

## **OTKA 38307 BESZÁMOLÓ**

### **ZÁRÓJELENTÉS**

Jelen OTKA pályázat keretében a gyermekkor leggyakoribb neoplasztikus elváltozásainak, a rosszindulatú vérképzőszervi betegségek, kiemelten az akut lymphoblastos leukaemia (ALL), az akut myeloid leukaemia (AML), valamint a myelodysplasiás szindróma (MDS) sejt- és molekuláris biológiai tulajdonságait kutattuk. Fő célkitűzésünk a kezelési eredmények valamint a tartós életminőség további javítására irányult. A nemzetközi törekvésekkel összhangban tanulmányoztuk új sejt- és molekuláris biológiai tulajdonságokon alapuló kockázati tényezők alkalmazási lehetőségeit. Laboratóriumi és klinikai körülmények között vizsgáltunk a hagyományos citosztatikus kezelés kiegészítésére lehetőséget teremtő innovatív terápiás eljárásokat. A leukaemia sejtek citokin szabályozásáról szerzett ismereteinket összevetettük a granulomatózus gyulladással elváltozások modellbetegségeként tanulmányozott krónikus apicalis periodontitis citokin regulációjával. A sejterápiás eljárások lehetséges fejlesztése céljából modellként vizsgáltuk Glanzmann thrombastaeniás beteg rendellenességét komplex molekuláris módszerekkel, valamint a vérzékenységet előidéző kóros és a vad típusú gének transzfektálásának és kifejeződésének hatékonyságát experimentális rendszerben.

#### **A gyermekkori vérképzőszervi malignitások előfordulása régióinkban**

Munkacsoportunk a Magyar Gyermekorvosok Társasága Gyermekonkológiai Szekciójának (GYOSZ) megalakulása óta annak tagjaként működik. Központunkban folyik az észak-kelet magyarországi régió, elsősorban Hajdú-Bihar és Szabolcs-Szatmár-Bereg megyék betegeinek gyermekonkológiai kivizsgálása, gyógykezelése, gondozása. Évente mintegy 30-40 új magyar daganatos gyermeket kezelünk. A régió epidemiológiai helyzete hasonló az észak-amerikai kontinens és a nyugat-európai országok helyzetéhez. A 0-14 éves korcsoport életkorra standardizált átlagos éves tumor-incidenciája 120,7/millió. A gyakori gyermekkori malignitásoké: leukaemia: 37,3/millió, központi idegrendszeri daganatok: 31,6/millió, a perifériás idegrendszer daganatai: 12,5/millió, lymphomák: 12,2/millió, gyermekkori vesedaganatok: 8,8/millió. Az éves átlagos incidencia a 70-es évek közepe óta egyenes, évi 2,6 %-os, szignifikáns növekedést mutat (Jakab Z, Balogh E, Kiss C, Olah E: Epidemiologic studies in a population based childhood cancer registry in North-East Hungary. Med Pediatr Oncol 38: 338-344, 2002.; impakt faktor: 1,216).

## **A kombinált citosztatikus ALL-BFM-95 protokollal elért kezelési eredmények gyermekkori ALL-ben**

A Magyar Gyermekorvosok Társasága Gyermekonkológiai Szekció valamennyi központjával közösen, retrospektív tanulmány keretében tekintettük át az 1996-2002 között a nemzetközi, korábban német, Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) munkacsoport ALL-BFM-95 protokollja szerint hazánkban kezelt ALL-es gyermek (életkor 1-18 év, medián 6 év) kórlefolyását és kezelési eredményeit. Fenti periódusban 368 beteg (fiú-leány arány: 1,27:1), közöttük 56 Debrecenben kórismézett és kezelt gyermek adatait tekintettük át. A betegeket a hagyományosan elfogadott kockázati tényezők, a kezdeti fehérvérsejt-szám, életkor, immunfenotípus, citogenetika és prednisolon-válasz alapján három – standard (110 beteg, 29,9%), közepes (210 beteg, 57,1%) és magas (48 beteg, 13%) – rizikócsoportha soroltuk. A citosztatikus kezelés tartama 2 év volt a standard rizikócsoportha sorolt fiúk kivételével, akik kezelése 3 éven át tartott. Az egész csoport komplett remissziós rátája 93,2% volt. Húsz beteget (5,4%) veszítettünk el az indukciós kezelés alatt és 5 beteg (1,4%) volt terápia-refrakter. Az 5 éves teljes túlélés az egész csoport vonatkozásában 78,5%, a standard rizikócsoportha 93,2%, a közepes rizikócsoportha 78,4% és a magas rizikócsoportha 44,5% volt (minimum utánkövetési idő 1,19 év, medián utánkövetési idő 4,85 év). A 368 beteg közül 272 (73,9%) van első komplett klinikai és hematológiai remisszióban és további 18 visszaesett beteg van életben. Relapszus a betegek 14,7%-ában következett be, leggyakrabban csontvelői recidíva formájában. Második malignitás fellépését egy betegben észleltük. Az 5 éves eseménymentes túlélés az egész csoport vonatkozásában 72,6%, a standard rizikócsoportha 87,6%, a közepes rizikócsoportha 72,1% és a magas rizikócsoportha 39,9% volt. Megállapítottuk, hogy a gyermekkori ALL kezelési eredményei az elmúlt évtizedek során jelentősen javultak. A hazai eredmények hasonlóak más munkacsoportok ALL-BFM-95 protokollal nyert eredményeihez. Ezzel és az ehhez hasonló eljárások segítségével az ALL-es gyermekek mintegy 78%-a gyógyítható meg. A tanulmány eredményeit magyar nyelvű lapban közzeltük (Muller J, Kovacs G, Jakab Z, Renyi I, Galantai I, Bekesi A, Kiss C, Nagy K, Kajtar P, Bartyik K, Masat P, Magyarosy E: Az ALL-BFM-95 protokollal szerzett hazai eredmények akut lymphoblastos leukaemiás gyermekek kezelésében. Orv Hetil 146:75-80, 2005.)

