

***Nemzeti Onkológiai Kutatás-Fejlesztési Konzorcium
a daganatos halálozás csökkentésére***

1/48/2001

3. Részjelentés: 2003. November 30.-2004. december 31.

RP.6. Gyermekonkológiai kutatások

Dr. Oláh Éva

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi
Centrum, Gyermek-klinika

RP.6. Gyermekonkológiai kutatás-fejlesztések a leggyakoribb daganatfélések területén

Témavezető: dr. Oláh Éva, DE, OEC, Gyermekgyógyászati klinika

Részvevők: dr. Kiss Csongor, DE, OEC, dr. Rásó Erzsébet, Országos Onkológiai Intézet

A./ A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia molekuláris biológiai ismereteinek felhasználása a hatékonyabb diagnosztikában és új innovatív terápia kialakításában

- 1./ ALL-es betegek epidemiológiai vizsgálata környezeti és genetikai faktorok vonatkozásában
- 2./ ALL-BFM2000 új terápiás protoll bevezetése
- 3./ Új innovatív terápiás eljárások kidolgozása ALL esetében
- 4./ A WT1 gén splice variánsai expressziójának meghatározása ALL-ben
- 5./ Különböző rizikócsoportha tartozó ALL WT1 expressziós mintázatának meghatározása
- 6./ Új diagnosztikumok előállítás az ALL staging elősegítésére (génpróbák és monoklonális antitestek)

B./ A gyermekkori neuroblasztoma szűrővizsgálata

C./ Humán papilloma vírus (HPV) lehetséges szerepének vizsgálata gyermekkori daganatok kialakulásában

1. HPV jelenlétének vizsgálata gyermekkori Wilms tumorban
2. HPV jelenlétének vizsgálata gyermekkori Acut Lymphoblastos Leukemiában

A. Alprojekt: A./ A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia molekuláris biológiai ismereteinek felhasználása a hatékonyabb diagnosztikában és új innovatív terápia kialakításában

ÖSSZEFOGLALÁS

A gyermekkori akut lymphoid leukaemia kezelési eredményeinek jelentős javulása ellenére a gyermekek mintegy 25-30%-át a terápiával szembeni rezisztencia, vagy a kezelés korai mellékhatásai (csontvelői aplasia okozta infekciók, vérzések) miatt veszítjük el. A terápiás eredmények további javítása egy differenciált, individuálisan megválasztott kezeléstől várható. A differenciált kezelés alapjául a betegek prognosztikai csoportosítása szolgál, amelynek egyik eszköze a blast sejtek genetikai jellemzése.

1993-ban egy országos programot indítottunk a hazai gyermekonkológiai osztályok részvételével azzal a céllal, hogy minden hazánkban újonnan diagnosztizált ALL-es gyermek kezdeti genetikai vizsgálata megtörténjen. A vizsgálat módszerei: klasszikus citogenetika FISH kiegészítéssel, DNS index meghatározás és a specifikus transzlokációk identifikálására szolgáló RT-PCR. A program kezdeményezőiként az évenkénti eredményeket, majd az első 10 esztendő tapasztalatait (1993-2002) magunk összegeztük. Az azóta eltelt két esztendőben a program folytatódik, a kezdeti genetikai vizsgálat a diagnosztika szerves részévé vált. Az eltérő genetikai alcsoportok prognózisa szignifikánsan különbözik.

A genetikailag eltérő alcsoportok prognosztikai különbségét eltérő terápia érzékenységük magyarázza. In vitro gyógyszerérzékenységi/gyógyszerrezisztencia vizsgálatokkal a várhatóan legjobb terápiás eredményhez vezető cytostaticum kombináció megválasztható.

A betegek ellátásában, a remisszió igazolásában és a relapszus korai felismerésében döntő jelentőségű a minimális reziduális betegség kimutatása. Erre a tumor-specifikus kromoszóma transzlokációk, valamint immunglobulin és T-sejt receptor átrendeződések molekuláris genetikai vizsgálata nyújt lehetőséget.

Munkánk során az alábbi kérdéseket tanulmányoztuk:

1. Klinikai vizsgálatok (Kiss Csongor, Bárdi Edit, Szegedi István, Oláh Éva)
2. A korábbi években bevezetett genetikai vizsgálatok folytatása a gyermekkori ALL kezdeti genetikai eltéréseinek kimutatására és a betegek prognosztikai csoportosítása. A 2004-es évben elsősorban a FISH vizsgálatok és a TEL/AML meghatározásra szolgáló RT-PCR módszer kiterjesztésére törekedtünk. (Balogh Erzsébet, Kiss Csongor, Bessenyei Beáta, Újfalusi Anikó, Oláh Éva) :
A csoportosítás alapjául szolgáló vizsgálatok:
 - Kariotipizálás
 - DNS index meghatározás (ploiditás vizsgálat)
 - FISH módszer a számszeletti kromoszómák és transzlokációk (TEL/AML1, ABL/BCR, MLL) azonosítására
 - t(12;21) (= TEL/AML1 átrendeződés) vizsgálata RT-PCR módszerrel.
3. Minimális reziduális betegség kimutatására szolgáló PCR módszer beállítása és alkalmazása (Scholtz Beáta, B. Julia, Kiss Csongor, Szegedi István, Oláh Éva)
4. In vitro gyógyszerrezisztencia vizsgálatok MTT teszt segítségével (Márkász László, Hajas György, Rajnavölgyi Éva, Oláh Éva)
 - ALL-es betegekben
 - KG1 myeloid sejtvonalon
5. Cytokinek (PHA-LCM, rhSCF, G-CSF, GM-CSF és IFN-alpha) hatásának vizsgálata sejtkultúrákban (Szegedi István, Kiss Csongor)

ad 1. Klinikai vizsgálatok

De novo leukaemiás betegek vizsgálata az utolsó évben

2003. november és 2004. 12. 30 között 10 de novo leukémiás és myelodysplasiás gyermeket diagnosztizáltunk. A csontvelői és perifériás őssejtek morfológiáját May-Grünwald Giemsa szerint festett keneteken, immunfenotípusát 3 paraméteres áramlási citometriás módszerrel, DNS indexét ugyancsak áramlási citometriás módszerrel vizsgáltuk. PCR analízissel vizsgáltuk az IgH immunglobulin gén és a TCR γ T-sejt receptor gén átrendeződést. A sejtek citogenetikai vizsgálata, in vitro gyógyszer rezisztencia vizsgálata, valamint a t(12;21) transzlokáció kimutatása RT-PCR módszerrel a klinika genetikai laboratóriumában történt (ld. 2.pont). Hat ALL-es, 3 AML-es és egy myelodysplasiás betegünk volt.

