

Dr. Egyed Miklós

PhD DOLGOZAT

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar

2003

PhD dolgozat

AZ ATRA ONKOHEMATOLÓGIAI HATÁSAI

**Retinoinsav hatása a citogenetikai remisszióra
krónikus fázisú CML-ben**

Dr. Egyed Miklós

Program megnevezése:

Tumorsejtek patomorfológiájának vizsgálata

NK sejtek: ontogenezis, funkció, patomorfológia

Programvezető:

DR. KELÉNYI GÁBOR – DR. PAJOR LÁSZLÓ

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar

2003

Tartalom

1. ÖSSZEFOGLALÁS	3
2. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK, ELVI HÁTTÉR.....	4
3. A TANULMÁNY LEÍRÁSA	8
3.1. Beteganyag	9
3.1.1. <i>A beválasztás kritériumai.....</i>	9
3.1.2. <i>A kizárás kritériumai</i>	10
3.2. Mellékhatások	11
3.2.1. <i>Az interferon várható mellékhatásai.....</i>	11
3.2.2. <i>Az ATRA várható mellékhatásai</i>	11
3.3. A tanulmány megszakítása vagy dózis-módosítás	12
3.3.1. <i>ATRA: megszakítás indokai</i>	12
3.3.2. <i>Interferon</i>	12
3.4. A kiértékelés kritériumai	13
3.4.1. <i>Tolerálhatóság.....</i>	13
3.4.2. <i>A válaszok kritériumai</i>	13
3.4.3. <i>A CML fázisok kritériumai: akcelerált fázis; blasztos fázis</i>	14
3.4.3.a. <i>Akcelerált fázis kritériumai</i>	14
3.4.3.b. <i>Blasztos fázis kritériumai</i>	14
3.5. A kiértékeléshez szükséges vizsgálatok.....	15
3.5.1. <i>Metafázis citogenetika</i>	15
3.5.2. <i>Interfázis citogenetika-FISH.....</i>	16
3.5.3. <i>Szemikvantitatív polimeráz láncreakció-Q-PCR</i>	16
4. EREDMÉNYEK	18
4.1. A résztvevő betegek összesített citogenetikai eredményei	26
5. MEGBESZÉLÉS	28
6. IRODALOM	34
7. RÖVIDÍTÉSEK.....	43
8. A PHD DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK, ABSZTRAKTOK ÉS ELŐADÁSOK.....	44
Közlemények.....	44
Absztraktok	46

1. Összefoglalás

A CML a pluripotens hemopoetikus őssejtből kiinduló betegség, az első malignus folyamat, amely genetikus alterációhoz, a bcr-abl fúziós génhez köthető. Kezelése az utóbbi két évtized jelentős haladása ellenére sem teljesen megoldott. Az eddig alkalmazott terápiás modalitások mindegyike a Ph+, klonális vérképzés szuppressziójára vagy kiirtására törekedett. Tanulmányunkban először alkalmaztuk a betegek kezelésére az IFN+ATRA kombinációt, amelytől a klonális vérképzés szuppressziója mellett az egészséges Ph-progenitoroknak nyújtott proliferációs előnyt (a két összetevő szinergista hatását) vártuk. 1995 és 2000 között 11 első krónikus fázisú CML-es betegen kezdtük el, és közülük 9 esetében fejeztük be a kombinált kezelést. A 9 beteg esetében a szokásos dóziszú IFN kezelést 12 hónapig kombináltuk ATRÁ-val. A 9 beteg közül 6 esetben az első 12 hónapban észleltünk major citogenetikai választ, az azt követő időszakban már további válasz nem volt.

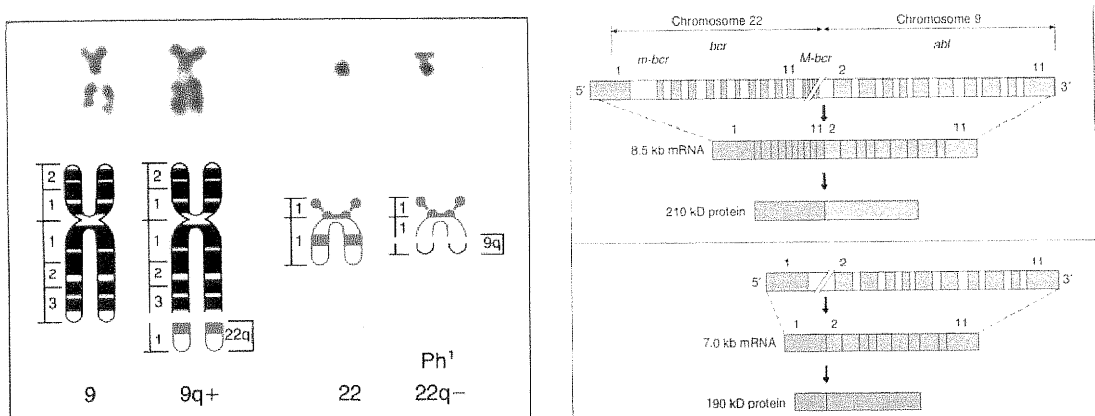
Az eredményeket az osztályunkon csak IFN-t kapott betegek adataival összevetve háromszor gyakrabban észleltünk major citogenetikai választ.

A kisszámú beteg adatait az irodalmi adatokkal összevetve az állapítható meg, hogy lényegesen nagyobb arányban és gyorsabban értük el a citogenetikai választ, kevesebb és enyhébb mellékhatás lépett fel.

Ez az első tanulmány az IFN+ATRA kombinációjával CML-es betegekben. A várt szinergista hatást az enyhébb mellékhatások és a gyakoribb és gyorsabb citogenetikai válasz bizonyíthatja. A kombináció alkalmazását ma eredményeink alapján az STI-571 rezisztens CML-es betegek körében tartjuk megfontolandónak. Az ATRA adását 12 hónapon túl is fontosnak tartjuk.

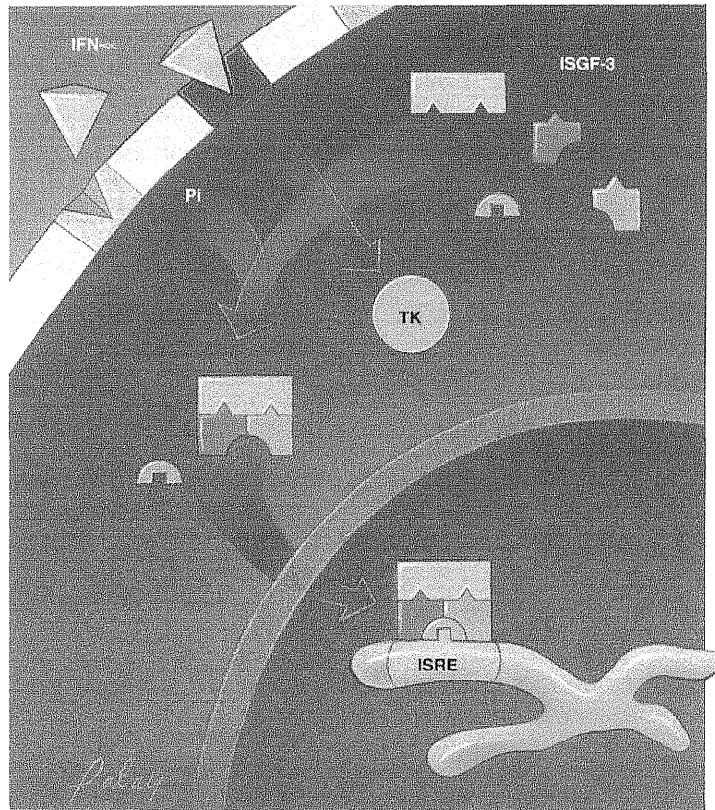
2. Bevezetés, célkitűzések, elvi háttér

A CML az első neoplasztikus folyamat volt, melyet konzisztens szerzett genetikus abnormalitáshoz lehetett kötni, és ma a leukémia leginkább ismert modellje. A CML a pluripotens hemopoetikus őssejt malignus klonális megbetegedése, amelyet Philadelphia transzlokáció $t(9;22)(q34;q11)$, molekuláris szinten a *bcr-abl* határoz meg (**1. ábra**). Gyógyításának ma egyetlen elfogadott módszere az allogén őssejt-transzplantáció. A donor elérhetőségének limitált volta és a betegek gyakran előrehaladott életkora azonban jelentősen beszűkíti alkalmazhatóságát.^{4, 9, 10, 22, 24} A CML krónikus fázisában a legtöbb beteg tünetmentes vagy csak alig van panasza, és az életminőség is jó. Ebből adódóan a nem transzplantálható betegek részére a krónikus fázis megnyújtása a terápiás cél.^{2, 7, 31, 32, 45} A Ph⁺ klón szuppressziója a krónikus fázis tartamának a megnyúlásával jár.^{32, 45} A betegség szinte bizonyosan az agresszív blasztos fázishoz vezet, melynek során a malignus mieloid őssejt elveszíti a differenciálódási képességét. A proliferációs és érési abnormalitások hasonlóak az APL-ban észleltekhöz. A tanulmány fő hipotézise az volt, hogy egy olyan a differenciálódást elősegítő anyag, mint az ATRA nem csak APL-ban lehet hatásos, de megnyújthatja a CML krónikus fázisát is.³⁷



1. ábra. A Ph transzlokáció és a *bcr-abl* fúziós gén

Az IFN $_{\alpha}$ -t 1983 óta használják a CML kezelésére és standard terápiává vált. ²
27, 29, 32, 44, 45, 50



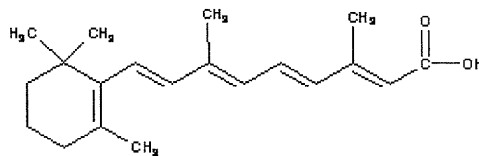
2. ábra. IFN-alfa feltételezett intracelluláris hatásmechanizmusa

Az IFN $_{\alpha}$ a citokinek családjába tartozó, a 9. kromoszómán kódolódó kis molekulájú 166 aminosavból álló fehérjék, illetve glükoprotein-molekulák csoportja, amelyek minimum 75% homológiát mutatnak egymással. Antivirális, antiproliferatív, immunmodulátor, angiogenezist gátló és natural killer sejt aktiváló hatása van. Mivel fehérjemolekula, intracelluláris hatását indirekt módon speciális sejtmembrán-receptorhoz kötődve hozza létre. A receptort az 5. kromoszóma hosszú karján lévő gén kódolja. A receptor a jelátvitelhez a Janus-kináz rendszert (JAK 1) és az IFN receptorhoz kötött tirozin-kinázt (TYK 2) használja. Az IFN $_{\alpha}$ receptorhoz való kötődése után (2. ábra) ⁴² a sejt citoplazmájában inaktív formában lévő ISGF-3

(*IFN stimulated gene factor-3*) elemei (p113, p91, p84) foszforilálódnak és p48-at, IRF-et (*IFN regulatory factor*) kötnek. Az ily módon aktivált 4 fehérjéből álló komplex (STAT; *signal transducer and activator of transcription*) a sejtmagba jut és ott az IFN hatását kifejező fehérjék kódolását végző gének aktivációját indítja el. Ezen gének közősek abban, hogy promoter régióikban 15 bázispáros „enhancer” ISRE (*interferon stimulated responsive element*) helyezkedik el.^{20, 23, 26, 49, 52}

Az IFN CML-ben észlelt hatása ma sem ismert pontosan. A betegek kb. 75%-ában képes hematológiai remissziót létrehozni, hatása a krónikus fázisra korlátozódik, dózisfüggő és főleg a korai krónikus fázisban hatásos. A Ph⁺ progenitorok proliferációs előnyét szünteti meg. Hatása minden bizonnyal összetett, a bcr-abl ligand független tirozin-kináz hatását neutralizálja, de emellett a NK sejtek aktivitás fokozódása által keltett citotoxikus immunreakciónak is szerepe lehet. Újabban a mieloid dentritikus sejtek CML-ben igazoltan csökkent IFN termelésének is jelentős szerepet tulajdonítanak a Ph⁺ progenitorok progressziójában, az IFN terápia citokinpótlásként hathat.^{2, 3, 7, 25, 27}