A visszaeső és terápia-refrakter betegek alulkezelésének, valamint a jól reagáló standard és közepes rizikójú betegek túlkezeléséből eredő veszteségeinek csökkentése érdekében a

BFM munkacsoport nyugat-európai központjai új antileukaemiás protokollt, az ALL-BFM-2000-t vezették be az ALL-es gyermekek kezelése céljából. Ez a protokoll a rizikócsoportok meghatározásánál alapvetően veszi figyelembe az immunoglobulin nehéz lánc (IgH) gén és a T-sejt receptor (TCR) gének klón-specifikus átrendeződésének molekuláris vizsgálatán alapuló minimális maradék-betegség (MRD) kimutathatóságát, illetőleg a QPCR módszerrel megállapítható MRD szint kienetikáját. A nemzetközi BFM tanulmányokhoz a közelmúltban csatlakozott kelet-európai és Európán kívüli országok munkacsoportjai számára a BFM munkacsoport bevezette a hagyományos kockázatbecslő tényezőkön, ezek között kiemelten a csontvelői kenet több időpontban történő morfológiai értékelésén alapuló BFM-ALL IC-2002 protokollt, amelyhez a hazai munkacsoport és annak részeként a pályázatban résztvevő DE OEC gyermekhematológiai munkacsoportja is csatlakozott. A BFM-ALL IC-2002 protokoll célja kettős: 1) korszerű kezelési lehetőséget kínál fel azon munkacsoportok betegei számára, amelyek még nem vezették be az ALL-BFM-2000 protokollban előírt MRD meghatározó módszereket; 2) összehasonlítja a csupán kockázatbecslő stratégiájában különböző ALL-BFM-2000 és BFM-ALL IC-2002 protokollokkal elérhető kezelési eredményeket. A BFM-ALL IC-2002 protokoll ugyanakkor lehetőséget teremtett arra, hogy a kockázatbecslést nem befolyásoló módon, kísérő tanulmány („pilot study”) keretében, a munkacsoportok kidolgozzák az ALL-BFM-2000 protokollal kompatibilis, génátrendeződések vizsgálatán alapuló kockázatbecslő stratégiát („Mini risk project”) valamint, hogy ezt a molekuláris módszert összehasonlítsák a négy színű immunfluoreszcens jelölésen alapuló áramlási citometria módszerrel történő MRD meghatározás alkalmazhatóságával („Mini-mini project”).

Munkacsoportunk jelen pályázat keretében a négy színű jelölésen alapuló áramlási citometriás módszer kidolgozására, alkalmazására és tanulmányozására vállalkozott, nemzetközi együttműködés keretében. A pályázati támogatás mérséklése következtében csupán három gyermekhematológiai központ, DE OEC Gyermekklinika, Semmelweis Egyetem II. Gyermekklinika, BAZ Megyei Kórház Gyermekhematológiai és Csontvelőtranszplantációs Osztály betegeinek vizsgálatára nyílt lehetőség. A reprezentatív minták értékelése és az eredmények feldolgozása a Mini-mini projekt többi résztvevőjével közösen történik. A Mini-mini projekt eredményeit a BFM-ALL IC-2002 tanulmány zárásával összevetjük az egyéb támogatási forrás segítségével párhuzamosan bevezetett Mini risk projekt eredményeivel.

**ALL blasztok immunfenotípus vizsgálata négy színű immunfluoreszcens jelöléssel**

A munkacsoportunk által 1997 óta rutin-szerűen alkalmazott kettős, majd 2000 óta három színű immunfluoreszcens jelöléssel folytatott áramlási citometriás vizsgálatot a nemzetközi BFM munkacsoport ALL tanulmányának „non-MRD” ágát folytató országok munkacsoportjaival együtt, a minimális maradék-betegséget (MRD) vizsgáló „Mini-mini” kísérő-tanulmány ajánlásai szerint, bevezettük a leukaemiás lymphoblastok négy színű immunfluoreszcens analízisét.

Az újonnan diagnosztizált gyermekkori ALL-es csontvelő aspiráció során nyert mintákat 4 időpontban vizsgáltuk: a diagnóziskor, a kezelés megkezdésétől számított 15. és 33. napon, majd 12. héten. De novo eseteknél, amikor a kóros populáció sejtvonal specificitása (B- vagy T-lineage) még nem ismert, mindkét sejtvonalra specifikus monoklonális antitestekkel jelöltük a mintát. A későbbi (follow-up) mintáknál a diagnóziskor karakterizált sejtvonalra specifikus jelölést alkalmaztunk. B-lineage ALL-nél sejtfelszíni antigének jelenlétét vizsgáltuk monoklonális antitestekkel, T-ALL esetében sejtfelszíni és intracitoplazmatikus antigének jelenlétét egyaránt vizsgáltuk.

A vizsgálathoz az alábbi monoklonális antitesteket alkalmaztuk:

CD66c-PE (phycoerythrin): Beckman Coulter, klón: KOR-SA3544

CD99-FITC (fluorescein-isothiocyanat): Becton Dickinson (BD), klón: TÛ12

cyTDT-FITC: Dako, klón: HT-6

CD10-RPE (phycoerythrin): Dako, klón: SS2/36

CD3-APC (allophycocyanin): Immunotech, klón: UCHT1

CD7-PE: Immunotech, klón: 8H8.1

CD10-FITC: Immunotech, klón: ALB2

CD19-PE: Immunotech, klón: J4.119

CD34-APC: Immunotech, klón: 581

CD5-PC5 (phycoerythrin-cyanin5): Immunotech, klón: BL1A

CD19-PC5: Immunotech, klón: J4.119

CD58-FITC: Immunotech, klón: AICD58

CD3-PC5: Immunotech, klón: UCHT1

CD20-FITC: BD, klón: L27

CD45-APC: BD, klón: 2D1

CD45-PerCP (peridin-chlorophyll-protein complex): BD, klón: 2D1

A minták standard módon történő lizálását és jelölését követően az áramlási citométeren (FACScan; Becton Dickinson, San Jose, CA), de novo esetekben 50 000, az utánkövető

