezek közül két esetben a neutropénia fennállása igen elhúzódó volt (3 és 7 hónap). Imatinib kezelés mellett észlelt neutropénia az emelt dózisok (napi 600 mg vagy 800 mg) kapcsán alakult ki gyakrabban. A sztenderd (napi 400 mg) imatinib dózis mellett észleltük a legkevesebb hematológiai mellékhatást. A ponatinib kezelésben részesülő betegek kis száma (n=9) miatt az észlelt toxicitás nem volt reprezentatív. Egy esetben észleltünk grade 2 súlyosságú trombocitopéniát napi 1x45 mg ponatinib dózis esetén.

**5. táblázat: Súlyos (grade 3-4) hematológiai toxicitás gyakorisága az egyes TKI kezelések kapcsán**

| TKI/napi dózis (n)    | anémia | neutropénia | trombocitopénia |
|-----------------------|--------|-------------|-----------------|
| imatinib/400 mg (91)  | 36%    | -           | 26%             |
| imatinib/600 mg (3)   | 67%    | 67%         | 33%             |
| nilotinib/600 mg (27) | 18%    | 35%         | 18%             |
| nilotinib/800 mg (38) | 32%    | 22%         | 39%             |
| bozutinib/400 mg (12) | 42%    | 25%         | 67%             |
| dazatinib/100 mg (51) | 61%    | 76%         | 69%             |
| ponatinib/45 mg (8)   | -      | 13%         | 25%             |
| ponatinib/30 mg (6)   | -      | -           | 17%             |

### ***Kardiovaszkuláris eltérések***

Az Európai Kardiológus Társaság által meghatározott rizikó besorolás alapján [84] a nagy és közepes kardiovaszkuláris kockázatú betegeknél minden esetben imatinib kezelést indítottunk. Az első vonalban adott imatinib kezelés mellett (n=88) nem tapasztaltunk kardiovaszkuláris szövődményt. Kis kardiovaszkuláris rizikó, fiatal kor ( $\leq 60$  év), nagy ELTS-pontszám [12], és egyéb társbetegségek (diabetes mellitus, COPD, hipertónia, perifériás artériás érbetegség, stb.) hiányában, második generációs TKI (dazatinib vagy nilotinib) terápiát indítottunk el. Dazatinib kezelés (n=6) mellett nem tapasztaltunk kardiovaszkuláris szövődményt. Nilotinib terápia (n=17) esetén 2 betegnél stroke, 3 betegnél perifériás artériás elzáródásos betegség, 5 betegnél hipertónia jelentkezett. A stroke és az érszűkület eseteiben a kezelést imatinib adásával folytattuk (n=3), vagy az elért mély molekuláris válasz miatt a TKI kezelést sikeresen végleg elhagytuk (TFR, n=2). A kezelés során észlelt hypertonia esetén (n=5) a betegek terápiáját bozutinibre (n=3) vagy dazatinibre (n=2) váltottuk, illetve megfelelő vérnyomáscsökkentő kezelést kezdtünk el. QTc-idő megnyúlást, vagy szívelégtelenségre utaló szív-ultrahang vizsgálati eltérést egyetlen betegnél sem észleltünk. Többedik terápiás vonalban, T315I-mutáció vagy megelőző imatinib és legalább két második generációs TKI kezelés eredménytelensége esetén alkalmazott, napi 1×45 mg ponatinib kezelés mellett (n=9) három esetben alakult ki vaszkuláris szövődmény (egy-egy stroke, PAOD és mélyvénás trombózis). Mindhárom beteg megelőzően nilotinib kezelésben is részesült. Nem tapasztaltunk kardiovaszkuláris komplikációt második vagy harmadik vonalban alkalmazott bozutinib terápia során (6. táblázat).

### ***Pulmonális események***

Emelt dózisú (napi 1×600 mg) imatinib kezelés (n=3) mellett egy esetben alakult ki nem súlyos (grade 2) mellkasi folyadékgyülem, amely az imatinib terápia átmeneti elhagyását, és vízajtó adását követően napi 1×400 mg dózisban ismét visszaadhatóvá vált. Az első vonalban alkalmazott, napi 1×100 mg dazatinib kezelés (n=6) mellett egy esetben észleltünk nem súlyos (grade 2) mellkasi folyadékgyülemet. A dazatinib átmeneti elhagyását és vízajtó adását követően a dazatinib előbb csökkentett (napi 1×70 mg), később teljes dózisban biztonságosan visszaadható volt. A második vonalban adott dazatinib terápia (n=40) során négy esetben jelentkezett enyhe (grade 1-2) és két esetben súlyos (grade 3) mellkasi folyadékgyülem (6. táblázat). A súlyos formában jelentkező hydrothorax miatt terápia váltásra (bozutinibre) volt szükség.

### ***Metabolikus eltérések***

A CML diagnózisának megállapításakor 17 esetben volt ismert 2-es típusú cukorbetegség. Ezen betegek döntő többségénél (n=15) imatinib kezelés indult, és a vércukor háztartás az imatinib kezelés mellett is egyensúlyban maradt. Két esetben napi 2×300 mg nilotinib terápia indult, a vércukor háztartás nem változott, a korábbi antidiabetikus kezelésem nem kellett módosítani, de a kezelés alatt mindkét esetben emelkedett lipidértékeket észleltünk, és sztatin terápia is szükségessé vált. Az első vonalban alkalmazott, napi 2×300 mg nilotinib terápia (n=17) esetén csökkent glükóztolerancia három betegnél alakult ki. Két esetben dazatinibre váltottunk, egy esetben diétával és életmód-változtatással a nilotinib kezelés tartósan folytatható volt, a beteg DMR-t ért el, és a nilotinib végleg elhagyhatóvá vált (TFR). A második vonalban napi 2×400 mg nilotinib terápia mellett (n=24) két alkalommal észleltünk antidiabetikus kezelést (metformin) igénylő cukorbetegséget (6. táblázat). A nilotinib elhagyását követően, dazatinib kezelés mellett a metformin elhagyható volt.

### ***Gasztroenterológiai szövődmények***

Bozutinib kezelés (n=12) mellett jelentkezett a leggyakrabban gasztroenterológiai mellékhatás (hasmenés), amely az esetek jelentős részében (n=10) enyhe volt (grade 1-2), és a kezelés indítását követő 2–4. héten jelentkezett. A két súlyos (grade 3) esetben a bozutinibet véglegesen el kellett hagynunk, és terápia módosításra volt szükség. Az enyhe esetekben a bozutinib kezelés átmeneti felfüggesztése, tüneti terápia (loperamid), majd kis dózissal (napi 1×100 mg) való fokozatos dózisszabályozás mellett a hasmenéses tünetek jól uralhatók voltak. Két idős betegnél napi 1×200 mg bozutinib terápia mellett DMR alakult ki. Az első vonalban adott, napi 2×300 mg nilotinib kezelés (n=17) kapcsán észleltünk 3 esetben enyhe (grade 1 vagy 2) hasmenést. A nilotinib átmeneti kihagyását követően a tünetek megszűntek, és ismételt elindítását követően nem jelentkeztek újra.

Nilotinib kezelés kapcsán 3 esetben észleltünk átmeneti szérum amiláz- és lipáz-szint emelkedést, melyek nem okoztak hasi tüneteket és a gyógyszer kihagyását követően rendeződtek. Ponatinib kezelés során két beteg esetében alakult ki súlyos hasnyálmirigy gyulladás, amely miatt a ponatinib kezelést fel kellett függeszteni (6. táblázat).

Sor került betegeink hepatitisz szerológiai szűrővizsgálatára is, amely minden esetben negatívnak bizonyult hepatitisz B- és C-vírus tekintetében. A TKI kezelés mellett nem észleltünk jelentősebb májfunkciós eltéréseket, emiatt terápia-módosításra nem volt szükség. Betegeinknél napi 1x100 mg dazatinib kezelés során két alkalommal jelentkezett súlyos, transzfúziót igénylő gasztrointesztinális vérzés. Kolonoszkópos vizsgálat során mindkét esetben hemorrágiás kolitisz igazolódott. A primer hemosztázis vizsgálata során a vérlemezke-aggregáció gátlása mellett csökkent "coated"-vérlemezke képződés is kimutatható volt (lásd 5.3 fejezet). Ez utóbbi a dazatinib primer hemosztázisra kifejtett gátló hatásának érzékeny indikátora [36]. A dazatinibet elhagytuk, és imatinib kezelésre tértünk át. Újabb gasztrointesztinális vérzést nem észleltünk.

**6. táblázat: Az egyes TKI kezelések kapcsán észlelt nem hematológiai mellékhatások gyakorisága**

| TKI              | hipertónia | stroke | MVT | PAOD | mellkasi folyadék | csökkent glükóz tolerancia | DM | hasmenés | amiláz, lipáz emelkedés*<br>pancreatitis** | GI vérzés |
|------------------|------------|--------|-----|------|-------------------|----------------------------|----|----------|--|-----------|
| imatinib (n=94)  | -          | -      | -   | -    | 1                 | -                          | -  | -        | -  | -         |
| dazatinib (n=51) | -          | -      | -   | -    | 7                 | -                          | -  | -        | -  | 2         |
| nilotinib (n=58) | 5          | 2      | -   | 3    | -                 | 3                          | 2  | 3        | 3*   | -         |
| bozutinib (n=12) | -          | -      | -   | -    | -                 | -                          | -  | 12       | -  | -         |
| ponatinib (n=9)  | 3          | 1      | 1   | 1    | -                 | -                          | -  | -        | 2**  | -         |

TKI: tirozinkináz-gátló, MVT: mélyvénás trombózis, PAOD: perifériás arteriális obstruktív érbetegség, DM: diabetes mellitus, GI: gasztrointesztinális

**Fogamzás és terhesség**

Családtervezési szándékkal egy fiatal nőbetegünk esetén MR4,5 mélységű molekuláris válasz mellett (*BCR::ABL1* [IS]: 0,0032%) a nilotinib kezelést az *in vitro* fertilizáció időszakára több alkalommal átmenetileg felfüggesztettük, a fogamzás azonban többszöri próbálkozással sem történt meg. A DMR fokozatos elvesztése miatt a nilotinib kezelést ismét elindítottuk, melyet követően a *BCR::ABL1* [IS] érték 6 hónapon belül a korábbi, megfelelően mély értékre csökkent (*BCR::ABL1* [IS]: 0,002%).

Egy dazatinib, majd később ponatinib kezelésben részesülő fiatal férfi betegünknek mindkét TKI terápia alatt gyermeke fogant, majd egészséges gyermekei születtek.

### 5.3. A primer hemosztázis eltérések vizsgálata TKI kezelés során

#### 5.3.1 A dazatinib hatásának vizsgálata a primer hemosztázisra

Azon korábbi megfigyelések alapján, amelyek szerint a dazatinib gátolja a trombocita-aggregációt [86], valamint hogy a csökkent "coated"-vérlemezke képződés a vérzékenység egyik érzékeny mutatója [78,81], vérlemezke aggregációs és "coated"-vérlemezke funkciós vizsgálatokat végeztünk. A dazatinib primer hemosztázisra kifejtett *in vitro* és *ex vivo* hatásainak részletes elemzéséhez egészséges önkéntesek és dazatinib, valamint (negatív kontrollként) nilotinib kezelésben részesülő betegek vérlemezke funkcióit vizsgáltuk meg (az *in vitro* vizsgálatok eredményeit a társszerző korábban már bemutatta). A vizsgált betegek adatait a 7. táblázatban foglaltuk össze.

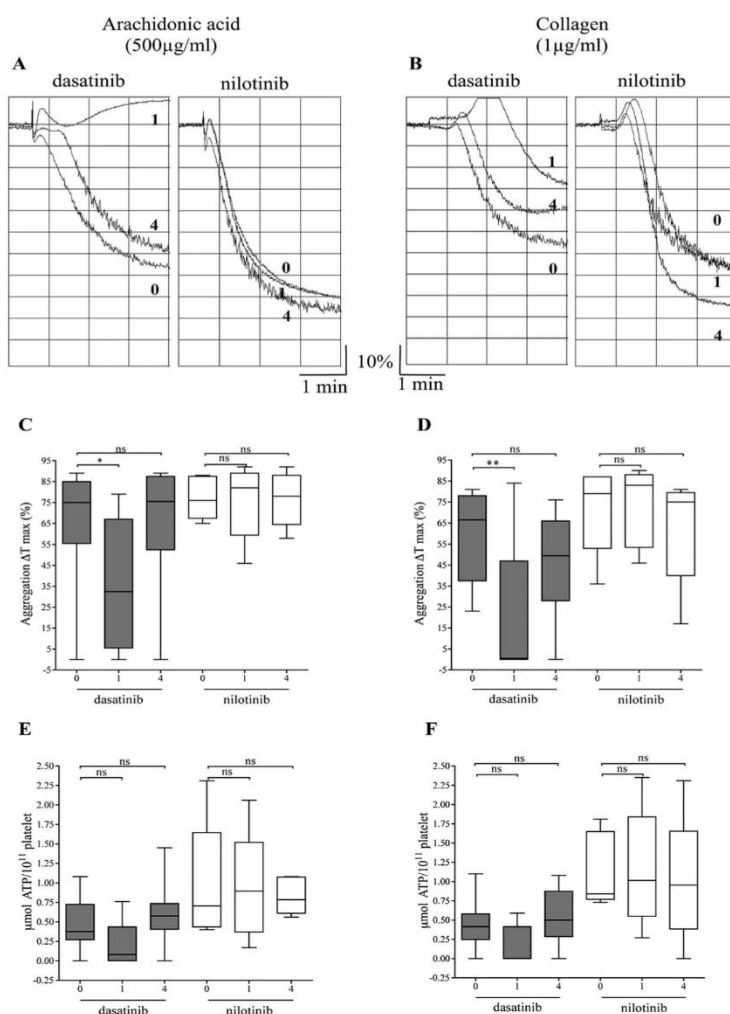
#### 7. táblázat: Az *ex vivo* kísérletek során vizsgált - TKI kezelésben részesülő - betegek jellemzői

| A dazatinib kezelésben részesülő betegek jellemzői |       |              |                                       |                                     |                              |        |
|--|-------|--------------|---------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|--------|
| beteg  | nem   | életkor (év) | TKI kezelés teljes időtartama (hónap) | a dazatinib kezelés terápiás vonala | vérlemezke szám ( $10^9/L$ ) | vérzés |
| 1  | nő    | 29           | 13                                    | második                             | 363                          | nem    |
| 2  | férfi | 84           | 9                                     | második                             | 147                          | GI     |
| 3*   | férfi | 41           | 6                                     | első                                | 231                          | nem    |
| 4  | férfi | 43           | 39                                    | második                             | 183                          | nem    |
| 5  | nő    | 66           | 160                                   | második                             | 143                          | nem    |
| 6  | nő    | 80           | 34                                    | második                             | 235                          | nem    |
| 7  | férfi | 59           | 157                                   | második                             | 187                          | nem    |
| 8  | férfi | 83           | 168                                   | második                             | 146                          | nem    |
| 9  | férfi | 65           | 4                                     | második                             | 171                          | GI     |
| 10   | nő    | 59           | 5                                     | második                             | 220                          | nem    |
| A nilotinib kezelésben részesülő betegek jellemzői |       |              |                                       |                                     |                              |        |
| beteg  | nem   | életkor (év) | TKI kezelés teljes időtartama (hónap) | a nilotinib kezelés terápiás vonala | vérlemezke szám ( $10^9/L$ ) | vérzés |
| 1  | nő    | 63           | 61                                    | harmadik                            | 293                          | nem    |
| 2  | nő    | 67           | 197                                   | második                             | 224                          | nem    |
| 3  | nő    | 33           | 126                                   | második                             | 249                          | nem    |
| 4  | nő    | 77           | 64                                    | második                             | 209                          | nem    |
| 5  | férfi | 82           | 70                                    | második                             | 187                          | nem    |
| 6  | nő    | 79           | 34                                    | harmadik                            | 248                          | nem    |

\*Philadelphia kromoszóma pozitív ALL, GI: gasztrointesztinális

A "coated"-vérlemezke képződést gélfiltrált trombocitákban, az aggregációs folyamatokat pedig PFA-100 trombocita funkciós teszttel (teljes vér) és trombocita aggregometriával (PRP) vizsgáltuk. Feltételeztük, hogy a "coated"-vérlemezke képződés megfelelően érzékeny és hatékony eszköz lehet a dasatinib kezelés során jelentkező, vérlemezke aktivációs eltérésekhez kapcsolódó hemorrágiás állapotok kimutatásában.

Dasatinib vagy nilotinib kezelés alatt álló betegek vérlemezke aggregációját és ATP-felszabadulását vizsgáltuk közvetlenül a gyógyszer bevétele előtt (0 óra), majd azt követően 1 és 4 órával. A maximális aggregáció szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető 1 óra elteltével mindkét vizsgált trombocita agonista esetében (AA:  $p \leq 0,05$ , kollagén:  $p \leq 0,01$ ). Az aggregációs görbék 4 órával a gyógyszer bevitelét követően normalizálódtak (3. ábra A-D panelek). Hasonló, de nem szignifikáns változásokat figyeltünk meg az ATP felszabadulását vizsgálva (3. ábra E-F panelek). A nilotinibbel kezelt csoportban nem volt változás.



Az ábra első két panelén egy dasatinib (100 mg QD), és egy nilotinib (400 mg BID) kezelésben részesülő beteg trombocita-aggregációs görbéi láthatók. Arachidonsavat (500 µg/ml) és kollagént (1 µg/ml) használtunk agonistaként, és ábrázoltuk az aggregációs görbéket a TKI beadása előtt (0), és utána 1 és 4 órával (A, B panelek). Dasatinib kezelésben részesülő betegeknél 1 óra elteltével mindkét vizsgált trombocita-agonista (arachidonsav:  $p \leq 0,05$ , kollagén:  $p \leq 0,01$ ) maximális aggregációjában szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető. Az aggregációs görbék 4 órával a TKI bevitelét követően normalizálódtak. Nilotinib kezelés esetén nem volt változás. A vérlemezke-aggregáció és az ATP-felszabadulás eredményeit is bemutatjuk a TKI bevétele előtt (0), és a bevitel után 1 és 4 órával (C-F panelek). Dasatinib esetében (n=10) a bevitelt követően 1 órával mindkét agonistával szemben szignifikáns csökkenés volt kimutatható a maximális aggregációban (C, D panelek). Az aggregációs görbék 4 órával a dasatinib bevétele után normalizálódtak. Hasonló, de nem szignifikáns változások voltak megfigyelhetőek az ATP-felszabadulásban (E, F panelek). A nilotinibbel kezelt csoportban (n=6) nem volt változás. (QD: naponta egyszer, BID: naponta kétszer, ns: nem szignifikáns, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ ).

