

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Interferon-alfa alkalmazása a gyermekonkológiában

Dr. Szegedi István

**Debreceni Egyetem
Orvos és Egészségtudományi Centrum
Gyermecklinika
2006**

BEVEZETÉS

A debreceni Orvostudományi Egyetem Gyermekklinikája a Magyar Gyermekorvos Társaság Gyermekonkológiai Szekciójának regionális centrumaként működik. A gyermekonkológiai központokban országosan évente mintegy 300 új tumoros, 70-80 új leukaemiás eset kerül diagnosztizálásra, melyből klinikánkon évente 35-40 új rosszindulatú vérképzőszervi illetőleg egyéb daganatos megbetegedésben szenvedő gyermek ellátása történik. Hasonlóan a nemzetközi halálozási adatokhoz, hazánkban is a rosszindulatú betegségek képviselik a második leggyakoribb halálokot a gyermekkorban, s az esetek egyharmadát kitevő rosszindulatú vérképzőszervi betegek jelentik napjaink talán legnagyobb terápiás kihívását.

Az elmúlt évtizedekben a biológiai ismeretek bővülése, a diagnosztikus és terápiás lehetőségek fejlődése következtében a korábban csaknem kivétel nélkül fatális gyermekkori daganatos betegségek mintegy 70%-ban gyógyíthatókká váltak. Ez a kedvező változás elsősorban az intenzív kombinált kemoterápiás protokollok és a szupportáló kezelés területén megfigyelhető robbanásszerű fejlődés javára írható, melyek alkalmazása drámai módon javította az akut leukaemiák kezelési eredményeit is. Jelenleg az akut limfoblasztos leukaemiában (ALL) szenvedő gyermekek mintegy 80%-a meggyógyul, 20%-át azonban terápia rezisztencia, relapszus vagy a kezelés toxikus, infekciós szövődményei következtében elveszítjük. Sajnos a túlélési eredmények javulásában megfigyelhető kedvező tendencia lelassult, az utóbbi évtizedben jelentős előrelépés nem történt, minden egyes százalékpontnyi további javulás óriási erőfeszítéseket igényel. Sajátságos ellentmondás, hogy az anti-leukaemiás, anti-neoplastikus protokollok alkalmazásának határt szab toxicitásuk - elsősorban mielotoxikus és immunszuppresszív tulajdonságuk - másrészt viszont a klinikai tanulmányok amellet tanúskodnak, hogy az egyes kezelési sémák agresszivitása kedvezően befolyásolja a gyógyulás eredményességét. Egyre nagyobb hangsúlyt kap a túlélési adatok mellett az életminőség, melynek figyelembe vételével a jelenlegi kezelés intenzitása a kifejezett toxikus hatások miatt masszív szupportáló kezelés mellett sem fokozható tovább.

A gyermekkori akut limfoblasztos leukaemia kapcsán elért eredmények olyan úttörő jellegűek voltak, amelyek a „felnőtt” hematológiára is termékenyítőleg hatottak. Önteltség nélkül állíthatjuk, hogy a gyermekhematológusok a kombinált kemoterápiás protokoll stratégiája kidolgozásának zászlóvivői voltak. Ugyanakkor vannak olyan, a felnőtt betegek között gyakori rosszindulatú vérképzőszervi megbetegedések, így a mieloproliferatív megbetegedések és a mielodiszpláziás szindróma, amelyeknek a létezése a gyermekkorban –

a krónikus mieloid leukaemia kivételével – vitatott volt. A gyermekkori mieloproliferatív kórképekről magyar nyelven a közelmúltban nem jelent meg korszerű összefoglaló cikk, sem tankönyvi adat. Ebben a két betegségcsoportban a gyermekhematológusok „szorultak” a „felnőtt” hematológusok útmutatására. Érdeklődésem úgy az akut leukaemia, mint a krónikus gyermekkori vérképzőszervi rosszindulatú megbetegedések vonatkozásában a már elért szép eredmények további javításának lehetősége és igénye keltette fel.

Előrelépést jelent a betegek rizikó tényezők szerinti csoportosítása, az egyénre, a rosszindulatú betegség altípusára szabott kezelés bevezetése. Új terápiás stratégiai elem a gazdaszervezet ellenálló képességének növelését illetően a leukaemia/tumor sejtek biológiai tulajdonságainak módosítását célzó, kevésbé toxikus vegyületek, eljárások alkalmazása. Ezek a terápiás modalitások most kezdik helyüket megtalálni a kezelés fegyvertárában, azonban gyermekkorban csak ritkán alkalmazhatók. A beteg immunválaszának fokozása jelentősen hozzájárul a súlyos fertőzések leküzdéséhez csakúgy, mint a kóros klón elpusztításához. A leukaemia sejtek extracelluláris szabályozása, genetikai állományának befolyásolása képes a kóros sejtpopuláció újdonszaporodása és terminális differenciálódása között fennálló egyensúly megváltoztatására. Joggal remélhetjük tehát, hogy a monoklonális antitestek, citokinek, a differenciálódást indukáló, az angiogenezist gátló és egyéb biomoduláns vegyületek intelligens kombinációja tovább javítja majd a citoablatív terápiával illetően vérképző őssejt-átültetéssel elért eredményeket.

Az elmúlt évek kutatási eredményei, köztük saját megfigyeléseink mellett szólnak, hogy a citokinek eltérő módon befolyásolják a normál csontvelői vérképző elődsejtek és a leukaemia sejtek szaporodását és érését: bizonyos növekedési faktorok és kombinációk elősegítik a leukaemia sejtek in vitro szaporodását, míg mások elsősorban terminális érésüket és, az apoptózis folyamata révén, pusztulásukat idézik elő. Az ismert citokinek közül a granulocita-stimuláló faktor (G-CSF), a granulocita–makrofág (GM)-CSF, valamint interleukin (IL)-3 már bevezetésre került leukaemiás és egyéb klonális limfo-hemopoetikus kórformákban szenvedő betegek terápiás sémájában, a normál csontvelői sejtek serkentése céljából. A hemopoetikus növekedési faktorok leukaemia sejtekre kifejtett stimuláló hatása azonban negatívan befolyásolhatja az antileukaemiás kezelés terápiás effektusát. Tekintettel arra, hogy az őssejt faktor (SCF) az őssejteknek és a legkorábbi progenitoroknak, a G-CSF és GM-CSF pedig elsősorban az elkötelezett mieloid, különösen a granulocita-makrofág vonal sejtjeinek növekedését befolyásolja, nem meglepő ezen faktorok mieloid leukaemia sejteket stimuláló hatása. Ugyanakkor T-sejtes, B-sejtes és My+ALL sejteken is igazolható az SCF

receptorok jelenléte, s az SCF bizonyítottan fokozza számos leukaemia sejtvonal proliferációját, köztük elsősorban T-limfoblasztos leukaemia sejtvonalakét.

A kedvezőtlen, szaporodást serkentő hatás mellett figyelmet érdemel a citokinek illetőleg kombinációjuk proliferációt gátló hatása, mely tulajdonság kiaknázható a neopláziák kezelésében. Legintenzívebben az IL-2 és a tumor nekrosis faktor (TNF) daganat ellenes hatását vizsgálták. Előbbi, többek között a tumor specifikus T-sejtek, a limfokin-aktivált ölü (LAK) sejtek aktiválása révén, utóbbi a monocita citotoxicitás, a peroxid termelés fokozása révén fejt ki hatását. Biztató vizsgálatok folynak T-sejt működést szabályozó, angiogenezist gátló és egyéb daganat ellenes hatással rendelkező proinflammatorikus citokinekkel, mint amilyen az IL-12, IL-18 és az IL-27.

A különböző citokinek és kombinációjuk eltérően változtatják meg a leukaemia/lymphoma sejtek önmegegyezés és terminális differenciálódása közötti egyensúlyt. Ezt a differenciális szabályozó hatást önmagában vagy citosztatikus hatású gyógyszerekkel együtt a leukaemiás, neoplastikus klón gyors és tökéletes elpusztítására használhatjuk ki a normál vérképző elemek viszonylagos megkímélése mellett.

Az interferonok, vírus ellenes hatásuk mellett, elősegítik az emlős sejtek differenciálódását. A sejt szaporodás gátlásával, a szervezet tumor ellenes védekezést serkentő mechanizmusaival erőteljes daganat ellenes hatást fejtenek ki, amelyet felnőttkori rosszindulatú vérképzőszervi és szolid tumoros megbetegedésekben széles körben felhasználnak. A Philadelphia pozitív (Ph+) krónikus mieloid leukaemia (CML) interferon-alfa ($IFN\alpha$) kezelése kapcsán észlelt kedvező citogenetikai válasz és túlélési előny új korszakot nyitott ezen anti-neoplastikus glikoproteinek terápiás alkalmazásában. Ph+ CML mellett az $IFN\alpha$ hazánkban törzskönyvezve van follikuláris non-Hodgkin lymphomában (NHL), hajjas-sejtes leukaemiában, kután T-sejtes lymphomában, Kaposi sarcomában és malignus melanomában. Terápiás hatékonysága a felnőttkorban gyakori, gyermekkorban elvétve előforduló mieloproliferatív kórképek kezelésében is igazolást nyert. Az irodalomban közölt, mintegy 50 gyermekkori essentialis thrombocythaemiás (ET) eset kevés $IFN\alpha$ kezeléssel szerzett tapasztalatról számol be, azonban felnőtt ET betegek $IFN\alpha$ kezelése kapcsán a tanulmányok 78%-os kedvező válaszreakciót közöltek. Az $IFN\alpha$ kezelés klinikai hatékonyságát gyermekkori rosszindulatú kórképekben kevés számú és kicsiny betegcsoportot átölelő klinikai tanulmány, esetközlés demonstrálta. A Ph+ CML, amelyben az $IFN\alpha$ kezelés bizonyítottan hatékony, mindössze töredéke a gyermekkori neopláziáknak. Gondos és következetes in vitro kísérletek és klinikai tanulmányok végzésére van tehát szükség, hogy a

már bevezetett citokinek terápiás alkalmazása mellett meggyőződjünk ezen különösen hatékony szabályozó molekulák biztonságos gyermekhematológiai-onkológiai alkalmazásainak lehetőségéről.