minták esetében 300 000 sejtről gyűjtöttünk be jelet. A citométeren valamennyi minta vizsgálata során azonos beállítási paramétereket alkalmaztunk. A begyűjtött jeleket („esemény”) Cell Quest 3.2 software segítségével értékeltük. A minták fehérvérsejtszámának ismeretében az összes magvas sejtre vonatkoztatva egyaránt kiszámoltuk a leukaemiás blaszt sejtek százalékos arányát és abszolút számát (blaszt/ $\mu\text{L}$ ). 2004. február óta 31 ALL-es gyermek (15 fiú és 16 leány, 27 B-lineage ALL és 4 T-lineage ALL) mintáit tanulmányoztuk. A blaszt sejtszám a kezdeti mintákban 109 591-2167 blaszt/ $\mu\text{L}$ , az indukciós kezelés közepén (15. nap) 5587-0,9 blaszt/ $\mu\text{L}$ , a remisszió várható idején (33. nap) 77-0,8 blaszt/ $\mu\text{L}$  között változott. Az eddig kiértékelt 12. heti minták között 13/16 esetben észleltük a blaszt szám emelkedését, 3/16 esetben a blaszt szám további csökkenését a megelőző (remissziós) mintához képest. Ebben az időpontban 10 esetben haladta meg a blaszt sejtszám a 10 blaszt/ $\mu\text{L}$ , 4 esetben a 100 blaszt/ $\mu\text{L}$ , egy esetben az 1000 blaszt/ $\mu\text{L}$  mértéket.

A négy színű jelölés adatait összevetjük a gyermekkori ALL egyéb, konvencionális prognosztikai paramétereivel, valamint a munkacsoport által egyéb támogatási forrásból beállított IgH nehézlánc gén és TCR gén átrendeződésének Q-PCR módszerrel meghatározott MRD szintekkel. A két módszer összehasonlításának szükségességét támasztja alá egy, a komplex antileukaemiás kezelés részeként **CD20-ellenes monoklonális antitest (rituximab) kezelésben részesült, recidív ALL-es beteg esete.**

A 15 éves leány alapbetegsége „CALLA”-pozitív B sejt progenitor ALL-nek felelt meg (kezdeti immunfenotípus: CD20+/CD10+/CD19+/HLA-DR+/CD22+/CD34+). ALL-BFM-95 protokoll hatására remisszióba került. Első remisszióját 4,5 éven át tartotta. Első relapszusát jelentős öszdúzisú dexamethasont tartalmazó kombinált citosztatikus recidíva protokoll szerint kezeltük. Ismét remisszióba került, azonban a kortikoszteroid kezelés mellékhatásaként hónapokokon át tartó pszichiátriai kezelést igénylő psychosis, valamint csípő prothesis beültetését indokló baloldali femurfej necrosis lépett fel. Az időközben rendbe jött beteg 2. remissziója alatt egyetemet végzett, állásba került. Második csontvelői relapszusát az alapbetegség kialakulását követően csaknem 10 év elteltével, tünet- és panaszmentes állapotban, rutinellenőrzés során észleltük. Ekkor a blaszt sejtek immunfenotípusa meggegyezett a kiindulási immunfenotípussal, illetőleg az időközben bevezetett fejlesztésnek köszönhetően kimutattuk TdT-pozitív tulajdonságukat. Tekintettel az első relapszust kísérő súlyos kortikoszteroid mellékhatásokra, indukciós kezelésként FLAG-IDA protokollt alkalmaztunk, amelynek hatására újból remisszióba került. A FLAG-IDA indukciós kezelést követően konszolidációs kezelésként 4 ciklus magas dózisú methotrexate

kezelést alkalmaztunk per os 6-mercaptopurin kezeléssel kiegészítve. Posztkonsolidációs kezelésként, tekintettel a blaszt sejtek CD20-pozitív tulajdonságára, 2 ciklusban, 2 hetes időközben rituximab (375 mg/m<sup>2</sup>) kezelést, majd standard fenntartó kezelést (per os 6-mercaptopurin/methotrexate) kapott. Egyidejűleg, identikus testvér donor hiányában, megindult az alkalmas idegen donor keresése. A csontvelői blaszt sejtek arányát rendszeres időközönként áramlási citometria és QPCR módszerekkel ellenőriztük. Előbbi célra a beteg leukaemiás sejtpopulációját illetőleg normál lymphocyt szubpopulációit leghatékonyabban jelölő monoklonális antitest kombinációkat (CD3-PerCP, CD4-FITC, CD7-FITC, CD8-PE, CD19-PerCP, CD20-FITC, CD22-PE, CD34-fitc, CD34-PE, CD34-PerCP, CD45-FITC, CD45-PerCP, CD56-PECy5, HLA-DR-PerCP, κ-FITC, λ-PE: Becton Dickinson, San Jose, CA; CD10-PE, CD79α-PE, TdT-FITC, IgM-PE: DAKO, Glostrup, Denmark) alkalmaztuk. A lizálás, a jelölés és az áramlási citometria a fentiek szerint történt. Áramlási citometriával egyúttal a perifériás vér lymphocyt szubpopulációit is ellenőriztük a rituximab kezelés után. Ekkor 7 hónapon át a CD19-pozitív B-lymphocyták aránya tartósan 0,5% alatt, a CD20-pozitív lymphocyták aránya a módszer érzékenységi küszöbe alatt maradt a perifériás vérben. A csontvelőben a CD10/CD19/TdT koexpresszáló lymphoblasztok nem tűntek el rituximab kezelést követően, 0,4-0,8%-ban tartósan kimutathatóak voltak, noha a CD20-pozitív sejtek aránya a kimutathatóság küszöbe alá csökkent a csontvelői mintákban is. A 2. relapszus-kezelés 10. hónapján elvégzett csontvelői ellenőrzés során áramlási citometriával 12% patológiás lymphoblasztot mutattunk ki. A párhuzamosan alkalmazott QPCR módszerrel a betegre jellemző, stabil TCRδ génátrendeződést vizsgáltuk, beteg-specifikus primerek alkalmazásával. A 2. relapszus kórismézése alkalmával megállapított relatív kópiaszámot 1-nek tekintve, a molekuláris jel  $5,18 \times 10^{-2}$ -re, illetőleg  $5,43 \times 10^{-2}$ -re csökkent az indukciós kezelést (25. nap), illetőleg a 2. rituximab kezelést (4. hó) követően, rendre. Ezt követően, a 6., 7. és 8. kezelési hónap ellenőrzési időpontjában a kóros jel intenzitása a módszer érzékenységi küszöbe ( $4,74 \times 10^{-2}$ ) alatt maradt, noha az áramlási citometriával kimutatható kóros lymphoblasztok ezekben az időpontokban is valamennyi alkalommal kimutathatóak voltak. A 10. havi mintában a relatív kópiaszám egyértelműen jelentősen emelkedett:  $2,21 \times 10^{-1}$  értékre. Ekkor már a konvencionális May-Grünwald-Giemsza festés is igazolta a kezdődő relapszust (non-erythroid blaszt arány 8%). A beteg ekkor egyezett bele az idegen donoros hematopoetikus őssejt átültetésbe, amelynek céljából csontvelőtranszplantációs központba került. Az eset közzélése folyamatban van (Kiss F, Scholtz B, Kappelmayer J, Kiss C: Flow cytometry as a useful method to herald relapse in a rituximab-treated childhood ALL patient – submitted for publication).