**3. ábra: A dasatinib és a nilotinib időfüggő ex vivo hatásai a vérlemezke-aggregációra**

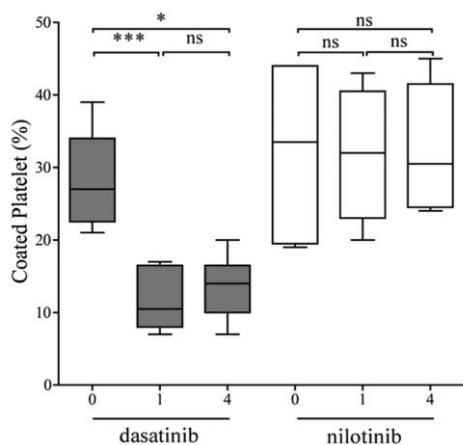
A PFA-100 méréseket is az adott TKI beadása előtt (0 óra), majd azt követően 1 és 4 órával végeztük el. A dazatinibbel kezelt betegekből származó mintákban a PFA-100 vizsgálatok során a kiindulási eredményekhez képest a C/Epi záródási idő szignifikáns megnyúlását figyeltük meg a bevételt követően 1 órával ( $p \leq 0,05$ ). A záródási idők 4 órával a dazatinib bevételét követően közel normalizálódtak. A nilotinibbel kezelt csoportban itt sem észleltünk változást (8. táblázat).

**8. táblázat: A dazatinib és a nilotinib időfüggő *ex vivo* hatásai PFA-100 zárási időkre**

| TKI<br>kezelés      | A vérvétel<br>ideje a TKI<br>bevételéhez<br>képest (h) | Záródási idők átlaga<br>(+/-SD)<br>C/Epi (sec) | Záródási idők átlaga<br>(+/-SD)<br>C/ADP (sec) |
|---------------------|--|--|--|
| Dazatinib<br>(n=10) | 0  | 124 ± 32                                       | 86 ± 13  |
|                     | 1  | 224 ± 88*                                      | 95 ± 8   |
|                     | 4  | 154 ± 61                                       | 86 ± 13  |
| Nilotinib<br>(n=6)  | 0  | 102 ± 28                                       | 84 ± 18  |
|                     | 1  | 98 ± 18  | 77 ± 10  |
|                     | 4  | 97 ± 14  | 79 ± 16  |

A PFA-100 méréseket a TKI beadása előtt (0), és a bevétel után 1 és 4 órával végeztük. A dazatinib-kezelésben részesülő betegeknél (100 mg QD, n=10) a kiindulási értékhez képest a kollagén/epinefrin záródási idejének jelentős megnyúlását észleltük a bevételt követően 1 órával. Négy órával a dazatinib bevételét követően a zárási idők közel voltak a kiindulási értékekhez. A nilotinibbel kezelt csoportban nem volt változás (400 mg BID, n=6). (QD: naponta egyszer, BID: naponta kétszer. \* $p \leq 0,05$ ).

A dazatinibbel kezelt CML-es betegekből származó *ex vivo* mintákban a "coated"-vérlemezske képződés szignifikáns csökkenését észleltük a gyógyszer bevételét követően 1 órával. Ez a hatás 4 órával a gyógyszer expozíciója után is kimutatható volt a dazatinibbel kezelt csoportban. A nilotinibbel kezelt csoportban nem figyeltünk meg változást (4. ábra).



Az ábrán TKI bevétele előtt (0) és a bevétel után különböző időpontokban (1 és 4 óra) a "coated"-vérlemezkék képződésének eredményei láthatók. Az *ex vivo* minták dasatinibbel (100 mg QD, n=10) vagy nilotinibbel (400 mg BID, n=6) kezelt CML-es betegektől származnak. A "coated"-vérlemezkék képződésének szignifikáns gátlása figyelhető meg 1 órával a dasatinib bevitelét követően. Ez a gátló hatás 4 órával a gyógyszer bevitelét követően is fennmaradt. A nilotinibbel kezelt csoportban nem volt változás. (QD: naponta egyszer, BID: naponta kétszer, ns: nem szignifikáns, \* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

#### 4. ábra: A dasatinib és a nilotinib időfüggő *ex vivo* hatásai a "coated"-vérlemezkék képződésére

### 5.3.2. A ponatinib hatásának vizsgálata a primer hemosztázisra

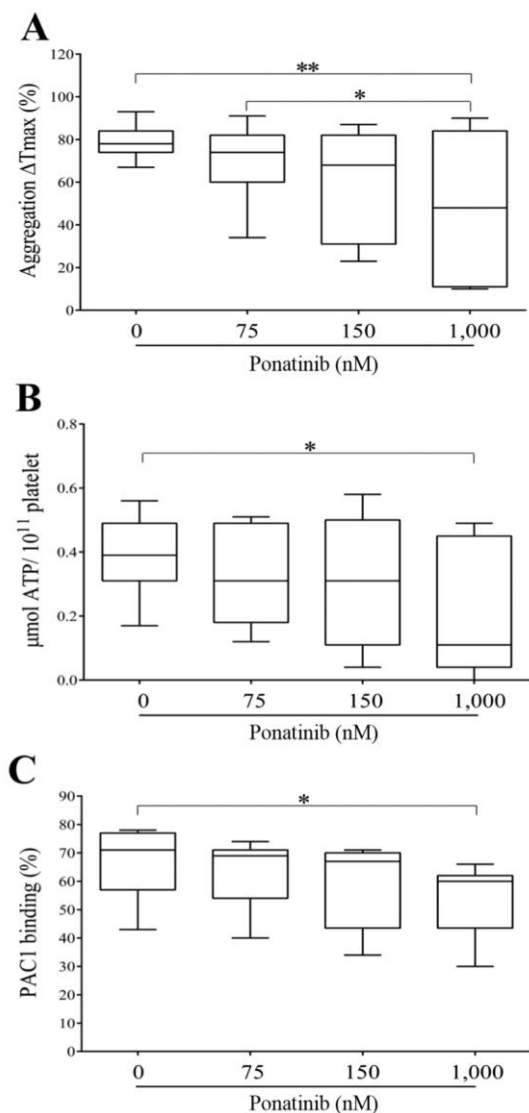
A ponatinib trombocita-funkcióra kifejtett ellentmondásos hatásainak további részletes elemzése céljából kísérleteinkben a ponatinib *in vitro* hatását vizsgáltuk a kollagén által kiváltott trombocita-aggregációra, az ATP szekréciónak és a "coated"-trombocita-képződésre. Továbbá *ex vivo* minták alapján értékeltük a ponatinib hatását a kollagén által kiváltott trombocita-aggregációra.

#### *A ponatinib hatása a vérlemezke-aggregációra és az $\alpha IIb\beta 3$ integrin aktiválására*

A vérlemezkék aktiválása számos agonista-specifikus vérlemezke receptoron keresztül jön létre. A primer hemosztázis folyamata során a vérlemezkék extracelluláris mátrix fehérjékhez való adhézióját a vérlemezkék aktiválódása és aggregációja követi. E folyamatok során ADP szabadul fel a vérlemezke dens granulumaiból, amely további trombocita aktivációt okozva elősegíti a trombus képződését. Kísérleteinkben PRP környezetben vizsgáltuk a kollagén és az ADP által kiváltott aggregációt ponatinib jelenlétében vagy anélkül. A kollagénre adott aggregációs válasz (5A ábra) és ATP-szekréciónak (5B ábra) koncentrációtól függőnek bizonyult, és ez a jelenség 1000 nM ponatinib koncentrációnál vált szignifikánssá mindkét vizsgált paraméternél (a fényáteresztés változásának maximuma ( $\Delta T_{max}$ ) és ATP szekréciónak). Ugyanakkor az ADP (5  $\mu M$ ) által kiváltott aggregáció során sem a trombocita-aggregációt, sem az ATP-szekréciónak nem befolyásolta a ponatinib.

Az  $\alpha IIb\beta 3$  integrin aktivációja az egyik legfontosabb lépés a vérlemezke-aggregáció során. Emiatt megvizsgáltuk a ponatinib hatását az aktivált  $\alpha IIb\beta 3$  mennyiségére PAC1 (egy monoklonális antitest, amely a GPIIb/IIIa receptor aktivált formáján lévő fibrinogénköti helyhez képes kapcsolódni) kötődés által. A ponatinib előkezelést követően a vérlemezkéket konvulxinallal aktiváltuk, és a PAC1 kötődését mértük. Megfigyeltük, hogy a ponatinib előkezelés dóziszfüggően

csökkentette a PAC1 kötő vérlemezkek százalékos arányát a konvulxinál aktivált mintákban, és ezek a változások szignifikánsnak bizonyultak 1000 nM ponatinib végső koncentrációjánál a konvulxin aktivált mintákban (5C ábra).



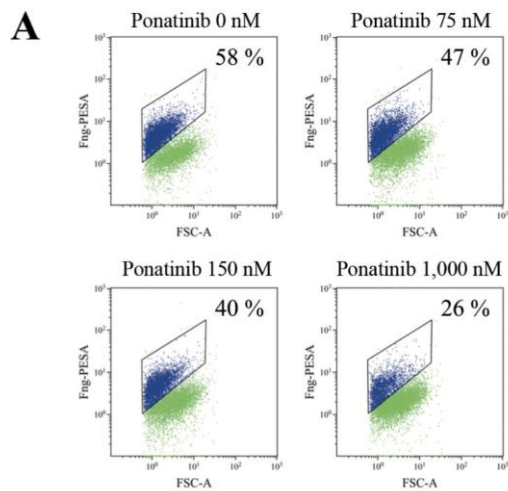
Az egészséges donoroktól (n=11) származó PRP-t 75, 150 és 1000 nM ponatinibbel vagy vivőanyaggal (0,2% DMSO) inkubáltuk 10 percig 37 °C-on, majd kollagénnel (1  $\mu\text{g/ml}$ ; n=11) kiváltott vérlemezke-aggregációt és adenoszin-trifoszfát (ATP) felszabadulást mértünk. A különböző ponatinib koncentrációkkal végzett előkezelés a kollagén által kiváltott aggregáció (A) és az ATP szekréció (B) dózisfüggő gátlását eredményezte, és ez a hatás 1000 nM ponatinib koncentrációjánál vált jelentőssé. Az aktivált  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  integrin mennyiségét fluoreszcein-izotiocianáttal konjugált PAC1 (FITC PAC1) kötődéssel határoztuk meg (n=9). A C panel a PAC1-kötő vérlemezkek százalékos arányának csökkenő tendenciáját mutatja ponatinibbel előkezelte mintákban konvulxin (25 ng/ml) által kiváltott aktiválás után. Szignifikáns különbség csak 1000 nM ponatinib koncentrációjánál volt megfigyelhető a konvulxinál aktivált mintákban. (aggregáció  $\Delta T_{max}$ : a minta maximális fényáteresztése, \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ).

## 5. ábra: A ponatinib *in vitro* hatása a vérlemezke-aggregációra és az $\alpha\text{IIb}\beta_3$ aktiválásra

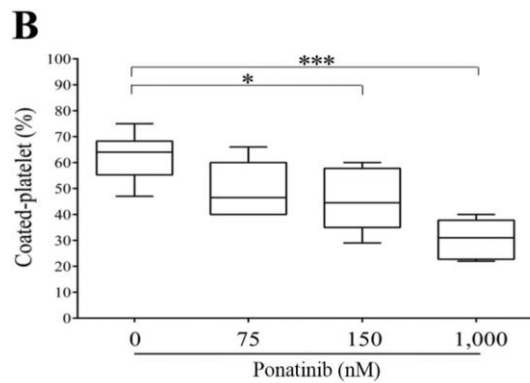
### A ponatinib hatása a "coated"-vérlemezke képződésre

Az *in vitro* vizsgálatok során egészséges donoroktól (n=11) származó GFP-t konvulxin és trombin keverékével aktiváltuk, és áramlási citometriával mértük a "coated"-vérlemezkek mennyiségét. A ponatinib előkezelés dózisfüggő módon gátolta a "coated"-vérlemezkek képződését (6A ábra). Hat párhuzamos kísérlet eredményeinek összegzése után arra a következtetésre jutottunk, hogy a ponatinib előkezelés már terápiás koncentrációban (150 nM) is szignifikánsan gátolta a "coated"-

vérlemezkék képződését, és a "coated"-vérlemezkék mennyisége további csökkenést mutatott 1000 nM ponatinib végkoncentrációnál (6B ábra).



Egészséges önkéntesektől származó GFP-t eltérő ponatinib koncentrációval (75, 150 és 1000 nM) inkubáltunk 10 percig 37 °C-on és a "coated"-vérlemezkék képződését biotinizált fibrinogén kötődéssel mértük (n=6). Az „A” panelen a ponatinibbel előkezelt "coated"-vérlemezkék fibrinogén-kötő pontdiagramjainak reprezentatív sorozata látható. A „B” panel diagramjai a "coated"-vérlemezkék százalékos arányát mutatják. A "coated"-vérlemezkék mennyisége szignifikánsan csökkent már 150 nM ponatinib koncentrációnál. (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001).



6. ábra: A ponatinib *in vitro* hatása a "coated"-vérlemezkék képződésére

Korábról az is ismert, hogy a CML-es betegek ponatinib-kezelése mérsékelten befolyásolta a vérlemezke-funkciót [87]. Ezen eredmények klinikai jelentőségének további vizsgálatára öt CML krónikus fázisában szenvedő és ponatinib kezelésben részesülő betegtől származó mintát vizsgáltunk meg. A betegek jellemzőit a 9. táblázat ismerteti.

9. táblázat: Ponatinib kezelésben részesülő CML-es betegek jellemzői

| beteg | nem   | kor<br>(év) | ponatinib<br>dózis<br>(mg/nap) | ponatinib<br>kezelés<br>(hónap) | ponatinib<br>kezelés<br>(vonal) | Vérlemezke szám (G/L) |       |
|-------|-------|-------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------|-------|
|       |       |             |                                |                                 |                                 | 0 óra                 | 4 óra |
| 1     | nő    | 78          | 15                             | 43                              | 3                               | 88                    | 91    |
| 2     | férfi | 41          | 30                             | 65                              | 4                               | 208                   | 211   |
| 3     | férfi | 51          | 30                             | 0.5                             | 3                               | 229                   | 231   |
| 4     | férfi | 38          | 30                             | 0.5                             | 4                               | 279                   | 250   |
| 5     | férfi | 53          | 45                             | 61                              | 5                               | 103                   | 97    |

CML: krónikus mieloid leukémia

A vérmintákat közvetlenül a ponatinib bevétele előtt (0 óra) és 4 órával a TKI bevétele után vettük le. A ponatinib napi dózisa az egyes betegek között eltérő volt, így az adatokat nem tudtuk együttesen értékelni, hanem egyedi eredményként értékeltük azokat. Az *in vitro* vizsgálatokhoz hasonlóan a kollagén által kiváltott trombocita aggregációt határoztuk meg a ponatinibbal kezelt betegek PRP mintáiban. Négy betegnél csökkent kollagén-indukált aggregációs választ mértünk a bevétel előtt levett mintákban. Ezenkívül megfigyeltük, hogy három betegnél volt csökkent a kollagén által kiváltott aggregációs válasz 4 órával a ponatinib beadása után (10. táblázat).

**10. táblázat: A kollagén által kiváltott aggregációs válasz jellemzői CML-es betegek esetén a ponatinib bevétele előtt és után**

| kontroll (n=6)<br>átlag ± SD | kollagén (1 µg/ml) ΔT max (%)<br>84.3±3.20 |                                       |
|------------------------------|--|---------------------------------------|
|                              | ponatinib előtt                            | 4 órával a ponatinib<br>bevétele után |
| beteg 1                      | <b>73</b>                                  | <b>69</b>                             |
| beteg 2                      | 84   | <b>69</b>                             |
| beteg 3                      | <b>73</b>                                  | 75                                    |
| beteg 4                      | <b>76</b>                                  | 76                                    |
| beteg 5                      | <b>60</b>                                  | <b>49</b>                             |
| átlag ± SD                   | 77.7±5.68                                  | 73.3±3.78                             |
| p-érték                      | 0.054                                      | 0.003*                                |

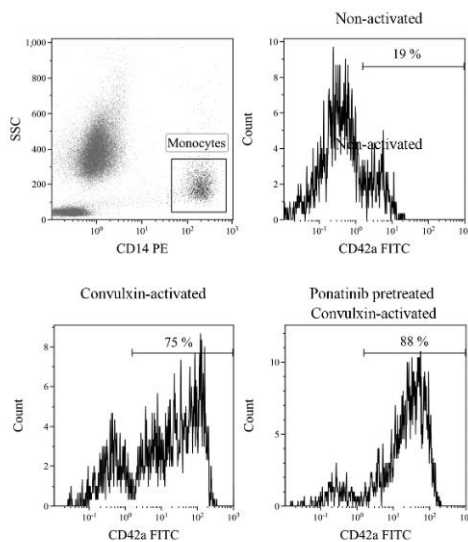
Napi 1x30 mg ponatinibet szedő betegek eredményeiből az átlagos, illetve az SD (sztenderd deviáció) értékeket statisztikailag számoltuk, összehasonlítva a páratlan t-próbát alkalmazó kontrollok eredményeivel. \*p≤0,05.

A ponatinib szignifikáns mértékben gátolta a kollagén által kiváltott aggregációt a ponatinibet szedő betegek esetében (bevétel utáni minták) a kontroll vérelemzések aggregációjához képest (p=0,003). Kiemelendő, hogy egy napi 1x30 mg ponatinib-kezelésben részesülő betegnél a ponatinib terápia megkezdése előtt és 2 hét ponatinib kezelést követően is végeztünk aggregációs vizsgálatokat. A kollagén által kiváltott aggregációk ΔTmax értékeit az alábbiak szerint figyeltük meg: ponatinib kezelés előtt 86%, illetve 73% és 75% a kezelés alatti időszakban a bevétel előtti és 4 órával az adagolás utáni mintákban.