Célkitűzés

1. Célul tűztem ki az I-es típusú interferonok daganat-ellenes hatásainak és alkalmazásainak irodalmi áttekintését gyermekkori neoplasztikus kórfolyamatokban különös tekintettel a ritka, gyermekkori mieloproliferatív megbetegedésekre.
2. Tanulmányozni kívántam az IFN α -2b hatását egészséges köldökzsínórvér-eredetű B-limfociták és B-sejtes leukaemia/lymphoma sejtvonalak szaporodási és differenciálódási tulajdonságaira in vitro rendszerben.
3. Vizsgálni kívántam, hogy milyen hatást fejt ki az IFN α -2b essentialis thrombocytosisban (ET) szenvedő gyermekbeteg csontvelői progenitor sejtjeire klonogén esszében.
4. Tanulmányozni kívántam az IFN α terápiás alkalmazásának lehetőségeit terápia-refrakter, recidiváló, kiemelten kedvezőtlen kórjóslatú gyermekkori neoplasztikus megbetegedésekben, különös tekintettel az in vitro vizsgálatba is bevont ET beteg esetére, valamint az IFN α kezelés, illetőleg az IFN α kezeléssel párhuzamosan alkalmazott isotretinoin kezelés mellékhatásaira.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtek

Sejtvonalak

Az EBV genom pozitív JY, az EBV genom negatív BL-41, valamint a HHV-8 pozitív, EBV és HIV-1 negatív BCBL-1 humán B-leukaemia/lymphoma sejtvonalakat 10% főtális borjú szérummal (FCS; GIBCO, Grand Island, NY), L-glutaminnal és antibiotikumokkal szupplementált RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY) tápfolyadékban 37°C fokon CO₂ termosztátban (5% CO₂) tenyésztetem. A sejtuszpenziókat a sejtvonaltól függően 2-4 naponta passzáltam, a kísérleteket a növekedés exponenciális fázisában végeztem.

Csontvelői és köldökzsínórvér eredetű mononukleáris sejtek

A csontvelői mintát az essentialis thrombocythaemiás betegből egyszer használatos csontvelő biopsziás, illetőleg aspirációs tű segítségével, crista ilei punkció útján, a köldökzsínór vérmintákat egészséges újszülöttek születése kapcsán, azok köldökzsínórijából

nyertem a szülők tájékoztatását követő beleegyezésével. Alvadásgátlás céljából a mintákat heparinizáltam. A csontvelői mintából steril körülmények között sejtszuspenziót készítettem. A mononukleáris sejteket 1000g-n, 15 percig, Ficoll-Iodamide (Pharmacia, Uppsala, Svédország) grádiensen centrifugálás segítségével szeparáltam. Az interfázisban lévő sejteket 2x mostam 5% FCS-t tartalmazó McCoy 5A médiummal (GIBCO, Grand Island, NY).

Sejtenyésztő módszerek

Kolónia esszé

A BL-41, JY és BCBL-1 sejtvonalakból 1×10^4 mononukleáris sejtet tartalmazó félfolyékony tenyészeteket készítettem. Minden vizsgált sejt minta, valamennyi vizsgálati időpont, exogén stimulus és dózis kapcsán 3 párhuzamos tenyészetet készítettem. A 20% FCS-t tartalmazó McCoy's 5A tápfolyadékot Pike és Robinson szerint aminosavakkal, vitaminokkal, Na-pyruváttal, NaHCO_3 -al, penicillinnel és streptomycinnel, valamint $2,5 \times 10^{-5}$ M merkaptotetanollal (LOBA Feinchemie, Fischamend, Németország) szupplementáltam. A lágy gél állapotot 1,2 % metilcellulóz (Methocel, 3000-5000 centipose; FLUKA, Neu-Ulm, Németország) hozzáadásával biztosítottam. 35 mm-es műanyag petri csészéket (Greiner, Nürtingen, Németország) használva, a tenyészetek 1 mL térfogatát 7 napig, 37°C hőmérsékleten, 5% CO_2 -t és telített vízgőzt tartalmazó CO_2 termosztátban inkubáltam.

A recombináns humán (rh) $\text{IFN}\alpha$ -2b-t (Shering-Plough, Brinny, Írország) közvetlenül a lágygélkultúrákhoz adtam a szélesztést megelőzően, 10, 100, 500, 1000 és 10000 U/mL végkoncentrációban. A több mint 50 sejtet tartalmazó sejtcsoportokat neveztem kolóniának. Ezek értékelésére az inkubációs idő végeztével disszekciós mikroszkóp (SZ6045; Olympus, Hamburg, Németország) segítségével történt.

A szekunder tenyészetekhez a primer kultúrákból származó sejteket McCoy's 5A médiumban reszuspendáltam, mostam, a primer kolónia lemezek szélesztéséhez felhasznált adalékok alkalmazásával újraszélesztettem és a primer kultúrához hasonló körülmények között további 7 napig inkubáltam. A klonális szaporodás eredményeit mind a primer, mind a szekunder kultúrák esetében az rh $\text{IFN}\alpha$ -2b-t nem tartalmazó kontroll kolóniaszámhoz viszonyított %-os arányban adtam meg („relative plating efficiency”).

Az essentialis thrombocythaemiás betegből származó csontvelői mononukleáris sejteket a sejtvonalakhoz hasonló körülmények között szélesztettem és inkubáltam. A spontán kolónia képzés értékeléséhez stimuláló ágenszt nem alkalmaztam. Stimuláló ágensként 5 U/mL rh EPO (epoietin-alpha, Eprex[®]; Janssen-Cilag, Sidney) és 10 ng/mL rh granulocita-kolónia stimuláló faktor (G-CSF; Neupogen[®], Hoffmann La Roche, Basel, Svájc) kombinált

alkalmazásával 7 illetve 14 nap után értékeltem a késői illetve korai eritroid prekursor sejtek: „colony-forming unit-erythroid” (CFU-E) és „burst-forming unit-erythroid” (BFU-E) képződését, rendre. A mieloid kolóniákat 300 ng/mL rh G-CSF, 100 ng/mL rh granulocita-makrofág (GM)-CSF (Leucomax[®]; Sandoz, Basel, Svájc), 100 ng/mL rh őssejt faktor (c-kit ligand, „stem-cell faktor” - (SCF; Genzyme, Cambridge, Anglia) és 10% (v/v) phytohaemagglutinin A-stimulált leukocita kondicionált médium (PHA-LCM) hozzáadását követően értékeltem. A PHA-LCM által stimulált kolónia képzés gátlásának vizsgálatát 100 illetve 1000 U/mL IFN α -2b hozzáadásával végeztem. Kontrollként hematológiai betegség gyanújával csontvelő vizsgálatra kerülő, későbbiekben egészségesnek bizonyult egyének mintája szolgált.

Phytohaemagglutininrel stimulált humán leukocita kondicionált médium

Egészséges felnőtt önkéntestől (Sz.I.) a Helsinki Deklarációban foglaltakat betartva nyertem perifériás vért a humán leukocita tenyészetek számára. Dresch és mtsai szerint az előbbieket alapján szeparált mononukleáris sejtsuszpenzióból 4×10^6 /mL sejtkoncentrációban a sejteket 15% autológ humán szérumot tartalmazó McCoy's 5A médiumban 17 mg/mL phytohaemagglutinin A (DIFCO Laboratories, Detroit, Mich.) és 10 mg/mL levamisole (Decaris[®], Richter Gedeon, Budapest, Magyarország) jelenlétében szuszpenziós kultúrában 37°C-on CO₂ termosztátban tenyésztettem, majd az 5. napon centrifugálás után a kapott felülúszót 1 mL-es frakciókban steril körülmények között dekantáltam, majd -20°C-on lefagyasztva tároltam.

Szuszpenziós kultúrák

A sejtfelszíni markerek és az apoptózis vizsgálata céljából az exponenciális növekedési fázisban lévő JY, BL-41 és BCBL-1 sejtvonalak sejtjeit, valamint a köldökzsínórvér eredetű mononukleáris sejteket 5×10^5 /mL töménységben, 35mm-es műanyag tenyésztőedényekben (Greiner), 5 mL RPMI 1640 tápfolyadékban, 37°C-on, 5% humid CO₂ termosztátban 72 órán (sejtvonalak) illetve 24 órán át (köldökzsínórvér mononukleáris sejtek) tenyésztettem. A sejtsuszpenziókhoz 100 U/mL, illetve 1000 U/mL végkoncentrációban adtam rh IFN α -2b-t, továbbá 10.000 U/mL, 100 ng/mL, illetve 50 ng/mL végkoncentrációban rh IFN- γ -t, rh GM-CSF-t és rh SCF-t. A kontroll sejtsuszpenziók nem tartalmaztak exogén citokineket.