Publikáció:

Jakab Z, Szegedi I, Balogh E, **Kiss C, Oláh E**: Duchenne muscular dystrophy-rhabdomyosarcoma, ichthyosis vulgaris-acute monoblastic leukemia: association of rare genetic disorders and childhood malignant diseases. Med Pediatr Oncol, 2002, 39, 66-68. (IF: 1.216)

A gyermekkori leukémiás és tumoros betegségek kezelése következtében létrejövő nephrotoxicus szövődmények vizsgálata

Az elmúlt évtizedek során az agresszív, kombinált kemoterápiás kezelés bevezetését követően a gyermekkori malignitások túlélési mutatói javultak. Egyre nagyobb figyelmet fordítunk a betegek életminőségét rontó akut és késői mellékhatásokra.

Saját vizsgálataink a nephrotoxicus szövődmények tanulmányozására irányultak. Vizsgálataink során a haematológiai osztályon jelenleg kezelt ill. a szakrendelőben ellenőrzött tartósan tumormentes, gyógyult gyerekek vesefunkciós ellenőrzését végeztük el.

A glomeruláris funkciót Counahan képlete alapján számított GFR, Histodil adással módosított kreatinin clearance ill. cystatin C (cysC) mérésével monitoroztuk. A proximális tubuláris funkciót NAG-áz ill. mikroalbumin ürítéssel vizsgáltuk, míg a disztális tubuláris funkciót szérumszint és vizelet ozmolaritás mérésével és elektrolit ürítéssel határoztuk meg. Továbbá meghatároztuk a gyermekek ACE receptor gén polimorfizmusát.

A pályázati periódus utolsó évében korábbi vizsgálataink eredményeinek értékelését végeztük. Vizsgálataink során a cystatin C és kreatinin koncentrációkat 1466 szérumszint és vizelet mintában határoztuk meg. A minták 258 gyermektől származtak, 92 jelenleg kezelés alatt álló betegtől, 108 tartós túlélőtől, 40 egészséges kontroll gyermektől (negatív kontroll) és 18 krónikus vesebeteg gyermektől (pozitív kontroll).

A citosztatikus kezelés alatt álló betegek CysC-je 1.13 ± 0.54 mg/L a negatív kontrolloké 0.95 ± 0.19 mg/L és a pozitív kontrolloké 4.69 ± 2.19 mg/L értéket adott. A pozitív kontrollok cystatin C értéke szignifikánsan különbözött mind a betegek, mind a negatív kontrollok cystatin C értékétől. A lineáris regressziós analízis során szignifikáns korrelációt sikerült kimutatni a cysC és a S_{cr} ($r = 0.850$, $p < 0.001$) között. A pozitív kontrollok közül 10 betegnél magas CysC értéket találtunk relatíve alacsony szérumszint kreatinin érték mellett, amelyet a kreatinin tubuláris szekréciója magyaráz és rávilágít arra tényre, hogy a cysC a krónikus vesebeteg esetében is alkalmasabb a GFR megítélése, mint a szérumszint kreatinin. Az $1/cysC$ és C_{Cr} közötti korreláció ill. az $1/cysC$ and $C_{Counahan}$ közötti korreláció gyengébb volt ugyan mint a cysC és a S_{cr} , közötti, ám mégis szignifikáns ($r = 0.178$, $p = 0.003$ and $r = 0.306$, $p < 0.001$). Saját eredményeink és az irodalmi adatok szerint a CysC egyszerűen kivitelezhető eljárás, amely felválthatja egyrészt a sugárterheléssel járó izotópos, másrészt a bonyolult és a gyakorlatban nehezen kivitelezhető inulin clearancet illetően a vizeletgyűjtés és a tubuláris szekréció által előidézett pontatlansággal terhelt kreatinin szint meghatározáson alapuló módszereket.

Párosított T próba segítségével összehasonlítottuk a kezelés alatt álló betegek kezelés előtti és utáni cystatin C értékeit és azt tapasztaltuk, hogy szignifikáns különbség volt kimutatható a ciklo-, ifoszfamid, methotrexat és ciszplatin kezelés során kapott értékek között.

Eredményeinket nemzetközi folyóiratban publikáltuk.

Publikáció:

Bárdi E, Bobok I, Oláh VA, Oláh É, Kappelmayer J, Kiss C: Cystatin C is a suitable marker of glomerular function in children with cancer. *Pediatr Nephrol* 19:1145-1147, 2004. (IF: 1,219)

A *késői túlélők* között a cystatin C csak a Wilms tumoros betegekben volt megemelkedett, főként az intenzív, nefrotoxikus szereket is tartalmazó kezelésben részesülő magas rizikójú betegekben.

Emelkedett mikroalbuminuriát (átlag: 37.3mg/l) és β -Nagase aktivitást (átlag: 230%) a betegek 26%-ban találtunk. Jelentős különbség mutatkozott az egyes betegcsoportok között. A leukémia/limfóma túlélők esetében 37.5%-ban találtunk emelkedett β -Nagase (195%) és 18% emelkedett mikroalbumin értéket (48.1%). A Wilms tumoros betegek között 21%-ban találtunk emelkedett β -Nagase (360%) és 5%-ban emelkedett mikroalbumin értéket (27mg/l). Az egyéb szolid tumoros betegeknél 54%-ban találtunk emelkedett β -Nagase (260%) és 25%-ban

emelkedett mikroalbumin értékeket (25.8%). Ez utóbbi csoport kezelési protokolljai platina származékot is tartalmaztak és nagyobb kumulatív dózisban kaptak egyéb vesekárosító citosztatikumokat. A disztális tubulus funkció tekintetében nem találtunk jelentős késői károsodásra utaló leletet.