### A ponatinib hatása a monocita-trombocita heterotípusos aggregátumok képződésére

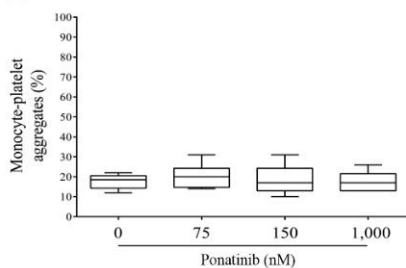
Korábbi irodalmi közlések szerint a ponatinib pro-trombotikus és pro-inflammatorikus hatást fejt ki a TKI-kezelés alatt álló CML-es betegekben [88]. Ezért feltételeztük, hogy a monocita-trombocita aggregátumok elemzése érzékeny indikátora lehet ezeknek a folyamatoknak [89,90]. Megvizsgáltuk a ponatinib hatását a monocita-trombocita heterotípus aggregátumok kialakulására is. Áramlási citometria vizsgálati módszerrel értékeltük a heterotípusos aggregátumok mennyiségének változását ponatinib előkezelés után nem aktivált és a GPVI receptor agonistával (konvulxin) aktivált mintákban. Nem aktivált vérlemezkéket különböző koncentrációjú ponatinibbel előkezelve nem figyeltünk meg változást a monocita-trombocita heterotípus aggregátumok mennyiségében (7A és 7B ábra). Ponatinib előkezelés és konvulxin aktiválás után a monocita-trombocita aggregátumok százalékos aránya dóziszfüggően nőtt, és ez hatás 1000 nM ponatinib előkezelésnél vált szignifikánssá (7C ábra).

**A**

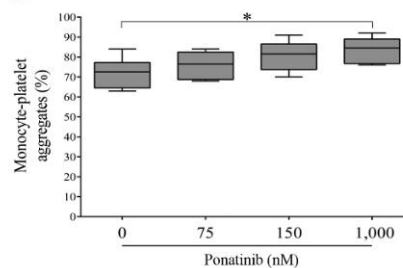


Egészséges donoroktól (n=6) származó teljes vért 75, 150 és 1000 nM ponatinibbal vagy vivőanyaggal (0,2% DMSO) inkubáltunk 10 percig 37 °C-on, majd a mintákat konvulxinnal aktiváltuk, vagy aktiválás nélkül hagytuk. A monocita-trombocita aggregátumok százalékos arányát fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált CD42a kötővel határoztuk meg (A). A hisztogram a monocita-kötő FITC-konjugált CD42a százalékos arányát mutatja nem aktivált (B) és konvulxinnal aktivált mintákban (C). A heterotípusos aggregátumok arányában növekvő tendencia figyelhető meg, de csak 1000 nM ponatinib okozott szignifikáns emelkedést a konvulxin aktivált mintákban (\*p<0,05).

**B**



**C**



**7. ábra: A ponatinib *in vitro* hatása a heterotípusos aggregátumok képződésére**

## 6. Megbeszélés

### 6.1. A TKI kezelés okozta mellékhatások

#### *Hematológiai toxicitás*

A dazatinib kezelés mellett észlelt gyakori hematológiai toxicitás háttérében a dazatinib széles spektrumú BCR::ABL1 gátlása áll. A kisebb specificitású, de a hematopoézis szempontjából fontos egyéb tirozin-kinázok (c-KIT, EPH A2, SRC, LYN, PDGFR) működését is gátolva, a dazatinib terápia gyakran citopénia kialakulásához vezet [91]. A TKI kezelés mellett észlelt anémia a TKI-k által okozott c-KIT gátlás következménye. Ez a receptor elengedhetetlen a normális vérképzéshez és az eritroid sejtek fejlődéséhez [92]. A neutropénia lehetséges oka a TKI-k aspecifikus kötődése az immunrendszer számos kulcsfontosságú kináz célpontjához (LCK, LYN, SRC) [93]. A neutropénia minden esetben gyorsan rendeződött a dazatinib kihagyásával, vagy a dózis csökkentésével. Hasonlóképpen, az imatinib is gátolja az LCK-t, de *in vitro* adatok alapján az LCK gátló hatása elmarad a dazatinibéhez képest. Ennek háttérében az áll, hogy az immunmoduláló hatások kiváltásához a szokásoshoz képest nagyobb szérumszint szükséges [94].

Ez összhangban van azzal a megfigyelésünkkel, hogy nagyobb imatinib dózis mellett gyakrabban alakult ki neutropénia.

A trombocitopénia kialakulásának oka szintén az SFK gátlásával magyarázható, amely a megakariociták és a vérlemezkék egyik fontos jelátviteli fehérjéje. Az SFK-k számos vérlemezke felszíni receptorról közvetítenek jelet, amelyek befolyásolják a vérlemezkék disszeminációját és a vaszkuláris környezetbe való migrációját. Ezért - annak ellenére - hogy a csontvelőben megnövekszik az érett megakaryociták száma, az SFK-k aspecifikus gátlása trombocitopéniát okoz a migráció és a proplatelet képződés gátlása révén [95-97]. A dazatinib és bozutinib kezelés kapcsán tapasztalt gyakoribb trombocitopénia az SFK-mediált receptor mechanizmusok gátlásával függhet össze. A dazatinib terápia kapcsán 68%-ban észleltük grade 3-4 trombocitopénia előfordulását. Ilyen esetben a dazatinib dózisának csökkentésével, vagy ideiglenes kihagyásával, majd a citopénia rendeződését követően a gyógyszer csökkentett dózisban (napi 1x50 mg) való visszaadásával terápia váltásra nem volt szükség. Miután a csökkentett dazatinib dózis mellett a vérkép stabil volt, a napi 100 mg dazatinib minden esetben visszaadható volt.

#### *Kardiovaszkuláris eltérések*

A CML felismerésekor a betegek több mint fele 65 évnél idősebb. Ennek megfelelően a kardiovaszkuláris megbetegedések előfordulása is gyakoribb, melyet saját beteganyagunkban is tapasztaltunk. Tartós (akár évtizedes) kezelés mellett az egyes TKI-k okozta kardiovaszkuláris rizikó (artériás és vénás tromboembólia, akut koronária szindróma, stroke, perifériás érbetegség,

hipertónia) igen eltérő gyakoriságú és súlyosságú lehet. A kardiovaszkuláris kockázat különösen jelentős azoknál a 65 évnél idősebb betegeknél, akik második vagy harmadik generációs TKI kezelésben részesülnek [98]. A kezelés megkezdése előtt ezért részletes kardio-metabolikus szűrővizsgálatok elvégzése javasolt (4. táblázat), melyeket a folyamatos TKI terápia mellett adott időpontokban rendszeresen ellenőrizni kell.

A krónikus fázisú CML első vonalbeli kezelésében azoknál a betegeknél, akiknél a szív- és érrendszeri megbetegedések kockázata nagyon nagy, az imatinib, a dasatinib vagy a bozutinib az előnyös választás. Ilyen betegeknél nilotinib kezelés nem javasolt, és csak a kockázati tényezők, a betegség rizikója, valamint a kezelés várható előnyeinek alapos mérlegelése után dönthetünk az alkalmazásáról [98]. Betegeink között az elvégzett kardiovaszkuláris szűrővizsgálatok (4. táblázat) alapján felismert nagy rizikó esetén mindenkor imatinib kezelést kezdtünk el. Ezek között a betegek között a vizsgálati időszakban nem észleltünk kardiovaszkuláris szövődményt. Kis vagy közepes kardiovaszkuláris kockázatú betegeknél bármelyik TKI választható [98].

A szűrővizsgálatok elvégzése az iszkémiás szívbetegséghez (IHD), az iszkémiás cerebrovaszkuláris eseményekhez (ICVE), vagy a perifériás artériás elzáródásos betegséghez (PAOD) vezető vaszkuláris események idő előtti, valamint a magasvérnyomás betegség időben történő felismerését és megelőzését segíti. A legtöbb klinikai tanulmány nilotinibbel és ponatinibbel kezelt betegek esetében számolt be fokozott kardiovaszkuláris kockázatról [99-101]. A kardiovaszkuláris szűrés ezekben az esetekben kiemelt jelentőséggel bír.

A nilotinib regisztrációját megelőző multicentrikus, randomizált klinikai vizsgálatban első vonalban napi 2x400 mg nilotinib kezelésben részesülő betegnél 13,4%-ban alakult ki valamilyen kardiovaszkuláris szövődmény (IHD: 8,7%, ICVE 3,2%, PAOD: 2,5%), melyek 8,7%-a volt súlyos [17,23]. Egykarú, multicentrikus, fázis 3b klinikai vizsgálatban első vonalban napi 2x300 mg nilotinibbel kezelt betegeknél 6%-ban tapasztaltak kardiovaszkuláris szövődményt (IHD: 3,4%, ICVE 0,8%, PAOD: 1,9%), melyek 3,5%-a volt súlyos [17,23]. A kardiovaszkuláris mellékhatások előfordulásának gyakorisága nilotinibbel kezelt CML-es betegeknél a terápia időtartamával [17] és az életkorral [102] egyértelműen növekedik. Napi 2x300 mg nilotinib dózis mellett az egyes korcsoportokban észlelt IHD előfordulása szignifikánsan gyakoribb idős kor ( $\geq 75$  év) esetén [103].

Nilotinib terápiaiban részesült betegeink esetén (n=58) stroke (n=2), intervenciós beavatkozást igénylő perifériás artériás elzáródásos betegség (n=3), illetve hipertónia (n=5) kialakulását figyeltük meg. A stroke és az érszűkület eseteiben a kezelést imatinib adásával folytattuk (n=3), illetve az

elért DMR miatt a TKI kezelést két esetben sikeresen véglegesen felfüggesztettük (TFR). Nilotinib kezelés kapcsán észlelt eredményeink összhangban állnak a nemzetközi irodalomban is közölt kardiovaszkuláris szövődmények előfordulási gyakoriságával. Az általunk 2015. óta alkalmazott szoros kardio-metabolikus szűrővizsgálatok (4. táblázat) elvégzése az esetleges mellékhatások időbeni felismerését és megfelelő szakmaspecifikus kivizsgálását és kezelését segítette elő.

Ponatinibbel kezelt CML-es betegeknél napi 1x45 mg dózis mellett 31%-ban alakult ki valamilyen kardiovaszkuláris vagy vénás tromboembóliás szövődmény (IHD: 16%, ICVE 13%, PAOD: 14%, vénás trombózis: 6%), melyek 26%-a súlyos volt (grade 3-4) [104]. Egyes betegek esetében egyidőben többféle kardiovaszkuláris szövődmény is kialakulhat. A mellékhatások gyakorisága dózisfüggő. A ponatinib átlagos napi dózisának 15 mg-al való csökkentése - a megfelelő klinikai válasz elérése és fenntartása mellett - a kardiovaszkuláris kockázat 33%-os csökkenésével jár [104]. Jelenleg a ponatinib csökkentett napi dózisa 1x30 mg, mely a megfelelő molekuláris válasz (MR3) elérését követően napi 15 mg-ra csökkenthető.

Megelőző imatinib és két második generációs TKI kezelés eredménytelensége, vagy T315I-mutáció esetén alkalmazott napi 1x45 mg vagy 1x30 mg ponatinib kezelés mellett (n=9) három esetben észleltünk vaszkuláris szövődményt (egy-egy stroke, PAOD és mélyvénás trombózis). Mindhárom beteg megelőzően nilotinib kezelésben is részesült.

Nilotinibbel és ponatinibbel végzett *in vitro* kísérletek során mindkét TKI esetén pro-aterogenetikus (fokozott ICAM-1 expresszió) és anti-angiogenetikus hatást (VEGF receptor gátlás) mutattak ki, melyek szerepet játszhatnak a kezelés során észlelt gyakoribb PAOD kialakulásában [105,106]. Ponatinibbel kezelt betegeknél napi 1x45 mg dózis mellett öt éves medián kezelés idő mellett 14%-ban jelentkezett PAOD, melynek 11%-a volt súlyos [104]. Emiatt a ponatinib kezelés kontraindikált érszűkületes megbetegedés esetén. Enyhe vagy közepesen súlyos érszűkület eseteiben, amennyiben a nilotinib az egyetlen választható TKI, megfelelő körültekintéssel és csak szoros követés mellett (boka-kar index, perifériás artériás Doppler vizsgálat, vérnyomás ellenőrzés, stb.) alkalmazható. Ilyen esetben javasolt az összes kardiovaszkuláris kockázati tényező korrigálása, jóllehet nincs egyértelmű klinikai evidencia arra, hogy ez csökkenti-e a ponatinib vagy a nilotinib okozta fokozott érrendszeri kockázatot [98].

A nemzetközi irodalmi adatok alapján imatinib, dasatinib és bozutinib kezelés mellett nem észlelték gyakrabban magasvérnyomás betegség kialakulását [98], melyet saját eredményeink is megerősítettek.

### ***Pulmonális eltérések***

Mellkasi folyadékgyülem leggyakrabban dazatinib kezelés (első vagy második vonal) mellett alakult ki betegeinknél (n=7/51), amely az esetek nagy részében nem volt súlyos (grade 1-2). Két esetben észleltük súlyos (grade 3) formában hydrothorax kialakulását, amely miatt terápia váltásra (bozutinib) volt szükség. Az irodalmi adatok szerint a mellkasi folyadékgyülem általában a kezelés megkezdését követő hónapokban jelenhet meg, de később - akár több évvel a kezelés elindítását követően - is kialakulhat [107]. Igen nagy betegszám mellett megvizsgált, különböző TKI kezeléseken kapcsán bejelentett mellékhatások adatbázisán végzett statisztikai elemzés szerint a pleurális folyadékgyülem kiemelkedő gyakorisággal fordult elő dazatinibbel kezelt betegek esetén [108]. A lehetséges "off target" molekuláris jelátviteli útvonalak közül az SRC tyrosine kinase családba tartozó LYN gátlásának szerepét valószínűsítették [108]. Ennek a jelátviteli útvonalnak a kiesése olyan nagy granuláris limfociták (LGL) oligoklonális felszaporodásához vezet, amelyek az endotél sejteken T-sejt mediált citotoxikus folyamatot indítanak el [109,110]. Kontrollált klinikai vizsgálatok során imatinibre rezisztens vagy intoleráns betegeknél második vonalban alkalmazott dazatinib kezelés mellett 13-39% között észleltek pleurális folyadékgyülemet [115]. A hydrothorax kialakulásának aránya nagyobb volt a CML előrehaladott stádiumában, és összefüggést mutatott a dazatinib dózisával is [116]. Fontos megjegyezni azonban, hogy a TKI kezelés mellett tapasztalt mellkasi folyadékgyülem az esetek jelentős részében kevés tünettel járó, nem súlyos mellékhatás (grade 1 vagy 2), ami a TKI dózisának csökkentésével megszűnik, és a dazatinib ismét elindítható. Első vonalban adott dazatinib esetén a mellkasi folyadék megjelenésének medián ideje 10 hónap volt, amely az esetek 89%-ában a kezelés első 8 hete alatt jelent meg [111]. Második vonalban alkalmazva a hydrothorax jelentkezésének medián ideje 5-11 hónap között volt [112], de volt olyan eset is, amikor 3 évvel a kezelés megkezdését követően jelentkezett [113]. Leggyakrabban száraz köhögés, fáradékonyság, mellkasi fájdalom és nehézlégzés tünetei kísérik, mely esetekben a fizikális és képalkotó (mellkas röntgen, nagy felbontású komputertomográfia) vizsgálatok elvégzése kötelező.

Bár a folyadékgyülem imatinib kezelés mellett ritkábban jelentkezik, a sztenderd dózisonál nagyobb (napi 600 mg vagy 800 mg) dózisok esetén a perikardiális és pleurális folyadékgyülem megjelenése gyakoribb [114]. Betegeink között emelt dózisú (napi 1×600 mg) imatinib kezelés (n=3) mellett egy esetben alakult ki nem súlyos (grade 2) mellkasi folyadékgyülem, amely az imatinib terápia átmeneti elhagyását és vízajtó adását követően napi 1×400 mg dózisban ismét visszaadhatóvá vált.

### ***Anyagcsere-zavarok***

A szénhidrát- és a zsíryanycsere zavara is gyakran észlelhető mellékhatás TKI kezelés során. Hiperglikémia leggyakrabban nilotinib kezelés mellett alakul ki. Első vonalban alkalmazott

nilotinib kezelés esetén a betegek 50%-ában észleltek emelkedett vércukor értékeket, melyből 7% súlyos (grade 3 vagy 4) hiperglikémia volt [117]. Azoknál az imatinib rezisztens vagy intoleráns krónikus fázisú CML-es betegeknél, akik nilotinib kezelésben részesültek, 12%-ban alakult ki súlyos (grade 3 vagy 4) hiperglikémia [118]. Akcelerált fázis esetén ez az arány 6.7% volt [119]. A hiperglikémia átlagosan egy héttel a kezelés megkezdését követően alakult ki [120]. Nilotinibbel kezelt CML-es cukorbeteg 31%-ánál volt szükség az antidiabetikus kezelés módosítására. Ketoacidózis nem fordult elő, de 60%-ban alakult ki súlyos (grade 3 vagy 4) hiperglikémia [121]. A nilotinib kezelés elindításakor normoglikémiás, nem diabéteszes betegek között 3 év követési idő alatt 20.1%-ban alakult ki cukorbetegség [122].

A nemzetközi irodalomban közölt metabolikus eltérésekhez hasonlóan betegeink között is észleltünk TKI kezelés mellett cukorháztartás és zsírsavcsere zavarokat. A CML diagnózisakor 17 betegnek volt ismert 2-es típusú cukorbetegsége. Ezen betegek többsége (n=15) imatinib kezelésben részesült. A vércukor háztartás az imatinib kezelés mellett végig egyensúlyban maradt. A korábban ismert cukorbetegség mellett nilotinib kezelést 2 esetben indítottunk el (fiatal kor és nagy rizikó miatt). A betegek figyelmét fokozottan felhívtuk a diéta pontos betartására, így a korábbi antidiabetikus kezelés (metformin) és diéta mellett a vércukorháztartás egyensúlyban maradt, az orális antidiabetikus kezeléssel nem kellett módosítani, molekuláris válaszuk megfelelő. A kezelés alatt azonban mindkét esetben emelkedett lipid értékek jelentkeztek, és sztatín terápia vált szükségessé. Első vonalban alkalmazott, napi 2×300 mg nilotinib terápia (n=17) esetén csökkent glükóztolerancia 3 betegünkönél igazolódott. Két esetben dazatinibre váltottunk, egy esetben diétával és életmód-változtatással a nilotinib kezelés tartósan folytatható volt. Később ez a beteg mély molekuláris választ ért el, és a nilotinib végleg elhagyhatóvá vált (TFR). Második vonalban napi 2×400 mg nilotinib terápia mellett (n=24) két alkalommal észleltünk diétát és metformin kezelést igénylő cukorbetegséget. A nilotinib elhagyását követően, dazatinib kezelés mellett, a metformin is elhagyható lett.