Az INF önmagában 25%-ban okoz parciális citogenetikai remissziót és kis dózisú ara-C-vel ez 40%-ra emelhető.^{3, 25, 31, 44, 45}



3. ábra. ATRA

Az ATRA (*all-trans-retinoic acid*) az A vitamin biológiailag aktív formája, melynek fontos szerepe van a különböző szövetek sejteinek differenciálódásában (3. ábra). Hatásmechanizmusában döntő, hogy ligandfüggő transzkripciós faktorokon keresztül hat. Mivel lipidoldékony, hatásához nem szükséges másodlagos jelátvivő rendszer. Bár a citoplazmában léteznek kötőfehérjéi, ezek inkább a metabolizmusban játszanak szerepet. A sejtmagban retinoinsav-receptorok mediálják hatásait. A receptorok egyik csoportja ligandfüggő transzkripciós faktor: RAR_α; RAR_β; RAR_γ;

génaktivációjának egyik lehetséges útja a szteroid receptorokkal egyező, eszerint a retinoin savnak RAR-hoz való kötődése után homodimerek (RA-RAR_α)₂ jönnek létre és ezek a target gén speciális promoter régiójához (RARE; *retinoic-acid-responsive element*) kötődve a transzkripció fokozódását vagy csökkenését okozzák. A receptorok másik csoportja a RXR család α, β, γ, melyek esetén nem direkt a retinoin sav a ligand, hanem annak metabolitja.^{8, 35, 39}

Az ATRÁ-nak és analógjainak fontos szerepe van az epiteloid szövetek normál differenciálódásában, állatkísérletekben gátolja a karcinogenezist, in vitro különböző sejtvonalak malignus transzformációját és tumoros sejtvonalak növekedését.^{5, 6}

In vitro egészséges humán csontvelői őssejteket ATRÁ-val kezelve bizonyították, hogy a szer stimulálja a normális granulopoézist. Valószínűleg részben a növekedési faktorokra való érzékenyítés útján fokozódik a kolóniákon belül a granulociták érése, de csökken a kolóniák száma.^{1, 12}

In vitro vizsgálatok bizonyították, hogy az ATRA gátolja az akcelerált és blasztos fázisú CML-es betegek mieloid progenitor sejtjeinek klonális növekedését.^{1, 21}

Az egészséges progenitor sejtre való hatása eltér a leukémiás őssejtre való hatástól, így az egészséges sejtek stimulációja a leukémiás proliferáció szuppressziójához vezethet. Mivel az IFN-ATRA kombinációt még sehol sem alkalmazták CML-es betegeken, ezért az EORTC-ben 1994-ben szerveztünk és 1995-ben elindítottunk egy tanulmányt, melyben elsőként próbáltuk ki az új kombinációt.^{17, 18, 37} Az osztályunkról regisztrált 11 betegen a következőket vizsgáltuk: 1. elsősorban a tolerálhatóságot, illetve a toxicitást vizsgáltuk. 2. Vizsgáltuk, hogy az IFN-nel elért hematológiai remisszió fennmarad-e? 3. A rendszeresen elvégzett citogenetikai vizsgálatokkal azt is tudni akartuk, hogy az ismert IFN citogenetikai válaszon változtat-e az ATRA, a válaszolók arányát, a válaszig eltelt időt, a válasz mélységét illetően.

A tanulmány második felében adatainkat az osztályunkon ezen időszakban kezelt, de az EORTC tanulmányba kerülést visszautasító, csak IFN-nel kezelt,

hasznló életkorú és SOKAL score-ral rendelkező⁴³ betegek eredményeivel hasonlítottuk össze.

3. A tanulmány leírása

A betegek 2 hónappal a regisztráció előtt már naponta legalább 3 millió egység IFN-en kívül semmi egyéb, a CML kezelésére használt szert nem kaphattak. Emellett hematológiai remisszióban maradtak és nem léptek fel súlyos, kizárást indokló mellékhatások. A regisztráció után minden második héten naponta 45 mg/m² ATRÁ-t kaptak per os (lehetőleg 12 óránként 2 egyenlő dózisban).

Havonta ellenőriztük általános állapotukat, életminőségüket, összegeztük a mellékhatásokat. Vérvkép, retikulocita, minőségi vérvkép, vese- (CN, kreatinin, húgysav) és májfunkció vizsgálatok (GOT, GPT, GGT, ALP, LDH, se-bi) történtek.

A 12 hónapos tanulmányba belépéskor és minden 4. hónapban (0, 4, 8, 12) néztük a szérum koleszterin és a triglicerid-szintet. A csontvelő aspirátumból:

- MAY-GRÜNWARD-GIEMSA szerint festett készítményeket értékeltünk.
- Citogenetikai vizsgálatot végeztünk: 1998 előtt csak metafázis citogenetikai vizsgálatra volt lehetőség a *Budapesti Szent László Kórház Citogenetikai Laboratóriumában*, (minimum 30 metafázis értékelése); 1998 óta FISH módszerrel interfázis citogenetikai vizsgálatra is mód van a fentivel párhuzamosan, a *POTE Patológiai Intézetében* (200–300 sejten).
- Molekuláris vizsgálat (bcr-abl) a *POTE Patológiai Intézetében* a tanulmány kezdetén (induláskor), illetve a teljes citogenetikai remisszió elérésekor.
- Szemikvantitatív PCR vizsgálatot is a *POTE Patológiai Intézete* végzett.

A 12 hónap elteltével az ATRÁ-t leállítottuk, a betegeket az addig alkalmazott napi IFN dózissal kezeltük tovább.

- Havonta ellenőriztük az életminőségüket, az esetleges mellékhatásokat, a vérképet.
- 4 havonta vese- és májfunkció ellenőrzést, csontvelővizsgálatot végeztünk, az aspirátumból citológiai értékeléssel és citogenetikai vizsgálatokkal.
- A tanulmányt 2000. augusztus 30-ig értékeltük ki (1995–2000).

3.1. Beteganyag

1995. decembere és 2000. augusztusa között 11, első krónikus fázisú CML-es beteget kezeltünk a *kaposvári Kaposi Mór Megyei Kórház Hematológiai Részlegén*.

3.1.1. A beválasztás kritériumai

- CML Philadelphia kromoszóma (Ph) vagy bcr-abl pozitivitás.
- CML első krónikus fázisban.
- Kevesebb, mint 36 hónapja diagnosztizált és kezelt beteg.
- A betegek a beválasztás előtti utolsó két hónapban naponta IFN-t kaptak, hidroxiureát vagy egyéb citosztatikus szer kezelésben nem részesültek.
- A betegek kora 18 és 70 év között lehetett.
- A perifériás fehérvérsejt-szám stabilan $2 - 10 \times 10^9/l$ között kellett, hogy legyen.
- WHO-ECOG szerinti általános állapotuk 0-I-II lehetett.
- Várható életkilátásuk eléri az egy évet.
- Írásos bejegyzésüket adták a kezeléshez a felvilágosítást követően és vállalták az együttműködést.

3.1.2. A kizárás kritériumai

- Csontvelő-transzplantáció lehetősége adott volt.
- A 18 évnél fiatalabb és 70 évnél idősebb betegek.
- Több mint 36 hónapja kezelést kaptak, illetve
- a regisztrálást megelőző 2 hónapban hidroxiureát vagy egyéb citosztatikumot kaptak.
- NCI-CTC 4 fokozatú nem hematológiai toxicitásuk volt IFN mellett, vagy
- 3 fokozatú toxicitás után a szer visszaadására a toxicitás visszatért, ha hematológiai toxicitás miatt le kellett állítani az IFN-t.
- Szívbeteg, akik gyógyszeres kezelést kaptak, vagy ejekciós frakciójuk 50% alatti volt.
- Máj- vagy vesebeteg, akiknek a bilirubin vagy a kreatinin szérumszintje a normális érték másfélszerese volt.
- Terhesek, illetve azok a gesztációs korú nők, akik nem voltak hajlandóak hatásos antikonceptív szedésére.
- Autoimmun betegségben szenvedők.
- Egyéb malignus betegségben szenvedők, kivéve noninvazív bőrrákok vagy in situ cervix karcinómások.
- Egyéb súlyos társult betegség.
- Azok, akik a beválasztás előtti 4 hétben egyéb tanulmányban vettek részt.
- Drogélvezők.

3.2. Mellékhatások

3.2.1. Az interferon várható mellékhatásai

- Erőtlenség, gyengeség,
- influenzaszerű tünetek: levertség, mialgia, láz,
- hajhullás (enyhe),
- hypotonia,
- gasztrointesztinális eltérések: émelygés, hányinger, anorexia nervosa,
- fogyás,
- neurológiai zavarok: depresszió, konfúzió, anorexia nervosa,
- granulocitopénia, trombocitopénia.

3.2.2. Az ATRA várható mellékhatásai

- Bőrszárazság,
- száj- és szemszárazság,
- bőrkiütések,
- ödéma,
- hányinger, hányás,
- csontfájdalom,
- fejfájás (pseudotumor cerebri),
- a szérum triglicerid, koleszterin és transzaminázok emelkedése,
- APL-ban leírt ATRA szindróma, melyet láz, fulladás, akut respirátoros elégtelenség, pulmonális infiltrátumok, hypotonia, pleurális effúziók, máj- veseelégtelenség, $20 \times 10^9/l$ feletti fehérvérsejtszám jellemez (Dexametazon prompt adása kötelező).

3.3. A tanulmány megszakítása vagy dózis-módosítás

A beteg részvétele önkéntes, kérésére bármikor, magyarázat nélkül kiléphet!

3.3.1. ATRA: megszakítás indokai

Végleges megszakítási indokok

- 12. hónap vége (tanulmány befejezése),
- szignifikáns toxicitás (NCI-CTG 3–4),
- a CML akcelerációja.

Átmeneti felfüggesztési indokok

- retinoin sav szindróma kezdetére utaló jelek,
- súlyos fejfájás, látászavarral, intrakraniális nyomásfokozódás jeleivel,
- májfunkciós eltérések (bilirubin-, transzamináz-, trigliceridemelkedés, amely meghaladta a normál érték ötszörösét). A tünetek eltűnését követően a napi dózist 50%-ban 4 napig újra adjuk, és panaszmentesség esetén ezután visszatérünk a 100%-os dózistra.

3.3.2. Interferon

- Az elérendő optimális fehérvérsejtszám $2-4 \times 10^9/l$.
- Fvs $1-2 \times 10^9/l$ között az IFN frekvenciáját felezzük.
- Fvs $1 \times 10^9/l$ alatt az IFN átmenetileg leáll, újra indul 50%-os dózissal, ha fvs $2 \times 10^9/l$ fölé emelkedik.
- Trombocita $25-50 \times 10^9/l$ között IFN frekvenciáját felezzük.
- Trombocita $25 \times 10^9/l$ alatt IFN átmenetileg leáll, újra indul 50%-os dózissal, ha a trombocitaszám $50 \times 10^9/l$ fölé emelkedik.

3.4. A kiértékelés kritériumai

3.4.1 Tolerálhatóság

Hematológiai és nem hematológiai toxicitások összegzése az NCI-CTC táblázat alapján.

3.4.2. A válaszok kritériumai

3.4.2.a. A komplett hematológiai válasz alatt az összes CML-lel összefüggő tünet megszűntét tekintettük; a lép nem tapintható, a fehérvérsejt-szám $10 \times 10^9/l$ alatti és csak érett granulocitákat (stab-segment) találhattunk a minőségi vérképben. Trombocitaszám $450 \times 10^9/l$ alatt és az akcelerált vagy blasztos fázis szimptomáinak hiánya.