Harminc beteg volt proteinuriás, amely 20 betegnél teljesen megszűnt a megfigyelési időszak alatt. A 10 perzisztáló proteinuriás beteg vizeletet elektroforézis vizsgálata során 5 betegnél glomeruláris, 5 betegnél kevert típusú proteinuriát mutattunk ki. A glomerularis proteinuria 1 esetben volt szelektív és 9 esetben non-szelektív, értéke 214 - 907 mg/24h (átlag: 455 mg/24h). A 36 hónapos követési idő alatt a proteinuria spontán javult 7 esetben és progrediált 3 esetben. Ez utóbbi 3 beteget ACE gátló kezelésben részesítettük. 12 hónapos kezelést követően az enalapril kezelésben részesülő betegek vizelete szinte teljesen negatívvá vált. Az ACE gén polimorfizmus proteinuriát befolyásoló hatásait vélhetően a csekély esetszám miatt nem tudtuk igazolni.

Eredményeinket nemzetközi folyóiratban publikáltuk.

Publikáció:

Bárdi E, Oláh VA, Bartyik K, Endreffy E, Jenei C, Kappelmayer J, **Kiss C**: Late effects on renal glomerular and tubular function in childhood cancer survivors. *Pediatr Blood Cancer* 43: 668-673, 2004. (IF: 1,737)

Váratlan kapcsolatot találtunk az ACE gén polimorfizmusában a lázas neutropénia esetén jelentkező szепtikus shock incidenciája és kórlefolyása tekintetében. A vizsgálat során 164 leukémiás, lymphomás valamint szolid tumoros gyermek (95 fiú, 69 lány, életkor: 0.5-24.0 év, átlag: 10.9 év) és 144 kontroll (82 fiú, 52 lány, életkor: 0.5-26.0 év, átlag: 8.3 év) ACE genotípusát és kórlefolyását tanulmányoztuk. A súlyos keringési elégtelenséget magas pulzusszám és csökkent vérnyomás jelezte. Shock indexet számoltunk: a szívfrekvencia és a szisztolés vérnyomás hányadosából és az 1 feletti értéket tekintettük kórosnak. Mindezekon túl fizikális vizsgálatot, vérkép, vérsajt-süllyedés, CRP, és Astrup vizsgálatokat végeztünk valamint regisztráltuk az intenzív osztályon eltöltött napok számát. A 164 közül 158 betegben lépett fel lázas neutropéniás epizód. Ötven betegnél figyeltük meg a kezdődő keringési elégtelenség tüneteit és 23 betegnél (13 fiú, 10 lány, életkor 0.5-16.0 év, átlag: 6.3 év) alakult ki súlyos, intenzív osztályos kezelést igénylő septikus shock. Minden beteg lázas, neutropéniás, tachycardiás, hypotensiós volt és a shock indexe >1 volt az intenzív osztályos felvétel idején. CRP és Westergreen értékük magas volt. Empirikus anti-infektív kezelés, volumen és pozitív inotrop terápia mellett 10 beteg légzéstartogatást igényelt 1-4 napig. A betegek 1-18 napig tartózkodtak az intenzív osztályon. 20 beteg meggyógyult, 3 beteg septikus shockban meghalt. A 164 beteg D (53 % vs. 60 %) és I (47 % vs. 40 %) allél megoszlása és a DD (36 % vs. 36 %), ID (47 % vs. 49 %) and II (17 % vs. 15%) genotípus gyakorisága nem különbözött a kontrollokétól és a kaukázusi populációtól. A DD genotípusú betegekben a szепtikus shock és a következményes intenzív osztályos elhelyezés szignifikánsan gyakoribb volt, mint az ID vagy I/I genotípusú betegekben. A D alléllal rendelkező betegek szignifikánsan hosszabb időt töltöttek intenzív osztályon (7 nap), mint az I alléllal rendelkező betegek (4 nap) Halálos kimenetelt csak a DD genotípusú betegben figyeltünk meg.

2004	Citogenetika	DNS	FISH	TEL/AML1 (RT-PCR)
1/04	46,XX,t(1;19)(q23;p13)/46,XX,idem,13q+ [42%]/ 46,XX [58%]	1,09	Nem volt	Negatív
2/04	46,XX	1,04	Nem volt	Pozitív
3/04	92,XY[18%]/46,XY[82%]	1,23	TEL/AML1 negatív	negatív
4/04	sikertelen	1,23	9-es trisomia 18-as trisomia 21-es tri-és tetrasomia X trisomia	Nem volt
5/04	sikertelen	0,96	TEL/AML1 pozitív	pozitív
6/04	sikertelen	Nem volt	Nem volt	Negatív

ad 2. ALL-es gyermekek kezdeti genetikai vizsgálata a DE OEC Gyermekklinika Genetikai Laboratóriumában.2/1. táblázat

A korábbi évek genetikai diagnosztikai munkája folytatásaként hat újonnan diagnosztizált ALL-es gyermek komplex genetikai vizsgálatát végeztük el. A hagyományos citogenetikai vizsgálatot DNS index meghatározással, FISH és RT-PCR módszerrel egészítettük ki. A hat citogenetikai vizsgálat közül három bizonyult sikeresnek: egy normális, diploid kariotípust, egy pre-B-sejtes leukémiára jellemző t(1;19) transzlokációt és egy tetraploid kromoszómakészletet igazoltunk. A vizsgálat három betegben sikertelennek bizonyult.

A DNS index alapján a vizsgált öt betegből három diploid range-be tartozott, míg két beteget a hyperdiploid B (DNS index: >1,16) csoportba soroltunk.