Az egyes TKI-k eltérő, BCR::ABL1 gátlásán túli, nem specifikus hatásai (c-KIT, PDGFR, SRC) különböző pontokon befolyásolják az anyagcsere folyamatok szabályozásának molekuláris útvonalait [123,124]. Imatinib és dazatinib esetében a vércukor és a lipid profil javulása [125], nilotinib esetén csökkent glükóztolerancia, diabetes mellitus és a zsírsavcsere paramétereinek romlása figyelhető meg [126]. Az imatinib vércukor háztartásra kifejtett kedvező hatása a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejt apoptózis bénítása révén fokozott inzulin szekréciót [123], valamint a TNF- $\alpha$  útvonal és az endoplazmatikus retikulum stressz gátlásán keresztül [124] fokozott perifériás szöveti inzulin érzékenységet hoz létre.

A nilotinib kedvezőtlen metabolikus profiljának molekuláris háttere ellentmondásos, és kevésbé tisztázott. Egy esettanulmányban csökkent inzulin szekrécióról számoltak be nilotinib terápia során, amely a kezelés felfüggesztését követően reverzibilisnek bizonyult [127]. Egy másik vizsgálatban 37 beteg nilotinib terápiaja kapcsán vizsgálták a vércukor anyagcsere változásait, és hiperinzulinémiát, valamint inzulin rezisztenciát állapítottak meg [126]. A TKI kezelés elindítása előtt, majd a kezelés során a betegek kardiometabolikus szűrővizsgálata és követése kiemelkedően fontos (4. táblázat), mivel az esetleges anyagcsere kisiklás időben történő felismerése és kezelése megelőzheti a terápia kapcsán egyébként is fokozott kardiovaszkuláris mellékhatások kialakulását.

Ismert cukorbetegség mellett elkezdett TKI kezelést követően a vércukor háztartás szigorúbb ellenőrzése, szükség esetén az antidiabetikus terápia módosítása javasolt. Ilyen esetekben a nilotinib kezelés helyett másik TKI választása ajánlott, de megfelelően kezelt 2-es típusú diabetes mellitus önmagában nem jelent abszolút kontraindikációt nilotinib kezelés szempontjából. Szoros vércukor kontroll, a glikolizált hemoglobin érték ellenőrzése, valamint diabetológus szakorvossal való konzultáció javasolt. Bár a klinikai vizsgálatok során első vonalban nilotinibbel kezelt diabéteszes betegek felénél alakult ki hiperglikémia (grade 3 vagy 4), súlyos szövődményt (ketoacidózis, hiperozmoláris kóma, kórházi kezelés) nem észleltek. A betegek közel háromnegyedének (74%) nem volt szükség az antidiabetikus kezelés módosítására sem, és a követési idő alatt nem alakult ki kardiovaszkuláris megbetegedés [121].

Nilotinib kezelés esetén a betegek 22%-ban észleltek enyhe (grade 1 vagy 2) koleszterin emelkedést. Három hónappal a nilotinib kezelést követően az LDL-koleszterin érték medián emelkedése 33 mg/dL volt [128]. Megelőző TKI kezelésekre rezisztens, ponatinib terápiában részesülő betegek esetén 12%-ban jelentkezett enyhe (grade 1 vagy 2) hipertrigliceridémia [104]. Bozutinib és dazatinib kezelés esetén nem észleltek a lipid háztartásban eltérést. A nilotinib kezelés kapcsán korán (3 hónap) kialakuló nagy koleszterin értékek összefüggést mutattak a PAOD kialakulásával és súlyosságával [129,130]. A lipid paraméterek ellenőrzése javasolt a terápia megkezdése előtt, illetve a kezelés során (4. táblázat). Nilotinib terápia mellett perzisztáló hiperkoleszterinémia (>6.2 mmol/l) esetén a beteg PAOD szempontjából nagy rizikójúnak tekintendő, és megfelelő sztatin kezelés mielőbbi beépítése szükséges. Vizsgálataink során TKI kezelésben részesülő betegek között a zsíryanagcsere-zavarra utaló eltérést nilotinib kezelés során tapasztaltunk. Korábról ismert cukorbetegség mellett elindított nilotinib kezelés (n=2) esetében, bár a vércukor háztartás nem romlott, emelkedett lipid értékeket észleltünk, és sztatin terápia vált szükségessé.

### ***Gasztrointesztinális tünetek***

A TKI kezelés okozta gasztrointesztinális tünetek között a hasmenés az egyik leggyakoribb mellékhatás. Klinikai vizsgálatok során leginkább bozutinib kezelés mellett figyelték meg. Napi 1x500 mg bozutinib esetében 8-11%-ban észleltek jelentős (grade 3 vagy 4), a kezelés első hónapjában jelentkező makacs és visszatérő jellegű hasmenést [7,24,25,131]. Azonban csak igen ritkán volt szükség a hasmenés miatt TKI váltásra [24]. A tünetek súlyossága a bozutinib dóziséval összefüggést mutatott. A betegek 67%-a szorult a hasmenés miatt loperamid, atropin vagy diphenoxylate hatóanyagú tüneti kezelésre [24,131]. Betegeink között napi 1x500 mg bozutinib kezelés (n=12) mellett az esetek jelentős részében (n=10) enyhe fokú (grade 1-2) hasmenés alakult ki, amely a kezelés indítását követően 2–4 héttel jelentkezett. Két esetben súlyos (grade 3) hasmenés miatt a bozutinibet véglegesen el kellett hagynunk, és terápia módosításra volt szükség. Az enyhe esetekben a bozutinib kezelés átmeneti felfüggesztése, tüneti terápia (loperamid), majd kis dóziszról (napi 1x100 mg) való ismételt fokozatos dózis-felépítés mellett a hasmenéses tünetek jól uralhatóak voltak. Két idős betegnél, akik a hasmenés miatt csak napi 1x200 mg bozutinib dózist toleráltak, 12 hónap kezelést követően tartós MMR alakult ki. Tapasztalataink szerint a kezelés elindításakor javasolt a terápiás cél-dózis fokozatos felépítése, amely jelentősen csökkenti a gasztrointesztinális tünetek kialakulásának gyakoriságát és mértékét is. A loperamid hatékony a hasmenés tüneteinek enyhítésére.

Dazatinib terápia kapcsán észlelt hasmenés miatt a betegek 1-3%-ában a kezelés átmeneti felfüggesztésére, 2%-ában pedig dóziscsökkentésre volt szükség [26]. Ponatinib kezelés mellett jelentősebb hasmenést nem észleltek [104]. Dazatinib és ponatinib kezelésben részesülő betegeink között nem volt hasmenés. Első vonalban adott, napi 2x300 mg nilotinib kezelés (n=17) kapcsán 3 esetben észleltünk enyhe (grade 1 vagy 2) hasmenést. A nilotinib átmeneti kihagyását követően a tünetek megszűntek, és ismételt elindítását követően nem jelentkeztek újra.

Dazatinib kezelés mellett, megtartott trombocita szám ellenére is kialakulhat gasztrointesztinális vérzés. A betegség fázisától függetlenül az esetek 17%-ában észlelték, és leggyakrabban hemorrágiás kolitisz formájában jelentkezik. Koagulációs eltérés 3%-ban volt igazolható, a vérlemezke szám az esetek kétharmadában  $100 \times 10^9/L$  alatti volt [86]. A trombocitopénia és a betegség előrehaladott stádiuma a gasztrointesztinális vérzés előfordulásának szempontjából független rizikófaktornak tekinthető [86]. Első vonalban adott dazatinib vagy más TKI kezelés kapcsán nem figyeltek meg fokozott gasztrointesztinális vérzésre való hajlamot [5]. A vérzés kialakulásában szerepet játszik a dazatinib kollagén-indukálta vérlemezke aggregáció gátló hatásán túl a primer hemosztázis jóval érzékenyebb indikátorának tekintett prokoaguláns vérlemezkek

képződésére kifejtett gátló hatása is [132,133]. Dazatinib kezelés mellett jelentkező gasztrointesztinális vérzés esetén a vérzésforrás igazolása szükséges. A gasztroszkópos és kolonoszkópos vizsgálatok eredményének értékelésével lehet dönteni a gyógyszer dózisának csökkentése vagy másik TKI-ra való váltás felől. Betegeinknél napi 1x100 mg dazatinib kezelés során 2 alkalommal jelentkezett súlyos, transzfúziót igénylő gasztrointesztinális vérzés. Kolonoszkópos vizsgálat során mindkét esetben hemorrágiás kolitisz igazolódott. A primer hemosztázis vizsgálata során a vérlemezke-aggregáció gátlása mellett a "coated"-vérlemezke képződés csökkenése is kimutatható. Ez utóbbi a dazatinib primer hemosztázisra kifejtett gátló hatásának érzékeny indikátora [133]. A dazatinibet elhagytuk, és imatinib kezelésre tértünk át. Újabb gasztrointesztinális vérzést nem észleltünk.

Szérum lipáz- és amiláz-szint emelkedés, valamint klinikai tünetekkel járó hasnyálmirigy gyulladás nilotinib, bozutinib és ponatinib kezelésben részesülő betegek esetében alakulhat ki. A TKI-kezelés mellett észlelt emelkedett szérum lipáz- és amiláz-értékek - klinikai tünetek nélkül - önmagukban nem jelentenek heveny hasnyálmirigy gyulladást, de a TKI kezelés dózisának átmeneti csökkentése, vagy teljes felfüggesztése javasolt [174]. A TKI kezelés kapcsán észlelt szérum amiláz- és lipáz-értékek, valamint a hasnyálmirigy gyulladás kialakulásának patomechanizmusa nem tisztázott.

### ***Májfunkciós eltérések***

Széleskörű meta-analízis eredményei alapján bármely TKI kezelés esetén szignifikánsan gyakoribb a súlyos (grade 3 vagy 4) májkárosodás kialakulásának esélye a kontroll karhoz képest [134]. TKI kezeléshez köthető, fatális kimenetelű májelégtelenséghez vezető hepatotoxicitás csupán néhány, imatinib és ponatinib kezelésben részesülő beteg kapcsán került eddig leírásra. A szövettani vizsgálat során a legtöbb fulmináns lefolyású esetben nem specifikus gyulladással infiltrátum mellett masszív, vírusos hepatitisz-szerű májszövet nekrozist véleményeztek, amelyet gyulladással idioszinkráziás folyamatok alakítottak ki [135-138]. Májfunkciós eltérések (emelkedett GOT vagy GPT) eltérő gyakorisággal és súlyossággal, de az összes TKI kezelés mellett kialakulhatnak. Az TKI kezelés okozta hepatotoxicitás az esetek 25-35%-ában enyhe (grade 1 vagy 2) és csupán átmeneti transzamináz érték emelkedéssel jár. Súlyos (grade 3 vagy 4) forma 2%-ban fordult elő, és leggyakrabban ponatinib kezelés mellett alakult ki [139]. A transzamináz érték emelkedés általában a kezelés megkezdését követően 2-8 héttel jelentkezik, de imatinib kezelés kapcsán ez bekövetkezhet későbbi időpontban is. Ponatinib kezelés elkezdését követően medián 46 nappal (1-334 nap) észleltek GOT vagy GPT emelkedést [139]. Betegeink között a TKI kezelés mellett nem észleltünk jelentősebb (grade 3-4) májfunkciós eltéréseket, emiatt terápia módosításra nem volt szükség.

### ***Fogamzás és terhesség***

Azoknál a férfiaknál akik imatinibet, bozutinibet, dazatinibet vagy nilotinibet szedtek, nem növekedett az utódokban a veleszületett rendellenességek kockázata [140-144]. Ponatinib terápia esetén az adatok hiányosak. A spermiumok minőségében és morfológiájában bekövetkező változások jelen lehetnek a diagnózisokor, és változatlanok maradnak az imatinib kezelés után [145]. Ezért családtervezési szándékból a férfiaknak nem kell abbahagyniuk a TKI kezelést.

A TKI kezelés alatt bekövetkező terhesség esetén a TKI terápiát az első trimeszterben abba kell hagyni, és azonnal magzati ultrahang vizsgálatot kell végezni. A TKI teratogenitása az organogenezis során a nem specifikus, valószínűleg PDGFR gátlás következménye. A második trimeszterben adott dazatinib kezelés mellett gyakrabban fordul elő hydrops fetalis [141], így biztonsági okokból az összes TKI ellenjavallt a terhesség alatt. Noha az imatinibet biztonságosan alkalmazták a második és harmadik trimeszterben, a rendelkezésre álló igen kevés tapasztalat alapján nem javasolt a rutin alkalmazás [146].

A terhesség alatt diagnosztizált CML kezelését személyre szabottan kell elkezdni. A terhesség-megszakítás mindenképpen megfontolandó, amennyiben a diagnózis előrehaladott, nagy rizikójú betegség során igazolódik. Alacsony rizikójú betegség esetén, ha a fehérvérsejt szám alacsony, szoros ellenőrzés mellett a kezelés elindításával egészen a szülésig is várakozhatunk. Trombocitózis esetén acetil-szalicilsav és/vagy alacsony molekulatömegű heparin adása javasolt. Magas fehérvérsejt szám esetén leukaferezis és/vagy  $\alpha$ -IFN biztonsággal alkalmazhatóak [140,147]. Ajánlott a szoros együttműködés a szülész kollégákkal, és fontos a rendszeres magzati ultrahangvizsgálat. A TKI az anyatejbe kis koncentrációban kiválasztódik, a szoptatás ideje alatt nem javasolt alkalmazásuk [148].

A kezelés felfüggesztésére alkalmas, tartósan mély molekuláris válaszban lévő nők számára a családtervezés időszakára a kezelés felfüggeszthető. Az ezt követő esetleges TKI kezelés az MMR fennmaradásától, vagy annak elvesztésétől függ. Azok a nők, akik a TFR során elveszítik az MMR-t és már terhesek, valószínűleg kihordják a terhességet anélkül, hogy a kezelés újraindítására szükség lenne. Azoknak a nőknek, akik elveszítik az MMR-t, és még nem terhesek, újra kell kezdeniük a TKI kezelést. Imatinib elhagyását követően ilyen esetben megfontolandó második generációs TKI-ra történő váltás, és ha a mély molekuláris választ ismét sikerül elérni, megpróbálható egy újabb kezelésmentes időszak. Nagy kihívást jelentenek azok a nőbetegek, akik tartós mély molekuláris válasz elérése nélkül vágnak a terhességre (gyakran idősebb kor és/vagy

társadalmi nyomás miatt). Ilyenkor a lehetséges megoldások között szerepel a TKI kezelés  $\alpha$ -IFN-nal való helyettesítése, vagy a fogamzás alternatív módszereinek (béranyaság) megfontolása.

## 6.2. Primer hemosztázis elérések a TKI kezelés során

### 6.2.1. Dazatinib *in vitro* és *ex vivo* hatása a primer hemosztázisra

A dazatinibbel végzett III. fázisú klinikai vizsgálatok során a vérzéses szövődmények előfordulási gyakorisága 9–40% (grade 1-4) volt [149-151]. Ebből súlyos (grade 3-4) vérzéses komplikáció 8%-ban fordult elő. A vérzés elsősorban a gyomor-bél traktust és a központi idegrendszert érintette [149-151]. A dazatinib kezelésben részesülő betegeknél jelentkező súlyos vérzéses eseményekről számos további esetismertetés kapcsán is beszámoltak [152-156]. A dazatinibbel végzett korábbi *in vitro* és *ex vivo* vizsgálatok a primer hemosztázis elégtelen működését igazolták. A közölt eredmények a trombocita aktiváció gátlását, a kollagén mátrixon mért, áramlási körülmények között kialakuló trombus-térfogat csökkenését, PFA-100 vizsgálattal a C/Epi megnyúlt záródási idejét, valamint csökkent epinefrin és AA által kiváltott vérlemezke aggregáció igazoltak [86, 87]. Dazatinibbel történt vizsgálataink során egészséges önkéntesek vérlemezkeit különböző koncentrációjú dazatinibbel és nilotinibbel kezeltük (ezen eredményeket a társszerző korábban már bemutatta), továbbá a dazatinib vagy nilotinib kezelésben részesülő betegek vérlemezke funkcióit a TKI-k bevétele előtt (0 óra) és után (1 és 4 óra) ellenőriztük. A nilotinibet negatív kontrollként használtuk, mivel a korábbi megfigyelések azt mutatták, hogy a nilotinibnek nincs hatása a vérlemezke aggregációra [86].

Tapasztalataink alapján a dazatinib kezelés a trombocita aktiváció és aggregáció dóziszfüggő károsodását eredményezte mind *in vitro*, mind pedig *ex vivo* körülmények között. A nilotinibnek egyáltalán nem volt hatása ezekre a folyamatokra. Ezek az adatok összhangban vannak a korábbi megfigyelésekkel, annak ellenére, hogy más vizsgálok az *in vitro* kísérletekben csak 10 perces előinkubálást végeztek dazatinibbel [86]. Vizsgálataink szerint a kettős agonistával aktivált prokoaguláns vérlemezkek csökkent "coated"-vérlemezke-képző hatásának kimutatása érzékenyebb módszernek bizonyult, mint a PFA-100 és a vérlemezke aggregáció.

A "coated"-vérlemezkek igen jelentős prokoaguláns aktivitással bíró, kettős agonistával aktivált vérlemezkek speciális alcsoportját alkotják. Közös jellemzőjük a mitokondriális depolarizáció, a tartós citoplazmatikus kalcium-szint emelkedés, a PS sejtfelszíni expressziója, és a GPIIb/IIIa receptorok inaktiválódása. Felszínükön számos funkcionálisan aktív prokoaguláns fehérje, köztük fibrinogén, V-ös faktor és von Willebrand faktor mutathatóak ki [59]. Ezeknek a prokoaguláns "coated"-vérlemezkeknek a túltermelődése korábban számos trombotikus folyamatban igazolható

volt (ismétlődő iszkémiás stroke fokozott kockázata [62], tranziens iszkémiás rohamot (TIA) követő stroke rizikójának meghatározása [63, 65]). Ugyanakkor a "coated"-vérlemezkék csökkent arányát találták spontán agyvérzés [78] és lacunáris stroke [60], illetve súlyos hemofilia A [81] eseteiben.

A trombocita kollagén receptora (GPVI) tirozinkináz-függő módon szabályozza a vérlemezke aktivációt [87, 157]. Az SRC család kinázai (SFK) kulcsszerepet játszanak a vérlemezkék aktiválásában (LYN, LCK, YES, FYN). A LYN nagymértékben expresszálódik a humán vérlemezkékben [158], és a GPVI citoplazmatikus doménjéhez kapcsolódva [159] foszforilálja és aktiválja a SYK-et. A dasatinib egy erős multikináz-inhibitor (ABL1, c-KIT, EPHA2, PDGF- $\beta$ , SFK) [87, 160]. Bár a nilotinib szintén második generációs TKI, amely számos tirozin-kináz (ABL1, PDGFR, c-KIT, ARG, EPHB4) működését blokkolja, azonban nem gátolja az SFK-t [160]. A trombin G-fehérje által mediált proteáz-aktivált receptoron keresztül fejt ki hatását, melynek során PLC $\beta$ -t aktivációt hoz létre, ami kalcium-mobilizációt és PKC-aktivációt, valamint kalcium-kalmodulin-dependens-kinázok, MAP-kinázok és foszfolipáz A2 aktiválásának fokozódását eredményezi [87]. Ezt az utóbbi jelátviteli utat nem befolyásolja sem a dasatinib, sem pedig a nilotinib terápia. Mivel a dasatinib jelentős gátló hatással van a "coated"-vérlemezke termelésre, a nilotinib pedig nem, feltételezzük, hogy a GPVI-receptorhoz kapcsolódó SRC család kinázok gátlásán keresztül alakul ki a "coated"-vérlemezke képződés csökkenés a dasatinib kezelésben részesülő CML-es betegekben.