Immunfluoreszcens jelölés és áramlási citometriás meghatározás

A sejtsuszpenziót fluoreszcein isotiocianáttal (FITC) jelölt anti-CD32 (IV.3; Medarex, West Lebanon, NH) és fikoeritrinnel (PE) jelzett anti-CD19 monoklonális

antitestekkel (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) inkubáltam, egyidejűleg. A mononukleáris sejtszuszpenzió egyéb szubpopulációit is meghatároztam, anti-CD4 és anti-CD8 monoklonális antitestet használva a T-limfociták, anti-CD14 monoklonális antitestet a monociták valamint anti-CD34 monoklonális antitestet használva a primitív hematopoetikus progenitor sejtek azonosításához (valamennyi Becton Dickinson). Kontrollként izotípus-azonos, irreleváns egér monoklonális antitestet használtam. A vörösvérsejtek FacsLysing (Becton Dickinson) oldattal történő lizálása után a mintákat 2x foszfát pufferes (pH 7,4; PBS, Sigma, St Louis, Mo) sóoldatban mostam és 1% (v/v) paraformaldehiddel (Kat-Chem, Budapest, Magyarország) fixáltam.

A minták vizsgálata 15mW argon lézeres FacScan áramlási citométerrel (Becton Dickinson) Lysis II „software” (Becton Dickinson) felhasználásával történt. Minden esetben 10.000 sejt vizsgálata alapján határoztam meg a leukaemia/lymphoma sejtek illetve a köldökzsínórvér mononukleáris sejtjeinek jellemzőit. Az adott antigénre nézve pozitívnak tekintettük azt a mintát, amelyikben a sejtek több mint 20%-a az izotípus kontrollhoz képest jelentősen nagyobb fluoreszcencia intenzitást mutatott. A pozitív sejtek arányát illetve az átlagos fluoreszcencia intenzitást (MFI) a kontroll százalékában fejeztem ki.

A CD19 és CD32 koexpresszió detektálása során a szuszpenziós kultúrák 100 U/mL illetőleg 1000 U/mL végkoncentrációban rh IFN α -2b-t továbbá 10.000 U/mL, 100 ng/mL illetőleg 50 ng/mL végkoncentrációban rh IFN γ -t, rh GM-CSF-t és rh SCF-t tartalmaztak. A kontroll sejt kultúrákhoz nem adtam exogén citokint.

Az apoptózis vizsgálata során a sejtszuszpenziókat az inkubálás után PBS oldattal mostam, majd 70%-os alkohollal történő fixálását követően a sejteket propidium jodiddal (Sigma, San Louis, MO) festettem, majd FacScan készülékkel, CellFIT (Becton Dickinson) program segítségével analizáltam. A DNS hisztogramot a DNS duplikátumok azonosításával kaptam. Azon sejteket tekintettem DNS fragmentációt mutató apoptotikus sejtekné, melyek DNS tartalma kevesebb volt, mint a G0/G1 fázisú sejteké. A nekrotikus sejteket akridin oranzs/etidium-bromid festéssel azonosítottam, fluoreszcens mikroszkóp használatával. A kísérletek során a sejt kultúrák a fenti koncentrációban tartalmaztak rh IFN α -2b-, rh IFN γ -t, rh GM-CSF-t és rh SCF-t. A kontroll sejt kultúrához nem adtam exogén citokint.

A trombocita P-szelektin (CD62) meghatározásához az ET-s beteg alvadásgátolt perifériás vérmintáját PE-jelölt anti-CD62 monoklonális antitesttel, illetőleg a trombociták GPIX antigén (CD42a) azonosítására szolgáló FITC-jelölt anti-CD42a monoklonális antitesttel inkubáltam. Kontrollként izotípus-azonos irreleváns egér monoklonális antitestet

használtam. A mintát továbbiakban a fent leírt módon, a mononukleáris sejtek esetében ismertett eljárás szerint, mostam és fixáltam. A minták vizsgálata 15mW argon lézeres FacScan áramlási citométerrel (Becton Dickinson) CellQuest „software” (Becton Dickinson) felhasználásával történt.

Klinikai tanulmány

1994 január és 2000 május között a DE OEC Gyermekklinika hematológiai osztályán 24, kiemelten kedvezőtlen kórlefolyású, terápia refrakter, illetőleg recidív rosszindulatú betegségben szenvedő gyermeket kezeltem IFN α -val. A klinikai tanulmány keretében az adatgyűjtés és adatfeldolgozás 1994-1997 között a betegdokumentációra támaszkodva, retrospektív módon, azt követően prospektív módon történt.

A 24 betegből 15 fiú, 9 leány volt. (élekor a diagnózis idején 1 hó-18 év, átlagéletkor 5,3 év, medián 3 év). Hat beteg vérképzőszervi malignitásban szenvedett. Közülük 3 eset akut leukaemiás; 1 akut kevert sejtes leukaemia (AMixL: CD7-, CD10-, CD19-, CD33-pozitív), 2 akut mieloid leukaemia (AML: egy M7: CD33-, CD41-, CD42a-, CD7-pozitív, és egy M2: CD33-, CD13-, CD7-pozitív); 2 eset MDS (1 JMML, és 1 RAEB) volt. Egy betegnek essentialis thrombocythaemiája (ET) volt. Két beteg disszeminált Langerhans-sejtes histiocytosissal (LCH), négy beteg gastrointestinalis malignitással került diagnosztizálásra: 1 hepatocelluláris carcinoma, 2 hepatoblastoma, 1 colon adenocarcinoma. Kilenc betegnek periferiás idegrendszeri (velőcső eredetű) tumora volt: 6 neuroblastoma, 1 ganglioneuroblastoma, 2 primitiv neuroectodermális tumor (PNET). Két betegnek központi idegrendszeri tumora volt: egy medulloblastoma valamint egy cervico-thoracalis gerincvelői astrocytoma (A2). Egy betegnek rhabdomyosarcomája volt.

Az IFN α kezelés megkezdése 3 esetben a kórismézéssel egyidőben történt: a hyperleukocytosissal, organomegaliával jellemezhető JMML-es beteg esetében az IFN α kezelés a kolónia esszében detektált kiváló in vitro antiproliferatív hatásra alapozva került elindításra; ET-ban az IFN α kezelés felnőttkorban bizonyítottan hatékony, a tanulmányban szereplő beteg esetében az IFN α kezelés in vitro hatékonyságát kolónia esszé módszerrel magam igazoltam; a colon adenocarcinomás betegben a radikális műtétet követően (hemicolecctomia) a minimális maradék betegség gátlására indult IFN α kezelés 5-Fluorouracillal kombinálva. A többi beteg standard antineoplasztikus kezelési protokollok szerint volt kezelve az IFN α adását megelőzően. Tizenkét beteg relapszusban volt: 8 lokális (az AML-es beteg csontvelői relapszusát is beleértve), 3 lokális és metasztatikus, 1 metasztatikus relapszus. Három beteg volt kezelésre refrakter. Hat beteg mutatott részleges

választ az IFN α alkalmazását megelőző kezelésre és volt így makroszkópos reziduális tumora. Az IFN α -t (IFN α -2b; Intron A[®], Schering-Plough, Brinny, Írország; IFN α -2a; Roferon A[®], Hoffmann-LaRoche, Basel, Svájc) heti 3x, subcutan (s.c.) módon alkalmaztam 7 esetben monoterápia formájában, illetőleg a többi esetben egyéb antineoplasztikus gyógyszerek, protokollok vagy biológiai válasz módosítók, így retinsav (RA) származékok és kis dózisú cytarabine (LD-ARAC) adásával kombinálva. Az esetek többségében az IFN α napi dózisa testfelszínre számítva 3 MU/m² volt. A kezdő dózist 2 esetben 6 MU/m²-re emeltem. Két beteg esetén a kezdő dózis 10 MU/m² (később 20 MU/m²-re emelve), illetőleg 5 MU/m² volt.

A tervezett kezelést megelőzően a betegek szüleitől tájékoztatást követő írásos beleegyezést kértem. A JMML-es beteg szülei öt és fél hónapos kezelést követően minden további terápiás eljárástól elzárkóztak még az IFN α terápiával együtt alkalmazott AML-BFM-93 protokoll szerinti konszolidációs kezelés befejezését megelőzően.

Az IFN α kezelésre adott válaszreakció felmérése fizikális vizsgálat, kvantitatív és kvalitatív vérkép, hematopoetikus malignitás esetén csontvelő aspiráció, illetve képpalkotó vizsgálatok, így konvencionális röntgen, ultrahang, CT és MRI segítségével történt. A tumoros folyamat aktivitásának felmérésében a ⁹⁹Tc csontscan, neuroblastomában a ¹²⁵I-metajodo-benzil-guanidine (MIBG) scan, valamint vérkémiiai tesztek (laktát dehidrogenáz, neuron specifikus enoláz és ferritin) ismételt alkalmazása is segített. A terápiás effektus szempontjából, konvencionális kritériumok alapján, komplett és parciális remissziót (CR illetve PR, rendre), stabil/stagnáló és progresszív betegséget (SD illetve PD, rendre) különböztettem meg. Regisztráltam a betegek túlélési idejét. A terápiás válasz mellett kiemelten tanulmányoztam az IFN α kezelés mellett jelentkező mellékhatásokat.

A 24 beteg közül részletesen ismertetem az ET-ben szenvedő beteg esetét, akinek csontvelői mononukleáris sejtjeit a kórismézés alkalmával kolónia esszé módszerrel jellmeztem. Ugyancsak ismertetem 2 beteg esetét, akikben az IFN α kezeléssel párhuzamosan alkalmazott 13-cisz-retinsav (isotretionin; Roaccutan[®], Roche, Basel, Svájc) terápia mellett Sweet szindróma alakult ki.