Az eset – túl az ALL-ben ma még experimentális gyógymódként alkalmazott in vivo monoklonális (rituximab) kezelésem – rámutat az áramlási citometrián és IgH/TCR génátrendeződésen alapuló MRD módszerek összehasonlításának fontosságára. A Mini-mini és Mini risk projektek kiértékelése – a többi résztvevő központ adataival együtt – a nemzetközi BFM-ALL IC-2002 tanulmány lezárását követően lesz lehetséges. Az immunfenotípus meghatározás jelentőségét gyermekkori ALL-ben esetismertetés kapcsán angol nyelvű nemzetközi közleményben, valamint magyar nyelvű, továbbképző jellegű publikációkban közöltük (Jakab Z, BNalogh E, Karaszi E, **Kappelmayer J, Kiss C, Olah E**: Variant translocations of 11q23 in infant acute lymphoblastic leukemia (ALL) – do outcomes differ from t(4;11)? *Med Pediatr Oncol* 39: 63-65, 2002.; impakt faktor: 1,216; **Kiss C**: Malignus vérképzőrendszeri zavarok korai tünetei. Gyermekorvos továbbképzés 2: 55-59, 2003.; **Kiss C**: A vérképző rendszer malignus betegségei. In: Szántó J (ed): Klinikai onkológia a gyakorlatban. Budapest, 2005. Medicina, pp. 423-440.)

Az MRD meghatározásának igénye különösen nyomatékosá teszi a leukaemia-asszociált immunfenotípus kimutatását. Ennek érdekében, új módszerként, elsőként vezettük be a XIII véralvadási faktor (FXIII) kifejeződésének meghatározását AML-ben és ALL-ben. A protranszglutamináz faktor két-két alegységből álló tetramer formában van jelen a keringő vérben (A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>). Intracelluláris alegységét FXIII-A kimutatták vérlemezkékben, egészséges és leukaemiás megakaryoblasztokban/megakaryocytákban, valamint egészséges monocytá és macrophag sejtekben.

### **FXIII kifejeződés AML blasztokban**

Véralvadási faktorok kifejeződését leukocytákban számos korábbi vizsgálat igazolta. Jelen pályázat keretében a FXIII A alegység (FXIII-A) kimutathatóságának szenzitivitását és specificitását vizsgáltuk leukaemiás myeloblaszt és monoblaszt sejtvonalakban, valamint vizsgáltuk az intracytoplasmikus FXIII-A kifejeződést ad novo AML mintákban. A sejt kultúrákban és a betegmintákban FITC-cel jelölt FXIII-A alegység ellenes monoklonális antitest jelölést követően áramlási citometriával vizsgáltuk a FXIII-A kifejeződését egyéb sejtvonal-specifikus differenciálódási markerekkel párhuzamosan. A sejtvonalak mellett 12 egészséges, felnőtt donor mintáit (7 csontvelő és 5 perifériás vérminta), 86 de novo AML-es beteg és 6 krónikus myelomonocytar leukaemiás (CMML) beteg mintáit vizsgáltuk. A MonoMac6 sejtvonalban a FXIII-A kifejeződése megelőzte a CD14 kifejeződését és negatív maradt a PLB-985 myeloblaszt sejtvonal maturációjának valamennyi stádiumában. Az AML

minták között a FXIII-A pozitív sejtek aránya 10% alatt maradt az akut myeloblasztos és promyelocytás leukaemia mintákban (FAB M0-M3), míg a monoblasztos/monocytás karaktert is kifejező AML esetekben (FAB M4, M5) a FXIII-A pozitív sejtek aránya 50% feletti volt, ami szignifikánsan magasabb ( $p < 0,0001$ ) volt mint a CD14-pozitív sejtek aránya. Az AML M4 és M5, valamint a CMML esetekben a FXIII-A szenzitív és specifikus módon jelöli a monoblaszt/monocyta sejteket, ezért a megakaryocytá sor mellett a monoblaszt/monocyta irányban differenciálódó leukaemia minták alkalmas intracytoplasmikus markerének tartjuk. Megfigyelésünket angol nyelvű, nemzetközi lapban közzétük (**Kappelmayer J, Simon A, Katona E, Szanto A, Nagy L, Kiss A, Kiss C, Muszbek L: Coagulation factor XIII-A - A flow cytometric intracellular marker in the classification of acute myeloid leukemias. Thromb Haemost 94: 454-459, 2005.; impakt faktor: 3,413**).