Korábbi vérlemezke aggregációs vizsgálatok a trombocita aktiváció és aggregáció károsodását igazolták dasatinib kezelés mellett [161]. A vizsgálatok igazolták, hogy a dasatinib hatékonyan gátolja a trombocita jelátvitelt és a kollagén által kiváltott trombocita aktivációs folyamatokat. Adataik azonban eltérő trombocita aggregációs eredményeket, és a kollagén hosszabb ideig tartó trombocita-funkció gátló hatását igazolták. Ezeknek az eltéréseknek a kísérletek eltérő körülményei lehetnek a legfőbb okai. Eredményeik szerint CML-ben szenvedő betegeknél a dasatinib kezelés trombocita aggregáció gátló hatása tovább tartott, mint 4 óra. Fontos megjegyezni, hogy a korábban közölt vizsgálatok során a betegek fele naponta kétszer 70 mg, másik fele pedig naponta egyszer 100 mg dasatinibet kapott. Kísérleteink során minden beteg (n=10) 100 mg dasatinibet kapott naponta. Farmakokinetikai vizsgálatok [162] alapján a dasatinib felezési ideje 3-6 óra, a  $C_{max}$  koncentrációt a gyógyszer bevitelét követően 1 óra alatt éri el, és az adagolási rend hatásai (naponta 1x vagy 2x) jelentős hatással vannak a dasatinib biztonságosságára és hatékonyságára. A dasatinib terápia vérlemezke funkció gátló hatása így valószínűleg kevésbé kifejezett 4 óra elteltével, melyet különböző adagolási sémák is nagyban befolyásolnak.

A gyomor-bélrendszeri vérzés gyakoribb nemkívánatos esemény dazatinib kezelés során, mint más TKI-k esetén. Bár minden dazatinib kezelésben részesülő betegnél kóros a kollagén által kiváltott trombocita aggregáció, a betegeknek csupán egy töredékénél alakul ki klinikailag jelentős vérzéses szövődmény [163]. Ennek oka nagy valószínűséggel a dazatinib további, a primer hemosztázis folyamataitól független hatása lehet. A többi TKI-vel ellentétben a dazatinibról ismert, hogy jelentősen befolyásolja a vaszkuláris endotélium barrier funkcióját is [164]. Az így létrejött vaszkuláris permeabilitás átmeneti növekedése - amelyet a vizsgálatainkkal igazolt "coated"-vérlemezke képződés csökkenése tovább fokoz -, valamint a csökkent trombocita aggregáció mind hozzájárulnak a hemorrágiás szövődmények kialakulásához.

### 6.2.2 A ponatinib *in vitro* és *ex vivo* hatása a primer hemosztázisra

Számtalan laboratóriumi vizsgálat elemezte már a ponatinib protrombotikus hatásának okát. A vizsgálatok kimutatták, hogy a ponatinib trombo-inflammatorikus választ indukál kollagén- és FeCl<sub>3</sub>-sérülési modellekben [88]. Más szerzők egér kísérletekben igazolták, hogy a ponatinib kezelés fokozza a P-selectin expressziót és a GPIIb/IIIa receptor dependens vérlemezke aktivációt [165]. Az észlelt aktivációs hatás azonban csak az agonisták (kollagén vagy trombin) alacsonyabb koncentrációi esetén volt kifejezett [165]. Farmakokinetikai vizsgálatok szerint a ponatinib felezési ideje 27-34 óra, és az átlagos ponatinib C<sub>0</sub> értékek napi 15, 30 vagy 45 mg ponatinib beadását követően 26,2 nM, 56,1 nM és 64,3 nM plazma koncentrációt igazoltak. Ezekben a vizsgálatokban kimutatták, hogy a ponatinib a bevételt követően 4-6 órával érte el a C<sub>max</sub> értéket, melyek 77 nM és 145 nM voltak napi 15 mg, illetve 45 mg adagolás mellett [166-168]. Ezért kísérleteinkben a ponatinib hatását a trombocita-agonisták által kiváltott változásokra klinikailag releváns terápiás (75 és 150 nM) és terápiás szinten felüli (1000 nM) koncentrációk esetén vizsgáltuk meg. Megelőző kísérleteinkben a dazatinib prokoaguláns vérlemezke képződés és trombus retrakció gátló hatását igazoltuk [169]. A dazatinib ezt a hatást különböző tirozin-kináz jelátviteli utak (LCK, LYN, SRC) gátlása révén fejt ki. Mivel a ponatinib is képes ezeket a kináz útvonalakat gátolni, feltehetően a vérlemezke-aggregációt és az ATP-felszabadulást gátló hatást is ezen az "off-target" útvonalon okozza. Ugyanakkor kollagén által kiváltott trombocita aggregációs válaszra kifejtett gátló hatást csak jóval a terápiás szint feletti koncentrációnál (1000 nM) figyeltünk meg. Eredményeink összhangban vannak egy korábbi vizsgálattal, amelyben mosott vérlemezkéket használtak. Ebben a vizsgálati környezetben a ponatinib már 100 nM koncentráció esetén gátolta a CRP által kiváltott vérlemezke-aggregációt [170]. Loren és munkatársai azt találták, hogy a ponatinib mosott vérlemezkekhez való *in vitro* hozzáadása gátolta a GPVI aktivációs útvonalakat, és a ponatinibvel kezelt vérlemezkek a fibrinogénnel vagy kollagénnel fedett felületen kevésbé tapadtak ki, hasonlóan az SRC család specifikus kináz-inhibitorral kezelt vérlemezkekhez. Ezenkívül a ponatinibvel kezelt,

fibrinogénhez vagy kollagénhez kapcsolódó vérlemezkék esetében csökkent foszforilációt mutattak ki a GPVI útvonal specifikus kinázainál, hasonlóan az SRC család kináz-inhibítorral kezelt vérlemezkékhez [170].

A ponatinib előkezelést követően észleltük a GPVI receptorok aktiválódását, mellyel párhuzamosan a vérlemezkék PAC1 monoklonális antitest kötődésének - amely a GPIIb/IIIa receptor aktivált állapotának indikátora - csökkenését figyeltük meg. Ez a hatás szignifikánsan nagyobb volt 1000 nM ponatinib koncentrációnál. Megfigyeléseinkkel összhangban Deb és munkatársai azt találták, hogy a ponatinib csökkentheti a PAC1-kötő vérlemezkék átlagos fluoreszcencia intenzitását a PAR1 és PAR4 receptorok aktiválása esetén 145 nM végső koncentrációnál [171]. Teljes vérmintákban vizsgálva a ponatinib hatását a GPVI receptor aktivációra, nem találtak eltérést [171].

A dazatinibbel végzett korábbi vizsgálataink alapján azt feltételeztük, hogy a "coated"-vérlemezke flow citométerrel való kimutatása érzékenyebb módszer a ponatinib gátló hatásának azonosítására, mint a klasszikus trombocita-aggregációs tesztek. GFP környezetben elvégzett kísérleteink során a minták GPVI (konvulxin) és PAR1 (trombin) receptoron keresztüli ko-aktiválásakor a "coated"-vérlemezke termelődés csökkenését figyeltük meg. Ez a hatás már 150 nM ponatinib koncentrációnál szignifikáns volt, 1000 nM koncentrációnál pedig a felére csökkent. A ponatinib általunk észlelt, a "coated"-vérlemezkékre gyakorolt gátló hatását klinikailag relevánsnak tartjuk, mivel korábban azt találtuk, hogy a kimutatásukra alkalmazott áramlási citometriai módszer érzékenyebb, mint a klasszikus trombocita aggregometriára épülő vizsgálati módszerek [133].

A ponatinib-kezelés a CML-betegeknek csak kis hányadára korlátozódik. Olyan betegek esetében javasolt alkalmazása, akiknél más TKI-kezelések sikertelennek bizonyultak, vagy akiknél megtalálható a *BCR::ABL1* ritka, T315I mutációja. Vizsgálataink időpontjában Magyarországon összesen 22 beteg részesült ponatinib kezelésben. Ezen betegek közül csak korlátozott számban (n=5) volt hozzáférésünk a ponatinib kezelés trombocita funkcióra gyakorolt hatásának értékeléséhez. A tartósan ponatinib kezelésben részesülő betegeknél a kollagénnel vizsgált maximális trombocita aggregáció ( $\Delta T_{max}$  érték) már a következő dózis bevétele előtti ( $C_0$ ) mintákban jelentősen csökkent volt, és a referencia tartomány alatt maradt. Így mind az *in vitro*, mind az *ex vivo* eredmények alátámasztják a ponatinib gátló hatását a klasszikus trombocita-agonisták által, a GPVI receptoron keresztül kiváltott vérlemezke aktivációra.

Az *in vitro* vizsgálatokat ellenőrzött körülmények között végeztük egészséges (ponatinibet nem szedő) önkéntesek PRP vagy GFP mintáin. CML-es betegek esetében többféle, egyidőben szedett

gyógyszer is hatással lehet a plazmában egyébként nagymértékben fehérjéhez kötött ponatinib szabad koncentrációjára. Továbbá a betegek egyéb társbetegségei és a ponatinib plazmában kifejtett hatása is jelentősen eltérhet az *in vitro* vizsgálatokban alkalmazott PRP vagy GFP mintákhoz képest. Elvégzett vizsgálataink alapján azt állapítottuk meg, hogy a ponatinib vérlemezkékre gyakorolt gátló hatása összefügg a Sarcoma család kinázainak (LYN, FYN ÉS SRC) gátlásával. Egy korábbi tanulmányban a gátlás mértékét hasonlóan találták a dazatinib és a ponatinib esetében [172], ami magyarázhatja annak gyengítő hatását a GPVI receptoron keresztüli trombocita aktivációra. Mivel a LYN konstitutívan aktív, a kisebb ponatinib dózis a p-LYN nyílt konformációját eredményezi azáltal, hogy csak a p-LYN Y507 nagyobb érzékenységű gátlóhelyét blokkolta [172]. A vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a ponatinib-kezelés megváltoztatja mind az érfal, mind a vérlemezke funkcióit, ami utóbbit hiperaktívvá teszi [172]. Egerekben a ponatinib terápia a vWF által közvetített vérlemezkék adhézióját fokozhatja a mikrovaszkuláris endotéliumhoz [173]. A trombocita adhéziót a szabaddá vált A1 domén GPIIb/IIIa kötődése közvetítette az endothelhez, vagy a leukocita-trombocita komplexhez kapcsolódó vWF-hez. Ezek a folyamatok a nagy artériákban és a perifériás mikrocirkulációban egyaránt előfordultak. Ez utóbbi iszkémiás változásokat idézhet elő az egyes szervek (pl. kamrai szívműködésben) működésben [173].

A ponatinibet szedő betegek kardiovaszkuláris eseményei a vérlemezkékre és a keringésben lévő egyéb sejtekre gyakorolt hatás következményei lehetnek. Kísérleti összeállításunkban a ponatinib vérlemezkékre gyakorolt gátló hatását PRP és GFR környezetben vizsgáltuk. A teljes vérminták vérlemezke-monocita aggregátumok képződésének eredményei azonban a ponatinib lehetséges aktiváló hatását mutatták a vérlemezkékre és/vagy a monocitákra. Vizsgálati eredményeink egyik korlátját a ponatinibvel kezelt betegek mintáinak kis száma jelentette. Továbbá a ponatinib gátló hatását tisztított kísérleti környezetben igazoltuk.

Összefoglalva, lumi-aggregációs vizsgálatokkal és a "coated"-vérlemezkék áramlási citometriás módszerrel történő kimutatásával *in vitro* kísérletekben és *ex vivo* mintákban kimutattuk a ponatinib gátló hatását humán vérlemezkékre, ahol a végső hemosztatikus hatás nagymértékben függ a mérés körülményeitől.

## 7. Új megállapítások

Vizsgálataink során a Debreceni Egyetem Klinikai Központ, Belgyógyászati Klinika, Hematológia Tanszékén gondozott 120 CML-s beteg ELN ajánlásainak megfelelő kezelési eredményeit dolgoztuk fel. A beteg-, illetve betegség-specifikus adatok részletes elemzésével értékeltük a progresszió mentes és a teljes túlélési eredményeket. Részletesen vizsgáltuk az adott TKI kezelések kapcsán jelentkező mellékhatásokat, melyek irodalmi adatokkal kiegészített részletes ismertetését először publikáltuk Magyarországon. A dazatinib kezelés kapcsán észlelt vérzékenységre utaló tünetek, illetve a ponatinib terápiával összefüggő fokozott kardiovaszkuláris kockázat hátterének további vizsgálatára a klasszikus lumi-aggregációs vizsgálatokon túl, a primer hemosztázisban kulcsszerepet játszó "coated"-vérlemezkék kialakulásának változását határoztuk meg.

Dazatinibet szedő CML-es betegek *ex vivo* mintáinak vizsgálata kapcsán igazoltuk, hogy a maximális aggregáció szignifikáns csökkenése alakul ki 1 órával a gyógyszer bevitelét követően. Az aggregációs görbék a dózis után 4 órával normalizálódtak. Ugyanakkor kimutattuk azt is, hogy a dazatinib a "coated"-trombocita képződés szignifikáns csökkenését okozza, és ez a hatás akkor is kimutatható, amikor a hagyományos vérlemezke-funkciós vizsgálatok már nem jeleznek eltérést.

Megállapítottuk továbbá, hogy az egészséges donoroktól származó vérlemezkék ponatinibbel történő előkezelése dózisfüggő módon gátolja a "coated"-vérlemezkék képződését. Kimutattuk, hogy a ponatinibet szedő betegeknél a gyógyszer szignifikánsan gátolja a kollagén által kiváltott aggregációt (a kontroll vérlemezkék aggregációjához képest). Eredményeink azt is igazolták, hogy a ponatinib gátló hatással van a GPVI agonisták által kiváltott vérlemezke aktivációra.

Mindezek alapján először igazoltuk, hogy a "coated"-vérlemezke meghatározás érzékenyebb indikátora a dazatinib okozta primer hemosztázis eltéréseknek, mint a klasszikus aggregációs vizsgálatok, továbbá a ponatinib kezelés kapcsán észlelt fokozott kardiovaszkuláris események a primer hemosztázis eltérésein túl egyéb (plazma koncentráció, endothel diszfunkció) tényezők hatásának eredményeként alakulhatnak ki.

## 8. Összefoglalás

A krónikus mieloid leukémia (CML) egy olyan ritka klonális őssejt betegség, melynek hátterében egyetlen genetikai defektus, a 9-es és a 22-es kromoszómák reciprok transzlokációja áll. A kórkép kialakulásáért a transzlokáció következtében létrejött fúziós gén (*BCR::ABL1*) által kódolt kóros tirozin-kináz aktivitású jelátviteli szabályozó fehérje felelős. A fokozott tirozin-kináz aktivitás célzott gátlása a leukémiás sejtklón eliminációjához vezet. Az elmúlt két évtized klinikai tapasztalatai alapján megállapítható, hogy a tirozinkináz-gátló kezelés a betegek egy részénél akár teljes gyógyulást is eredményezhet az egykor halálos kimenetelű kórképben. A TKI terápia kapcsán azonban számos kezelés-specifikus mellékhatás (intolerancia), illetve a *BCR::ABL1* fehérje gátlásával szembeni rezisztencia alakulhat ki, melyek a betegség terápiájának megfelelő módosítását igénylik, és negatívan befolyásolják a túlélést. Jelenleg a CML célzott kezelésében számos TKI érhető el, melyek *BCR::ABL1*-specifikus és nonspecifikus („*off-target*”) hatásaik alapján szerteágazó mellékhatás profillal rendelkeznek. Emiatt a CML terápiája az elmúlt években egyre inkább személyre szabottá vált. Ez a hatékony betegség-kontrollon túl a kezelés okozta mellékhatások időben történő felismerését, lehetőség szerinti elhárítását, szükség esetén pedig a terápia módosítását is jelenti. Kiemelkedő a második és harmadik generációs TKI kezelés mellett megfigyelt kardio-metabolikus és hemorrágiás események halmozódása, melyek oka nem minden részletében tisztázott. Számos laboratóriumi és klinika kutatás mutatott ki összefüggést a nilotinib- és ponatinib-kezelés és a kardiovaszkuláris kockázat növekedése, valamint a dazatinib kezelés és a vérzésemes szövödmények előfordulása között. A primer hemosztázis, azon belül pedig a prokoaguláns („*coated*”) vérlemezkék központi szerepet játszanak mind az aterotrombotikus, mind pedig a hemorrágiás folyamatok patofiziológiájában. Munkahipotézisünk az volt, hogy az egyes TKI kezelések során tapasztalt protrombotikus és hemorrágiás folyamatok hátterében a vérlemezkék aktivációjának és aggregációjának megváltozása áll.

Vizsgálataink során a Debreceni Egyetem Klinikai Központ, Belgyógyászati Klinika, Hematológiai Tanszékén CML miatt gondozott betegek TKI kezelésének kapcsán rögzítettük a betegek főbb jellemzőit, prognosztikai értékeit, a betegek kardiovaszkuláris státuszát, egyéb társbetegségeit, valamint a terápia során fellépő nemkívánatos mellékhatások előfordulását. Kiemelt figyelmet fordítottunk az *in vitro* és *ex vivo* megfigyelt vaszkuláris hematológiai eltérésekre.

Kimutattuk, hogy dazatinib kezelés során a vérzékenység kialakulásában a kollagén indukálta vérlemezke aggregáció gátló hatáson túl a primer hemosztázis jóval érzékenyebb indikátorának tekintett „*coated*”-vérlemezkék képződésére kifejtett gátló hatás is szerepet játszik. A dazatinib ezt a hatást a vérlemezkék glycoprotein VI (GPVI) receptorán keresztül, az SFK jelátviteli út blokkolásával fejt ki. Igazoltuk, hogy a ponatinib koncentrációtól függő módon gátolja a

prokoaguláns vérlemezke képződést és a GPVI agonista által kiváltott vérlemezke aktivációt. Kidolgoztunk egy kardio-metabolikus állapotot ellenőrző vizsgálati protokollt, melynek segítségével a nagy kardiovaszkuláris kockázatú betegek szűrését vezettük be. Ennek segítségével a betegre szabott TKI kezelés pontosabban meghatározhatóvá vált.