3.4.2.b. A citogenetikai választ a metafázis módszerrel 30 sejtoszlás %-os Philadelphia kromoszóma pozitivitásával, illetve a FISH pozitívitás %-ával fejeztük ki: nincs citogenetikai válasz: (NR) több mint 90% Ph+, minor citogenetikai válasz: (MiCR) 35–90% Ph+; major, részleges citogenetikai válasz: (PaCR) <35% Ph+ major, komplett citogenetikai válasz: (CoCR) 0% Ph+.

3.4.2.c. Komplett molekulárbiológiai válasz: bcr-abl negatív.

3.4.3. A CML fázisok kritériumai: akcelerált fázis; blasztos fázis

3.4.3.a. Akcelerált fázis kritériumai ⁴³

Ha az alábbiak közül egy is teljesül:

- a csontvelőben vagy a vérben több alkalommal 10%-nál több blaszt észlelhető,
- ismételten több, mint 20% blaszt és promielocita észlelhető,
- több, mint 20% bazofil- vagy eozinofilejt észlelhető,
- sűrűn észlelhetők PELGER HUET-szerű neutrofilok, magvas vvt-k, vagy megakariocita fragmentek,
- a csontvelő fibrózisa,
- új karotípus eltérés megjelenése a Ph kromoszóma mellett,
- rapidan progrediáló anémia vagy trombocitopénia,
- rapidan progrediáló splenomegália,
- jelentős trombocitózis kialakulása a kezelés ellenére,
- kemoterápia ellenére növekvő fehérvérsejtszám.

3.4.3.b. A blasztos fázis kritériumai

- több mint 50% blaszt + promielocita a csontvelőben,
- több mint 20% blaszt a vérben és/vagy a csontvelőben,
- extramedulláris blasztos infiltráció (tumor).

3.5. A kiértékeléshez szükséges vizsgálatok

3.5.1. Metafázis citogenetika

A *Budapesti Szent László Kórház Citogenetikai Laboratóriuma* végezte a kromoszómvizsgálatot. Az aspirációval nyert csontvelőből 1–2 ml-t 0,3 ml heparint és 3 ml fiziológiás konyhasót tartalmazó steril csőbe fecskendeztünk. Centrifugálás (10 percig 150 G-vel) után 2×10^6 sejtet tápfolyadékba (4:1 arányú 20 ml 37°C-os RPMI és borjúsérum) tettük, majd 24, illetve 48 órán át 37°C-os termosztátban tartottunk. Az inkubáció befejezése előtt 2 órával a sejtek osztódását 0,01 $\mu\text{mol/l}$ Colcemid oldattal leállítottuk. Az inkubálást követően 10 percig 150 G-vel centrifugáltuk, és a felülúszó leszívása után az üledéket 0,075 mol/l frissen készített KCl-oldattal 37°C-on 40 percig hipotonizáltuk, majd szobahőmérsékletű friss metanol/ecetsav 3:1 arányú elegyével fixáltuk. A felülúszó leszívása után az üledéket háromszor a fixálóban reszuszpendáltuk és centrifugáltuk, majd a sejtsuszpenzióból két cseppet desztillált vizes tárgylemezre cseppentettünk. A lemezeket 3–5 napig 37°C-os termosztátban szárítottuk. A preparálás után tripszin-Giemsá-(G-sáv) technikát használtuk. 0,2% tripszinoldatban 6–10 mp-ig tartó emésztés, majd a lemezek PBS- és desztillált vizes öblítése után 10 percig 0,5%-os Giemsa-oldattal festettük. A metafázisokat *International Sytem for Human Cytogenetic Nomenclature* alapján kariotipizáltuk. A preparátumok értékeléséhez 30 vagy több metafázis vizsgálata szükséges. (1. táblázat)

1. táblázat. A citogenetikai válaszok értékelése

Értékelés	Ph+ %
Major teljes (CoCR)	0
Major részleges (PaCR)	<35
Minor (MiCR)	35-90
Nincs válasz (NR)	>90
CoCR = teljes citogenetikai remisszió, PaCR = részleges citogenetikai remisszió, MiCR = minor citogenetikai remisszió, NR = nonresponder.	

3.5.2. Interfázis citogenetika-FISH

POTE Patológiai Intézet a Philadelphia-transzlokáció interfázis citogenetikai detektálására PI-klónokat (Vysis Inc., Downers Grove, IL) használtak. A 70%-os etanolban fixált izolált fehérvérsejteket 50%-os ecetsavban 3 percig utófixálták, majd tárgylemezre centrifugáltak és levegőn megszárították. Az így nyert interfázis magokon elvégzett fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) során a gyártó előírásait követték. A hibridizációt és előhívást követően a preparátumokat DAPI/Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) médiummal fedték, és VY-DGO kombinált bandpass filterrel (Vysis Inc.) felszerelt Zeiss Axioskop epi-illuminációs fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálták. Legalább 200, a DAPI-kép alapján intakt morfológiájú sejtmagot értékeltünk. Ph-kromoszóma pozitívnak tekintettük azt a magot, melyben a piros színnel (Sprectum-Orange) jelölt abl, valamint a zöld színnel (Sprectum-Green) jelölt bcr szekvenciák a transzlokáció eredményeként sárga fúziós színben egyesültek. A kiértékelés során nem súlyoztuk az egynél több Ph-kromoszómát tartalmazó sejteket. Négy egészséges egyén fehérvérsejtjein végzett kontrollvizsgálat során az álpozitivitás átlag + 2 S.D. értéke 4,8%-nak adódott, ezért a pozitivitás határát 5%-ban állapítottuk meg.

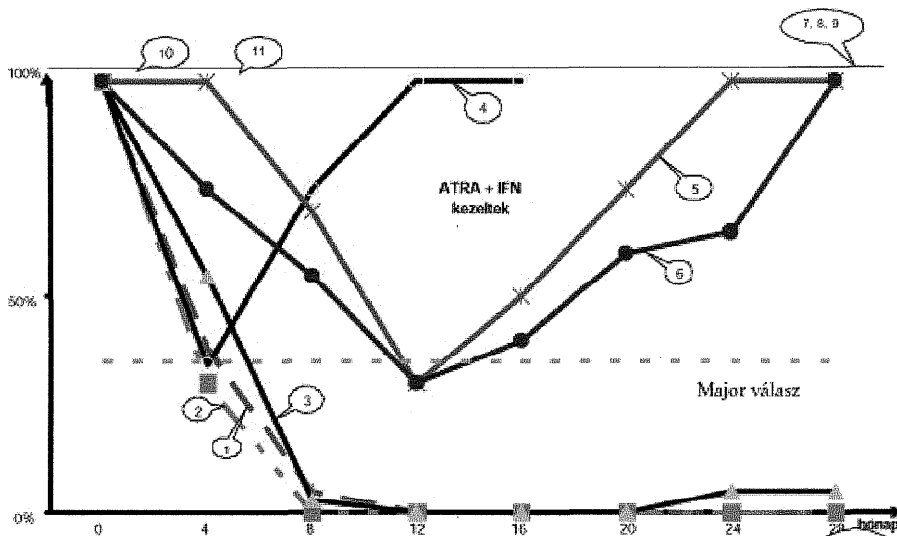
3.5.3. Szemikvantitatív polimeráz lánreakció-Q-PCR

POTE Patológiai Intézet a kiméra mRNS mennyiségi meghatározását korábban közölt ⁵² módszerrel végezte. Az M-bcr nested PCR reakció 1. lépés primereinek szekvenciája 5-TTC AGA AGC TTC TCC CTG-3, illetve 5-CTG CAC TGG CCA CAA AAT-3, a 2. lépés primereinek szekvenciája 5-GTG AAA CTC CAG ACT GTC-3, illetve 5-CAA GGA AAA GGT TGG GGT-3 volt. Az első lépésben 35, a második lépésben 25 ciklust alkalmaztunk a következő paraméterekkel: 94 C, 40 s; 54 C, 30 s; 72 C, 40 s. Az eredményeket az abl 2–3 Q-PCR reakció eredményére vonatkoztattuk, ahol az alkalmazott primerek szekvenciája

5-CAG GGG CCA GTA GCA TCT GAC TT-3, illetve 5-TCT GAT TAT AGC
CTA AGA CCC GGA G-3 volt és 40 ciklust alkalmaztunk a következő
paraméterekkel: 94 C, 60 s; 50 C, 60 s; 72 C, 60 s. ⁴

4. Eredmények

A vizsgálatban részt vett betegek a kezelést jól tolerálták, NCI-CTC 3–4 fokú toxicitást nem észleltünk. A májenzim-értékekben, illetve a lipidszintekben szignifikáns eltérés nem mutatkozott. A vizsgálatba bevont 11 beteg (a betegek számozása a **2. táblázat** alapján történik) közül 2 betegnél (*10. és 11. beteg*) fogyás, fejfájás, csontfájdalmak, szem- és szájszárazság (*10. beteg*) és együttműködési probléma (*11. beteg*) miatt le kellett állítani a kezelést. (**2. táblázat**). Az IFN-nel elért hematológiai remisszió a vizsgálat időszakában minden beteg esetén megmaradt, kivéve a *4. beteget*, akinél a 12. havi citogenetikai kontrollt követő 2 héten belül limfoblasztos fázisba való progressziót észleltünk. A citogenetikai remisszió értékelésére minden beteg esetében metafázis és interfázis citogenetikai vizsgálatot végeztünk. A 11 beteg közül 9 esetben mind a metafázis, mind az interfázis citogenetika alkalmas volt a betegség diagnózisára és követésére. Két esetben (*3. és 7. beteg*) a citogenetikai eltérések csak interfázis citogenetikával voltak vizsgálhatók. Az észlelt citogenetikai válaszokat az **4. ábra** szemlélteti.



4. ábra. ATRA+IFN-nel kezelt betegek citogenetikai válaszai az idő függvényében (4 havonta) (6 major citogenetikai válasz). A vonalra mutató nyilak mellett szereplő számok a betegek **2. táblázatban** feltüntetett sorszámai. A szaggatott vízszintes vonal a 35%-os Ph pozitivitást jelzi

2. táblázat. ATRA+IFN-nel kezelt betegek klinikai adatai

Sorszám	Nem	Életkor (év)	Dg. (időpont)	SOKAL- index ⁴³	Regisztráció (időpont)
1.	ffi	48	96. 09.	alacsony	97. 03.
2.	ffi	60	97. 10.	magas	98. 07.
3.	ffi	41	98. 12.	intermedier	99. 06.
4.	ffi	32	94. 09.	magas	96. 08.
5.	nő	42	97. 02.	intermedier	98. 01.
6.	ffi	57	96. 08.	intermedier	97. 08.
7.	nő	41	95. 07.	alacsony	95. 11.
8.	ffi	67	96. 02.	intermedier	96. 06.
9.	nő	53	98. 05.	magas	99. 02.
10.	nő	55	97. 05.	magas	97. 09.
11.	ffi	37	97. 01.	alacsony	97. 12.

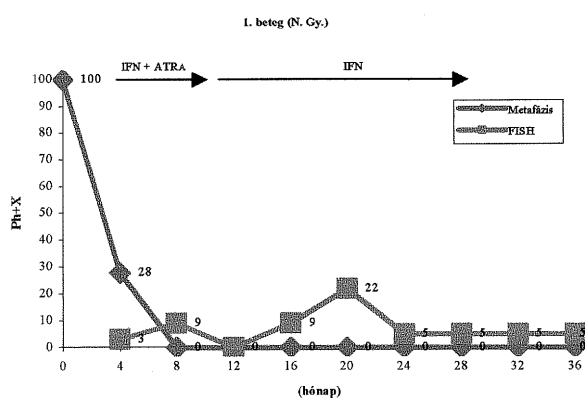
SOKAL-index⁴³

Az érték négyzetgyöke a $1/0,0116 (A-43,4) + 0,0345 (S-7,51) + 0,188 ((P/700)^2 - 0,563) + 0,0887 (B-2,10)$ matematikai képletnek, ahol A= *age* (életkor években), S= *spleen* (lépnagyság a bal bordaív alatt cm-ben), P= *platelet* (trombocitaszám $\times 10^9/l$ egységben), B= blaszt a perifériás vérben a diagnózis időpontjában.