Statisztikai értékelés

A különböző dózisú IFN α -2b dózisok mellett kialakuló apoptózis, kolóniaképzésgátlás, illetőleg CD19 és CD32 expresszió értékében mutatkozó differencia statisztikai szignifikanciáját a Student féle t-teszt segítségével vizsgáltuk, a normál eloszlás ellenőrzése

mellett. A statisztikai elemzés kapcsán a 0,05 alatti p értékeket ($p < 0.05$) tekintettem statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

IFN α -2b hatása B-sejtes leukaemia/lymphoma sejtvonalak primer és szekunder kolónia képzésére

Az IFN α -2b mindhárom vizsgált B-sejtes leukaemia/lymphoma sejtvonal esetén a primer illetőleg a szekunder kolónia képzés dózis dependens gátlását okozta. Primer kolóniák képzését 1000 U/mL IFN α -2b gátolta maximálisan a JY és a BL-41 sejtvonal esetén, míg a BCBL-1 sejtvonal esetében 10 U/mL IFN α -2b idézett elő közel maximális gátlást. A kolónia képzés gátlása a három vizsgált sejtvonal közül kettő esetében nem volt teljes, a túlélő sejtek aránya 70 % és 35% volt a JY és a BL-41 sejtvonal primer lágygél kultúrái esetén, 45% illetve 35% a szekunder kultúrákban, rendre. A BCBL-1 sejtek esetében 500 U/mL, illetőleg 100 U/mL IFN α -2b 100%-os klonális proliferáció-gátlást eredményezett a primer, illetőleg a szekunder metilcellulóz kultúrákban.

IFN α -2b hatása leukaemia/lymphoma sejtvonalak és köldökzsinórvér normál B-sejtjeinek apoptózisára és sejt felszíni Fc γ RII receptor expressziójára

A vizsgált sejtvonalakban, az exponenciális növekedés szakaszában a BL-41 sejtek 2,3-4,1%-a, a JY sejtek 3,6-6,7%-a apoptotikus. Ez a konstans, spontán apoptózis arány 72 óra (JY) illetve 96 óra (BL-41) múlva kezdett szignifikáns mértékben ($p < 0,05$) emelkedni a nem passzált sejt kultúrában. IFN α -2b 100 U/mL, illetőleg 1000 U/mL dózisban szignifikáns mértékben ($p < 0,05$) fokozta az apoptotikus sejtek arányát 48 illetve 24 óra múlva a BL-41 és a JY sejt kultúrában. A BCBL-1 sejtenyészetben 24 óra inkubációs időt követően 100 U/mL IFN α -2b kifejezett sejtnekrózist idézett elő.

Ellentétben a leukaemia/lymphoma sejtvonalaknál megfigyeltekkel, a köldökzsinórvér mononukleáris sejtjeiben 24 órás tenyésztést követően 10-szeresére nőtt az apoptotikus sejtek aránya, külső növekedési faktor hozzáadása nélkül. Az IFN α -2b szupplementáció jelentős csökkenést eredményezett már 100 U/mL dózisonál, s további csökkenést 1000 U/mL dózisonál. Az IFN α -2b-vel ellentétben IFN γ , GM-CSF és SCF alkalmazása nem előzte meg a köldökzsinórvér mononukleáris sejtfrakcióban kialakuló spontán apoptózist.

Az in vitro IFN α -2b kezelés befolyásolta a vizsgált sejtek sejt felszíni Fc γ RII (CD32) kifejeződését. A BL-41 és JY sejtek több mint 99%-a CD32 pozitív volt, azaz minden sejt

konstitutív módon kifejezte a receptort. 1000 U/mL IFN α -2b jelenlétében az átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) 24 óra inkubálást követően 13 \pm 9%-kal, valamint 7 \pm 3%-kal nőtt a nem kezelt BL-41 valamint JY sejtekhez viszonyítva.

A CD19-CD32 koexpressziót mutató B-sejtek aránya 10,8 \pm 5,3% volt a köldökzsínórvér mononukleáris sejtjei között, mely arány, IFN α -2b hiányában, 24 órás inkubációs időt követően szignifikánsan ($p < 0,05$), 5,8 \pm 3,5%-ra csökkent. 1000 U/mL IFN α -2b jelenlétében a CD19-CD32 koexpresszáló sejtek aránya nem változott (10,0 \pm 5,5%) lényegesen. Hasonló eltérést a köldökzsínórvér mononukleáris sejtjei egyéb szubpopulációiban (T-limfociták, monociták, CD34-pozitív vérképző progenitor sejtek) az IFN α nem idézett elő. Exogén IFN γ , GM-CSF valamint SCF nem akadályozta meg az Fc γ RII-t expresszáló köldökzsínórvér B-limfociták szignifikáns csökkenését.

A CD32 MFI hasonló változást mutatott: exogén IFN α -2b hiányában jelentősen csökkent ($p < 0,05$) - 4,8 \pm 2,8%-ról 2,2 \pm 0,7%-ra, ugyanakkor a szignifikáns csökkenés elmaradt az 1000 U/mL IFN α -2b-vel kezelt mintákban (4,3 \pm 1,9%). IFN γ , GM-CSF és SCF nem akadályozta meg a CD19-pozitív köldökzsínórvér B-limfociták CD32 MFI csökkenését.

Az inkubációs idő alatt az IFN α -2b nem befolyásolta jelentősen a T-limfociták (70 \pm 5%), a monociták (9 \pm 5%), és az éretlen CD34-pozitív hematopoetikus őssejtek (1.5 \pm 1%) arányát a köldökzsínórvér minták mononukleáris sejtfrakcióiban.

IFN α in vitro és in vivo hatása essentialis thrombocythaemiás (ET) betegben

Egy, a jelentkezés idején 3 éves kislány került klinikánkon kivizsgálásra fokozódó fejfájás, szédülés, enyhe splenomegalia miatt. Vérképvizsgálata kifejezett trombocita szám emelkedést (3000 G/L) igazolt, 10,5 fL átlagos trombocita térfogattal. A gyermek csontvelő biopsziás mintája mérsékelten hiperpláziás hematopoézist, az eritroid és mieloid prekursorok normál arányát és lokalizációját, a megakariociták kifejezetten fokozott megjelenését mutatta. A megakariociták a szokásosnál nagyobb méretűek, erősen hiperlobulált magvúak voltak, enyhén fokozott csontvelői retikuláris elemek mellett (Bauermeister grade 1-2). A berlini kék reakció nem mutatott ki gyűrűs szideroblastokat. A citogenetikai analízis normál női kariotípust igazolt (46, XX).

A beteg csontvelő-aspirációs mintájából nyert mononukleáris sejtek kolónia esszé vizsgálata spontán kolónia képzést nem mutatott. 5 U/mL EPO és 10 ng/mL G-CSF kombinált alkalmazása 7 illetve 14 nap tenyésztési idő alatt, normál CFU-E és BFU-E képződést eredményezett, rendre. A normál csontvelői mieloid progenitorokat optimálisan serkentő 300 ng/mL G-CSF, 100 ng/mL GM-CSF, 100 ng/mL rh SCF, illetve 10% (v/v)

PHA-LCM alkalmazása a betegből származó csontvelői mononukleáris sejt mintákban relatíve kevés számú (50-200), nagy, VIII-as faktor antigénre negatív reakciót adó, mieloid kolóniák képződését indukálta. A IFN α -2b a PHA-LCM-indukálta kolónia képzés dózis-dependens gátlását eredményezte, 1000 U/mL dózisban komplett gátlással.

A kifejezett in vitro gátló hatást és a felnőtt ET-ben leírt kedvező terápiás effektust figyelembe véve, subcutan IFN α kezelést indítottam 3 MU dózisban heti 3x alkalommal adagolva. Az IFN α dózisát fokozatosan 6 MU-re emeltem. Emellett a beteg a trombocitaszám 1000 G/L alá csökkenéséig 5 mg/ttkg/nap aspirin kezelésben részesült a trombocita aggregáció gátlása céljából. Hatvanöt havi IFN α kezelés mellett a trombocitaszám fokozatosan csökkent, csaknem a normális értékre (440 G/L). A beteg prezentációs tünetei már két havi IFN α kezelést követően megszűntek, a gyermek hétköznapi életmódot folytat, iskolába jár, tünet- és panaszmentes. Mellékhatásként mindössze enyhe láz és influenza-szerű tünetegyüttes jelentkezett. Az IFN α kezelés leállítását követő időszakban a beteg trombocitaszáma stabilan 400 és 600 G/L közötti.

Az IFN α kezelés befejezését követően 3 hónappal végzett csontvelői minta áramlási citometriás elemzése normál mieloid/eritroid, T-sejt/B-sejt és CD4/CD8 arányt mutatott, s kimutatható volt egy CD45halvány/CD34/cyFXIII-A pozitív, intenzív GPIIb és GPIX expressziót mutató, elkülönülő sejtpopuláció (6%). A perifériás vérminta áramlási citometriás analízise a trombociták kifejezetten fokozott (30%) P-szelektin expresszióját mutatta a normál kontroll trombocitákhoz viszonyítva (0-3%), jelezve a trombocita aktivációt. Tizenöt hónappal az IFN α kezelés leállítását követően a fenti paraméterek normalizálódtak.

Malignus betegségben szenvedő gyermekek in vivo IFN α kezelésével szerzett klinikai tapasztalatok

Az IFN α kezelést, mint első-vonalbeli terápiát választottam az ET esetében, az irodalmi adatok szerinti hatékonyságra, valamint a JMML esetében a kedvező in vitro hatásosságra alapozva. A colon adenocarcinomás beteg az IFN α -t irodalmi adatok alapján, a fenntartó kezelés részeként kapta Fluoro-uracillal kombináltan. Előbbi betegen kívül a két LCH-s, a két reziduális masszával bíró velőcső eredetű tumoros, valamint az astocytomás betegek kapták az IFN α -t -kezelésük során végig, vagy részben - monoterápia formájában. A többi beteg az alapbetegségnek megfelelő kemoterápiával kombinált formában kapta az IFN α kezelést.