## 9. Summary

Chronic myeloid leukemia (CML) is a rare clonal stem cell disease caused by a single genetic defect in the reciprocal translocation of chromosomes 9 and 22. A signal transduction protein with abnormal tyrosine kinase activity encoded by the fusion gene (*BCR::ABL1*) is responsible for the development of the disease. Targeted inhibition of increased tyrosine kinase activity leads to the elimination of the leukemic cell clone. Based on clinical experience over the past two decades, tyrosine kinase inhibitor (TKI) treatment may result in a complete cure in some patients with a once-fatal disease. However, in the context of TKI therapy, a number of treatment-specific side effects (intolerance) and *BCR::ABL1* resistance to protein inhibition may develop, requiring appropriate modification of the therapy of the disease and adversely affecting survival. There are currently a number of TKIs available for the targeted treatment of CML that may have different effects on the course of the disease and have a diverse side effect profile based on their *BCR::ABL1* specific and non-target effects. Because of this, CML therapy has become increasingly personalized in recent years. In addition to effective disease control, this means recognizing the side effects of treatment in a timely manner and - if possible - adjusting therapy if necessary. Outstanding in the second and accumulation of cardio-metabolic and haemorrhagic events observed with third-generation TKI, the cause of which is not fully elucidated. Numerous laboratory and clinical studies have shown an association between nilotinib and ponatinib treatment and cardiovascular risk as well as between dasatinib treatment and the incidence of bleeding complications. Primary hemostasis, including procoagulant ("*coated*") platelets, plays a central role in the pathophysiology of both atherothrombotic and hemorrhagic processes. Our working hypothesis was that the prothrombotic and haemorrhagic adverse events experienced during each TKI treatment were due to changes in the properties of platelet activation and aggregation.

In this thesis we present the main patient's characteristic during TKI therapy, along with the cardiovascular status, other co-morbidities and the occurrence of adverse events during the TKI treatment at the Department of Hematology, University of Debrecen Clinical Centre, Department of Internal Medicine. Progression free and overall survival rates and adverse events associated with each TKI treatment were also assessed.

Particular attention was paid to the vascular haematological alterations found during *in vitro* and *ex vivo* studies. We have identified that in addition to the inhibitory effect on collagen-induced platelet aggregation during dasatinib treatment, the inhibitory effect on the formation of "*coated*"-platelets - which is considered to be a much more sensitive indicator of primary haemostasis - has an impact on the development of haemorrhagic complications. We have showed that dasatinib exerts this effect via the platelet glycoprotein VI (GPVI) receptor by blocking the SFK signalling pathway. We

have demonstrated that ponatinib inhibits procoagulant platelet formation and GPVI agonist-induced platelet activation in a concentration-dependent manner. We developed a protocol for monitoring cardio-metabolic status to introduce screening of patients at high cardiovascular risk. This allowed a more accurate determination of the TKI treatment tailored to the patient.

## 10. Irodalomjegyzék

- [1] Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243:290-3.
- [2] Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996;2:561-6.
- [3] O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R, Druker BJ; IRIS Investigators. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003; 348:994-1004.
- [4] Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L, Larson RA; IRIS Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006;355:2408-17.
- [5] Kantarjian HM, Shah NP, Cortes JE, Baccarani M, Agarwal MB, Undurraga MS, Wang J, Ipiña JJ, Kim DW, Ogura M, Pavlovsky C, Junghanss C, Milone JH, Nicolini FE, Robak T, Van Droogenbroeck J, Vellenga E, Bradley-Garelik MB, Zhu C, Hochhaus A. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood*. 2012;119(5):1123-9.
- [6] Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, Pasquini R, Clark RE, Hochhaus A, Hughes TP, Gallagher N, Hoenekopp A, Dong M, Haque A, Larson RA, Kantarjian HM; ENESTnd Investigators. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;362:2251-9.
- [7] Cortes JE, Kim DW, Kantarjian HM, Brümmendorf TH, Dyagil I, Griskevicius L, Malhotra H, Powell C, Gogat K, Countouriotis AM, Gambacorti-Passerini C. Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results from the BELA trial. *J Clin Oncol*. 2012;30:3486-92.
- [8] Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, le Coutre P, Paquette R, Chuah C, Nicolini FE, Apperley JF, Khoury HJ, Talpaz M, DiPersio J, DeAngelo DJ, Abruzzese E, Rea D, Baccarani M, Müller MC, Gambacorti-Passerini C, Wong S, Lustgarten S, Rivera VM, Clackson T, Turner CD, Haluska FG, Guilhot F, Deininger MW, Hochhaus A, Hughes T, Goldman JM, Shah NP, Kantarjian H; PACE Investigators. A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*. 2013 Nov 7;369(19):1783-96.
- [9] Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood* 1984; 63: 789-99.
- [10] Hasford J, Pffirmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluin-Nelemans JC et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90: 850-8.

- [11] Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, Guilhot J, Saussele S, Rosti G et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood*. 2011; 118: 686-92.
- [12] Pfirrmann M, Baccarani M, Saussele S, Guilhot J, Cervantes F, Ossenkoppele G, et al. Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016; 30: 48–56.
- [13] Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, Clark RE, Cortes JE, Deininger MW, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Hughes TP, Janssen JJWM, Kantarjian HM, Kim DW, Larson RA, Lipton JH, Mahon FX, Mayer J, Nicolini F, Niederwieser D, Pane F, Radich JP, Rea D, Richter J, Rosti G, Rousset P, Saglio G, Sauße S, Soverini S, Steegmann JL, Turkina A, Zaritskey A, Hehlmann R. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020; 34: 966-984.
- [14] Wang W, Cortes JE, Tang G, Khoury JD, Wang S, Bueso-Ramos CE, DiGiuseppe JA, Chen Z, Kantarjian HM, Medeiros LJ, Hu S. Risk stratification of chromosomal abnormalities in chronic myelogenous leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood*. 2016; 127: 2742-50.
- [15] Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, Radich JP, Branford S, Hughes TP, Baccarani M, Deininger MW, Cervantes F, Fujihara S, Ortmann CE, Menssen HD, Kantarjian H, O'Brien SG, Druker BJ; IRIS Investigators. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2017;376:917-927.
- [16] Cortes JE, Saglio G, Kantarjian HM, Baccarani M, Mayer J, Boqué C, Shah NP, Chuah C, Casanova L, Bradley-Garelik B, Manos G, Hochhaus A. Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naïve Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. *J Clin Oncol*. 2016;34:2333-40.
- [17] Kantarjian HM, Hughes TP, Larson RA, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Boquimpani C, Pasquini R, Clark RE, Dubruille V, Flinn IW, Kyrz-Krzemien S, Medras E, Zanichelli M, Bendit I, Cacciatore S, Titorenko K, Aimone P, Saglio G, Hochhaus A. Long-term outcomes with frontline nilotinib versus imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 10-year analysis. *Leukemia*. 2021;35:440-453.
- [18] Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, Pane F, Müller MC, Ernst T, Rosti G, Porkka K, Baccarani M, Cross NC, Martinelli G. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood*. 2011;118:1208-15.
- [19] Khorashad JS, Kelley TW, Szankasi P, Mason CC, Soverini S, Adrian LT, Eide CA, Zabriskie MS, Lange T, Estrada JC, Pomicter AD, Eiring AM, Kraft IL, Anderson DJ, Gu Z, Alikian M, Reid AG, Foroni L, Marin D, Druker BJ, O'Hare T, Deininger MW. BCR-ABL1 compound mutations in tyrosine kinase inhibitor-resistant CML: frequency and clonal relationships. *Blood*. 2013;121:489-98.
- [20] Hughes TP, Saglio G, Quintás-Cardama A, Mauro MJ, Kim DW, Lipton JH, Bradley-Garelik MB, Ukropec J, Hochhaus A. BCR-ABL1 mutation development during first-line treatment

with dasatinib or imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Leukemia*. 2015;29:1832-8.

- [21] Baccarani M, Rosti G, Castagnetti F, Haznedaroglu I, Porkka K, Abruzzese E, Alimena G, Ehrencrona H, Hjorth-Hansen H, Kairisto V, Levato L, Martinelli G, Nagler A, Lannig Nielsen J, Ozbek U, Palandri F, Palmieri F, Pane F, Rege-Cambrin G, Russo D, Specchia G, Testoni N, Weiss-Bjerrum O, Saglio G, Simonsson B. Comparison of imatinib 400 mg and 800 mg daily in the front-line treatment of high-risk, Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia: a European LeukemiaNet Study. *Blood*. 2009;113:4497-504.
- [22] Hehlmann R, Lauseker M, Jung-Munkwitz S, Leitner A, Müller MC, Pletsch N, Proetel U, Haferlach C, Schlegelberger B, Balleisen L, Hänel M, Pfirrmann M, Krause SW, Nerl C, Pralle H, Gratwohl A, Hossfeld DK, Hasford J, Hochhaus A, Saussele S. Tolerability-adapted imatinib 800 mg/d versus 400 mg/d versus 400 mg/d plus interferon- $\alpha$  in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29:1634-42.
- [23] Hochhaus A, Saglio G, Hughes TP, Larson RA, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre PD, Etienne G, Dorlhiac-Llacer PE, Clark RE, Flinn IW, Nakamae H, Donohue B, Deng W, Dalal D, Menssen HD, Kantarjian HM. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial. *Leukemia*. 2016 May;30(5):1044-54.
- [24] Cortes JE, Houry HJ, Kantarjian HM, Lipton JH, Kim DW, Schafhausen P, Matczak E, Leip E, Noonan K, Brümmendorf TH, Gambacorti-Passerini C. Long-term bosutinib for chronic phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib plus dasatinib and/or nilotinib. *Am J Hematol*. 2016;91:1206-1214.
- [25] Brümmendorf TH, Cortes JE, de Souza CA, Guilhot F, Duvillié L, Pavlov D, Gogat K, Countouriotis AM, Gambacorti-Passerini C. Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukaemia: results from the 24-month follow-up of the BELA trial. *Br J Haematol*. 2015;168:69-81.
- [26] Shah NP, Guilhot F, Cortes JE, Schiffer CA, le Coutre P, Brümmendorf TH, Kantarjian HM, Hochhaus A, Rousselot P, Mohamed H, Healey D, Cunningham M, Saglio G. Long-term outcome with dasatinib after imatinib failure in chronic-phase chronic myeloid leukemia: follow-up of a phase 3 study. *Blood*. 2014;123:2317-24.
- [27] Kantarjian HM, Giles FJ, Bhalla KN, Pinilla-Ibarz J, Larson RA, Gattermann N, Ottmann OG, Hochhaus A, Radich JP, Saglio G, Hughes TP, Martinelli G, Kim DW, Shou Y, Gallagher NJ, Blakesley R, Baccarani M, Cortes J, le Coutre PD. Nilotinib is effective in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib resistance or intolerance: 24-month follow-up results. *Blood*. 2011;117:1141-5.
- [28] Söderlund S, Dahlén T, Sandin F, Olsson-Strömberg U, Creignou M, Dreimane A, Lübking A, Markevörn B, Sjölander A, Wadenvik H, Stenke L, Richter J, Höglund M. Advanced phase chronic myeloid leukaemia (CML) in the tyrosine kinase inhibitor era - a report from the Swedish CML register. *Eur J Haematol*. 2017;98:57-66.
- [29] Bonifacio M, Stagno F, Scaffidi L, Krampera M, Di Raimondo F. Management of Chronic Myeloid Leukemia in Advanced Phase. *Front Oncol*. 2019;9:1132.

- [30] Rea D, Mauro MJ, Boquimpani C, Minami Y, Lomaia E, Voloshin S, Turkina A, Kim DW, Apperley JF, Abdo A, Fogliatto LM, Kim DDH, le Coutre P, Saussele S, Annunziata M, Hughes TP, Chaudhri N, Sasaki K, Chee L, García-Gutiérrez V, Cortes JE, Aimone P, Allepuz A, Quenet S, Bédoucha V, Hochhaus A. A phase 3, open-label, randomized study of asciminib, a STAMP inhibitor, vs bosutinib in CML after 2 or more prior TKIs. *Blood*. 2021;138:2031-2041.
- [31] Cortes JE, Saikia T, Kim DW, et al. Phase 1 trial of vodobatinib, a novel oral BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitor (TKI): activity in CML chronic phase patients failing TKI therapies including ponatinib. *Blood*. 2020;136(Supplement1):51–52.
- [32] Mahon FX, Réa D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, Legros L, Charbonnier A, Guerci A, Varet B, Etienne G, Reiffers J, Rousset P; Intergroupe Français des Leucémies Myéloïdes Chroniques. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*. 2010;11:1029-35.
- [33] Rea D, Cayuela JM. Treatment-free remission in patients with chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2018;108:355-364.
- [34] Hughes TP, Ross DM. Moving treatment-free remission into mainstream clinical practice in CML. *Blood*. 2016;128:17-23.
- [35] Abrams CS. Intracellular signaling in platelets. *Curr Opin Hematol*. 2005;12:401-5.
- [36] Heemskerk JW, Mattheij NJ, Cosemans JM. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost*. 2013;11:2-16.
- [37] van der Meijden PEJ, Heemskerk JW. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16:166-179.
- [38] Reddy EC, Rand ML. Procoagulant Phosphatidylserine-Exposing Platelets in vitro and in vivo. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:15.
- [39] Agbani EO, Poole AW. Procoagulant platelets: generation, function, and therapeutic targeting in thrombosis. *Blood*. 2017;130:2171-2179.
- [40] Dale GL, Friese P, Batar P, Hamilton SF, Reed GL, Jackson KW, Clemetson KJ, Alberio L. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature*. 2002;415:175-9.
- [41] Alberio L, Safa O, Clemetson KJ, Esmon CT, Dale GL. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood*. 2000;95:1694-702.
- [42] Dale GL. Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response. *J Thromb Haemost*. 2005;3:2185-92.
- [43] Kirkpatrick AC, Stoner JA, Dale GL, Rabadi M, Prodan CI. Higher Coated-Platelet Levels in Acute Stroke are Associated with Lower Cognitive Scores at Three Months Post Infarction. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2019;28:2398-2406.

- [44] Agbani EO, van den Bosch MT, Brown E, Williams CM, Mattheij NJ, Cosemans JM, Collins PW, Heemskerk JW, Hers I, Poole AW. Coordinated Membrane Ballooning and Procoagulant Spreading in Human Platelets. *Circulation*. 2015;132:1414-24.
- [45] Mazepa M, Hoffman M, Monroe D. Superactivated platelets: thrombus regulators, thrombin generators, and potential clinical targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:1747-52.
- [46] Pecci A, Balduini CL. Desmopressin and super platelets. *Blood*. 2014;123:1779-80.
- [47] Jackson SP, Schoenwaelder SM. Procoagulant platelets: are they necrotic? *Blood*. 2010;116:2011-8.
- [48] Hua VM, Abeynaike L, Glaros E, Campbell H, Pasalic L, Hogg PJ, Chen VM. Necrotic platelets provide a procoagulant surface during thrombosis. *Blood*. 2015;126:2852-62.
- [49] Alberio L, Ravanat C, Hechler B, Mangin PH, Lanza F, Gachet C. Delayed-onset of procoagulant signalling revealed by kinetic analysis of COAT platelet formation. *Thromb Haemost*. 2017;117:1101-1114.
- [50] Obydenyy SI, Sveshnikova AN, Ataulakhanov FI, Panteleev MA. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation. *J Thromb Haemost*. 2016;14:1867-81.
- [51] Aliotta A, Bertaggia Calderara D, Zermatten MG, Alberio L. Sodium-Calcium Exchanger Reverse Mode Sustains Dichotomous Ion Fluxes Required for Procoagulant COAT Platelet Formation. *Thromb Haemost*. 2021;121:309-321.
- [52] Kholmukhamedov A, Janecke R, Choo HJ, Jobe SM. The mitochondrial calcium uniporter regulates procoagulant platelet formation. *J Thromb Haemost*. 2018;16:2315-2321.
- [53] Mattheij NJ, Gilio K, van Kruchten R, Jobe SM, Wieschhaus AJ, Chishti AH, Collins P, Heemskerk JW, Cosemans JM. Dual mechanism of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 closure in procoagulant platelets. *J Biol Chem*. 2013;288:13325-36.
- [54] Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*. 2010;468:834-8.
- [55] Yang H, Kim A, David T, Palmer D, Jin T, Tien J, Huang F, Cheng T, Coughlin SR, Jan YN, Jan LY. TMEM16F forms a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation. *Cell*. 2012;151:111-22.
- [56] Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 2013;93:327-58.
- [57] Daskalakis M, Colucci G, Keller P, Rochat S, Silzle T, Biasiutti FD, Barizzi G, Alberio L. Decreased generation of procoagulant platelets detected by flow cytometric analysis in patients with bleeding diathesis. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014;86:397-409.
- [58] Prodan CI, Joseph PM, Vincent AS, Dale GL. Coated-platelet levels are influenced by smoking, aspirin, and selective serotonin reuptake inhibitors. *J Thromb Haemost*. 2007;5:2149-51.