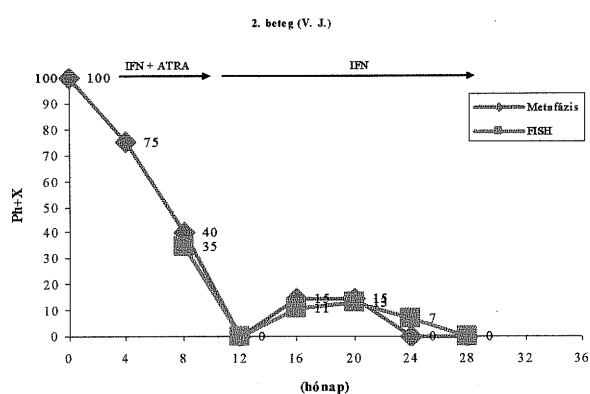
Alacsony index 0,8 alatt, intermedier 0,8–1,4 között, magas 1,4 felett.

Az egy évig kezelt 9 beteg közül 3 betegnél (7., 8. és 9. *beteg*) nem sikerült citogenetikai választ elérni. 6 betegnél major citogenetikai választ, közülük az 1., 2. és 3. *betegekben* komplett citogenetikai remissziót (CoCR) észleltünk a 12. hónapban, mely az 1. *betegnél* több mint 2 év után is megmaradt. A tanulmány leállítását követően 1 évvel molekuláris remisszióba jutott. A 2. *betegnél* az ATRA leállítását követően parciális citogenetikai relapszus (15% Ph+) lépett fel. A 3. *betegnek* az 1 évig tartó ATRA-kezelés befejezése után csak 4 hónapos kontrollját végeztük el, komplett citogenetikai remisszióban maradt. A 4. *beteg* a regisztrációkor már 2 éve kapott interferon kezelést CML miatt (heti 3×3 ME dózisban), de 100%-

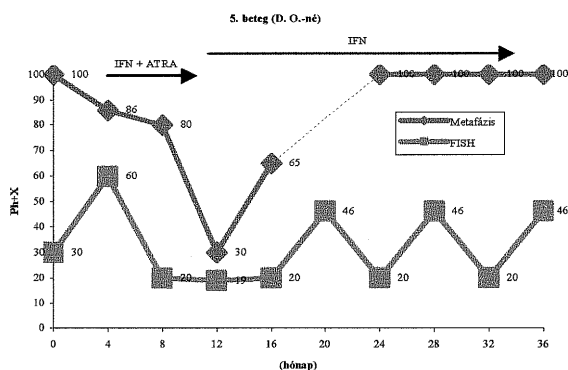
ban Ph⁺ volt. A 4. hónapra major részleges citogenetikai remissziót (PaCR) detektáltunk átmenetileg, mely a 8. hónapra romlott (MiCR), a 12. hónapra teljes citogenetikai relapszust észleltünk, és a citogenetikai lelet megérkezésekor már limfoblasztos krízisbe került, majd 6 hónap múlva meghalt. Az 5. és 6. beteg a 12. hónapra szintén major részleges citogenetikai remisszióba (PaCR) jutott, az ATRA leállítását követően azonban a változatlan dózisban adott interferon mellett, a hematológiai remisszió ellenére teljes citogenetikai relapszus következett be. A vizsgált időszakban új citogenetikai eltérés nem alakult ki beleértve a 4. beteget is. A tanulmány későbbi időszakában regisztrált 4 beteg esetén lehetséges volt a 2 citogenetikai módszer eredményeinek összehasonlítása. Az 1., 2., 5. és 6. beteg metafázis és FISH eredményeit tüntettük fel a 5–8. ábrákon.



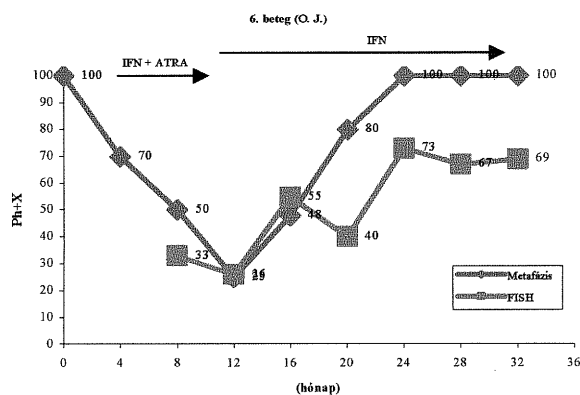
5. ábra



6. ábra



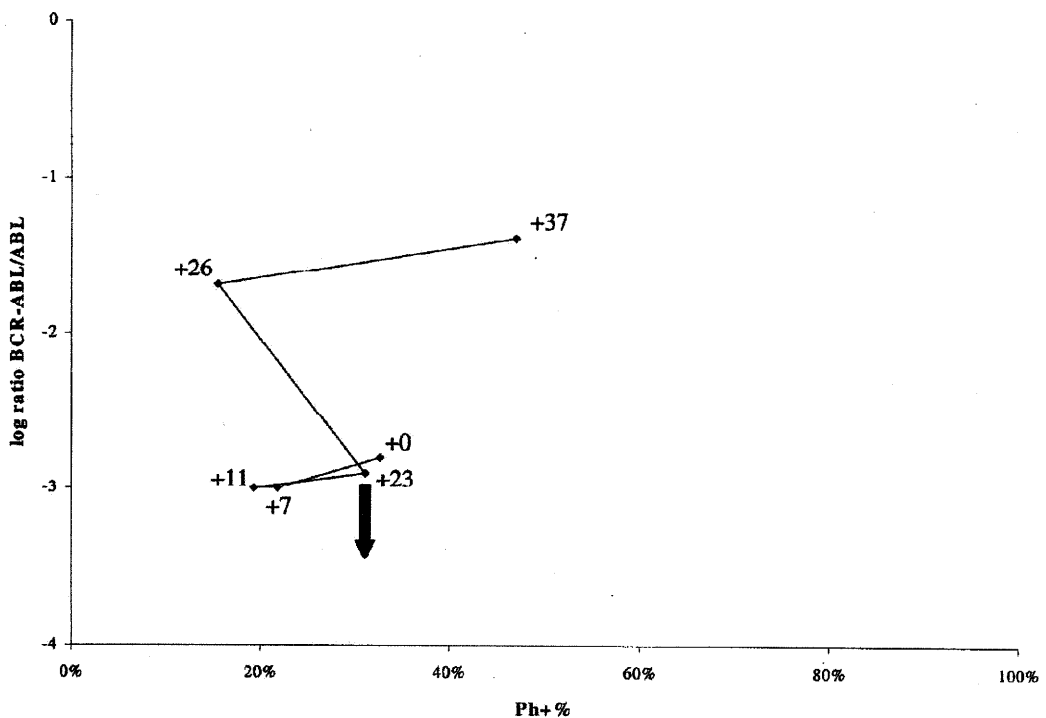
7. ábra. (A 20. hónapban a metafízis-vizsgálat sikertelen volt)



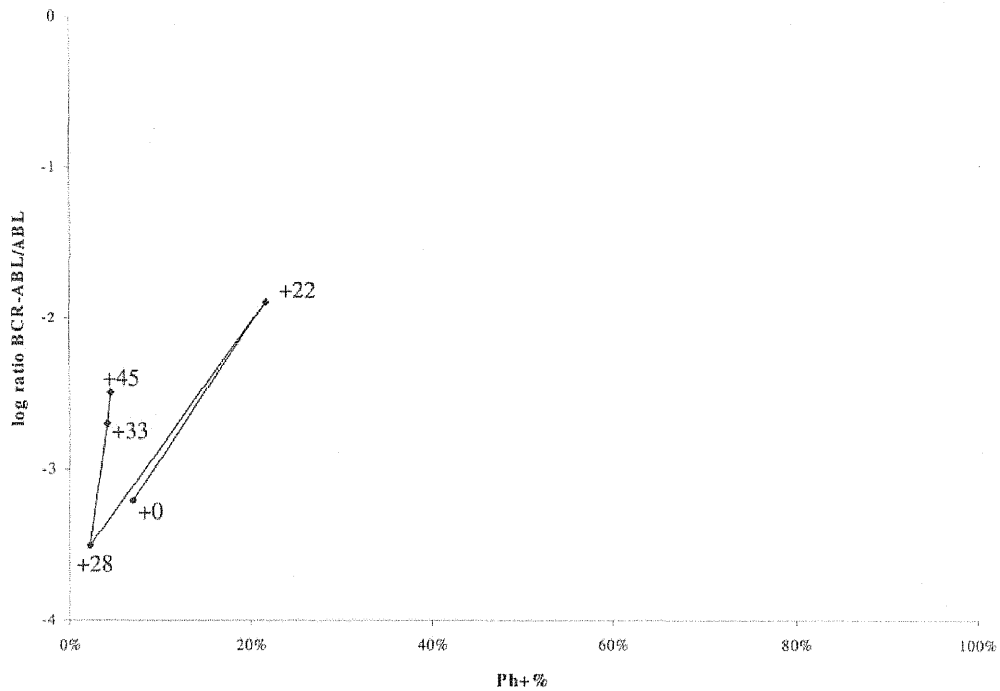
8. ábra

Látható, hogy mindkét módszer alkalmas volt az elért citogenetikai válasz mélységének megállapítására és a két görbe lefutása hasonló, kivéve az 5. beteget, ahol a citogenetikai relapszust a FISH módszer is jelezte, de mélysége nem egyezett a metafázis citogenetikai eredménnyel.

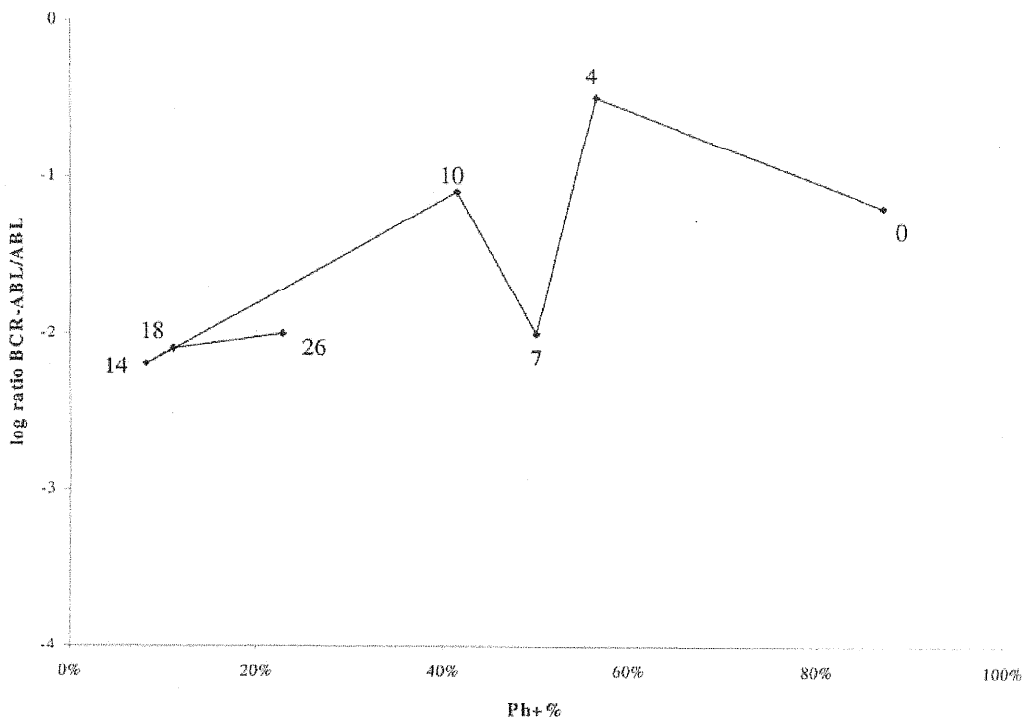
Szemikvantitatív polimeráz láncreakció (Q-PCR) eredményeket mutatunk be a 9–11. ábrákon.