Az IFN α -val kezelt 24 betegből 14 (58,3%) komplett (CR) vagy parciális (PR) remisszióba került. Ezen alcsoportban a túlélési idő 9-167+ hónap volt (átlag 79,4 hó, medián

79 hó). A reagáló betegek csoportjában található valamennyi túlélő beteg. A 7 túlélő beteg mellett kedvező terápiás választ észleltem 4 vérképzőszervi rosszindulatú betegségben szenvedő valamint, átmenetileg, a colon adenocarcinomás, a neuroblastomás és az LCH miatt kezelt, később elveszített betegek esetében. A 3 stabil/stagnáló betegségben illetve a 8 progresszív betegségben szenvedő gyermek kivétel nélkül meghalt (11/24, 45,8%). Ezen alcsoportban az átlag túlélési idő 35 hónap volt (8-67 hó, medián 32 hó). Kedvezőtlen válaszreakciót észleltem a gastrointestinalis malignitás miatt kezelés alatt álló, az MDS, a PNET illetőleg neuroblastoma, a medulloblastoma valamint a rhabdomyosarcoma miatt kezelt betegek esetében.

A betegek többsége az IFN α -t 3MU/m² dózisban kapta. Ettől az adagolási rendtől összesen 5 beteg esetében történt eltérés. A standard kezelésre nem reagáló AmixL beteg esetében az induló dózis 10 MU/m² volt, melyet 20 MU/m² dózissig emeltem, a szokványos mellékhatások fokozódása nélkül. A hepatocelluláris carcinomás beteg esetében a 3 MU/m² kezdő dózist 5 MU/m²-ig, míg az ET, egy neuroblastomás és az astrocytomás beteg esetében 6 MU/m² dózissig emeltem. A dózis emeléseknél az addigi kezelésre adott kedvező válaszreakciót és az egyéni toleranciát vettem figyelembe. Az emelt dózissal IFN α -t kapó betegcsoportban a mellékhatások előfordulási gyakorisága és intenzitása nem különbözött a szokványos alapdózissal kapó beteghez képest.

Az IFN α kezelést minden egyes beteg jól tolerálta, kizárólag enyhe influenza-szerű tünetek, illetve a s.c. adagolásmód okozta enyhe lokális kellemetlenség jelentkezett mellékhatásként. Csupán egy esetben lépett fel számottevő fáradtság, enyhe figyelemdeficit, étvágy- és testsúlycsökkenéssel kísérvé.

Súlyos mellékhatást két, az IFN α kezeléssel egyidejűleg 13-cisz-retinsav (isotretinoin) kezelést kapó betegben észleltem. Egy 18 éves leány, aki cerebelláris medulloblastoma miatt craniospinális irradiációt és VEP (Vincristin/Elobromol/Procarbazine) séma szerinti kemoterápiát kapott. Három évvel később szekunder mielodiszpláziás szindróma (refrakter anaemia blastus túlsúllyal, RAEB) alakult ki, mely miatt allogén vérképző őssejt átültetés történt. Öt hónappal a transzplantációt követően a diszplasztikus klón újból kimutathatóvá vált. Két alkalommal donor eredetű „buffy coat” transzfúziót, IFN α -át (3MU/m²/hetente 3x), isotretinoint (120 mg/m²) és ismételt alacsony dózissal ARA-C-t kapott. Az isotretinoin adását követő 8. naptól a beteg bőrén fájdalmas vörhenyes csomók jelentkeztek, 2 hónapig tartó láz, leukocytosis (érett neutrofilek), emelkedett vérszékelyedés kíséretében, ismételt negatív tenyésztési eredményekkel. Ezen tünetekhez 4 hét múlva proteinuria, folyadékretenció társult,

mely a beteg haláláig fennált, szemben a többi klinikai tünettel, mely az isotretinoin megvonás és az alkalmazott 6-methylprednisolon kezelés mellett jelentősen javult. Hasonló klinikai kép bontakozott ki a egy neuroblastomás beteg lokális relapszusa valamint májmetasztázis okán alkalmazott, CEV (carboplatin/etoposid/vincristin) ciklusok mellett IFN α -t és ugyancsak isotretinoint tartalmazó kombinációs kezelése során. A beteg mellékhatásnak megfelelő klinikai tünetei (subcutan csomók, láz) az isotretinoin megvonása és 6-methylprednisolon kezelés mellett szanálódtek. A két beteg kezelése kapcsán észlelt klinikai tünetcsoport Sweet szindrómának felelt meg.

MEGBESZÉLÉS

A kísérletek során vizsgáltam az IFN α -2b-nek három B-sejtes leukaemia/lymphoma sejtvonal, az EBV-vel fertőzött, immortalizált JY, a vírusgenom-mentes BL-41 és a HHV-8 genomot hordozó BCBL-1 sejtek klonális növekedésére, apoptózisára, illetőleg bizonyos sejtfelszíni molekulák kifejeződésében megnyilvánuló fenotípus-változására gyakorolt hatását. Az IFN α -2b mindhárom vizsgált sejtvonal esetén szignifikáns, dózis-dependens gátlást idézett elő mind a primer mind a szekunder kolóniák vonatkozásában. Tekintettel arra, hogy a primer kolónia képzés a terminális differenciálódást jellemzi, míg a szekunder kolónia képzéssel a sejtek önmegújuló képessége jellemezhető, az eredmények alapján az IFN α -2b antiproliferatív hatása a leukaemia őssejt illetőleg a leszármazott, terminális oszlásban résztvevő leánysejtek szintjén is megnyilvánul. A JY és BL-41 sejtek kolóniaképzés- gátlását az apoptotikus sejtek arányának növekedése kísérte. Ezekben a sejtvonalakban az IFN α -2b önmagában nem hozott létre sem teljes fokú kolóniaképzés-gátlást, sem 100%-os apoptózis-indukciót. A túlélő sejtfrakció IFN α -ra természetes rezisztenciát mutató vagy az apoptózis útvonalat megkerülő sejteket reprezentál.

Humán B-sejtes leukaemia/lymphoma sejtvonalakra vonatkozóan az IFN α apoptózist indukáló hatásáról irodalmi adat nem jelent meg. Trubiani és mtsai differenciált humán leukaemia B-sejtvonalra vonatkozóan közöltek saját eredményeinkkel megegyező, IFN γ kezelés kapcsán kialakuló apoptózis indukciót.

A HHV-8 infektált BCBL-1 sejtvonal esetén a primer és szekunder kolónia képzés IFN α -kiváltotta komplett gátlása volt megfigyelhető. Az IFN α -kezelt tenyészetben kifejezett volt a nekrotikus sejtek aránya. Ezen sejtvonal humán IL-1 β , IL-10, IL-12, illetőleg két, a β -kemokin családba tartozó makrofág gyulladáshoz vezető protein, a transzformáló-növekedési faktor β -

1 (TGFB-1), valamint a virális IL-6 detektálható mennyiségű mRNA-ét expresszálja. Az IFN α feltehetőleg ezen citokinekkal interferáló, a sejt növekedését szabályozó, autokrin hurkok befolyásolása révén fejtette ki proliferáció-gátló hatását.

Az IFN α kezelés képes gátolni a BCBL-1 sejtvonal HHV-8 produkcióját. A vírus hosszú homológ régiójában az interferon-reguláló faktorról (IFR) nagyfokú homológiát mutató ORF-K9 proteint kódol. Igazolható, hogy az IFN α az IFR-1 termelés indukciója és a virális IRF DNS kötődésének kompetíciója révén fejt ki vírus-növekedés gátló hatását. Megfigyelték, hogy az I-es típusú IFN BCBL-1 sejtbe történő transzfektálása a virális litikus kör aktivációjának gátlásával apoptózist idéz elő és megszünteti a tumorindukáló hatást SCID egértörzsben.

Ellentétben a leukaemia/lymphoma sejtvonalak esetében tapasztaltakkal, a köldökzsínórvér eredetű mononukleáris sejtek in vitro spontán apoptózist az IFN α -2b kezelés kivédte. Ez az új megfigyelés alátámasztja azt az álláspontot miszerint az IFN α az érett B-sejtek fontos túlélési faktora.

A köldökzsínórvér B-limfocitákon megfigyelhető anti-apoptózis hatással párhuzamosan az IFN α -2b megelőzte a CD32-pozitív, Fc γ RII-t kifejező B-limfociták arányának csökkenését. Ezen megfigyelésekkel egyezően Ruuth és mtsai az IFN α hatására létrejövő perifériás B-limfociták spontán apoptózisának gátlását igazolták, mely specifikus foszfatidil-inozitol-3 (PI3)-kináz inhibitorral gátolható volt, a PI3, mint másodlagos hírvívő útvonal folyamatban betöltött központi szerepére utalva. Tekintettel arra, hogy a köldökzsínórvér egyéb mononukleáris sejtjeinek szubpopulációiban (T-limfociták, monociták, CD34-pozitív éretlen hemopoetikus elődsejtek) hasonló változás nem volt megfigyelhető, feltételezhető hogy az IFN α főképpen a normál B-limfocitákban fejt ki anti-apoptotikus hatást. Az IFN α hatása szelektív, mivel az IFN γ , a GM-CSF és az SCF nem volt képes hasonló változást létrehozni sem az apoptotikus sejtarány, sem az Fc γ RII kifejeződés tekintetében. Habár a mononukleáris sejtfrakcióban jelenlévő monociták és T-sejtek által termelt egyéb, B-sejt túlélési faktorok indirekt hatása nem valószínű, ezt a lehetőséget nem lehet teljesen kizárni.