- [59] Dale GL. Procoagulant Platelets: Further Details but Many More Questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37:1596-1597.
- [60] Prodan CI, Joseph PM, Vincent AS, Dale GL. Coated-platelets in ischemic stroke: differences between lacunar and cortical stroke. *J Thromb Haemost.* 2008;6:609-14.
- [61] Prodan CI, Vincent AS, Dale GL. Coated-platelet levels are elevated in patients with transient ischemic attack. *Transl Res.* 2011;158:71-5.
- [62] Prodan CI, Stoner JA, Cowan LD, Dale GL. Higher coated-platelet levels are associated with stroke recurrence following nonlacunar brain infarction. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33:287-92.
- [63] Kirkpatrick AC, Vincent AS, Dale GL, Prodan CI. Coated-platelets predict stroke at 30 days following TIA. *Neurology.* 2017;89:125-128.
- [64] Kirkpatrick AC, Stoner JA, Dale GL, Prodan CI. Elevated coated-platelets in symptomatic large-artery stenosis patients are associated with early stroke recurrence. *Platelets.* 2014;25:93-6.
- [65] Kirkpatrick AC, Tafur AJ, Vincent AS, Dale GL, Prodan CI. Coated-platelets improve prediction of stroke and transient ischemic attack in asymptomatic internal carotid artery stenosis. *Stroke.* 2014;45:2995-3001.
- [66] Kirkpatrick AC, Vincent AS, Dale GL, Prodan CI. Increased platelet procoagulant potential predicts recurrent stroke and TIA after lacunar infarction. *J Thromb Haemost.* 2020;18:660-668.
- [67] Wang L, Bi Y, Yu M, Li T, Tong D, Yang X, Zhang C, Guo L, Wang C, Kou Y, Dong Z, Novakovic VA, Tian Y, Kou J, Shammas MA, Shi J. Phosphatidylserine-exposing blood cells and microparticles induce procoagulant activity in non-valvular atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 2018;258:138-143.
- [68] Pasalic L, Wing-Lun E, Lau JK, Campbell H, Pennings GJ, Lau E, Connor D, Liang HP, Muller D, Kritharides L, Hogg PJ, Chen VM. Novel assay demonstrates that coronary artery disease patients have heightened procoagulant platelet response. *J Thromb Haemost.* 2018;16:1198-1210.
- [69] Kou Y, Zou L, Liu R, Zhao X, Wang Y, Zhang C, Dong Z, Kou J, Bi Y, Fu L, Shi J. Intravascular cells and circulating microparticles induce procoagulant activity via phosphatidylserine exposure in heart failure. *J Thromb Thrombolysis.* 2019;48:187-194.
- [70] Ray B, Pandav VM, Mathews EA, Thompson DM, Ford L, Yearout LK, Bohnstedt BN, Chaudhary S, Dale GL, Prodan CI. Coated-Platelet Trends Predict Short-Term Clinical Outcome After Subarachnoid Hemorrhage. *Transl Stroke Res.* 2018;9:459-470.
- [71] Ray B, Ross SR, Danala G, Aghaei F, Nouh CD, Ford L, Hollabaugh KM, Karfonta BN, Santucci JA, Cornwell BO, Bohnstedt BN, Zheng B, Dale GL, Prodan CI. Systemic response of coated-platelet and peripheral blood inflammatory cell indices after aneurysmal subarachnoid hemorrhage and long-term clinical outcome. *J Crit Care.* 2019;52:1-9.

- [72] Jenkins AJ, Gosmanova AK, Lyons TJ, May KD, Dashti A, Baker MZ, Olansky L, Aston CE, Dale GL. Coated-platelet levels in patients with Type 1 and with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008;81:e8-10.
- [73] Kirkpatrick AC, Vincent AS, Dale GL, Prodan CI. Clopidogrel use and smoking cessation result in lower coated-platelet levels after stroke. *Platelets.* 2020;31:236-241.
- [74] Weiss HJ, Vicic WJ, Lages BA, Rogers J. Isolated deficiency of platelet procoagulant activity. *Am J Med.* 1979;67:206-13.
- [75] Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1636:119-28.
- [76] van Geffen JP, Swieringa F, Heemskerk JW. Platelets and coagulation in thrombus formation: aberrations in the Scott syndrome. *Thromb Res.* 2016;141:S12-6.
- [77] Prodan CI, Vincent AS, Padmanabhan R, Dale GL. Coated-platelet levels are low in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 2009;40:2578-80.
- [78] Prodan CI, Vincent AS, Dale GL. Coated platelet levels correlate with bleed volume in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 2010;41:1301-3.
- [79] Prodan CI, Stoner JA, Dale GL. Lower Coated-Platelet Levels Are Associated With Increased Mortality After Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. *Stroke.* 2015;46:1819-25.
- [80] Prodan CI, Vincent AS, Kirkpatrick AC, Hoover SL, Dale GL. Higher levels of coated-platelets are observed in patients with subarachnoid hemorrhage but lower levels are associated with increased mortality at 30 days. *J Neurol Sci.* 2013;334:126-9.
- [81] Saxena K, Pethe K, Dale GL. Coated-platelet levels may explain some variability in clinical phenotypes observed with severe hemophilia. *J Thromb Haemost.* 2010;8:1140-2.
- [82] Lastrapes KK, Mohammed BM, Mazepa MA, Martin EJ, Barrett JC, Massey GV, Kuhn JG, Nolte ME, Hoffman M, Monroe DM, Brophy DF. Coated platelets and severe haemophilia A bleeding phenotype: Is there a connection? *Haemophilia.* 2016;22:148-51.
- [83] Reményi G, Szász R, Debreceni IB, Szarvas M, Batár P, Nagy B Jr, Kappelmayer J, Udvardy M. Comparison of coated-platelet levels in patients with essential thrombocythemia with and without hydroxyurea treatment. *Platelets.* 2013;24:486-92.
- [84] Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, Cooney MT, Corrà U, Cosyns B, Deaton C, Graham I, Hall MS, Hobbs FDR, Løchen ML, Löllgen H, Marques-Vidal P, Perk J, Prescott E, Redon J, Richter DJ, Sattar N, Smulders Y, Tiberi M, van der Worp HB, van Dis I, Verschuren WMM, Binno S; ESC Scientific Document Group. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J.* 2016;37:2315-2381.

- [85] Jenkins AJ, Gosmanova AK, Lyons TJ, May KD, Dashti A, Baker MZ, Olansky L, Aston CE, Dale GL. Coated-platelet levels in patients with Type 1 and with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008;81:e8-10.
- [86] Quintás-Cardama A, Han X, Kantarjian H, Cortes J. Tyrosine kinase inhibitor-induced platelet dysfunction in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2009;114:261-3.
- [87] Levade M, Severin S, Gratacap MP, Ysebaert L, Payraastre B. Targeting Kinases in Cancer Therapies: Adverse Effects on Blood Platelets. *Curr Pharm Des.* 2016;22:2315-22.
- [88] Hamadi A, Grigg AP, Dobie G, Burbury KL, Schwarzer AP, Kwa FA, Jackson DE. Ponatinib Tyrosine Kinase Inhibitor Induces a Thromboinflammatory Response. *Thromb Haemost.* 2019;119:1112-1123.
- [89] Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, Hechtman HB, Michelson AD. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:352-8.
- [90] Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001;104:1533-7.
- [91] Fachi MM, Tonin FS, Leonart LP, Rotta I, Fernandez-Llimos F, Pontarolo R. Haematological adverse events associated with tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukaemia: A network meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol.* 2019;85:2280-2291.
- [92] Munugalavadla V, Kapur R. Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005;54:63-75.
- [93] Schade AE, Schieven GL, Townsend R, Jankowska AM, Susulic V, Zhang R, Szpurka H, Maciejewski JP. Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation. *Blood.* 2008;111:1366-77.
- [94] Lee KC, Ouwehand I, Giannini AL, Thomas NS, Dibb NJ, Bijlmakers MJ. Lck is a key target of imatinib and dasatinib in T-cell activation. *Leukemia.* 2010;24:896-900.
- [95] Carneiro BA, Kaplan JB, Giles FJ. Tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukemia: update on key adverse events. *Expert Rev Hematol.* 2015;8:457-79.
- [96] Barber NA, Afzal W, Akhtari M. Hematologic toxicities of small molecule tyrosine kinase inhibitors. *Target Oncol.* 2011;6:203-15.
- [97] Mazharian A, Ghevaert C, Zhang L, Massberg S, Watson SP. Dasatinib enhances megakaryocyte differentiation but inhibits platelet formation. *Blood.* 2011;117:5198-206.
- [98] Steegmann JL, Baccarani M, Breccia M, Casado LF, García-Gutiérrez V, Hochhaus A, Kim DW, Kim TD, Khoury HJ, Le Coutre P, Mayer J, Milojkovic D, Porkka K, Rea D, Rosti G, Saussele S, Hehlmann R, Clark RE. European LeukemiaNet recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia. *Leukemia.* 2016;30:1648-71.

- [99] Haguet H, Douxfils J, Mullier F, Chatelain C, Graux C, Dogné JM. Risk of arterial and venous occlusive events in chronic myeloid leukemia patients treated with new generation BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Expert Opin Drug Saf.* 2017;16(1):5-12.
- [100] Dahlén T, Edgren G, Lambe M, Höglund M, Björkholm M, Sandin F, Sjölander A, Richter J, Olsson-Strömberg U, Ohm L, Bäck M, Stenke L; Swedish CML Group and the Swedish CML Register Group. Cardiovascular Events Associated With Use of Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia: A Population-Based Cohort Study. *Ann Intern Med.* 2016 Aug 2;165(3):161-6.
- [101] Valent P, Hadzijusufovic E, Schernthaner GH, Wolf D, Rea D, le Coutre P. Vascular safety issues in CML patients treated with BCR/ABL1 kinase inhibitors. *Blood.* 2015;125(6):901-906.
- [102] Giles FJ, Mauro MJ, Hong F, Ortmann CE, McNeill C, Woodman RC, Hochhaus A, le Coutre PD, Saglio G. Rates of peripheral arterial occlusive disease in patients with chronic myeloid leukemia in the chronic phase treated with imatinib, nilotinib, or non-tyrosine kinase therapy: a retrospective cohort analysis. *Leukemia.* 2013 Jun;27(6):1310-5.
- [103] Giles FJ, Rea D, Rosti G, Cross NCP, Steegmann JL, Griskevicius L, le Coutre P, Coriu D, Petrov L, Ossenkuppele GJ, Mahon FX, Saussele S, Hellmann A, Koskenvesa P, Brümmendorf TH, Gastl G, Castagnetti F, Vincenzi B, Haenig J, Hochhaus A. Impact of age on efficacy and toxicity of nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENEST1st subanalysis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2017 Aug;143(8):1585-1596.
- [104] Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, le Coutre PD, Paquette R, Chuah C, Nicolini FE, Apperley JF, Khoury HJ, Talpaz M, DeAngelo DJ, Abruzzese E, Rea D, Baccarani M, Müller MC, Gambacorti-Passerini C, Lustgarten S, Rivera VM, Haluska FG, Guilhot F, Deininger MW, Hochhaus A, Hughes TP, Shah NP, Kantarjian HM. Ponatinib efficacy and safety in Philadelphia chromosome-positive leukemia: final 5-year results of the phase 2 PACE trial. *Blood.* 2018;132:393-404.
- [105] Hadzijusufovic E, Albrecht-Schgoer K, Huber K, Hoermann G, Grebien F, Eisenwort G, Schgoer W, Herndlhofer S, Kaun C, Theurl M, Sperr WR, Rix U, Sadovnik I, Jilma B, Schernthaner GH, Wojta J, Wolf D, Superti-Furga G, Kirchmair R, Valent P. Nilotinib-induced vasculopathy: identification of vascular endothelial cells as a primary target site. *Leukemia.* 2017;31:2388-2397.
- [106] Gover-Proaktor A, Granot G, Shapira S, Raz O, Pasvolsky O, Nagler A, Lev DL, Inbal A, Lubin I, Raanani P, Leader A. Ponatinib reduces viability, migration, and functionality of human endothelial cells. *Leuk Lymphoma.* 2017;58:1455-1467.
- [107] Quintás-Cardama A, Kantarjian H, O'brien S, Borthakur G, Bruzzi J, Munden R, Cortes J. Pleural effusion in patients with chronic myelogenous leukemia treated with dasatinib after imatinib failure. *J Clin Oncol.* 2007 Sep 1;25(25):3908-14
- [108] Mahé J, de Campaigno EP, Chené AL, Montastruc JL, Despas F, Jolliet P. Pleural adverse drugs reactions and protein kinase inhibitors: Identification of suspicious targets by disproportionality analysis from Vigibase. *Br J Clin Pharmacol.* 2018;84:2373-2383.

- [109] Powers JJ, Dubovsky JA, Epling-Burnette PK, Moscinski L, Zhang L, Mustjoki S, Sotomayor EM, Pinilla-Ibarz JA. A molecular and functional analysis of large granular lymphocyte expansions in patients with chronic myelogenous leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Lymphoma*. 2011;52:668-79.
- [110] Nagata Y, Ohashi K, Fukuda S, Kamata N, Akiyama H, Sakamaki H. Clinical features of dasatinib-induced large granular lymphocytosis and pleural effusion. *Int J Hematol*. 2010;91:799-807.
- [111] Porkka K, Khoury HJ, Paquette RL, Matloub Y, Sinha R, Cortes JE. Dasatinib 100 mg once daily minimizes the occurrence of pleural effusion in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase and efficacy is unaffected in patients who develop pleural effusion. *Cancer*. 2010;116:377-86.
- [112] Latagliata R, Breccia M, Fava C, Stagno F, Tiribelli M, Luciano L, Gozzini A, Gugliotta G, Annunziata M, Cavazzini F, Ferrero D, Musto P, Capodanno I, Iurlo A, Visani G, Crugnola M, Calistri E, Castagnetti F, Vigneri P, Alimena G. Incidence, risk factors and management of pleural effusions during dasatinib treatment in unselected elderly patients with chronic myelogenous leukaemia. *Hematol Oncol*. 2013;31:103-9.
- [113] Kim D, Goh HG, Kim SH, Cho BS, Kim DW. Long-term pattern of pleural effusion from chronic myeloid leukemia patients in second-line dasatinib therapy. *Int J Hematol*. 2011;94:361-371.
- [114] Breccia M, D'Elia GM, D'Andrea M, Latagliata R, Alimena G. Pleural-pericardic effusion as uncommon complication in CML patients treated with Imatinib. *Eur J Haematol*. 2005;74:89-90.
- [115] Hughes TP, Laneuville P, Rousselot P, Snyder DS, Rea D, Shah NP, Paar D, Abruzzese E, Hochhaus A, Lipton JH, Cortes JE. Incidence, outcomes, and risk factors of pleural effusion in patients receiving dasatinib therapy for Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Haematologica*. 2019;104:93-101.
- [116] Apperley JF, Cortes JE, Kim DW, Roy L, Roboz GJ, Rosti G, Bullorsky EO, Abruzzese E, Hochhaus A, Heim D, de Souza CA, Larson RA, Lipton JH, Khoury HJ, Kim HJ, Sillaber C, Hughes TP, Erben P, Van Tornout J, Stone RM. Dasatinib in the treatment of chronic myeloid leukemia in accelerated phase after imatinib failure: the START a trial. *J Clin Oncol*. 2009;27:3472-9.
- [117] Hochhaus A, Saglio G, Hughes TP, Larson RA, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre PD, Etienne G, Dorlhiac-Llacer PE, Clark RE, Flinn IW, Nakamae H, Donohue B, Deng W, Dalal D, Menssen HD, Kantarjian HM. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial. *Leukemia*. 2016;30:1044-54.
- [118] Breccia M, Muscaritoli M, Gentilini F, Latagliata R, Carosino I, Rossi Fanelli F, Alimena G. Impaired fasting glucose level as metabolic side effect of nilotinib in non-diabetic chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib. *Leuk Res*. 2007;31:1770-2.
- [119] Nicolini FE, Turkina A, Shen ZX, Gallagher N, Jootar S, Powell BL, De Souza C, Zheng M, Szczudlo T, le Coutre P. Expanding Nilotinib Access in Clinical Trials (ENACT): an open-label, multicenter study of oral nilotinib in adult patients with imatinib-resistant or imatinib-

intolerant Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in the chronic phase. *Cancer*. 2012;118:118-26.

- [120] le Coutre P, Giles FJ, Hochhaus A, Martinelli G, Wang J, Passos V. Analysis of glucose profiles in imatinib-resistant or intolerant chronic myelogenous leukemia (CML) patients (pts) treated with nilotinib: lack of correlation between glucose levels and nilotinib efficacy. *Blood*. 2007; 110: 4588.
- [121] Saglio G, Larson RA, Hughes TP, Issaragrisil S, Turkina AG, Marin D. Efficacy and safety of nilotinib in chronic phase (CP) chronic myeloid leukemia (CML) patients (Pts) with type 2 diabetes in the ENESTnd trial. *Blood*. 2010; 116: 3430.
- [122] Rea D, Gautier JF, Breccia M, Saglio G, Hughes TP, Kantarjian HM. Incidence of hyperglycemia by 3 years in patients (Pts) with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with nilotinib (NIL) or imatinib (IM) in ENESTnd. *Blood*. 2012;120:1686.
- [123] Hägerkvist R, Sandler S, Mokhtari D, Welsh N. Amelioration of diabetes by imatinib mesylate (Gleevec): role of beta-cell NF-kappaB activation and anti-apoptotic preconditioning. *FASEB J*. 2007;21:618-28.
- [124] Han MS, Chung KW, Cheon HG, Rhee SD, Yoon CH, Lee MK, Kim KW, Lee MS. Imatinib mesylate reduces endoplasmic reticulum stress and induces remission of diabetes in db/db mice. *Diabetes*. 2009;58:329-36.
- [125] Breccia M, Muscaritoli M, Cannella L, Stefanizzi C, Frustaci A, Alimena G. Fasting glucose improvement under dasatinib treatment in an accelerated phase chronic myeloid leukemia patient unresponsive to imatinib and nilotinib. *Leuk Res*. 2008;32:1626–1628.
- [126] Racil Z, Belohlavkova P, Cetkovsky P, Faber E, Klamova H, Ludmila M, Sacha T, Jaroslava V, Zackova D, Zak P, Mayer J. Comparison of Glucose and Lipid Metabolism Abnormality during Nilotinib, Imatinib and Dasatinib Therapy – Results of Enigma 2 Study. *Blood*. 2014;124:1813.
- [127] Ito Y, Miyamoto T, Chong Y, Maki T, Akashi K, Kamimura T. Nilotinib exacerbates diabetes mellitus by decreasing secretion of endogenous insulin. *Int J Hematol*. 2013;97:135-8.
- [128] Rea D, Mirault T, Cluzeau T, Gautier JF, Guilhot F, Dombret H, Messas E. Early onset hypercholesterolemia induced by the 2nd-generation tyrosine kinase inhibitor nilotinib in patients with chronic phase-chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2014;99:1197-203.
- [129] Aichberger KJ, Herndlhofer S, Schernthaner GH, Schillinger M, Mitterbauer- Hohendanner G, Sillaber C et al. Progressive peripheral arterial occlusive disease and other vascular events during nilotinib therapy in CML. *Am J Hematol*. 2011;86:533–539.
- [130] Hiwase DK, Yeung DT, Carne L. Hypercholesterolemia in imatinib intolerant/resistant CML-CP patients treated with nilotinib: a retrospective analysis. *Blood*. 2013;122:1503.
- [131] Khoury HJ, Cortes JE, Kantarjian HM, Gambacorti-Passerini C, Baccarani M, Kim DW, Zaritskey A, Countouriotis A, Besson N, Leip E, Kelly V, Brümmendorf TH. Bosutinib is active in chronic phase chronic myeloid leukemia after imatinib and dasatinib and/or nilotinib therapy failure. *Blood*. 2012;119:3403-12.