9. ábra. A diagram az 5. beteg molekuláris vizsgálatait mutatja. Az egyes pontokhoz tartozó számok a vizsgálat idejét jelzik hónapban, az első vizsgálatához (0 időpont) képest. (Az 5. beteg esetén a vizsgálatra a tanulmány 8. hónapjában került sor.) Az y tengely a kvantitatív RT-PCR reakcióval 10^7 sejtben meghatározott bcr-abl kiméra mRNS molekula szám és a fiziológiásan minden sejtben jelenlévő, a transzlokációtól közvetlen telometrikusan elhelyezkedő, abban soha nem résztvevő abl, a2a3 mRNS hányadosát mutatja *logaritmus skálán*. Az y tengelyen a 0 érték a legnagyobb, a -4 érték a legkisebb bcr-abl mRNS mennyiségét jelenti. Az x tengelyen a bcr-abl pozitív sejtek arányát tüntettük fel %-osan, amelyet FISH módszerrel határoztunk meg. Log ratio BCR-ABL/ABL: -1,4



10. ábra. A diagram az 1. beteg molekuláris vizsgálatait mutatja (a 9. ábrával megegyező jelölés szerint).



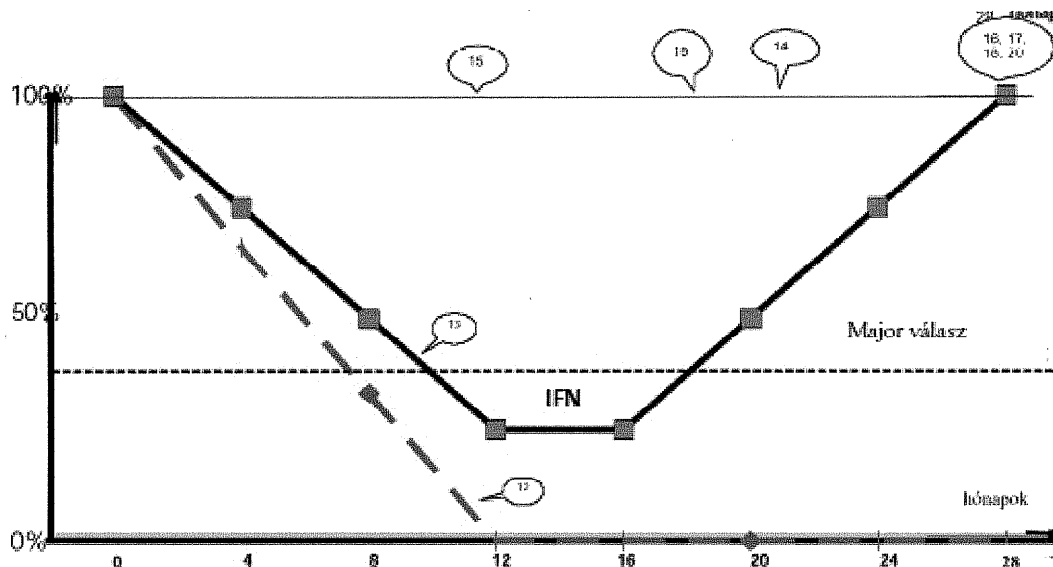
11. ábra. A diagram az 3. beteg molekuláris vizsgálatait mutatja (a 9. ábrával megegyező jelölés szerint). Log ratio BCR-ABL/ABL: -2,0

Lényegében a citogenetika eredményével megegyezően a bcr-abl expresszió csökkenését mutatja a kiméra mRNS szintjén, illetve a FISH módszerrel a sejtekben való megjelenítését.

Mivel az EORTC tanulmánynak nem volt kontroll betegcsoportja, ezért az IFN+ATRA kezelt betegek eredményeit az osztályunkon ezen időben kezelt betegek eredményeivel hasonlítottuk össze. A kilenc hasonló életkorú és SOKAL score-ral rendelkező ⁴³ beteg az EORTC tanulmányba való belépést nem vállalta, kezelésük azonban azonos dózissal IFN-nel történt, és ellenőrzésük is a 3. pontban leírtaknak megfelelően. A betegek adatait a **3. táblázatban**, citogenetikai válaszaikat a **10. ábrán** összegeztük.

3. táblázat. Interferonnal kezelt betegek klinikai adatai

Sorszám	Nem	Életkor (év)	Dg. (időpont)	Sokal-index ⁴³	Regisztráció (időpont)
12.	nő	55	92. 04.	magas	92. 05.
13.	nő	36	97. 04.	intermedier	97. 06.
14.	ffi	38	98. 10.	alacsony	97. 12.
15.	ffi	75	99. 08.	intermedier	99. 10.
16.	nő	34	94. 07.	alacsony	94. 10.
17.	nő	53	95. 06.	intermedier	95. 08.
18.	ffi	35	94. 09.	intermedier	94. 12.
19.	nő	49	97. 10.	alacsony	97. 11.
20.	nő	38	98. 06.	alacsony	98. 07.



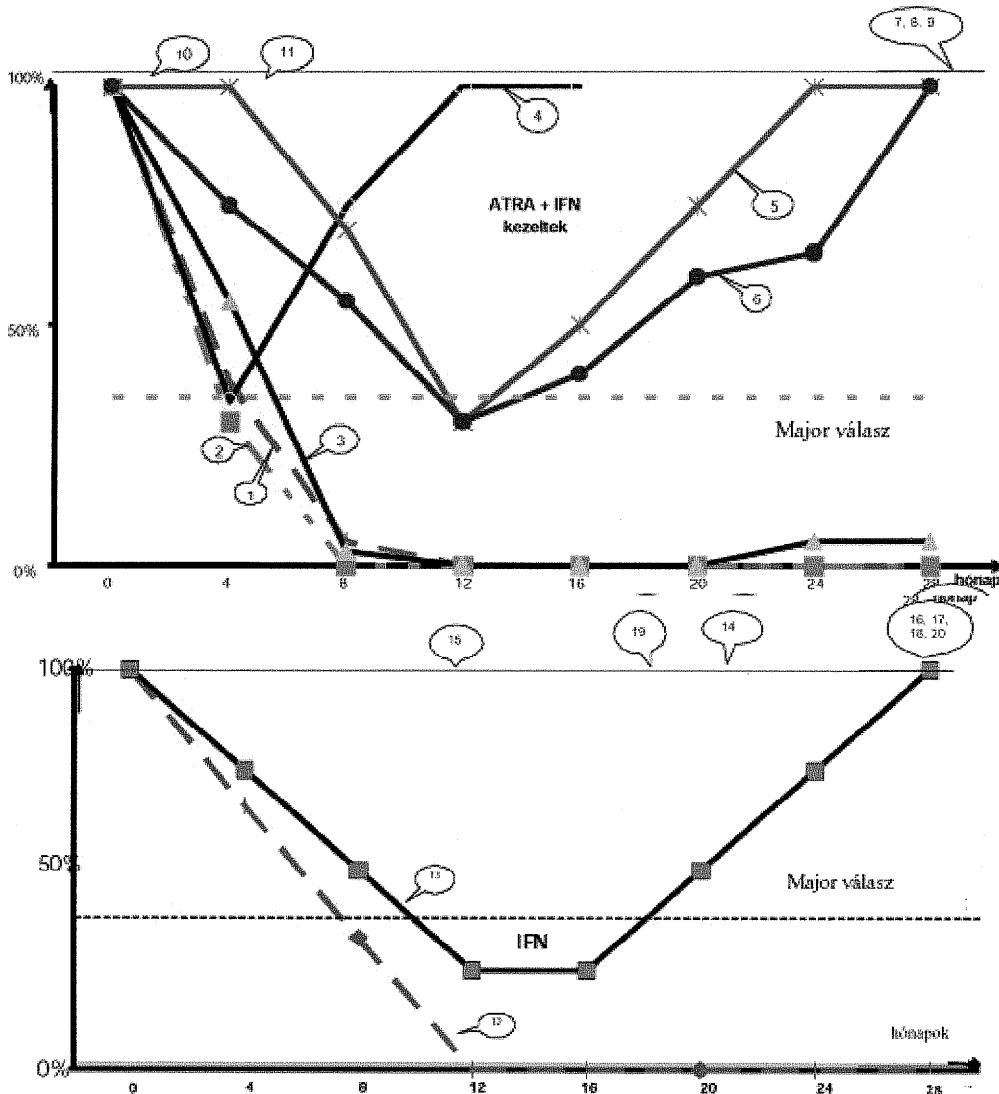
12. ábra. Csak interferonnal kezelt betegek citogenetikai válasza az idő függvényében (4 havonta) (2 major citogenetikai válasz). A vonalra mutató nyilak mellett szereplő számok a betegek **2. táblázatban** feltüntetett sorszámai. A szaggatott vízszintes vonal a 35%-os Philadelphia pozitivitást jelzi

A 12. és 13. sz. betegeken észleltünk major citogenetikai választ, a 12. sz. beteg 1 évvel az IFN kezdetét követően komplett citogenetikai, újabb 2 év múlva molekuláris remisszióba jutott. További 2 év múlva az IFN kezelést leállítottuk, és a beteg ezt követő 3 év múlva is molekuláris remisszióban maradt (gyógyult?!). A 13. betegnél, aki major részleges citogenetikai remisszióba jutott, az IFN folytatása mellett is lassú citogenetikai relapszus következett be. Citogenetikai eredményeiket a **12. ábrán** mutatjuk be.

A csoportban a követés alatt 4 beteg esetén észleltük a betegség progresszióját, blasztos fázis kialakulását 12–50 hónappal a diagnózis felállítását követően. A 14. beteg 12 hónappal a diagnózis után a hirtelen növekvő szubmandubuláris és axilláris nyirokcsomó szövettani vizsgálata igazolta az extramedulláris mieloblasztos transzformációt (a csontvelő hematológiai remissziót mutatott és a citogenetikai vizsgálat sem igazolt újabb kariotípus eltérést). BISHOP protokoll adása után 1 évig tartó hematológiai remissziót sikerült elérni, melyet követően már medulláris

mieloblasztos fázis alakult ki és gombaszepszisben halt meg. A *16. beteg* 4 évvel a diagnózis felállítását követően mieloblasztos krízis BISHOP protokoll indukciós kezelése során Gram negatív szepszis (szeptikus shock) tünetei között exitált. 17-es izokromoszóma kialakulását igazoltuk (p53 vesztes). A *17. és 19. betegeken* 42, illetve 20 hónappal a diagnózis után kifejezett csontfájdalmak, trombocitózis vezette be a mieloblasztos fázis kialakulását, mindkettőjükénél második Philadelphia kromoszóma kialakulását igazoltuk citogenetikai vizsgálatokkal. BISHOP protokoll adására nem jutottak hematológiai remisszióba és szepszis tünetei között exitáltak.

4.1. A résztvevő betegek összesített citogenetikai eredményei



13. ábra. A résztvevő betegek összesített citogenetikai eredményei

Az ATRA+IFN csoportban háromszor gyakrabban és gyorsabban észleltünk major citogenetikai választ.