Ez a megfigyelés új, bár nem váratlan. IFN α vonatkozásában eddig még nem, IFN γ esetén ismert volt az a jelenség, hogy az IFN γ fokozza az I-es és II-es típusú sejt felszíni Fc γ receptorok kifejeződését monocita/makrofág illetve megakariocita sejtvonalakban. Az IFN γ a „ γ -reszponz régió”-nak nevezett (GRR) specifikus protein komplexek gyors indukcióját idézi elő, az Fc γ RI gén transzkripció rátájának kifejezett növekedését eredményezve. Az

IFN α szintén indukálja a reszponz régió összeálló hasonló komplexek kialakulását, de nem aktiválja a mononukleáris sejtek Fc γ RI transzkripcióját. Az Fc γ receptorok manifesztációjának általam is megfigyelt fokozott szintje jó összefüggést mutat a differenciálódás lépéseivel és az IFN α -ra adott fokozott válaszkésztséggel a B-sejtekben.

A leukaemia sejtek klonális proliferációjának gátlása, a neoplasztikus és normál B-sejtek apoptózisának eltérő szabályozása ígéretes IFN α által kiváltott hatás, mely potenciálisan hasznosítható a gyermekkori B-sejtes malignitások ellen irányuló daganatellenes kezelésben. További vizsgálatok szükségesek az IFN α és a citosztatikus gyógyszerek kombinációjának de novo leukaemia/lymphoma sejtekre kifejtett hatásának felmérésére, hogy meghatározhassuk az IFN α mono- illetve kombinációs terápia pontos helyét a gyermekonkohematológia fegyvertárában.

Az essentialis thrombocythaemia ismeretlen eredetű, a trombocita prekursorok túlzott proliferációjával járó klonális mieloproliferatív betegség. Ellentétben a krónikus és akut mieloid leukaemiával, a citogenetikai és molekuláris genetikai vizsgálatok kromoszóma eltérést rendszerint nem mutatnak. Philadelphia transzlokáció [t(9;22) / bcr-abl átrendeződés] sem mutatható ki. Egy friss tanulmányban vizsgált 7, nem familiáris ET-ás és egy szekunder thrombocytosisos gyermekben sem a trombopoetint (TPO) sem a receptorát, a *c-mpl* gént kódoló szekvenciákban nem találtak módosulást, jelezve, hogy a zavar nem a megakariociták TPO-ra adott válaszában, hanem valószínűleg a jelátviteli mechanizmus szintjén lehet.

A felnőtt ET-ás betegek hematopoetikus prekursor sejt klonális proliferációjának tanulmányozása hozzásegített a betegség kórlelettanának jobb megértéséhez. Megelőzően Ash és mtsai igazoltak spontán CFU-MK kolónia képzést, később Juvonen és mtsai mutattak ki felnőtt betegekben szignifikáns CFU-MK kolónia képzés-emelkedést szuboptimális dóziszú PHA-LCM stimuláció mellett, az egyéb mieloproliferatív betegségben észlelt spontán kolónia képzéssel megegyező jelenséggént. Randi és munkatársai 5 vizsgált ET-ás gyermekben a spontán BFU-E kolónia képzés hiányát detektálták. Florensa és mtsai voltak, akik először tanulmányozták CFU-MK és CFU-GM kolónia képzést ET-ás gyermekekben. Ellentétben a Randi munkacsoport eredményeivel, 4/5 esetben detektáltak spontán BFU-E kolónia képzést. Spontán CFU-MK 4/5 esetben volt kimutatható, spontán CFU-GM kolónia képzést nem találtak. Megfelelő exogén citokin stimuláció után, az átlag BFU-E, CFU-MK és CFU-GM 78,4; 6,6 illetve 36,4 volt 2×10^5 számú mononukleáris sejtre vonatkoztatva. Felnőtt ET-ás betegben Gugliotta és mtsai közlése szerint az IFN α -2b igen alacsony koncentrációban (1-10 U/mL) gátolta a CFU-MK kolóniák növekedést.

Gyermekkori ET-ban a kezelés indikációja és fajtája kevésbé meghatározott, mint felnőtt betegekben. Tünetmentes esetekben megfigyelés-követés indokolt. Tüneteket mutató betegben trombocita-ellenes vagy citoreduktív kezelés beállítása szükséges. Az alkiláló ágensek, mint a busulfan vagy hydroxyurea fokozzák a leukaemiás transzformáció rizikóját. Alacsony dózisu aspirin hatékony a kísérotünetek kezelésében, habár alkalmazása magas trombocita számmal járó ET-ban ellentmondásos. Újabban anagrelide javasolt az emelkedett trombocita szám korrigálására mind felnőtt-, mind gyermekkorban. Az IFN α használata mint alternatív terápia lehetőség javasolt. Az IFN α közvetlenül gátolja a TPO-idukált megakariocita növekedést a SOCS-1 gén-indukció következtében létrejövő TPO-szignál gátlása révén. Mivel a humán megakariocita progenitor proliferáció stimulálható TPO-független úton is, az I-típusú interferonok CFU-MK növekedést indirekt módon gátló hatása sem zárható ki. Az IFN α nem mutagén, nem leukaemogén, azonban influenza-szerű mellékhatása és subcutan adagolhatósága korlátozza használatát. Jelentősebb mellékhatást, mint amilyen az irreverzibilis neurológiai károsodás, igen ritkán közöltek.

Egy 1999-ben intenzív homloktáji fejfájás panaszával jelentkező 3 éves leánygyermek esete megfelelt a „Polycythemia Vera Study Group” diagnosztikus kritériumainak. A gyermek 3 éves életkorával egyike a legfiatalabb ET-s betegeknek. A gyermek esetében tanulmányoztam a csontvelői eredetű mononukleáris sejtek eritroid és mieloid kolónia képzési tulajdonságát. A betegből származó csontvelői minta nem mutatott spontán kolónia képző tulajdonságot. Az indukált BFU-E, CFU-E és CFU-GM kolónia képzés mértéke a Florensa és munkatársai által dokumentált mintákéhoz hasonlított. A vizsgálat idején nem volt lehetőség a TPO in vitro kolónia képzésre gyakorolt hatásának jellemzésére, azonban a G-CSF, GM-CSF, SCF, PHA-LCM stimulációra képződő kolóniák negatívak voltak intracelluláris FVIII antigénre. Felnőtt mintákhoz hasonlóan az IFN α -2b igen hatékonyan gátolta a PHA-LCM-indukált mieloid kolónia képzést.

A felnőtt minták IFN α gátlása és a felnőttkori kedvező klinikai tapasztalatok alapján a beteg IFN α kezelése megkezdődött, melyre szignifikáns trombocitaszám-csökkenés, illetőleg a klinikai tünetek oldódása következett be. Az IFN α kezelés hatása tartósnak bizonyult, mivel a kezelés leállítása óta eltelt 26 hónap alatt a trombocita szám 400-600 G/L érték között stabilizálódott. Az IFN α kezelés leállítását követő 3 hónappal a GPIIb, GPIX és a P szelektin szint emelkedése volt kimutatható, mely jelenség in vivo trombocita aktivációra utalt. A 12 hónap múlva ismételt vizsgálat az in vivo trombocita aktiváció normalizálódását mutatta. Kóros trombocita aktiváció in vivo gyulladási folyamatok illetve in vitro exogén stimulus

hatására alakul ki a megakariocita/trombocita vonalban. Az I-es típusú interferon kezelést a trombociták P-szelektin kifejeződésének csökkenése kísérte krónikus hepatitis C fertőzött egyénekben, mutatva az IFN α aktivált trombocita-stabilizáló hatását. Ez a megfigyelés felveti, hogy az IFN α kezelés hatékonyságához a trombocita aktivációt gátló hatás hozzájárulhat a kedvező terápiás válaszhoz ET-ban.

Az IFN α terápiát, munkatársaimmal együtt, elsőként alkalmaztam nagyobb számú, 24 esetet számláló gyermekkori kohort kezelésére. A részletesen ismertetett ET esetén kívül 23 gyermeknek recidív, illetőleg az alkalmazott terápiára gyengén reagáló, azaz, akár a javulási tendenciát, akár a gyógyulási esélyeket tekintve kifejezetten rossz prognózisú folyamata volt. Az IFN α terápiát, mint elsővonalbeli kezelést az ET esethez hasonlóan, a kedvező in vitro érzékenység okán JMML-ben, valamint felnőttkori esetekre vonatkozó szakirodalmi adatok alapján, radikális sebészi eltávolítást követően colon adenocarcinomás gyermekben választottam. A többi beteg esetében az IFN α kezelésre a megelőző kemoterápiás kezelések mellett észlelt makroszkópos maradék betegség, tumorprogresszió illetőleg recidíva miatt került sor.

Az alapbetegség kifejezetten előrehaladott jellege ellenére a vizsgált 24 betegből 14 kedvezően reagált az IFN α kezelésre. A CD7-pozitív leukaemiás betegek válaszreakciója különösen figyelemre méltó, mivel a CD7 antigén a még véglegesen T-sejtvonal irányba el nem kötelezett, éretlen hematopoetikus elődsejtek felszínén expresszálódik, s az ezen sejtekből transzformálódó leukaemia az IFN α kezelésre jól reagálhat. Komplettn vagy parciális terápiás válaszreakció volt látható a már ismertetett ET eset mellett JMML, disszeminált LCH, astrocytoma, valamint neuroblastoma/ganglioneuroblastoma esetén. Az utóbbi kórképek kapcsán a kedvező válaszreakció azokban az esetekben volt megfigyelhető, amelyekben az IFN α terápia a standard multimodális kezelést követően került alkalmazásra, parciális remisszióban, mint fenntartó monoterápia vagy 13-cisz-retinsavval együttesen adva. Egy újabban végzett meta-analízis eredményeihez hasonlóan a colorectalis tumor IFN α kezelése kapcsán mi sem észleltünk kedvező terápiás hatást. Az IFN α kezelésre reagáló 14 malignus betegből 7 tartós túlélő. Közülük 6 gyermek alapfolyamata jelenleg nem mutat aktivitási jeleket, 1 parciális remisszióban (PR) van.