Három betegben végeztünk sikeres FISH vizsgálatot: számfeletti kromoszómák meghatározása mellett egy egy betegben negative, illetve pozitív TEL/AML1 átrendeződést igazoltunk. RT-PCR-rel három beteg TEL/AML1 negatívnak, kettő pozitívnak bizonyult. Vizsgálataink prognosztikai értékelésére az országos adatok részeként kerül majd sor.

ad 3. Minimális reziduális betegség kimutatására szolgáló PCR módszer beállítása és alkalmazása

A nemzetközi ajánlások figyelembe vételével a DE OEC Genomikai Központjával együttműködésben beállítottuk a MRD kimutatására szolgáló módszert.

A 2004-ben elvégzett munka és az elért eredmények rövid ismertetése.

Számítógépes adatbázis és biobank a gyermekkori akut limfoblasztos leukémia (ALL) tanulmányozásához

Az ALL páciensek mintáiban azonosított génátrendeződések, és a minimális reziduális betegség (MRD) kvantitálását szolgáló real-time kvantitatív PCR (RQ-PCR) mérések eredményeinek biztonságos és áttekinthető rögzítéséhez központi adatbázist hoztunk létre. Az adatbázist a Debreceni Egyetem egyik védett (secure) szerverén tartjuk fenn, amely csak külön jelszóval érhető el, és megfelelő biztonsági rendszerrel védett (**Internet címe: <https://genomics.dote.hu/all>**). A laboratóriumi jegyzőkönyvekből rendszeresen töltjük fel a friss adatokat, magát a teljes adatbázist pedig kéthetente CD-re mentjük. Az esetleges adatvesztést megelőzendő tehát a molekuláris biológiai adatokat és kísérleti eredményeket három

szinten rögzítjük: először a szokásos laboratóriumi jegyzőkönyvekben, majd a központi adatbázisban, végül pedig CD-n.

Az adatbázisban a mintafeldolgozás és a soklépéses kvantitatív mérés minden kísérleti fázisának eredményeit rögzítjük. Ez részben folyamatosan ellenőrizhetővé teszi a kísérletek minőségét, a mérési adatok megbízhatóságát, részben pedig egyértelműen visszakereshetővé teszi minden páciens esetében az azonosított génátrendeződéseket, és az MRD analízis eredményeit. Mivel az ALL-es betegeket több éven keresztül monitorozzuk az esetleges relapszus felismerése érdekében, a központi adatbázis nagyban elősegíti a biztonságos, hosszú távú adattárolást, és az esetleges új munkatársak számára is azonnal áttekinthető, egyértelmű információforrást biztosít.

Az adatbázisban jelenleg 23 beteg molekuláris biológiai adatait tartjuk nyilván, anonimizálva. *A biobankot képező, tisztított DNS minták száma ennek többszöröse*, hiszen a betegség nyomonkövetéséhez az első év során először kéthetente, majd néhány havonta, a későbbiekben pedig évente vesznek csontvelőt vagy perifériás vérmintát a betegektől.

A mintavétel időpontjai: 0 (diagnózis ideje), 15., 33. nap, 3-6-12 hónap

A munkafázisok a következők voltak:

- genomikus DNS izolálása D1 csontvelő mintából
- Multiplex PCR: IgH, TCRg, TCRd, TCRb, IgK (Biomed2 primer-párok)
- heteroduplex analízis: mono/oligoklonális génátrendeződések
- Szekvenálás: beteg-specifikus szekvencia
- Primer tervezés, real-time kvantitatív PCR assay (QPCR) optimalizálása és karakterizálása
- Follow-up csontvelő minták analízise, MRD kvantitálása

Az Ig/TCR átrendeződések azonosítása, és a specifikus RQ-PCR assay-k optimalizálása és karakterizálása.

Munkánk során a következő géekre kerestünk páciens-specifikus átrendeződéseket: IgH, IgK, TCRdelta, TCRgamma, TCRbéta. A csontvelőmintából tisztított genom DNS templátként szolgált a **multiplex** PCR-hoz – minden gén esetében több V- vagy D-szegmens-specifikus forward primert és egy vagy több J-szegmensre specifikus reverz primert használtunk ugyanazon PCR-ben. A PCR sikerét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Ennek gyenge méretbeli feloldóképessége miatt a poliklonális génátrendeződések is gyakran adnak látszólag egyetlen terméket. A monoklonális génátrendeződéseket heteroduplex analízissel azonosítottuk, a PCR termékeket felhasználva. A monoklonális génátrendeződések termékeit ezután mindkét irányba megszekvenálva megállapítottuk a génátrendeződés pontos, páciens-specifikus szekvenciáját. Az II/5.-1. táblázat foglalja össze az eddig azonosított leukémia-specifikus génátrendeződéseket, páciensek szerinti felbontásban. Ezek a szekvenciák szolgáltak alapul a megfelelő RQ-PCR assay páciens-specifikus, forward primerjének megtervezéséhez. Ezek után az RQ-PCR assay-t karakterizáltuk és a reakciókörülményeket optimalizáltuk.

Az eredményeket a II/5.-2. táblázat foglalja össze. A tervezett QPCR assay-k hatékonysága a $-3.23/-3.37$ tartományban mozgott, azaz optimálisnak mondható, amit a korrelációs koefficiensek értékei (mind ≥ 0.99) is alátámasztanak. Összességében megállapíthatjuk, hogy a tervezett QPCR assay-k többsége technikailag kiválóan alkalmas a leukémiás sejtek számának érzékeny és pontos nyomonkövetéséhez.

Az eddig elért eredményeket a *Magyar Humángenetikusok V. Munkakonferenciáján* (Szeged, 2004. november 11-13.) előadásban ismertettük.