4. táblázat. A résztvevő betegek összesített klinikai adatai

Sorszám	Nem	Életkor (év)	Dg. (időpont)	SOKAL- index ⁴³	Regisztráció (időpont)
IFN+ATRA					
1.	ffi	48	96. 09.	alacsony	97. 03.
2.	ffi	60	97. 10.	magas	98. 07.
3.	ffi	41	98. 12.	intermedier	99. 06.
4.	ffi	32	94. 09.	magas	96. 08.
5.	nő	42	97. 02.	intermedier	98. 01.
6.	ffi	57	96. 08.	intermedier	97. 08.
7.	nő	41	95. 07.	alacsony	95. 11.
8.	ffi	67	96. 02.	intermedier	96. 06.
9.	nő	53	98. 05.	magas	99. 02.
10.	nő	55	97. 05.	magas	97. 09.
11.	ffi	37	97. 01.	alacsony	97. 12.
IFN					
12.	nő	55	92. 04.	magas	92. 05.
13.	nő	36	97. 04.	intermedier	97. 06.
14.	ffi	38	98. 10.	alacsony	97. 12.
15.	ffi	75	99. 08.	intermedier	99. 10.
16.	nő	34	94. 07.	alacsony	94. 10.
17.	nő	53	95. 06.	intermedier	95. 08.
18.	ffi	35	94. 09.	intermedier	94. 12.
19.	nő	49	97. 10.	alacsony	97. 11.
20.	nő	38	98. 06.	alacsony	98. 07.

A két betegcsoport életkora, és Sokal-indexe hasonló volt. A kontroll (IFN) csoport a tanulmány kezdete előtt diagnosztizált vagy a kombinált kezelést nem vállaló első krónikus fázisú CML-es betegekből állt.

5. Megbeszélés

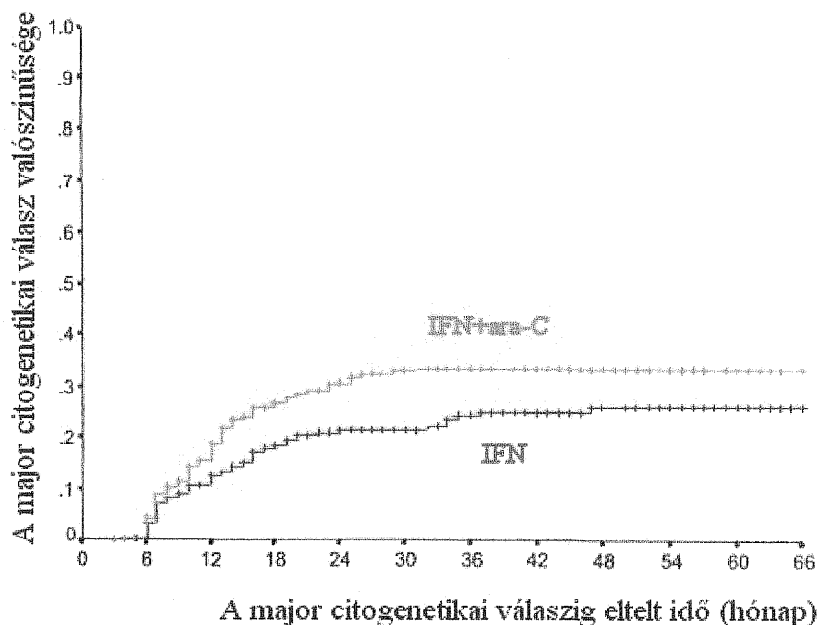
A tanulmány keretében 11 krónikus fázisú 34–68 év közötti életkorú CML-es beteg kezelése során alkalmaztuk az IFN+ATRA kombinációt.^{17, 18, 37} Arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a klonális vérképzést gátló IFN és a klonális vérképzést szintén gátló, de inkább a Ph-progenitorok proliferációját elősegítő ATRA kombinációja előnyös-e, a várható szinergista hatásuk érvényesül-e? Az IFN+ATRA kombináció előnyösebb-e az IFN monoterápiánál? A kis számú beteg eredményeit az osztályunkon IFN monoterápiával kezelt betegek eredményeivel hasonlítottuk össze. Mivel a kilenc IFN+ATRA kezelt, és a kilenc csak IFN kezelt beteg klinikai, prognosztikus score értéke és az alkalmazott IFN dózisa egyező volt, az alacsony betegszám ellenére eredményeik összehasonlíthatóak.

Az IFN+ATRA kombinációval kezelt 9 beteg esetében a kezelés 12 hónapja alatt háromszor gyakrabban értünk el major citogenetikai remissziót, mint a kontroll csak IFN kezelt betegek között. A kezelés során használt ATRA mellett a betegek életminőségét rontó mellékhatás nem jelentkezett. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az ATRA in vitro kedvező hatása a CML-es sejtekre in vivo körülmények között is érvényesül és toxikus hatása sem korlátozza alkalmazhatóságát. Az ATRA várt hatására utalhat az a tény, hogy a 12 hónapos kezelés alatt 3 major részleges citogenetikai választ adó betegben a változatlan dózisban adott interferon mellett relapszus alakult ki a következő 1 év során. Eredményeink alapján felvetődik, hogy az ATRA kezelés csak akkor nyújt hosszan tartó remissziót, ha tartósan alkalmazzuk. A csak IFN-nel^{2, 7, 27, 29}, illetve az IFN+ara-C kombinációval^{3, 25, 31} eredményeknél (beleértve a saját kontrollként kezelt csoportot is) az IFN+ATRA kombináció előnyösebbnek látszik. Az IFN monoterápiával legjobb eredményt közlő houstoni MD Anderson munkacsoport 38%-os major citogenetikai válaszról számolt be (26% komplett és 12% parciális). A többi nagy tanulmányban 10% körüli volt a major válasz aránya. Az IFN-t legelterjedtebben kisdózisú citarabinnal kombinálják, az

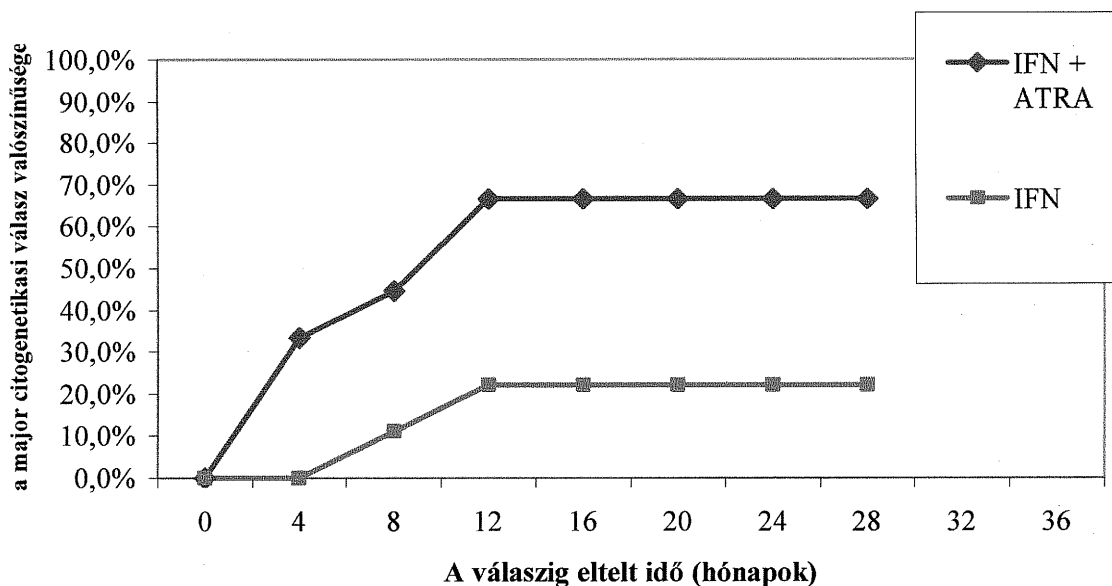
egyik legnagyobb beteganyagon a GUILHOT vezette francia CML munkacsoport próbálta ki.²⁵ A kétkarú randomizált tanulmányban a csak IFN kezelt csoportban 24%-os major citogenetikai választ észleltek, 9% teljes és 15% részleges, a kombinációt kapottak között 41%-os volt a major citogenetikai válasz, 15% teljes és 26% részleges.

Hasonló eredményről számolt be a BACCARANI vezette olasz CML munkacsoport³ is, akik az IFN csoportban 18%-os major citogenetikai választ (10% részleges és 8% teljes) az IFN+ara-C csoportban 28%-os major citogenetikai választ (14 részleges és 14% teljes) észleltek. Érdekes adat, hogy a válaszoknak csak fele jött létre az első évben és a harmadik évtől már újabb citogenetikai válasz nem volt észlelhető (14. ábra)³.

Az IFN csoportban saját eredményeink (15. ábra) hasonló képet mutatnak, de az IFN+ATRA csoportban jelentősen, csaknem négyszer magasabb a major citogenetikai válasz aránya, mint az idézett tanulmány IFN csoportjáé, és több mint kétszer magasabb az IFN+ara-C csoportnál.



14. ábra. A major citogenetikai válaszig eltelt idő



15. ábra. A major citogenetikai válaszig eltelt idő (9 beteg, 6 major citogenetikai válasz)

Jelentősnek gondoljuk továbbá a major citogenetikai válaszig eltelt időt is. Az olasz tanulmány esetében fokozatosan 24–30 hónapig nőtt a citogenetikai válaszolók aránya, és a 6. hónapban még szinte nem észleltek választ. Ez a saját IFN+ATRA csoportunkban már a 4. hónapban megindult és egy évig folytatódott. A változatlan dózisban tovább adott IFN mellett már nem alakult ki további genetikai válasz, így ez a tény is az ATRA hatását bizonyítja. Az a feltételezés, hogy ATRA és IFN szinergista módon hat, a beteg kis száma ellenére is bizonyíthatónak tűnik.

Látható, hogy az olyan kombinációhoz viszonyítva, melynek mindkét eleme a Ph+ klónon hat (IFN+ara-C), az általunk vizsgált IFN+ATRA kombináció előnyösebbnek látszik a major válasz elérésére.

CML kezelés során két dolgot nagyon fontos leszögeznünk:

1. A Ph hemopoetikus őssejtek egyre csökkenő arányban lesznek jelen a csontvelőben, illetve a keringő vérben a betegség előrehaladása során.
2. A Ph+ klón újabb mutációkat szenved, és egyre kevésbé befolyásolható, elnyomható az eddigi módszereinkkel.

Legjobb tudomásunk szerint ez az első olyan kombináció, amelynek a klonális vérképzés elnyomása mellett hangsúlyozottan a fő célkitűzése volt az egészséges őssejtekből való vérképzés visszaállítása.

Az ATRA Ph- (egészséges) őssejtre való kedvező hatására utalhat, hogy a vizsgált kombináció alkalmazása során több, mélyebb major citogenetikai válasz jött létre, és lényegesen rövidebb kezelési idő alatt, mint az eddig vizsgált kombinációk alkalmazásakor (ahol a kombináció egyik szerepe ugyanaz az IFN volt, mint esetünkben).

Láthatóan gyakrabban és gyorsabban következett be a válasz, mint az eddigi kombinációkkal, és mivel az ATRÁ-val in vitro nyert eredmények kevésbé a Ph+ klón elnyomására utalnak, a hatásban az egészséges őssejt proliferációs hátrányának a megszüntetése játszhat szerepet.

Az egyetlen klinikai tanulmány, ahol ATRÁ-t alkalmaztak a krónikus fázisú CML-es betegek kezelésére, a houston-i munkacsoporttól származik ⁴⁴; nagyon súlyos toxikus mellékhatásokról számol be, de nem kettős, hanem hármas (IFN+ara-C+ATRA) volt a kombináció. Az ismert nagy tanulmányok szinte mindegyikében az NCI 2 vagy nagyobb fokú toxicitás a tisztán IFN kezeltek közel 40%-ában, az IFN+ara-C csoportban 50–60%-ban fordult elő. A mi beteganyagunkban 2/11 esetben fordult elő 2. fokú toxicitás, így a kettős kombinációt kifejezetten előnyösnek gondoljuk a toxicitás szempontjából.