Az IFN α kezelés a betegek számára kifejezetten jól tolerálható volt, enyhe vagy mérsékelt mellékhatások kíséretében. Minden betegben különböző súlyosságú és tartamú lázas, influenza-szerű reakciót észleltem az IFN α adása kapcsán. A s.c. injekciók fájdalmas

mivoltára 2 gyermek (8%) panaszkodott. Egy esetben (4%) kellett az IFN α kezelést fáradékonyság, étvágytalanság, kifejezett testsúly-csökkenés miatt átmenetileg szüneteltetni.

Két gyermek esetében, akik az IFN α terápiával párhuzamosan isotretinoin kezelésben is részesültek, Sweet szindróma kialakulását észleltük, amelyet, mint gyermekkorban ritkán előforduló akut neutrofilias dermatózist eredetileg Sweet és mtsai írtak le. A kórkép pontos patogenezise nem ismert. Az IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF és IFN γ citokineket érintő diszreguláció feltételezhető. Jellemző hisztopatológiai eltérés a noduláris perivaszkuláris neutrofil sejtes beszűrődés, a neutrofil karyorrhexis, a nyilvánvaló vasculitis hiánya. Kután erupciók, eritémás papulák és plakkok, magas, intermittáló láz, influenza-szerű felső légúti megelőző tünetek, kötőhártya-, szivárványhártya-, ízületi-gyulladás mellett steril belszervi érintettség (alveolitis, osteomyelitis, veseelégtelenség, máj-, pancreas-, idegrendszeri) fordulhat elő. A kórkép gyakran társul hematológiai neopláziákkal, szolid tumorokkal, immunológiai és gyulladásos folyamatokkal, gyógyszerek, kolónia stimuláló faktorok alkalmazásával illetőleg csupa-transz-retinsav kezeléssel. A két eset az első, 13-cis-retinsav (isotretinoin) kezeléssel összefüggésben jelentkező gyermekkori, közlésre került Sweet szindrómás eset, melynek hátterében specifikus citokin háttér gerjesztette, neutrofil-mediált reaktív folyamat állhat.

Az IFN α közvetlen és immun-mediált tumor-ellenes hatásán túl gátolja az érújdonképződést is. Utóbbi hatásán alapul alkalmazása hemangioendothelioma, metasztatikus hemangiopericytoma, Kasabach-Merritt szindróma kezelésében. Életet veszélyeztető hemangiómák kezelése mintegy 70%-ban regressziót, 30%-ban stabil betegséget eredményezett, az 1-5 éves korcsoportban. A ritka spontán regressziót mutató 1 év alatti korcsoportban 68%-os kedvező terápiás effektusról számoltak be. Részben az angiogenesis gátlásán alapulhat az IFN α hatékonysága neuroblastomában, mely mellett kísérletes állat modellek szólnak. A fázis 2 humán vizsgálatok eredménye egyelőre nem meggyőző. Kedvező kezelési eredményekről számolnak be CD7-pozitív, differenciálatlan sejtes akut leukaemia, allogén csontvelőátültetést követően relapszusba kerülő JMML, illetőleg előrehaladott, kezelésre refrakter, recidív Hodgkin-lymphoma gyermekkori IFN α kezelésével kapcsolatban.

Az ET IFN α kezelésével felnőttkorban jelentékeny klinikai tapasztalat gyűlt össze, gyermekkorban azonban kevés a klinikai tapasztalat. A PV IFN α kezeléséről szintén kevés nemzetközi és hazai közlemény számol be. A mastocytosis agresszív formáinak, valamint az

LCH generalizált folyamatainak IFN α kezelésével, saját eredményeinkkel egyezően kedvezőek a klinikai tapasztalatok.

Folyamatban van az osteosarcomás betegek randomizációs vizsgálata az EURAMOS („European and American Osteosarcoma Study Group”) tanulmány keretében. Elsődleges cél a rezekálható, cisplatin-doxorubicin-methotrexate kezelésre kedvező szöveti válaszreakciót mutató betegek fenntartó IFN α kezelése, illetőleg a túlélésre gyakorolt hatásának vizsgálata. Több tanulmány vizsgálja az IFN α kezelés hatékonyságát gyermekkori agytumorokban. HG („high grade”) gliómában Rajkumar és mtsai 5/9 esetben kedvező válaszreakcióról, míg más szerzők IFN α és kemoterápia kombinációja kapcsán a toxicitás fokozódásáról számoltak be. LG („low grade”) astrocytomában fibroblast-IFN 36%-os remissziós rátát eredményezett.

Az IFN α -t sikerrel alkalmazták T-sejtes limfoid leukaemia kezelésében, amikor hepatitis B infekció, illetőleg a kezelés okozta hepato-toxicitás a konszolidációs fázis folytatását nem tette lehetővé. Így az IFN α terápia megfelelő alternatíva lehet azon gyermekkori ALL esetek -elsősorban fenntartó- kezelésében, ahol a beteg hepatitis B vagy C infekció miatt nem részesülhet további kemoterápiás kezelésben.

Az IFN α terápiás aktivitása potencírozható citosztatikus gyógyszerekkel, egyéb biológiai válaszmódosítókkal, így platina származékok, nukleotid analógok és antagonisták, epipodophyllotoxin származékok, antraciklin antibiotikumok, alkiláló ágensek, és retinsav derivátumok alkalmazásával. Kihhasználva ezen pozitív interakciókat, gondosan megválasztva az IFN α kezeléssel kombinált citosztatikus blokkok megfelelő időrendjét, helyes adagolási módját, alkalmazásukat kiterjeszthetjük a gyermekkori daganatos betegségekben, amelyekben korlátozott a használatukkal szerzett, bizonyítékokon alapuló tapasztalat.

ÖSSZEFOGLALÁS

A gyermekkori szolid és hematopoetikus malignus megbetegedések a gyermekkori halálozás legfontosabb tényezői. A kezelési lehetőségek robbanásszerű fejlődése ellenére a gyermekek 20-30%-át napjainkban is elveszítjük. Ígéretes lehetőséget kínálnak a szervezet daganat ellenes védekezését fokozó, illetőleg a neoplasztikus sejt megzavart differenciálódási-érési egyensúlyát helyreállító biológiai választ módosító anyagok. Ezen terápiás csoport jeles képviselje az interferon-alfa, mely alkalmazásával különösen felnőttkori malignitások terápiájában kedvezőek a tapasztalatok. A gyermekonkológiai alkalmazás pontos helye a korlátozott.

Áttekintettem az I-es típusú interferonok daganat-ellenes hatásainak és alkalmazásainak irodalmát, különös tekintettel a gyermekkori neoplasztikus, ezen belül a ritka mieloproliferatív kórfolyamatokra. In vitro tanulmányoztam az IFN α -2b hatását egészséges köldökzsínórvér-eredetű B-limfociták és B-sejtes leukaemia/lymphoma sejtvonalak szaporodási és differenciálódási tulajdonságaira, valamint essentialis thrombocytosisban (ET) szenvedő gyermekbeteg csontvelői progenitor sejteire klonogén esszében. Értékeltem az IFN α terápiás alkalmazásának lehetőségeit terápia-refrakter, recidiváló, kiemelten kedvezőtlen kórjólátú gyermekkori neoplasztikus megbetegedésekben, különös tekintettel az ET-ra, illetőleg az IFN α és a vele párhuzamosan alkalmazott isotretinoin kezelés mellékhatásaira.

Az IFN α szignifikáns mértékben dózis dependens módon gátolta három vizsgált B-sejtes leukaemia/lymphoma sejtvonal primer és szekunder kolónia képzést. Szignifikánsan fokozta a vizsgált sejtvonalakban az programozott sejthalál mértékét. A normál köldökzsínórvér eredetű B-limfocitákban a sejtvonalaknál megfigyelten ellentétben az IFN α megelőzte a spontán apoptózist. Az IFN α klinikai alkalmazása a kedvező in vitro hatással párhuzamosan ET-ban a beteg állapotának tartós javulását eredményezte. A kifejezetten rossz prognózisú neoplasztikus folyamatok kezelése kapcsán 14/24 esetben parciális vagy komplett remisszió alakult ki. A mellékhatások enyhék voltak, így az IFN α klinikai alkalmazása a gyermekonkológiai gyakorlatban biztonságos. Jelentős mellékhatást 2 esetben, Sweet szindróma formájában, isotretinoin kezeléssel párhuzamosan alkalmazott IFN α terápia folytán észleltem.