Buslig J., Oláh É., Kiss Cs., Kappelmayer J., Balogh E., Bessenyei B., Scholtz B.:
Terápia nyomonkövetése real-time kvantitatív PCR-rel gyermekkori akut limfoblasztos leukémiában

Páciens	Génátrendeződés	
Q003	IgH VDJ IgH VDJ	
Q005	IgH DJ TCRdelta	
Q015	IgH VDJ 1. IgH VDJ 2.	biklonális IgH
Q013	IgK Kdel TCRd TCRg	
Q016	IgH VDJ 1. IgH VDJ 2. TCRgamma	biallélikus vagy biklonális IgH

1. táblázat

2. táblázat

Páciens/assay	Kvantitálás	Detektálás	PBMC háttér	Assay meredekség	R2
Q003 IgH FW1	2 x 10 ⁻⁴	2 x 10 ⁻⁴	nincs	-3,31	0,993
Q003 IgH FW2	4 x 10 ⁻⁵	4 x 10 ⁻⁵	nincs	-3,37	1
Q015 IgH FW1	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁴	nincs	-3,23	0,996
Q015 IgHF W3	1x10 ⁻³	1x10 ⁻³	nincs	-3,32	0,998
Q013 IgK Kdel	2 x 10 ⁻⁴	2 x 10 ⁻⁴	alacsony	-3,26	0,991
Q013 TCRd	1x10 ⁻²	1x10 ⁻²	magas		
Q013 TCRg	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁵	nincs	-3,34	0,99

Célkitűzés	1x10 ⁻⁴	10 ⁻⁴ /10 ⁻⁵	nincs	-3,33	1
Elfogadható	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁴	alacsony	-3 /-3.9	? 0.95

Minimális reziduális betegség nyomonkövetése real-time kvantitatív PCR-rel

Az eddig végzett mérések eredményét és értékelését példaként bemutatjuk.

A). Q003 páciens

Vizsgált csontvelői genom DNS minták: D1, azaz a diagnózis napja; D15, Mo3 (3. hónap), Mo5, Mo7.5, Mo10, Mo11

Az MRD analízishez használt QPCR assay-k: egy IgH génátrendeződést detektálnak, az egyik primer (FW1) a V-D szegmens közötti N1 régióra specifikus, a másik primer (FW2) a D-J szegmens közötti N2 régióra specifikus. A 15. napi (D15) mintában szignifikáns mennyiségű blasztsejtet detektáltunk (7.86×10^{-2} a D1 napi mintához viszonyítva, $D1=1$). Mivel D30 napi minta nem állt rendelkezésünkre, prognosztikai analízist nem végezhattünk. Az összes további mintában a leukémiás sejtek száma a QPCR MRD assay detektálási limitje alatt volt.

B). Q013 páciens

Vizsgált csontvelői genom DNS minták: D1, azaz a diagnózis napja; D15, D30, Mo3 (3. hónap), Mo4, Mo5.

Az MRD analízishez használt QPCR assay-k: TCRgamma és IgK Kdel génátrendeződéseket detektálnak. A D33 és Mo3 mintákban a blasztsejtek mennyisége a kvantitálási limitet nem éri el, ez alapján a páciens az alacsony kockázati kategóriába tartozik a relapszusveszély szempontjából. Az 5. havi minta (Mo5) a TCRgamma assay alapján pozitív, azaz leukémiás sejtek egyértelműen detektálhatók a mintában, habár mennyiségük a kvantitálási limitet nem éri el.

C). Q015 páciens

Vizsgált csontvelői genom DNS minták: D1, azaz a diagnózis napja; D15, D30, D40, Mo2 (2. hónap), Mo2.5, Mo4.

Az MRD analízishez használt QPCR assay-k: Két független IgH génátrendeződést detektálnak. A D30 mintában egyik assay szerint a blasztsejtek mennyisége a kvantitálási limitet nem éri el; a másik assay szerint a blasztsejtek mennyisége $\leq 10^{-3}$. A Mo2.5/Mo4 mintákban a blasztsejtek mennyisége a kvantitálási limitet nem éri el - mindezek alapján a páciens alacsony kockázati kategóriába tartozik a relapszusveszély szempontjából. Figyelemre méltó, hogy a D15 mintában a két QPCR assay szignifikánsan különböző számú blasztsejtet detektált (tízszerez különbség!), ami arra enged következtetni, hogy a leukémiás sejtpopuláció oligoklonális.

D). A további páciensek QPCR MRD analízise folyamatban van.

ad 4. Gyógyszer-rezisztencia vizsgálatok ALL-es gyermekekben és KG1 myeloid leukémiás sejtvonalon MTT teszt alkalmazásával. **A G-CSF és cytostaticumok szinergista és/vagy gátló hatásának vizsgálata KG1 myeloid sejtvonalon**

In vitro gyógyszer-rezisztencia vizsgálatok gyermekkori akut lymphoid leukaemiában MTT teszt segítségével.

Ismert, hogy ALL-ben a genetikailag eltérő alcsoportok prognózisa szignifikánsan különbözik. E különbségek hátterében eltérő gyógyszerérzékenység áll. Az eltérő terápiás válasz ismeretében a várhatóan legeredményesebb gyógyszerkombináció megkereshető. Ily módon nem csak a túlélők számának növelése érhető el, hanem a terápia toxicus mellékhatásainak elkerülésével a túlélők életminősége is javítható.

Az in vitro gyógyszerérzékenység meghatározására alkalmas módszer a szemikvantitatív kolorimetriás módszer, az MTT teszt.

Munkánk során a klinikánkon diagnosztizált ALL-es betegek MTT tesztrel vizsgált in vitro gyógyszerérzékenységét összehasonlítottuk az in vivo gyógyszerérzékenységet jelző klinikai és haematológiai paraméterekkel, valamint összefüggést keresünk az in vitro gyógyszerérzékenység és a leukémiás blasztsejtek genetikai/immunológiai jellemzői között.

A vizsgálatot a diagnózis felállításakor vett, első csontvelőmintából végezzük.