A CML talán a leginkább kutatott és molekuláris szinten megismert leukémia. 1996 óta ^{14, 15, 16, 48} a fúziós géntermék bcr-abl tirozin-kináz enzimét specifikusan

bénító terápiával, az imatinib mesylate-val (STI-571, Glivec) rendelkezünk. A szer a leukemogenezisért felelős enzim ATP kötő helyére kötődve blokkolja annak ligand független aktivitását. Mivel mai tudásunk szerint a CML létrejöttéért maga a bcr-abl fúziós génen képződött fehérje a felelős, így ennek blokkolása szinte oki terápiának tűnik, elsőként a daganatok történetében.

Nyilvánvalóan mindent felülmúló az érdeklődés az új gyógyszer iránt, az eredmények nagyrészt igazolják is a reményeket.³⁶ I. fázisú tanulmányokban^{14, 15}, krónikus fázisú CML-es betegek esetén 300 mg/nap dózis felett a betegek 98%-ban teljes hematológiai remissziót lehetett elérni 4 hét alatt, és 31%-ban major citogenetikai választ (13% teljes, 18% részleges)¹⁴. Blasztos fázisban 55–70% között lépett fel hematológiai remisszió és az 2–3 hónapig tartott¹⁵. 400 mg/nap vagy ezt meghaladó STI-571 dózis mellett IFN refrakter betegek 95%-a került hematológiai remisszióba és 60% major citogenetikai választ észleltek (41% teljes és 19% részleges).⁴⁸

Újabb tanulmányok frissen diagnosztizált CML-es betegeken igen magas és dóziszfüggő citogenetikai választ észleltek³⁰. Akcelerált⁴⁶ és blasztos fázisban²⁶ is hatékonynak találták az STI-571-et. III. fázisú tanulmány több mint 1000 betegén 63%-ban észleltek major citogenetikai választ.¹³

Fenti eredmények alapján ma az STI-571 a CML kezelésében a leginkább hatékony szernek tűnik. Az irodalmi adatokból azonban nyilvánvaló, hogy a betegség progressziója során egyre nagyobb arányban kell számolni STI-571 rezisztenciával. A rezisztencia priméren fennállhat (nonresponder) vagy a kezelés során alakulhat ki (szekunder vagy szerzett rezisztencia).

A késői krónikus fázisban a betegek 10%-a hematológiailag és közel 50%-a citogenetikailag nonresponder. Az akcelerált fázisban 18%, a blasztos fázisban közel 50% a hematológiai nonresponderek aránya.⁴⁸

A primér rezisztencia esetén a bcr-abl nem bénítható, más mechanizmus lehet felelős a progresszióért.¹⁵ A szerzett rezisztencia esetén a génamplifikáció, vagy csak a szoliter bcr-abl fokozott expressziója^{33, 53}, (multidrug-resistance) fokozott

expressziója ³⁴, vagy a bcr-abl fúziós géntermék intracelluláris megváltozott lokalizációja ⁵², vagy bcr-abl független jelátvivő rendszer általi progresszió ¹¹ lehet felelős a hatástalanságért.

Ezen irodalmi adatok azt bizonyítják, hogy a specifikusnak tekinthető target molekulát blokkoló terápia mellett is egyre nagyobb arányban találunk olyan betegeket, akiknek kezelése nem megoldott. Számukra egyéb szerekekkel való kombináció ^{40, 46, 47} az egyik lehetséges megoldás, vagy eddig még nem alkalmazott kombinációk.

A kisszámú betegünkön észlelt magas citogenetikai válasz és enyhe mellékhatások miatt a jövőben talán ezen betegek részére lenne érdemes alkalmazni az általunk vizsgált IFN+ATRA kombinációt.

6. Irodalom

1. AGLIETTA M, PIACIBELLO W, STACCHINI A, SANANVIO F, GAVOSTO F (1985) In-vitro effect of retinoic acid on normal and chronic myeloid leukemia granulopoiesis. *Leukemia Res.* 9: 878–883.
2. ALLAN N, RICHARDS S, SHEPHERD P (1995) UK-Medical Research Council randomized, multicenter trial of interferon-alfa-n1 for chronic myeloid leukemia:improved survival irrespective of cytogenetic response. *Lancet.* 345: 1392–1397.
3. BACCARANI M, ROSTI G, DE VIVO A, BONIFAZI F, RUSSO D, MARTINELLI G, TESTONI N, AMABILE M, FIACCHINI M, MONTEFUSCO E, SAGLIO G, TURA S (2002) A randomized study of interferon-alpha versus interferon-alpha and low-dose arabinosyl cytosine in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 99: 1527–1535.
4. BIGGS J, SZER J, CRILLEY P, ATKINSON K, DOWNS K, DODDS A, CONCANNON AJ, AVALOS B, TUTSCHKA P, KAPOOR N (1992) Treatment of chronic myeloid leukemia with allogeneic bone marrow transplantation after preparation with BUCy2. *Blood.* 82: 1352–1357.
5. BOLLAG W (1972) Prophylaxis of chemically induced benign and malignant epithelial tumors by Vitamin A acid (retinoic acid). *Eur J Cancer.* 8: 689–693.
6. BOLLAG W, HOLDENER EE (1992) Retinoids in cancer prevention and therapy, a review. *Ann Oncol.* 3: 513–526.

7. BONIFAZI F, DE VIVO A, ROSTI G, GUILHOT F, GUILHOT J, TRABACCHI E, HEHLMANN R, HOCHHAUS A, SHEPHERD PC, STEEGMANN JL, KLUIN-NELEMANS HC, THALER J, SIMONSSON B, LOUWAGIE A, REIFFERS J, MAHON FX, MONTEFUSCO E, ALIMENA G, HASFORD J, RICHARDS S, SAGLIO G, TESTONI N, MARTINELLI G, TURA S, BACCARANI M (2001) Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. *Blood*. 98: 3074–3081.
8. BRAND N, PETKOVICH M, KRUST A, CHAMBON P, DE THE H, MARCHIO A, TIOLLAIS P, DEJEAN A (1988) Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature*. 332: 850–853.
9. CLIFT RA, APPELBAUM F, THOMAS ED (1994) Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 83: 2752–2754.
10. CLIFT RA, BUCKNER CD, THOMAS ED, BENSINGER WI, BOWDEN R, BRYANT E, DEEG HJ, DONEY KC, FISHER LD, HANSEN JA (1994) Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: A randomized study comparing cyclophosphamide and total body irradiation with busulfan and cyclophosphamide. *Blood*. 84: 2036–2043.
11. DONATO N, WU J, ALBITAR M, ARLINGHAUS R, KANTARJIAN H, TALPAZ M (2001) Multiple resistance mechanisms identified through studies of cell lines derived from chronic myelogenous leukemia patients progressing on STI-571 therapy. *Blood* 99: 3206.
12. DOUER D, KOEFFLER P (1982) Retinoic acid enhances colony stimulating factor induced growth of normal human myeloid progenitor cells in vitro. *Exp Cell Res*. 138: 193–198.

13. DRUKER BJ, SAWYERS CL, HOCHHAUS A, SCHIFFER CA, TALPAZ M, GUILHOT F (2002) STI-571 (Gleevac/Glivec, imatinib) versus interferon (IFN) + cytarabine as initial therapy for patients with CML: results of a randomized study. *Blood*. 100(Suppl.): 163a.
14. DRUKER BJ, SAWYERS CL, CAPDEVILLE R, FORD JM, BACCARANI M, GOLDMAN JM (2001) Chronic myelogenous leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Book)*. 1: 87-112.
15. DRUKER BJ, TALPAZ M, RESTA DJ, PENG B, BUCHDUNGER E, FORD JM, LYDON NB, KANTARJIAN H, CAPDEVILLE R, OHNO-JONES S, SAWYERS CL (2001) Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 344: 1031–1037.
16. DRUKER BJ, TAMURA S, BUCHDUNGER E, OHNO S, SEGAL GM, FANNING S, ZIMMERMANN J, LYDON NB (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 2: 561–566.
17. EGYED M, MIHÁLYFALVI Z, KOLLÁR B, RUMI GY, KELLER É, VASS J, FEKETE S (2001) Retinsav hatása a citogenetikai remisszióra krónikus myeloid leukemia interferonnal kezelt első krónikus fázisában. *Orv Hetil*. 142: 2421–2425.
18. EGYED M, KOLLÁR B, RUMI GY, KELLER É, VASS J, FEKETE S (2003) Effect of retinoic acid treatment on cytogenetic remission of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematolog*. 324(109).
19. FENAUX P, ROBERT MC, CASTAIGNE S, ARCHIMBAUD E, CHOMIENNE C, LINK H, GUERCI A, BOWEN D et al (1993) A multicenter trial comparing

- all-trans retinoic acid plus chemotherapy (ATRA+CT) and CT alone in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL). *Proc Am Soc Clin Oncol.* 12: 300–308.
20. FU XY, KESSLER DS, VEALS SA, LEVY DE, DARNELL JE JR (1990) ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 8555–8559.
 21. GALLAGHER R, AHEARN G, THOMPSON D, STRACK M, PAIETTA E, DUTCHER J, WIERNIK P (1990) Retinoic Acid enhanced neutrophilic differentiation of granulocyte macrophage progenitors in blastic crisis chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 76: 272a.
 22. GOLDMAN J, SZYDLO R, HOROWITZ M, GALE RP, ASH RC, ATKINSON K, DICKE KA, GLUCKMAN E, HERZIG RH, MARMONT A (1993) Choice of pretransplant treatment and timing of transplants for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Blood.* 82: 2235–2238.
 23. GONGORA C, MECHTI N (1999) [Interferon signaling pathways] *Bull Cancer.* 86: 911–919.
 24. GRATWOHL A, HERMANS J, NIEDERWIESER D (1993) Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: Long-term results. *Bone Marrow Transplant.* 12: 509–516.
 25. GUILHOT F, CHASTANG C, MICHALETT M, GUERCI A, HAROUSSEAU JL, MALOISEL F, BOUABDALLAH R, GUYOTAT D, CHERON N, NICOLINI F, ABGRALL JF, TANZER J (1995) Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. *N Eng J Med.* 337: 223–229.

26. GUTCH MJ, DALY C, REICH NC (1992) Tyrosine phosphorylation is required for activation of an alpha interferon-stimulated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89: 11411–11415.
27. HEHLMANN R, HEIMPEL H, HASFORD J, KOLB HJ, PRALLE H, HOSSFELD DK, QUISSER W, LÖFFLER H, HOCHHAUS A, HEINZE B (1984) Randomized comparison of interferon-alfa with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 84: 4064–4077.
28. KANTARJIAN HM, CORTES JE, O'BRIEN S, GILES F, GARCIA-MANERO G, FADERL S, THOMAS D, JEHA S, RIOS MB, LETVAK L, BOCHINSKI K, ARLINGHAUS R, TALPAZ M (2002) Imatinib mesylate therapy in newly-diagnosed patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia: high incidence of early complete and major cytogenetic responses. *Blood*. 99: 3547–3553.
29. KANTARJIAN HM, DEISSEROTH A, KURZROCK R, ESTROV Z, TALPAZ M (1993) Review. Chronic myelogenous leukemia: A concise update. *Blood*. 82: 691–703.
30. KANTARJIAN HM, JORGE C, O'BRIEN S, GILES F, THOMAS D, FADERL S, GARCIA-MANERO G, RIOS MB, LETVAK L, BOCHINSKI K, SHAN J, TALPAZ M (2002) High rates of early major and complete cytogenetic responses with imatinib mesylate therapy given at 400 mg or 800 mg orally daily in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Blood*. 100(Suppl.): 95a.
31. KANTARJIAN HM, KEATING M, ESTEY EO, O'BRIEN S, PIERCE S, BERAN M, KOLLER C, FELDMAN E, TALPAZ M (1992) Treatment of advanced stages