### **FXIII kifejeződés ALL blasztkban**

A FXIII-A kifejeződés tanulmányozása során olyan leukaemia mintákban is találtunk – váratlan módon – pozitivitást, amelyek esetében a May-Grünwald-Giemsa-festett csontvelői kenet előzetes vizsgálatával nem lehetett bizonyosan eldönteni az akut leukaemia myeloid vs. lymphoid jellegét, ám a sejtek az immunfenotípus meghatározás során egyértelműen lymphoidnak, ezen belül B sejt eredetűnek (B-lineage) bizonyultak. A pályázat keretében folytatott tanulmány célja a FXIII-A kifejeződés szisztematikus vizsgálata volt a B-lineage ALL csontvelői mintákban. Negyvenhét de novo B sejt eredetű ALL esetet tanulmányoztunk áramlási citometriával. A FXIII-A-t FITC-cel konjugált monoklonális antitesttel jelöltük, CD34- és CD45-ellenes monoklonális antitestekkel párhuzamosan. Néhány esetben a FXIII-A-pozitivitást blaszt sejtuszpenzióból készített citospin lemezekon vizualizáltuk fluoreszcens mikroszkóp, illetőleg konfokális lézer szkennig mikroszkóp alatt. A blaszt sejtek FXIII-A tartalmát Western blottal verifikáltuk és igen ELISA módszerrel quantitáltuk. Áramlási citometriával a 47 eset közül 19 minta bizonyult FXIII-A pozitívnek. A blasztk antigén koncentrációja  $3.11 \pm 1.19$  fg/blaszt volt, míg a normál lymphoid prekursor sejtek és B-CLL-ből származó érett lymphocyták nem tartalmaztak FXIII-A-t. A Western blot analízis a lymphoblasztkban egyetlen 82 kDa molekulatömegű, FXIII-A-nak megfelelő sávot mutatott ki. A konfokális lézer szkennig mikroszkópos vizsgálat a FXIII-A jelenlétét a lymphoblasztk cytoplasmájában mutatta ki. A FXIII-A új kifejeződsi helye leukaemiás lymphoblasztkban alkalmas diagnosztikai eszközt kínál a leukaemia-asszociált immunfenotípus és az MRD áramlási citometriával történő meghatározásában. A



megfigyelést angol nyelvű nemzetközi lapban idézhető kongresszusi absztrakt formájában közöltük, teljes közlés folyamatban van (Hevessy Z, Kiss F, Gyorfi-Veszpremi A, Haramura G, Katona E, Kiss C, Kappelmayer J: Aberrant immunophenotype - Expression of blood coagulation factor XIII in De Novo B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Cytometry Part B-Clin Cytometry 67B: 35-35, 2005.; impakt faktor: 1,438).

### **Citokinek szabályozó szerepe leukaemiában és lobos folyamatban**

A hagyományos morfológiai módszerek mellett áramlási citometrián alapuló immunfenotípus vizsgálattal pontosan és érzékenyen azonosítható leukaemiás blaszt sejtek túlélésében, szaporodásában, a normál vérképző ős- és elődsejtekkel összevetve részleges, aberráns, esetenként csak a terminális mitózis formájában megnyilvánuló differenciálódásában alapvető szabályozó szerepet töltenek be a hematopoetikus citokinek. A citokin háló és a leukaemia sejtek kölcsönhatásának tanulmányozása jelentősen hozzájárul a betegség etiopatogenezisének alkotott képünkhöz és innovatív terápiai stratégiák fejlesztésének alapját képezi.

A hematopoetikus citokinek komplex szabályozó szerepet töltenek be a leukaemiás vérképzésben. Megállapítottuk, hogy „rendellenes”, a sejtvonal-specifititás korlátait átlépő serkentő hatások észlelhetők. Így a normál vérképzést tekintve myelopoietikusnak tartott citokin, a klinikai gyakorlatban kiterjedten alkalmazott granulocita (G)-kolónia-stimuláló faktor (CSF) a gyermekkori leukaemiás lymphoblastok szaporodását is fokozza. A G-CSF a normál lymphocytákat és elődsejtjeiket nem stimulálja. Az aberránsnak tartható serkentő hatást a szélesebb biológiai aktivitású granulocita/macrophag (GM)-CSF és a pleiotrop őssejt faktor (SCF, c-kit ligand) szinergista módon fokozza. Gyermekbetegekből származó myelodysplasiás hematopoetikus elődsejtek esetében hasonló kölcsönhatásokat tapasztaltunk. Az MDS csontvelői minták esetében a leghatékonyabb serkentő ágens a GM-CSF volt, különösen juvenilis myelomonocytar leukaemia (JMML) esetében. A citokin reguláció a leukaemogenezisben is szerepet játszik. Jellegzetes pozitív és negatív feed-back mechanizmusok azonosíthatók, amelyek hozzájárulnak autokrin és parakrin serkentő és gátló mechanizmusok megjelenéséhez. Ezen „aberráns” hatások figyelembevételével, az egyes leukaemia típusok esetében azonosítható serkentő és gátló citokinek spektruma jellegzetes különbségeket is mutat.

A gátló citokinek közül ezen pályázat segítségével a klinikai gyakorlatban széles körben használt interferon (IFN)-alfát tanulmányoztuk. Az IFN $\alpha$  hatékonyan és dózis-függő módon gátolta három B-lineage neoplasztikus lymphoblast sejtvonal spontán, valamint 4

gyermekkori myelodysplasiás (3 RAEB és 1 JMML) és egy gyermekkori essentialis thrombocythaemiás csontvelői sejtminta PHA-LCM által indukált kolónia képződését. A lymphoblast sejtvonalak in vitro előkezelése IFN $\alpha$ -val késleltette a lymphoma-szerű fatális betegség kialakulását SCID egerekben. Egy JMML-es beteg esetében a kolónia esszét az in vivo IFN $\alpha$  kezeléssel párhuzamosan, több alkalommal is elvégeztük. Megállapítottuk, hogy az IFN $\alpha$  gátló hatása csökkent az in vivo IFN $\alpha$  kezelés során, majd az eredeti szintre emelkedett az in vivo IFN $\alpha$  terápia felfüggesztését követően. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy in vivo monoterápiás alkalmazása során viszonylag rezisztens klón szelektálódásával kell számolnunk.