Betegek és módszer

A Debreceni Gyermeklinka Haematológiai Centrumában Hajdú-Bihar és Szabolcs-Szatmár-Bereg megye leukaemiás gyermekeinek kezelését végezzük. In vitro gyógyszerrezisztencia vizsgálatokra 2002. október és 2004 május között diagnosztizált 10 új ALL-es és három relapsusos beteg esetében került sor. Kizártuk a vizsgálati csoportból azokat a betegeket, akik specifikus előkezelésben részesültek, illetve akiknél a lymphoblastok aránya a sejtszeparálást követően nem érte el a 80%-ot.

MTT teszt (módszer)

A diagnózis felállítására vett csontvelőt RPMI 1640 tápfolyadékkal 1:1 arányban hígítottuk, majd 1/3 rész ficolt rétegeztünk rá és 2000 fordulaton 20 percig centrifugáltuk. A sejtszámlálás tripánkék festést követően Bürker kamrában történt.

A csontvelőből szeparált limfoblasztokat 96 lyukú microplaten (Greiner) négy napig a vizsgálandó cytostaticum megfelelő hígítási sorát tartalmazó speciális tápfolyadékban [RPMI 164, holland változat (Sigma), 20% fetalis borjúsavó (Sigma), 5µg/ml inzulin, 5µg/ml transferrin, 5µg/ml nátrium szelenit kiegészítés (Gibco), 2mM L-glutamin (Sigma), 100 IU/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 0.125 µg/ml fungizone, 200µg/ml gentamycin (Flow Laboratories)] 5%-os CO₂ termosztátban 37°C-on inkubáltuk. A kiindulási blasztszuspenzió homogén volt (koncentráció: 1.5-2·10⁶ sejt/ml), azaz minimálisan 80%-ban tartalmazott kóros sejteket és azok aránya – a teszt megbízhatósága érdekében - az inkubálási periódus végére sem csökkenhetet 70% alá. A citosztatikum oldatokat (vincristin, daunorubicin, doxorubicin, citozin-arabinozid, dexamethason, prednizolon, asparaginase, etoposid) a hattagú hígítási sorok elkészítéséhez a gyógyszerertári forgalomból vettük, és az adott feloldási javaslat szerint készítettük. Kivételt a 6-merkaptopurin és 6-tioguanin (Sigma). Utóbbi két gyógyszer por alakját 0.1 M NaOH-ban oldottuk. A methotrexát nem tesztelhető ebben a rendszerben, mivel az elpusztuló sejtekből felszabaduló metabolitok rescue utat biztosítanak a többi sejt számára.

A microplatekre a citosztatikum hígítási sorokat, lemezenként 3-4 féle gyógyszert előre felvittük (20µl/ mező, kontrollok: RPMI), majd fagyasztva tároltuk. Bizonyos citosztatikumoknál (6-merkaptopurin, prednizolon) saját kontroll hígítási sort kell alkalmazni mert a gyógyszerek maguk is befolyásolják az optikai denzitást. Négy nap után 10µl/mező (5mg/ml) dimetil-tiazol-tetrazóliumot (Sigma) adunk hozzá a citosztatikum hígításokhoz hat órára, majd a sejteket 10 perces rázógépes kezeléssel reszuszpendáljuk. A sárga MTT-reagenst az élő, tehát gyógyszerrezisztens sejtek számukkal egyenesen arányos mértékben kék formazán kristályokká alakítják, mértéke 100µl savanyított izopropanollal feloldva microplate spektrofotométerrel meghatározható (562 nm, korrigálás: 720nm) (OD, optikai denzitás). A mérések mindig két párhuzamos, azonos összetételű sejt sor felhasználásával történnek. A sejt koncentrációt, az élő sejtek arányát (tripánkék festéssel) és a sejtek morfológiáját (citospin preparátumon May-Grünwald-Giemsa festéssel) indítás előtt és az MTT-reagens hozzáadásakor ellenőrizzük. A sejtek túlélésének aránya kontroll, citosztatikum mentes limfoblasztok túléléséhez viszonyítva számítható ki (LCS: leucemic cell survival, LCS=OD kezelt sejtek/átlag OD kontrollsejtek x 100). A sejtek túlélési diagramját koordináta rendszerben ábrázoljuk. A gyógyszerrezisztencia jellemzésére azt a gyógyszerkoncentrációt használjuk, amelynél a sejtek fele él túl (LC50).

Eredmények

A vizsgált betegek klinikai (kor, nem), haematológiai adatait (rizikócsoport, prednison válasz), a genetikai és immunológiai jellemzőket összevetettük az in vitro gyógyszerérzékenységi adatokkal. A kapott LC50 értékek jelentős inter-individuális különbségeket mutattak. (1. táblázat)

A betegek nagy részénél összefüggést találtunk a genetikai alcsoport, a rizikócsoport, az in vivo gyógyszerhatás, valamint a kapott in vitro gyógyszerérzékenységi adatok között.

Ugyanakkor meglepő volt, hogy a magas rizikó csoportba sorolható relapsusos beteg a rossz klinikai válasszal ellentétben in vitro minden gyógyszerre érzékenynek bizonyult.

Ez a megfigyelés egyéb tényezők egyidejű szerepére hívja fel a figyelmet.