-
- of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia with interferon-alfa and low dose cytarabine. *J Clin Oncol.* 10: 772–778.
32. KANTARJIAN HM, SMITH TO, BRIEN S, BERAN M, PIERCE S, TALPAZ M (1995) Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia following cytogenetic response to alpha interferon therapy. *Ann Intern Med.* 122: 254–261.
33. LE COUTRE P, TASSI E, VARELLA-GARCIA M, BARNI R, MOLOGNI L, CABRITA G, MARCHESI E, SUPINO R, GAMBACORTI-PASSERINI C (2000) Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI-571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood.* 95: 1758–1766.
34. MAHON FX, DEININGER MW, SCHULTHEIS B, CHABROL J, REIFFERS J, GOLDMAN JM, MELO JV (2000) Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI-571: diverse mechanisms of resistance. *Blood.* 96: 1070–1079.
35. MANGELSDORF DJ, ONG ES, DYCK JA, EVANS RM (1990) Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature.* 345: 224–229.
36. MOLNÁR L, LOSONCZY H (2002) Új lehetőség a krónikus myeloid leukaemia kezelésében: specifikus tirzinkináz-inhibitor (STI-571). *Orv Hetil.* 143: 2379–2384.
37. MUUS P, EGYED M, BEKSAC M, LABAR B, INDRAK K, DARDENNE M, SUCIU S, CEVRESKA L, WILLEMZE R, STRYCKMANS P (1999) All-trans retinoic acid (ATRA) in addition to r-interferon alpha in CML in first

- chronic phase, a feasibility study by the EORTC-LCG. *Blood*. 94(Suppl.): 1673.
38. PARKINSON DR, SMITH MA (1992) Retinoid Therapy for acute promyelocytic leukemia: A coming of age for the differentiation therapy of malignancy. *Ann Int Med*. 117: 338–339.
 39. PETKOVICH M, BRAND NJ, KRUST A, CHAMBON P (1987) A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature*. 330: 444–450.
 40. POROSNICU M, NIMMANAPALLI R, NGUYEN D, WORTHINGTON E, PERKINS C, BHALLA KN (2001) Co-treatment with As₂O₃ enhances selective cytotoxic effects of STI-571 against Bcr-Abl-positive acute leukemia cells. *Leukemia*. 15: 772–778.
 41. SACCHI S, KANTARJIAN HM, FREIREICH EJ, O'BRIEN S, CORTES J, RIOS MB, KORNBLAU S, GILES FJ, KOLLER C, GAJEWSKI J, TALPAZ M (1998) Excessive toxicity with the combination of alpha interferon (IFN alpha), low-dose cytosine arabinoside (LD-ara-C) and all trans retinoic acid (ATRA) in patients with chronic myelogenous leukemia (CML). *Blood*. 92(Suppl.): 4067.
 42. SCHINDLER C, SHUAI K, PREZIOSO VR, DARNELL JE Jr (1992) Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science*. 257: 809–813.
 43. SOKAL JE., BACCARANI M, RUSSO D, TURA S (1988) Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia. *Sem Hematol*. 25: 49–61.

-
44. TALPAZ M, KANTARJIAN HM, KURZROCK R, TRUJILLO JM (1991) Interferon alpha produces sustained cytogenetic responses in Philadelphia positive chronic myelogenous leukemia. *Ann Intern Med.* 114: 532–538.
 45. TALPAZ M, KANTARJIAN HM, MCCREDIE K, TRUJILLO JM, KEATING MJ, GUTTERMAN JU (1986) Hematologic remission and cytogenetic improvement induced by recombinant human interferon alpha A in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med.* 314: 1065–1069.
 46. TALPAZ M, SILVER RT, DRUKER BJ, GOLDMAN JM, GAMBACORTI-PASSERINI C, GUILHOT F, SCHIFFER CA, FISCHER T, DEININGER MW, LENNARD AL, HOCHHAUS A, OTTMANN OG, GRATWOHL A, BACCARANI M, STONE R, TURA S, MAHON FX, FERNANDES-REESE S, GATHMANN I, CAPDEVILLE R, KANTARJIAN HM, SAWYERS CL (2002) Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood.* 99: 1928–1937.
 47. TOPALY J, ZELLER WJ, FRUEHAUF S (2002) Combination therapy with imatinib mesylate (STI-571): synopsis of in vitro studies. *Br J Haematol.* 119: 3–14.
 48. TSAO AS, KANTARJIAN H, TALPAZ M (2002) STI-571 in chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 119: 15–24.
 49. TZOANOPOULOS D, SPELETAS M, ARVANITIDIS K, VEIOPOULOU C, KYRIAKI S, THYPHRONITIS G, SIDERAS P, KARTALIS G, RITIS K (2002) Low expression of interferon regulatory factor-1 and identification of novel exons skipping in patients with chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 119: 46–53.

-
50. TURA S, BACCARANI M, ZUFFA E & The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia (1994) Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 330: 820–825.
 51. VASS JA, KERESKAI L, PAJOR L (2000) Krónikus myeloid leukemia komplex molekuláris monitorizálása. *Orv Hetil.* 42: 2279–2285.
 52. VEALS SA, KESSLER DS, JOSIAH S, LEONARD DG, LEVY DE (1991) Signal transduction pathway activating interferon-alpha-stimulated gene expression. *Br J Haematol.* 79(Suppl. 1.): 9–13.
 53. VIGNERI P, WANG JY (2001) Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat Med.* 7: 228–234.
 54. WEISBERG E, GRIFFIN JD (2000) Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI-571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines. *Blood.* 95: 3498–3505.

7. Rövidítések

APL	Akut promielocitás leukémia
ara-C	citozin arabinozid
ATRA	<i>All-trans-retinoic acid</i>
bcr-abl	<i>break point cluster region</i> – <i>abelson leukemia gen</i>
CML	Krónikus mieloid leukémia
CoCR	Komplett (teljes) citogenetikai válasz
EORTC	<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridisatio</i>
IFN	Interferon
IRF	<i>IFN regulatory factor</i>
ISGF-3	<i>IFN stimulated gene factor-3</i>
ISRE	<i>IFN stimulated response element</i>
ME	millió egység
MiCR	Minor citogenetikai válasz
NCI-CTC	<i>National Cancer Institution – Common Toxicity Criteria</i>
NR	Nonresponder
PaCR	Parciális (részleges) citogenetikai válasz
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Ph	Philadelphia kromoszóma
RAR	<i>Retinoic acid receptor</i>
RARE	<i>Retinoic-acid-responsive element</i>
RXR	<i>Retinoic X receptor</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STI	<i>Signal transduction inhibitor</i>
WHO-ECOG	<i>World Health Organization – Eastern Cooperative Oncology Group</i>

8. A PhD dolgozat alapjául szolgáló közlemények, absztraktok és előadások

Közlemények

EGYED M, NYÁRÁDI A, BOROS B, VISKI A, KELE M, PUSKÁS A, KOCSIS T, HORVÁTH GY (1998) **Hepatocellularis carcinoma eredményes All-transz-retinsav kezelése.** *Orv Hetil.* 139(14):

EGYED M, ABDUL-ALIM M, KELE M, VISKI A, HORVÁTH GY (1998) **Case report: successful treatment of hepatocellular carcinoma with All-trans-retinoic acid (ATRA).** *Med J Cairo Univ.* 66: 461–462.

EGYED M, ABDUL-ALIM M (1998) **Case report: lymphoid and myeloid malignancies in a patient who lost p53.** *Med J Cairo Univ.* 66: 463–464.

EGYED M, ABDUL-ALIM M, BOROS B, KAPÁS B (1998) **Treatment of acute promyelocytic leukemia with AIDA protocol (All-trans-retinoic acid, Idarubicin).** *Med J Cairo Univ.* 66: 385–389.

EGYED M, RUMI GY, BOROS B, PÁLDI-HARIS P, FÖLDI J (2000) **Interferon may reduce minimal residual disease of acute promyelocytic leukemia.** *Leukemia.* 14: 1153.

PAJOR L, VASS JA, KERESKAI L, KAJTÁR P, SZOMOR Á, EGYED M, IVÁNYI J, JÁKSÓ P (2000) **The existence of lymphoid lineage restricted Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia with heterogeneous bcr-abl re arrangement.** *Leukemia.* 14: 1122–1126.

MATOLCSY A, BORBÉNYI Z, DEMETER J, EGYED M, FEKETE S, FÖLDI J, GERGELY L, KAJTÁR P, KELÉNYI G, KISS A, LÁSZLÓ T, LEHOCZKY D, LOSONCZY H, NAGY M, PÁL K, PALÓCZY K, RADVÁNYI G, SEMSEI, VARGA GY, UDVARDY M (2000) **A minimális reziduális betegség kimutatása B-sejtes tumorok esetében az immunglobulin nehézlánc génre specifikus polimeráz láncreakció segítségével.** *Orv Hetil.* 141: 1403–1406.

EGYED M, MIHÁLYFALVI Z, KOLLÁR B, RUMI GY, KELLER É, VASS J, FEKETE S (2001) **Retinsav hatása a citogenetikai remisszióra krónikus myeloid leukemia interferonnal kezelt első krónikus fázisában.** *Orv Hetil.* 142: 2421–2425.

EGYED M, KOLLÁR B, RUMI GY, KELLER É, VASS J, FEKETE S (2003) **Effect of retinoic acid treatment on cytogenetic remission of chronic myeloid leukemia.** *Acta Haematol.* 324: (accepted for publication).

Absztraktok

EGYED M (1997) **Successful treatment of hepatocellular carcinoma with all-trans-retinoic-acid (ATRA).** *Onkologie. 20(Suppl. 1):*

EGYED M, KOLLÁR B, BOROS B, RUMI GY, FÖLDI J (1998) **Can interferon cause molecular remission in genetically relapsed acut promyelocytic leukemic patient.** *Ann Hematology. 77(Suppl. 2.):*

EGYED M, RUMI GY, KOLLÁR B, FEKETE S (1999) **Myelodysplastic syndrome /RARS/ with dysplastic marrow eosinophilia and del (16q).** *Leukemia Res. 23(Suppl.).*

EGYED M, RUMI G, VISKI A, PUSKÁS A, HORVÁTH G (1999) **Treatment of hepatocellular carcinoma with all-trans-retinoic-acid (ATRA).** *Eur J Int Med. (Suppl.)*

EGYED M, RUMI G, PUSKÁS A, HORVÁTH G, VISKI A (1999) **All-trans-retinoic-acid, a possible agent in the treatment of hepatocellular carcinoma.** *Clinical Cancer Research. (Suppl.)*

MUSS P, EGYED M, BEKSAC M, LABAR B, INDRÁK K, DARDENE M, SUCIU S, CEVRESKA L, WILLEMZE R, STRYCKMANS P (1999) **All-trans retinoic acid (ATRA) in addition to r-interferon alpha first chronic phase, a feasibility study by the EORTC-LCG.** *Blood. 94(Suppl.): 1673.*

JAKSIC B, BRUGIATELLI M, SUCIU S, BEAUMELOU E, WIJERMANS PW, DELMER A, ROOZENDAAL KJ, TEIXEIRA A, JEHN U, FEREMANS W, BELHABRI A, EGYED M, VENDITI A, INDRAK K, CEVRESKA L, RODTS P, SOLBU G, WILLEMZE R, DE WITTE TM & For EORTC Leukemia Group Dept. of Medicine, University Hospital „Merkur” Zagreb Croatia (2000) **Fludarabine vs. high dose chlorambucil in advanced B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): results of EORTC phase-II randomized trial after 4 years of median follow-up.** *Blood.* 96: 758a.

SZOMOR Á, MOLNÁR L, IVÁNYI J, RADVÁNYI G, NAGY Zs, KARÁDI Á, GERGELY L, BÁNYAI A, DEMETER J, ARYAN H, GASZTONYI Z, KISS A, KOLLÁR B, EGYED M, LOSONCZY H, KELÉNYI G, PAJOR L (2001) **Extranodal involvement in primary systemic anaplastic large cell lymphoma (ALCL) in adults.** *Ann Hemat.* 80(Suppl. 3.): B144.