- [132] Kostos L, Burbury K, Srivastava G, Prince HM. Gastrointestinal bleeding in a chronic myeloid leukaemia patient precipitated by dasatinib-induced platelet dysfunction: Case report. *Platelets*. 2015;26:809-11.
- [133] Mezei G, Debreceni IB, Kerenyi A, Remenyi G, Szasz R, Illes A, Kappelmayer J, Batar P. Dasatinib inhibits coated-platelet generation in patients with chronic myeloid leukemia. *Platelets*. 2019;30:836-843.
- [134] Teo YL, Ho HK, Chan A. Risk of tyrosine kinase inhibitors-induced hepatotoxicity in cancer patients: a meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2013;39:199-206.
- [135] Spataro V. Nilotinib in a patient with postnecrotic liver cirrhosis related to imatinib. *J Clin Oncol*. 2011;29:e50-2.
- [136] Lin NU, Sarantopoulos S, Stone JR, Galinsky I, Stone RM, Deangelo DJ, Soiffer RJ. Fatal hepatic necrosis following imatinib mesylate therapy. *Blood*. 2003;102:3455-6.
- [137] Kikuchi S, Muroi K, Takahashi S, Kawano-Yamamoto C, Takatoku M, Miyazato A, Nagai T, Mori M, Komatsu N, Ozawa K. Severe hepatitis and complete molecular response caused by imatinib mesylate: possible association of its serum concentration with clinical outcomes. *Leuk Lymphoma*. 2004;45:2349-51.
- [138] Ohyashiki K, Kuriyama Y, Nakajima A, Tauchi T, Ito Y, Miyazawa H, Kimura Y, Serizawa H, Ebihara Y. Imatinib mesylate-induced hepato-toxicity in chronic myeloid leukemia demonstrated focal necrosis resembling acute viral hepatitis. *Leukemia*. 2002;16:2160-1.
- [139] Shah RR, Morganroth J, Shah DR. Hepatotoxicity of tyrosine kinase inhibitors: clinical and regulatory perspectives. *Drug Saf*. 2013;36:491-503.
- [140] Apperley J. Issues of imatinib and pregnancy outcome. *J Natl Compr Canc Netw*. 2009;7:1050-8.
- [141] Carlier P, Markarian M, Bernard N, Lagarce L, Dautriche A, Béné J, Fouilhé Sam-Lai N, Eftekhari P. Pregnancy outcome among partners of male patients receiving imatinib, dasatinib or nilotinib in chronic myeloid leukemia: reports collected by the French network pharmacovigilance centers. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;295:269-271.
- [142] Cortes JE, Abruzzese E, Chelysheva E, Guha M, Wallis N, Apperley JF. The impact of dasatinib on pregnancy outcomes. *Am J Hematol*. 2015;90:1111-5.
- [143] Abruzzese E, de Fabritiis P, Trawinska MM, Niscola P, Apperley JF, Mauro MJ. Back to the future: Treatment-free remission and pregnancy in chronic myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2019;102:197-199.
- [144] Cortes JE, Gambacorti-Passerini C, Deininger M, Abruzzese E, DeAnnuntis L, Brümmendorf TH. Pregnancy outcomes in patients treated with bosutinib. *Int J Hematol Oncol*. 2020;9:IJH26.
- [145] Nicolini FE, Alcazer V, Hugué F, Cony-Makhoul P, Heiblig M, Fort MP, Morisset S, Guerci-Bresler A, Soula V, Sobh M, d'Estaing SG, Daudin M, Etienne G. CML patients show

sperm alterations at diagnosis that are not improved with imatinib treatment. *Leuk Res.* 2016;48:80-3.

- [146] Lasica M, Willcox A, Burbury K, Ross DM, Branford S, Butler J, Filshie R, Januszewicz H, Joske D, Mills A, Simpson D, Tam C, Taylor K, Watson AM, Wolf M, Grigg A. The effect of tyrosine kinase inhibitor interruption and interferon use on pregnancy outcomes and long-term disease control in chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2019;60:1796-1802.
- [147] Chelysheva E, Turkina A. Risks and challenges of CML management during pregnancy: Looking for a balanced decision. *Eur J Haematol.* 2019;102:378-379.
- [148] Chelysheva E, Aleshin S, Polushkina E, Shmakov R, Shokhin I, Chilov G, Turkina A. Breastfeeding in patients with chronic myeloid leukaemia: Case series with measurements of drug concentrations in maternal milk and literature review. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2018;10:e2018027.
- [149] Kantarjian H, Cortes J, Kim DW, Dorlhiac-Llacer P, Pasquini R, DiPersio J, Müller MC, Radich JP, Khoury HJ, Khoroshko N, Bradley-Garelik MB, Zhu C, Tallman MS. Phase 3 study of dasatinib 140 mg once daily versus 70 mg twice daily in patients with chronic myeloid leukemia in accelerated phase resistant or intolerant to imatinib: 15-month median follow-up. *Blood.* 2009;113:6322-9.
- [150] Lilly MB, Ottmann OG, Shah NP, Larson RA, Reiffers JJ, Ehninger G, Müller MC, Charbonnier A, Bullorsky E, Dombret H, Brigid Bradley-Garelik M, Zhu C, Martinelli G. Dasatinib 140 mg once daily versus 70 mg twice daily in patients with Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who failed imatinib: Results from a phase 3 study. *Am J Hematol.* 2010;85:164-70.
- [151] Brave M, Goodman V, Kaminskas E, Farrell A, Timmer W, Pope S, Harapanhalli R, Saber H, Morse D, Bullock J, Men A, Noory C, Ramchandani R, Kenna L, Booth B, Gobburu J, Jiang X, Sridhara R, Justice R, Pazdur R. Sprycel for chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia resistant to or intolerant of imatinib mesylate. *Clin Cancer Res.* 2008;14:352-9.
- [152] Ono Y, Mori T, Kato J, Yamane A, Yajima T, Iwao Y, Hibi T, Okamoto S. Hemorrhagic colonic ulcers caused by dasatinib for chronic myelogenous leukemia. *Int J Hematol.* 2010;92:556-8.
- [153] Sartor C, Papayannidis C, Chiara Abbenante M, Iacobucci I, Broccoli A, Venturi C, Testoni N, Ferrari A, Martinelli G. Recurrent Gastrointestinal Hemorrhage in Treatment with Dasatinib in a Patient Showing SMAD4 Mutation with Acute Lymphoblastic Leukemia Philadelphia Positive and Juvenile Polyposis Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Syndrome. *Hematol Rep.* 2013;5:26-7.
- [154] Yim E, Choi YG, Nam YJ, Lee J, Kim JA. Dasatinib induces severe hemorrhagic colitis in a patient with accelerated phase of chronic myelogenous leukemia. *Korean J Intern Med.* 2018;33:446-448.
- [155] Eskazan AE, Hatemi İ, Öngören Aydın S, Ar MC, Soysal T. Acute colitis presenting with hematochezia in a patient with chronic myeloid leukemia during dasatinib therapy. *Turk J Gastroenterol.* 2014;25 Suppl 1:233.

- [156] Kmira Z, Nesrine BS, Houneida Z, Wafa BF, Aida S, Yosra BY, Monia Z, Sriha B, Abderrahim K. Severe hemorrhagic colitis in a patient with chronic myeloid leukemia in the blastic phase after dasatinib use. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2013;4:59-62.
- [157] Senis YA, Mazharian A, Mori J. Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood.* 2014;124:2013-24.
- [158] Huang MM, Bolen JB, Barnwell JW, Shattil SJ, Brugge JS. Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:7844-8.
- [159] Ezumi Y, Shindoh K, Tsuji M, Takayama H. Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma chain complex on human platelets. *J Exp Med.* 1998;188:267-76.
- [160] Giles FJ, O'Dwyer M, Swords R. Class effects of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2009;23:1698-707.
- [161] Gratacap MP, Martin V, Valéra MC, Allart S, Garcia C, Sié P, Recher C, Payrastre B. The new tyrosine-kinase inhibitor and anticancer drug dasatinib reversibly affects platelet activation in vitro and in vivo. *Blood.* 2009;114:1884-92.
- [162] Wang X, Roy A, Hochhaus A, Kantarjian HM, Chen TT, Shah NP. Differential effects of dosing regimen on the safety and efficacy of dasatinib: retrospective exposure-response analysis of a Phase III study. *Clin Pharmacol.* 2013 Jun 10;5:85-97.
- [163] Nishiwaki S, Maeda M, Yamada M, Okuno S, Harada Y, Suzuki K, Kurahashi S, Urano F, Okamura S, Sugiura I. Clinical efficacy of fecal occult blood test and colonoscopy for dasatinib-induced hemorrhagic colitis in CML patients. *Blood.* 2017;129:126-128.
- [164] Kreutzman A, Colom-Fernández B, Jiménez AM, Ilander M, Cuesta-Mateos C, Pérez-García Y, Arévalo CD, Brück O, Hakanen H, Saarela J, Ortega-Carrión A, de Rosendo A, Juanes-García A, Steegmann JL, Mustjoki S, Vicente-Manzanares M, Muñoz-Calleja C. Dasatinib Reversibly Disrupts Endothelial Vascular Integrity by Increasing Non-Muscle Myosin II Contractility in a ROCK-Dependent Manner. *Clin Cancer Res.* 2017;23:6697-6707.
- [165] Merkulova A, Mitchell SC, Stavrou EX, Forbes GL, Schmaier AH. Ponatinib treatment promotes arterial thrombosis and hyperactive platelets. *Blood Adv.* 2019;3:2312-2316.
- [166] Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, Bixby D, Mauro MJ, Flinn I, O'Hare T, Hu S, Narasimhan NI, Rivera VM, Clackson T, Turner CD, Haluska FG, Druker BJ, Deininger MW, Talpaz M. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med.* 2012;367:2075-88.
- [167] Yasu T, Momo K, Kobayashi S, Kuroda S, Tojo A. Simple Determination of Plasma Ponatinib Concentration Using HPLC. *Biol Pharm Bull.* 2018;41:254-258.
- [168] Ye YE, Woodward CN, Narasimhan NI. Absorption, metabolism, and excretion of [<sup>14</sup>C]ponatinib after a single oral dose in humans. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;79:507-518.

- [169] Beke Debreceni I, Mezei G, Batár P, Illés Á, Kappelmayer J. Dasatinib Inhibits Procoagulant and Clot Retracting Activities of Human Platelets. *Int J Mol Sci.* 2019;20:5430.
- [170] Loren CP, Aslan JE, Rigg RA, Nowak MS, Healy LD, Gruber A, Druker BJ, McCarty OJ. The BCR-ABL inhibitor ponatinib inhibits platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) signaling, platelet activation and aggregate formation under shear. *Thromb Res.* 2015;135:155-60.
- [171] Deb S, Boknäs N, Sjöström C, Tharmakulanathan A, Lotfi K, Ramström S. Varying effects of tyrosine kinase inhibitors on platelet function-A need for individualized CML treatment to minimize the risk for hemostatic and thrombotic complications? *Cancer Med.* 2020;9:313-323.
- [172] Zeng P, Schmaier A. Ponatinib and other CML Tyrosine Kinase Inhibitors in Thrombosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21:6556.
- [173] Latifi Y, Moccetti F, Wu M, Xie A, Packwood W, Qi Y, Ozawa K, Shentu W, Brown E, Shirai T, McCarty OJ, Ruggeri Z, Moslehi J, Chen J, Druker BJ, López JA, Lindner JR. Thrombotic microangiopathy as a cause of cardiovascular toxicity from the BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitor ponatinib. *Blood.* 2019;133:1597-1606.
- [173] Mohanavelu P, Mutnick M, Mehra N, White B, Kudrimoti S, Hernandez Kluesner K, Chen X, Nguyen T, Horlander E, Thenot H, Kota V, Mitchell CS. Meta-Analysis of Gastrointestinal Adverse Events from Tyrosine Kinase Inhibitors for Chronic Myeloid Leukemia. *Cancers.* 2021;13(7):1643.

## **11. Kulcsszavak**

krónikus mieloid leukémia, tirozinkináz-gátló kezelés, tirozinkináz-gátló intolerancia/rezisztencia, nemkívánatos mellékhatások, primer hemosztázis, prokoaguláns vérlemezkék

## **Keywords**

chronic myeloid leukemia, tyrosine kinase inhibitor treatment, tyrosine kinase inhibitor intolerance and resistance, adverse events, primary hemostasis, procoagulant platelets

## 12. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Batár Péternek szeretném köszönetemet kifejezni, aki szakmai ötleteivel megalapozta a kutatómunkámat. Segítségemre volt a tervezésében, a kivitelezésben, az eredmények értékelésében, és minden probléma megoldásában önzetlenül mellettem állt. Hálás vagyok az élet minden területén nyújtott támogatásáért.

Köszönet illeti Bekéné Dr. Debreceni Ildikót az eredményes közös munkáért, a statisztikai számításokért és az eredményeink összegzésében nyújtott segítségért.

Hálával tartozom Dr. Ujj Györgynek, aki egyetemi éveim alatt, TDK munkám témavezetőjeként felkeltette érdeklődésemet a hematológia iránt.

Köszönöm Illés Árpád professzor úrnak, hogy folyamatosan ösztönözte tudományos munkámat.

Köszönettel tartozom Kappelmayer János professzor úrnak és Dr. Kerényi Adriennek, akik szakértelmükkel és tanácsaikkal segítették a közös munkát.

Külön köszönet illeti Dr. Baráthné Szikora Évát, aki mindig lelkesen segítségemre volt a betegekkel való kapcsolattartásban, a vizsgálatok és vérvételek megszervezésben és kivitelezésében.

Köszönettel tartozom Dr. Ruszty Katalin Zsófiának és Futó Dórának az adatok rendszerezésében nyújtott segítségükért.

Köszönöm a közlemények valamennyi társszerzőjének és munkatársaimnak a segítséget és a támogatást.

Végezetül hálásan köszönöm a családomnak, elsősorban a szüleimnek és gyermekeimnek a támogatást, azt hogy szeretettel és türelemmel mindvégig mellettem álltak.

## 13. Publikációs lista



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/387/2023.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Mezei Gabriella

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Mezei, G.**, Batár, P., Kozma, L., Illés, Á., Kappelmayer, J., Bekéné Debreceni, I.: Ponatinib Exerts an Inhibitory Effect on Collagen-induced Platelet Aggregation and Generation of Coated-Platelets.  
*Anticancer Res.* 41 (10), 4867-4874, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.21873/anticancerres.15300>  
IF: 2.435
2. **Mezei, G.**, Bekéné Debreceni, I., Kerényi, A., Reményi, G., Szász, R., Illés, Á., Kappelmayer, J., Batár, P.: Dasatinib inhibits coated-platelet generation in patients with chronic myeloid leukemia.  
*Platelets.* 30 (7), 836-843, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/09537104.2018.1501470>  
IF: 3.378

### További közlemények

3. **Mezei, G.**, Illés, Á., Batár, P.: A krónikus myeloid leukaemia tirozin-kináz-gátló kezelésének mellékhatásai és azok gyakorlati ellátása.  
*Orv. Hetil.* 162 (30), 1198-1207, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2021.32177>  
IF: 0.707
4. Kotogány, E., Balog, J. A., Nagy, L. I., Alföldi, R., Bertagnolo, V., Brugnol, F., Demjén, A., Kovács, A. K., Batár, P., **Mezei, G.**, Szabó, R., Kanizsai, I., Varga, C., Puskás, L. G., Szeben, G. J.: Imidazo[1,2-b]pyrazole-7-Carboxamide Derivative Induces Differentiation-Coupled Apoptosis of Immature Myeloid Cells Such as Acute Myeloid Leukemia and Myeloid-Derived Suppressor Cells.  
*Int. J. Mol. Sci.* 21 (14), 1-27, 2020.  
IF: 5.924





5. Bekéné Debreceni, I., **Mezei, G.**, Batár, P., Illés, Á., Kappelmayer, J.: Dasatinib Inhibits Procoagulant and Clot Retracting Activities of Human Platelets.  
*Int. J. Mol. Sci.* 20 (21), 1-14, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20215430>  
IF: 4.556
6. Telek, B., Rejtő, L., Batár, P., Miltényi, Z., Reményi, G., Simon, Z., Ujj, Z., **Mezei, G.**, Szász, R., Kiss, A., Udvardy, M., Illés, Á.: Az akut myeloid leukaemia gyógyszeres kezelése: Jelenlegi lehetőségek, jövőbeli kilátások.  
*Orvosi Hetilap.* 157 (22), 843-848, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2016.30433>  
IF: 0.349
7. Reményi, G., **Mezei, G.**, Illés, Á.: FLT3-gátlók akut myeloid leukaemia kezelésében.  
*Hematol. Transzfuziol.* 49 (2), 67-74, 2016.
8. Udvardy, M., Telek, B., **Mezei, G.**, Batár, P., Altorjay, I.: Successful control of massive coumarol induced acute upper GI bleeding and correction of prothrombin time by recombinant active Factor VII (Eptacog-alpha, NovoSeven) in a patient with a prosthetic aortic valve and two malignancies (chronic lymphoid leukaemia and lung cancer).  
*Blood Coagul. Fibrinolysis.* 15 (3), 265-267, 2004.  
IF: 1.506
9. Papp, M., **Mezei, G.**, Udvardy, M., Altorjay, I.: Haematológiai és haemostasis paraméterek változása transjuguláris intrahepaticus portosystemas shunt hatására.  
*Orv. Hetil.* 144 (27), 1341-1345, 2003.
10. Telek, B., Rejtő, L., **Mezei, G.**, Karászi, É., Kappelmayer, J., Balázs, M., Kiss, A., Ujj, G., Rák, K., Udvardy, M.: Molekuláris biológiai vizsgálatok kronikus lymphoid leukaemiában = Molecular biology examination in chronic lymphocytic leukemia.  
*Orv. Hetil.* 142 (16), 833-837, 2001.





11. Rejtő, L., Balázs, M., Ádány, R., Rák, K., Telek, B., Kiss, A., Ujj, G., **Mezei, G.**, Balogh, E., Udvardy, M.: Fluoreszcencia in situ hibridizációval szerzett tapasztalataink a krónikus myeloid leukaemia diagnosztikájában és követésében.  
*Orv. Hetil.* 141 (39), 2133-2137, 2000.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,855**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
5,813**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.08.23.



## **14. Függelék - A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények gyűjteménye**

**Mezei G**, Debreceni IB, Kerényi A, Remenyi G, Szasz R, Illes A, Kappelmayer J, Batar P. Dasatinib inhibits coated-platelet generation in patients with chronic myeloid leukemia. Platelets. 2019;30(7):836-843.

**Mezei G**, Batár P, Kozma L, Illés Á, Kappelmayer J, Debreceni IB. Ponatinib Exerts an Inhibitory Effect on Collagen-induced Platelet Aggregation and Generation of Coated-Platelets. Anticancer Res. 2021 Oct;41(10):4867-4874