Saját eredményeinket nemzetközi folyóiratban közöltük, illetőleg közöljük (**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 in press, E-publ ahead; impakt faktor: 1,362; Szegedi I, Benkő I, Karászi É, Vámosi G, Márton II, Szöllősi J, Kovács P, Kiss C: Differential regulation of leukemic and umbilical cord blood B-cells by interferon-alfa. - submitted for publication**), valamint a szakirodalomban közölt megfigyelésekkel összevetve áttekintő (review) tanulmányként, nemzetközi folyóiratban publikáltuk, továbbá részét képezte MTA doktori téziseimnek (**Kiss C, Benkő I, Kovács P: Leukemic cells and the cytokine patchwork. Pediatr Blood Cancer 42: 113-121, 2004.; impakt faktor: 1,362; Kiss C: Korszerű laboratóriumi vizsgálómódszerek és a citokin-háló szabályozó szerepe gyermekkori leukaemia sejtekben és rosszindulatú daganatos gyermekbetegekben. Értekezés a Magyar Tudományos Akadémia doktora cím elnyerésére. Tézisek**).

A pályázat eredeti célkitűzéseit kibővítve a citokin háló leukaemia sejteket szabályozó működését összehasonlítottuk a lobos folyamatokban kifejtett reguláló hatással. Modellként a fog gyökércsatornájának fertőzése következtében létrejövő apikális periodontitisben megfigyelhető sejt-sejtes kölcsönhatásokat tanulmányoztuk. Az apikális periodontitis lézió dinamikus ekvilibriumot reprezentál a gyökércsatorna felől beáramló kórokozók – leggyakrabban kevert anaerob baktériumok, ritkábban vírusok, gombák – és a szervezet immunrendszere között. A védekező reakciók intenzitása többnyire nem elégséges a mikroorganizmusok elpusztításához a fertőzött gyökércsatornában, azonban a kórokozók tovaterjedését hatékonyan megakadályozza. A lobos folyamatok azonban, protektív szerepük mellett, szövetkárosodást, a ligamentum periapicale destrukcióját, csontreszorbcíót is előidéznek. A protektív és destruktív reakciók eredőjeként a felszívódott alveolaris

csontszövet helyén sarjszövet, periapikális granuloma képződik. A granulomatózus lézió jellegzetes hagymahéj-szerű szöveti struktúrát mutat: kórokozók többnyire csak a gyökércsúcs közvetlen közelében kialakuló necroticus zónában találhatók. Ezt az immunrendszer első védelmi vonalát megjelenítő, neutrophil granulocytákban gazdag exudatív zóna öleli körül, amelyet a granulomatosis zóna követ. A granulomatosis zóna képviseli a lézió „motorját”, amelyben számottevő szegregáció nélkül a természetes és a specifikus immunrendszer valamennyi sejtje megtalálható. A lobos sarjszövetet a környező ép csont felé fibroticus zóna határolja el. A periapikális granulomák többsége epithel sejteket is tartalmaz. Az epithel sejtek a periapikális léziók mintegy 50 %-ában a gyökércsatornával közlekedő, vagy önmagukba zárt radicularis cystát képeznek. A lézió kialakulását, a lobsejtek infiltrációját alapvetően befolyásolja a mikroorganizmusok és a periapikális ligamentum sejtjeinek kölcsönhatása során kialakuló kemokin és inflammatorikus citokin környezet. A kemokinek közül tanulmányozott interleukin (IL)-8, monocyta chemoattraktáns protein (MCP)-I és Rantes jellegzetes, egymástól jól elkülönülő kifejeződési mintázatot (epithel, endothel, extracelluláris mátrix, rendre) mutat. A kifejezett periapikális granulomában termelődő citokinek a szervezet távoli szöveteinek, sejtjeinek működését is befolyásolhatják. Kimutattuk, hogy a nagyméretű, klinikai tüneteket okozó, neutrophil leukocytákban és epithel sejtekben gazdag periapikális léziók szövethomogenizátumában szignifikánsan nagyobb az IL-6 és a GM-CSF koncentrációja mint a kisebb méretű, tünetmentes, neutrophil leukocytákban és epithel sejtekben szegény elváltozásokban, illetőleg a gyulladás-mentes kontroll szövetben.

Saját eredményeinket nemzetközi folyóiratban közöltük: Radics T, Kiss C, Tar I, Marton JJ: Interleukin-6 and GM-CSF in apical periodontitis: correlation with clinical and histologic findings of the involved teeth. Oral Microbiol Immunol, 2003, 18, 9-13.(IF: 1.242), illetőleg a szakirodalomban közölt megfigyelésekkel összevetve áttekintő (review) tanulmányként, nemzetközi folyóiratba publikálásra nyújtottuk be (Kiss C: Cell-to-cell interactions. Endod Topics 8: 88-103, 2004.)

### **Bcl-2 antisense oligonukleotid hatása leukaemia sejtek szaporodására**

A gátló hatású IFN $\alpha$  mellett bcl-2 antisense oligonukleotid hatását vizsgáltuk a pályázat keretében. A leukémiák, limfómák patogenezisében szerepet játszó bcl-2 anti-apoptotikus protein képződésének gátlása másik lehetséges támadási pontot kínál. Kísérleteinkben 18 nukleotidból szintetizált, teljesen foszforotioált, bcl-2 antisense oligonucleotid (AON)