Megfigyeléseim mások tapasztalataival egybehangzóan azt sugallják, hogy az IFN α kezelés ígéretes lehet gyermekkori malignitások bizonyos típusaiban.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

A tézisek alapját képező, lektorált folyóiratokban megjelent saját közlemények

1. Kiss C, Kiss M, **Szegedi I**, Árvai K, Tóth J, Oláh É. Interferon-alpha therapy in children with malignant diseases: clinical experience in twenty-four patients treated in a single pediatric oncology unit. Med Pediatr Oncol 2002;39:115-119. **IF: 1.216**
2. Györfy Á, Kovács T, **Szegedi I**, Oláh É, Kiss C. Sweet syndrome associated with 13-cis-retinoic acid (isotretinoin) therapy. Med Pediatr Oncol 2003;40:135-138. **IF: 1.216**

3. **Szegedi I**, Kiss C, Karászi É, Vámosi G, Szöllösi J, Kovács P, Benkő I. Differential regulation of umbilical cord blood and leukemic B cells by interferon-alpha (IFN- α): observations in cultured cells. *Pathol Oncol Res* 2006;12:159-163. **IF: 1.16**
4. **Szegedi I**, Kiss C. Myeloproliferatív szindrómák gyermekkorban. *Gyermekgyógyászati Továbbképző Szemle* 2006;5:149-155.
5. **Szegedi I**, Benkő I, Merő G, Prinzing Á, Kappelmayer J, Kiss C. Long-lasting partial remission by interferon-alpha treatment in a child with essential thrombocythemia. *Pediatr Blood Cancer* 2006 [Epub ahead of print]. **IF: 1,512**

Az értekezés témaköréhez szorosan nem kapcsolódó egyéb saját közlemények

1. Karászi É, Kiss C, Jakab Z, **Szegedi I**, Hevessy Z, Kappelmayer J. Gyermekkori akut leukémiák vizsgálata sejtfelszíni markerek és ploiditás alapján. *Gyermekgyógy* 1998; 49:319-329.
2. Kiss C, **Szegedi I**, Jakab Z, Kiss M, Felszeghy E, Oláh É. Kolónia-stimuláló faktorok alkalmazása másodlagos granulocytopeniás gyermekekben. *Magyar Belorv Arch* 1998;51:237-242.
3. Oláh VA, **Szegedi I**, Nagy E, Varga J, Kiss C, Oláh É. Plasma levels of anthracyclines and their effect on the kidney. *Adv Chromatogr Electrophor Relat Separat Methods* 1998;1:161-167.
4. Kerényi A, Schlamadinger A, Ajzner E, **Szegedi I**, Kiss C, Pap Z, Boda Z, Muszbek L. Comparison of PFA-100 closure time and template bleeding time in patients with inherited disorders causing defective platelet function. *Thrombosis Res* 1999;96:487-492. **IF: 1.207**
5. Kerényi A, **Szegedi I**, Sarudi S, Kappelmayer J, Kiss C, Muszbek L. A Glantzmann thrombasthenia II. típusa. Esetleírás. *Klin Kísérl Lab Med* 1999;25:162-168.
6. Benkő I, Kovács P, **Szegedi I**, Megyeri A, Kiss A, Balogh E, Oláh É, Kappelmayer J, Kiss C. Effect of myelopoietic and pleiotropic cytokines on colony formation by blast cells of children with acute lymphoblastic leukemia. *N-S Arch Pharmacol* 2001;363:499-508. **IF: 2.472**
7. Jakab Z, **Szegedi I**, Balogh E, Kiss C, Oláh E. Duchenne muscular dystrophy-rhabdomyosarcoma, ichthyosis vulgaris-acute monoblastic leukemia: association of rare genetic disorders and childhood malignant diseases. *Med Pediatr Oncol* 2002;39: 66-68. **IF: 1.216**

8. **Szegedi I.** Húgyúti infekciók kezelése csecsemő és gyermekkorban. Családorvosi Fórum 2004;4:32-35.
9. Bárdi E, **Szegedi I**, Kiss C. Harmadik folyadéktér szerepe a methotrexát toxicitás kialakulásában, esetbemutatók kapcsán. Gyermekgyógyászat 2005;56:438-442.
10. Sohajda Z, Damjanovich J, Bárdi E, **Szegedi I**, Berta A, Kiss C. Combined local treatment and chemotherapy in the management of bilateral retinoblastomas in Hungary. J Pediatr Hematol Oncol 2006;28:399-401. **IF: 1.282**
11. **Szegedi I.** Immunthrombocytopenia a gyermekkorban. Gyermekorvos továbbképzés; [in press].

IF (összesen): 11.281

Lektorált folyóiratban megjelent idézhető kongresszusi absztraktok

1. **Szegedi I**, Jakab Z, Kiss M, Felszeghy E, Oláh É, Kiss C. Idarubicin in pediatric ALL and non-Hodgkin's lymphoma: Induction therapy in relapsed disease. Med Pediatr Oncol 1997; 29:474. **IF: 1.693**
2. Benkő I, Kovács P, Megyeri A, **Szegedi I**, Kiss C. Stimulation of blast cells in vitro in children with acute lymphoblastic leukaemia by granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF), granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) and stem cell factor (SCF). N-S Arch Pharmacol 1997;356:R20. **IF: 2.492**
3. Oláh VA, **Szegedi I**, Nagy E, Kiss M, Kiss C, Oláh É. Új diagnosztikai és preventív lehetőségek anthracyclin kezeléseknél. Klin Kísérl Lab Med 1997;24:103.
4. Kiss C, Benkő I, Kiss M, Jakab Z, **Szegedi I**: Interferons in pediatric oncology. Med Pediatr Oncol 1998;31:349. **IF: 1.783**
5. Kiss C, Benkő I, Karászi É, Vámosi G, **Szegedi I**, Kappelmayer J, Szöllősi J. Interferon- α -2b induces growth inhibition, apoptosis and differentiation in human B-cell lineage leukemic cell lines. Med Pediatr Oncol 1999;33:271. **IF: 1.518**
6. **Szegedi I**, Benkő I, Karászi E, Vámosi G, Kappelmayer J, Szöllősi J, Kiss C. Interferon-alpha-2b induces growth inhibition, apoptosis, and differentiation in human B-cell-lineage leukemic cell lines. Cytometry 2000;42:156. **IF: 2.557**
7. Benkő I, Kovács P, **Szegedi I**, Megyeri A, Kiss A, Balogh E, Oláh E, Kappelmayer J, Kiss C. Effect of myelopoietic and pleiotropic cytokines on colony formation of blast cells of children with acute lymphoblastic leukemia. Med Pediatr Oncol 2000;35:226. **IF: 1.301**

8. Bárdi E, Szegedi I, Udvardi E, Kiss C, Rényi I. Preliminary experiences with recombinant urate oxidase (Fasturtec®) for prevention of hyperuricemia in children with leukemia or lymphoma. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:272. **IF: 2.607**
9. Kiss C, Szegedi I, Katona K, Aradi J, Kappelmayer J. BCL-2 antisense oligonucleotid inhibits clonal growth of leukemia cell lines. *Pediatr Blood and Cancer* 43:398, 2004. **IF: 1.512**

ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

- Hazánkban elsőként tekintetem át összefoglaló klinikai közleményben a gyermekkori mieloproliferatív betegségek klinikai képét, korszerű (XXI. századi) besorolását és kezelését, különös tekintettel az IFN α terápiás alkalmazására.
- Elsőként figyeltem meg, hogy az IFN α -2b dózis-dependens módon gátolja B-sejtes leukaemia/lymphoma sejtvonalak klonális szaporodását a sejtpusztulás egyidejű fokozódásával, míg egészséges, köldökzsinórvér eredetű B-limfocitákra eltérő hatást fejt ki, gátolja azok spontán, in vitro apoptózisát.
- Elsőként figyeltem meg, hogy az IFN α fokozza a CD32 (Fc γ RIIA) kifejeződését B-limfocitákon és limfoblasztokon.
- Elsők között, hazánkban elsőként, közöltem 3 éves essentialis thrombocythemiában szenvedő beteg esetét, karakterizáltam a beteg csontvelői mononukleáris sejteinek kolónia-képző tulajdonságait, írtam le az IFN α kezelés kedvező in vitro és in vivo hatásait.
- Szerzőtársaimmal elsők között figyeltük meg IFN α kedvező in vivo hatásait súlyos, előrehaladott rosszindulatú betegségben szenvedő gyermekekben.
- Szerzőtársaimmal elsők között figyeltük meg Sweet szindróma kialakulását együttes IFN α és isotretinoin kezelés kapcsán.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

A munkát az Egészségügyi, Szociális és Családügyi Minisztérium (ETT-308/96, ETT-508/2000, ETT-6090/1/1999, ETT-542/2000, ETT 552/2000, OTKA T16809/T038307/T048745/T043061/NK61412) pályázatait, a „Leukémiás gyermekekért” és a „Remény a leukémiás gyermekeméért” alapítvány támogatta.

Köszönetet mondok témavezetőmnek, Dr. Kiss Csongor egyetemi tanár úrnak aki kutatómunkám feltételeit biztosította és annak minden szakaszában segítséget, útmutatást nyújtott. Köszönöm Dr. Oláh Éva egyetemi tanár, klinikaigazgató asszony folyamatos buzdítását. Kiemelten mondok köszönetet Dr. Benkő Ilona egyetemi docens asszonynak, akitől a kolónia esszé-módszert elsajátítottam, és aki első kísérleteim végzése során segített. Köszönöm Dr. Kovács Péter egyetemi tanár úr segítségét a kolónia esszé megfigyelések interpretálásában. Köszönöm Dr. Szöllősi János egyetemi tanár úrnak és Dr. Kappelmayer János egyetemi docens úrnak az áramlási citometriás kísérletek megtervezéséhez és interpretációjához, Dr. Karászi Éva főorvosasszonynak és Dr. Vámosi György tanársegéd úrnak azok kivitelezéséhez nyújtott segítségét. Köszönöm Gellértné Bartha Magdolna laboratóriumi asszisztensnek a kísérletek előkészítése és kivitelezése során nyújtott segítséget. Köszönöm a Gyermekklinika Hematológiai-Onkológiai Szakrendelőjében és Osztályán dolgozó munkatársaim, orvosok, nővérek és asszisztensek segítségét, kiemelten Dr. Kiss Magdolnáét, Dr. Gyórfy Ágnesét és Dr. Kovács Tamásét, akikkel együtt a klinikai kutatómunkába bevont betegeket gondoztam. Köszönöm Dr. Balogh Erzsébet tudományos főmunkatárs asszonynak az essentialis thrombocythaemiás beteg citogenetikai vizsgálatát.

A biztos családi háttér, gyermekeim türelme biztosította a munka létrejöttét.