Rózsaszín:	Relapsus
Piros:	Rezisztens
Zöld:	Érzékeny

LC50
értékek

	Prednisolon mg/ml	L-ASP U/ml	VCR µg/ml	DNRµg/ml	VP16 µg/ml	6MP µg/ml	6-TG	DEXA µg/ml	ARA-C
tart.	5-0.00005 mg/ml	10- 0.0032 U/ml	50- 0.0488	2-0.00195	50- 0.1953	500- 15.6	50- 1.5625	6- 0.000183	2.5- 0.00243
1.					50	320	50		2.5
2.	4.7				50				
3.	0.05	0.0078	0.0845	0.208	0.499	54.37		0.000935	
4.	0.078		25.7	0.156					
5.	0.00142	0.0032	0.141	0.143	3.125	162.5	4.687	6	0.6
6.	0.5	0.4	35.4	0.105	0.78	480	4.843		2.5
7.	0.181	10	26.041	0.125					
8.	0.002861		1.885	0.0502					
9.		0.016		0.00983		203.99		0.0078	
10.	0.201	0.01039	10.442	0.1164					
11.	0.203								
12.	0.000311		1.953		0.1953	113.5		0.1109	
13.	0.234	0.07174		0.0825				0.005563	

1.táblázat

A G-CSF és cytostaticumok szinergista és/vagy gátló hatásának vizsgálata KG1 myeloid sejtvonalon MTT teszt segítségével

A leukémiák kezelése során alkalmazott cytostaticumok okozta cytopeniás időszak csökkentésére, a csontvelői regeneráció elősegítésére az adjuváns terápia részeként csontvelői stimuláló faktorokat, Granulocyta Colonia Stimuláló Faktort (G-CSF), Granulocyta-Monocyta Colonia Stimuláló Faktort (GM-CSF) alkalmaznak. Ezzel kapcsolatban felmerül a kérdés, vajon a cytopeniás fázisban adott G-CSF nem csökkenti-e a következő kemoterápiás ciklus hatásosságát? Stimulálja-e a leukémiás sejteket is a normális sejtek mellett?

Ennek a kérdésnek a megközelítésére vizsgáltuk, G-CSF előkezelést követően a KG-1 myeloid sejtek in vitro cytostaticum érzékenységét. A cytostaticumok közül esetleges apoptosist indukáló hatása miatt a daunorubicint választottuk.

KG-1 myeloid sejtvonalon G-CSF-daunorubicin interakcióját vizsgáltuk. Az alkalmazott DNR koncentrációk az alábbiak voltak:

- 1, 8 µg/ml
- 2, 2 µg/ml
- 3, 0.5 µg/ml
- 4, 0.125 µg/ml
- 5, 3,1x10⁻² µg/ml
- 6, 7, 8x10⁻³ µg/ml

A sejtvonal érzékenynek bizonyult daunorubicinre, a sejtvonal túlélését a G-CSF az esetek többségében egyik vizsgált koncentráció (10, 100, 1000 ng/ml) esetében sem befolyásolta, néhány esetben – nem szignifikáns mértékben – csökkentette.

A Daunorubicinnel együtt alkalmazott G-CSF hatása koncentrációfüggőnek bizonyult: A három G-CSF koncentráció közül az alacsonyabb koncentrációjú (10ng/ml) G-CSF előkezelést követően magasabb DNR koncentrációnál kifejezett túlélés növekedés mutatkozott. A jelenség magarázatát keresve, vizsgáltuk, vajjon igazolható-e G-CSF receptorok jelenléte a KG1 sejtek felszínén? A KG1 sejtek felszínén G-CSF receptor jelenlétét igazoltuk. (II/6-1.ábra) II/6 -1. ábra

A G-CSF esetleges *differenciáló hatásának* megítélésére a sejtfelszíni markerek expresszió változását vizsgáltuk. A vizsgált markerek a következők voltak: CD11 a,b,c; HLA-DR; MDR; CD58; CD86; CD34.

Megállapítottuk, hogy

- a G-CSF a kontrollhoz képest önmagában nem okozott expresszió változást.
- A Daunorubicin minden marker esetében expresszió csökkenést okozott.
- Ezt az expresszió csökkenést a G-CSF előkezelés tovább fokozta.
- A változás legkifejezettebb volt a CD11a és CD58 esetében.

Összefoglalva,

A félautomata MTT módszer alkalmasnak bizonyult a leukaemia sejtek gyors és objektív celluláris gyógyszerrezisztencia meghatározására. A módszer előnye, hogy kevés kiindulási sejtből ALL esetében már az egyhetes kortikoszteroid monoterápia végére prediktív értékű információ nyerhető.

A kapott in vitro gyógyszerérzékenységi adatok az esetek többségében jól korrelálnak a klinikai hatással. Az MTT teszt eredménye külön prognosztikai faktornak tekinthető. Az esetszám növekedésével megfigyelést tehetünk a kedvezőtlen és kedvező prognosztikai csoportba tartozó betegek gyógyszerrezisztencia profiljának különbségeire vonatkozóan.

A Debreceni Gyermekklinikai Genetika Laboratóriumában közel másfél év alatt 13 esetben ALL-es beteg esetében végeztünk sikeres MTT vizsgálatot. A citosztatikumra vonatkozó LC50 értékek jelentős inter-individuális különbséget mutattak. A betegek nagy részénél korreláció volt megfigyelhető az in vivo klinikai gyógyszerhatás és a kapott in vitro gyógyszerérzékenységi adatok között.

Más esetben ugyanakkor meglepő volt, hogy magas rizikócsoportba sorolható relapsusos beteg a rossz klinikai válasszal ellentétben in vitro minden gyógyszerre érzékenynek bizonyult. Ez az egyes genetikai alcsoportok heterogenitására hívja fel a figyelmet. Emellett klinikai adatok utalnak arra, hogy az ALL eltérő genetikai tulajdonságú alcsoportjai eltérő terápiával kezelhetők eredményesen.

A leukaemia adjuváns terápiájában alkalmazott G-CSF hatását a következő citosztatikus blokkra nézve a KG-1 myeloid sejtvonal modelljén tanulmányoztuk. A sejtvonal alkalmazásának előnye a vizsgálatok reprodukálhatósága. A KG-1 sejtvonal érzékenynek bizonyult daunorubicinre, a G-CSF receptor jelenléte a sejtfelszínen antitest segítségével bizonyítható volt, ami alkalmassá tette citosztatikum-citokin interakció modellezésére.

A sejtvonal túlélését a G-CSF önmagában nem befolyásolta, más esetben csökkentette. Ez a hatás önmagában nem bizonyult koncentrációfüggőnek, daunorubicin jelenlétében viszont igen. A három G-CSF koncentráció közül az alacsonyabb koncentrációjú G-CSF előkezelést

követően alkalmazott magasabb daunorubicin koncentrációnál kifejezett túlélés növekedés mutatkozott.