szekvencia hatását vizsgáltuk három B sejtes leukémia-limfóma sejtvonalon (JY, BL-41, BCBL-1) valamint két primer leukémiás csontvelői blast sejt populáción. Az AON mindhárom sejtvonala esetében 0,125-0,5  $\mu$ M koncentrációban jelentős, dózisfüggő kolónia képzés gátlást eredményezett metilcellulóz kultúrában (BL-41: 81%, JY: 82%, BCBL-1: 65%). Kontroll random oligonucleotid (RON) szekvencia nem gátolta szignifikánsan a kolónia-képzést. Az AON Western blot módszerrel kimutatható módon mindhárom sejtvonala esetében jelentősen csökkentette a sejtek bcl-2 protein tartalmát (JY és BL-41 50%, BCBL-1 90%). A primer leukémia sejtekben 82% és 75% bcl-2 szint csökkenést tapasztaltunk. A RON nem okozott bcl-2 protein depléciót. A bcl-2 szint csökkenéssel társuló kolónia-képződés gátlását apoptózis okozta, amelyet DNS létra vizsgálattal igazoltunk. Megállapítható, hogy a több felnőttkori daganatos betegségekben fázis II/III klinikai kipróbálás alatt álló bcl-2 AON terápiának szerepe lehet gyermekkori rosszindulatú hematológiai betegségek kezelésében.

Eredményeinket nemzetközi konferencián és lektorált, nemzetközi folyóiratban megjelent citáható absztrakt formájában ismertettük (**Kiss C, Szegedi I, Katona K, Kappelmayer J, Aradi J: BCL-2 antisense oligonucleotid inhibits clonal growth of leukemia cell lines. *Pediatr Blood Cancer* 43: 398-398, 2004.;** **impakt faktor: 1,362; kézirat közlésre beküldve**).

### **IFN $\alpha$ és cisz-retinsav alkalmazása gyermekkori hemopoetikus neopláziák és solid tumorok gyógykezelésében**

Retrospektív klinikai tanulmány keretében 24, 1994-2000 között IFN $\alpha$  kezelésben részesített betegünk eseteit dolgoztuk fel. Betegeink közül 6 hemopoetikus rosszindulatú daganatos betegségben, 2 Langerhans sejtes histiocytosisban (LCH), 4 gasztrointesztinális daganatos betegségben, 9 velőcső-eredetű daganatos betegségben, 2 a központi idegrendszer daganatában, 1 rhabdomyosarcomában szenvedett. Az IFN $\alpha$  kezelés bevezetésére 21 esetben citosztatikus kezelést követően, 12 esetben a betegség recidívája, 3 esetben terápia-rezisztens mivolta miatt került sor. Hat betegben a kezelést parciális remisszióban, makroszkópos tumorreziduum miatt alkalmaztuk. Három esetben az IFN $\alpha$  kezelést a diagnózis megállapítását követően kezdtük meg, 2 esetben az irodalmi ajánlások alapján (1 essentialis thrombocythaemia, 1 colon adenocarcinoma), 1 JMML-es betegben a kedvező in vitro gátlóhatás alapján a hyperleukocytosis szindróma következményeinek megelőzése céljából. Hét esetben az IFN $\alpha$ -t monoterápia formájában, 17 esetben más citosztatikumokkal, illetve

retisav származékokkal együtt alkalmaztuk napi 3-20 ME/m<sup>2</sup> dóziban, heti 3 alkalommal, szubkután injekció, súlyos thrombocytopenia esetén infúzió formájában. A 24 betegünk túlélési ideje 8-107+ hónap volt (átlag 40,0 hónap, medián 31 hónap). Nyolc betegünk (33%) van életben. Követési idejük 62+ - 155+ hónap. Tizennégy esetben (58%) észleltünk terápiás választ (5 komplett és 9 parciális remisszió). A túlélő betegek valamennyien a reszponderek csoportjából kerültek ki. A retinsav származékok (ATRA, illetőleg isotretinoin) neuroblastomás, LCH-s és MDS-es gyermekek esetében hozzájárultak az IFN $\alpha$  kezelés kedvező hatásához.

Az IFN $\alpha$  kezelést a gyermekek jól tolerálták. Mellékhatásként valamennyi esetben tapasztaltuk influenza-szerű szindróma fellépését, néhány esetben bágyadtságot, levertséget, étvágy- és testsúlycsökkenést. A retinsav származékok alkalmazása során hiper-A vitaminózis szindróma különböző súlyossági fokban valamennyi esetben fellépett. Két betegben az isotretinoin kezelés szövődményeként Sweet szindróma kialakulását és proteinuria jelentkezését észleltük.

Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy az IFN $\alpha$  és a retinsav kezelés hatékonyan egészítheti ki a CD 7-pozitív akut leukaemiás, JMML-es, myeloproliferatív szindrómás, disszeminált LCH-s és neuroblastomás gyermekek kezelését. Nemzetközi multicentrikus tanulmányok tisztázhatják az IFN $\alpha$  és a retinsav származékok helyét a gyermekgyógyászati hematológia-onkológia terápiás fegyvertárában.

Megfigyeléseinket angol nyelvű nemzetközi és hazai lapokban közzeltük, valamint az eredmények részét képezték MTA doktori téziseimnek (**Kiss C, Kiss M, Szegedi I, Árvai K, Tóth J, Oláh E: Interferon-alpha therapy in children with malignant diseases: clinical experiences in 24 patients treated in a single pediatric oncology unit. Med Pediatr Oncol 39: 115-119, 2002.;** impakt faktor: 1,216; Jakab Z, Szegedi I, Balogh E, Kiss C, Olah E: Duchenne muscular dystrophy – rhabdomyosarcoma, ichthyosis vulgaris – acute monoblastic leukemia: association of rare genetic disorders and childhood malignant diseases. Med Pediatr Oncol 39: 66-68, 2002.; impakt faktor: 1,216; Györfy A, Kovács T, Szegedi I, Oláh E, Kiss C: Sweet syndrome associated with 13-cis-retinoic acid (isotretinoin) therapy. Med Pediatr Oncol 40: 135-136, 2003.; impakt faktor: 1.737; Árvai K, Tóth J, Németh T, Kiss C, Molnár P, Oláh É: Csecsemőkori nyaki lokalizációjú neuroblastoma. Magyar Onkológia 48: 89-95, 2004.; **Kiss C: Korszerű laboratóriumi vizsgálómódszerek és a citokin-háló szabályozó szerepe gyermekkori leukaemia sejtekben és rosszindulatú daganatos gyermekbetegekben. Értekezés a Magyar Tudományos Akadémia doktora cím elnyerésére. Tézisek)**

### **Glanzmann kóros beteg molekuláris biológiai vizsgálata**

A vérképzés molekuláris szabályozásának modelljeként, illetőleg új, génterápiás lehetőségek kidolgozásának előkészítése céljából részletesen tanulmányoztuk egy súlyos vérzékenységben szenvedő 6 éves, roma származású fiúbeteg esetét. A gyermeknek újszülött korában elhúzódó köldökcsont vérzése és postinjekciós haematomája, a későbbiekben ismétlődő, súlyos, jelentős anemizálódást előidéző epistaxisai voltak. A kvantitatív vérképe a vérszegénységtől eltekintve normális volt. A jelentősen megnyúlt vérzési idő (>20 min) thrombocyta funkciózavarra utalt. A vérlemezkék kóros működését az ugyancsak jelentősen megnyúlt PFA-100 záródási idők (>300 s mind collagen/epinephrin, mind collagen/ADP patronnal), valamint az ADP, arachidonsav, epinephrin és collagen serkentéssel sem kiváltható thrombocyta aggregáció igazolta. A thrombocyták kicsiny mérete és a thrombocytadús plazma alvadék-retrakció hiánya Glanzmann thrombasthenia kórismézését tette lehetővé.

Kvantitatív áramlási citometriával és Western blot vizsgálattal kimutattuk a fibrinogén receptor (GpIIb/IIIa; CD41a) GpIIb komponensének teljes hiányát a beteg thrombocytákban. A beteg szüleinek vérlemezkéi a normál kontroll thrombocytákon meghatározott receptorszám mintegy 39%-át fejezték ki (anya 22 415, apa 22 075 fibrinogén receptor/thrombocyta). A beteg thrombocyták felszínén kompenzatórikusan magasabb volt az  $\alpha_v$  integrin molekulák mellett GpIIIa fehérjét tartalmazó vitronektin (VnR) receptorok száma (377/thrombocyta) mint a kontroll vérlemezkék felszínén ( $97 \pm 36$ /thrombocyta). A VnR-k száma a beteg thrombocytákon thrombin receptor agonista peptid (TRAP) hatására szignifikánsan emelkedett (634/thrombocyta), míg a fibrinogén receptor expressziót továbbra sem lehetett igazolni. Az egészséges vérlemezkék fordítva viselkedtek: felszínükön, illetőleg citoplazmájukban TRAP stimulációt követően jelentősen fokozódott a fibrinogén receptor és nem változott a VnR kifejeződés mértéke.

A kvantitatív áramlási citometriás vizsgálatok arra utaltak, hogy a betegben az autoszóm recesszív módon öröklődő Glanzmann-kór hátterében a GPIIb gén defektusa áll. A gén közvetlen szekvenálásával új, eddig nem közölt mutációt találtunk: a 17-es exonban az 1619-es pozícióban elhelyezkedő citozin delécióját állapítottuk meg, homozygota formában. A szülők a mutációra nézve heterozygotának bizonyultak. A deletált citozin két AGCTG repeat között helyezkedik el. A bázisdeléció az érett fehérje 509-es aminosavját követően frameshift mutációt idéz elő stop kodonnal az 533-as pozícióban. A betegből származó mRNS-eredetű

GPIIb cDNS közvetlen, a 12-es és 21-es exonok között elvégzett szekvencia analízise nem utalt alternatív splicing folyamat léteire a beteg thrombocytákban. A GPIIb-mRNS expresszióját a GAPDH-mRNS expressziójára normalizálva megállapítottuk, hogy a beteg thrombocytái az egészséges thrombocytákban kifejeződő GPIIb-mRNS 0,06 %-át tartalmazták, ami a mutáns mRNS labilitását igazolta.

A mutáció ismeretében vad típusú, illetőleg az általunk karakterizált mutációt hordozó GPIIb-t tartalmazó pCDNA3 plazmidot állítottunk elő, a mutáns variánst site-directed mutagenézissel. A vad, illetőleg mutáns pCDNA3-GPIIb plazmidokat vad típusú pCEP4-GPIIIa plazmidokkal együtt ilpofekcióval BHK sejtekbe transzfektáltuk. A mutáns plazmiddal transzfektált BHK sejteken áramlási citometriával sem GpIIb molekulákat, sem GpIIb/IIIa komplexeket nem lehetett kimutatni. Immunprecipitációs vizsgálattal megállapítottuk, hogy a mind GpIIb-vel, mind GpIIIa-val reagáló poliklonális immunsavó használatával kis mennyiségű, 60 kDa molekulatömegű GpIIb kimutatható a transzfektált sejtek lizátumában. Ellentétben a vad típusú pCDNA3-GPIIb plazmiddal transzfektált BHK sejtekkel, a mutáns plazmiddal transzfektált BHK sejtek lizátumában GpIIIa-ellenes monoklonális ellenanyag alkalmazásával a GpIIb protein nem volt koprecipitálható, ami azt igazolja, hogy az általunk leírt, a gén/fehérje korai szakaszát érintő, igen frameshift→nonszensz mutáció során szintetizálódó trunkált GpIIb fehérje nem képes komplexet képezni az élettani GpIIIa fehérjével – a fibronectin receptorok teljes hiányát eredményezve. Eredményeinket angol nyelvű, nemzetközi folyóiratban publikáltuk (Losonczy G, Rosenberg N, Kiss C, Kappelmayer J, Vereb G, Kerényi A, Balogh I, Muszbek L: A novel homozygous mutation (1619delC) in GPIIb gene associated with Glanzmann thrombasthenia, the decay of GPIIb-mRNA and the synthesis of a truncated GPIIb unable to form complex with GPIIIa. Thromb Haemost 93: 904-909, 2005.; impakt faktor: 3,413).