A G-CSF differenciálódást indukáló hatás bizonyításhoz, a sejtfelszíni markerprofil esetleges változását vizsgáltuk. A fenti markerek jelenlétét flow cytometriával vizsgálva a daunorubicin a CD11a és CD58 markerek expresszióját kifejezetten csökkentette, s ezt a hatást a G-CSF előkezelés tovább erősítette. A jelenség hatásmechanizmusának értelmezése céljából szükségesnek tartjuk vizsgálni a sejtfelszíni G-CSF receptorszám és affinitás változását G-CSF és daunorubicin jelenlétében illetve azok kombinált alkalmazását követően. Ugyancsak további vizsgálatokat igényel az apoptotikus markerek esetleges megváltozásának ellenőrzése Western-blot segítségével.

Publikáció:

Absztrakt:

Zs. Jakab, E. Balogh, Cs., Kiss, É. Oláh.: Drug resistance testing by MTT-assay in childhood acute lymphoid leukemia. *Cytometry* 46/3: 209, 2001.

Kísérletes eredményeinket nemzetközi folyóiratban kívánjuk közzéadni (*Pediatr Blood Cancer*)

ad 5. Citokinek szabályozó szerepe leukaemiában

A hematopetikus citokinek komplex szabályozó szerepet töltenek be a leukaemiás vérképzésben. Megállapítható, hogy olyan „rendellenes”, a sejtvonal-specificitás korlátait átlépő serkentő hatások észlelhetők, amelyek alapján a normál vérképzést tekintve myelopoi-etikusnak tartott citokinek, így a klinikai gyakorlatban kiterjedten alkalmazott G-CSF a leukaemiás lymphoblastok szaporodását is befolyásolni képes. 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.

Saját eredményeinket a szakirodalomban közölt megfigyelésekkel összevetve áttekintő (review) cikk keretében, nemzetközi folyóiratban publikáltuk:

Publikáció:

Kiss C, Benkő I, Kovács P: Leukemic cells and the cytokine patchwork. *Pediatr Blood Cancer*, 2004, 42, 113-121. (IF: 1,737)

Myelodysplasiás szindrómás (MDS) gyermekek myeloid progenitor sejtjeinek proliferációs készségét, apoptózisát és citokin-regulációját kolónia assay módszerrel vizsgáltuk:

Hét MDS-ben szenvedő gyermek (1 RA, 5 RAEB és 1 JMML) csontvelői eredetű myeloid progenitor sejtjeinek kolónia képzését tanulmányoztuk primér metilcellulóz kultúrában PHA-LCM, mint konvencionális citokin-forrás, valamint rh SCF, G-CSF, illetőleg GM-CSF jelenlétében. Feltűnő volt a kolónia képződés mértékének heterogenitása az MDS-es populációban az egészséges kontrollok adataival összevetve. A várakozásnak megfelelően a normál csontvelői sejtek sohasem képeztek spontán kolóniákat, ugyanakkor valamennyi esetben makroszkóposan jól elhatárolódó, mikroszkóposan differenciált morfológiájú sejtekből felépített telepek képződésével reagáltak a megfelelő stimulusok hatására. Ezzel szemben ritkán fordult elő differenciált sejtekből felépülő, az egészséges csontvelői sejtek által képzett telepekhez hasonló morfológiájú és telepszámú minta a betegek anyaga között. Az esetek többségében a kolónia képzés mértéke vagy jelentősen elmaradt a kontroll kolóniaszámtól, vagy jelentősen meghaladta azt. Spontán kolónia képződést 3/7 esetben, 1 JMML-es és 2 RAEB-s beteg mintáiban tapasztaltunk. Két esetben találtunk túlnyomó, a kolóniáknál kevesebb sejtből álló telep „cluster”-képződést. A vizsgált rh citokinek dózis-függő, klonális pro-

liferációt serkentő hatását 5/7 esetben a PHA-LCM-ét hasonló mértékben, 4/6 esetben tapasztaltuk, 2 beteg mintája semmiféle stimulusra sem reagált. A leghatékonyabb serkentő ágenseknek a GM-CSF és az SCF bizonyultak. Különösen kifejezett volt a JMML-es beteg mintájának GM-CSF és SCF iránti hiperszenzitivitása. Hatékonyságuk, lineáris regressziós analízissel tanulmányozva, egymáshoz hasonlóan, a G-CSF hatékonyságát szignifikánsan megelőzőnek bizonyult. Az analízis további eredménye az, hogy, akárcsak az ALL minták esetében, az MDS progenitorok esetében is szignifikáns korreláció mutatkozott az egyes faktorok hatékonyságának mértéke között, feltehetőleg az azonos célsejt-populáció következtében. Citokin kombinációk tekintetében GM-CSF és SCF hozzáadása a G-CSF-hez szignifikánsan emelte az önállóan G-CSF-fel indukált kolóniák számát.

Eredményeink arra utalnak, hogy a kolónia assay vizsgálatok során nem a reziduális normál hemopoetikus sejtek, hanem az MDS progenitorok proliferációs készségéről nyertünk információt. Az adatok a citokin reguláció alapvetően kóros mivoltára utalnak gyermekkori MDS-ben. A spontán kolóniaképzés és a GM-CSF hiperszenzitivitás kimutatása diagnosztikus értékű JMML-ben. A kórlefolyás (túlélési idő, leukaemiás transzformáció) és a kolónia képződés mennyiségi és minőségi mutatói között fennálló esetleges összefüggés felderítése a vizsgálatok folytatását igényli ebben a ritka gyermekkori betegségben.

Eredményeinket nemzetközi folyóiratban tervezzük publikálni (kézirát előkészületben).

A serkentő hatású citokinek mellett az innovatív terápiás eljárások részeként szóba jövő IFN-alpha és bcl-2 antiszenz oligonukleotid hatását ugyancsak a kolónia esszé módszerével tanulmányoztuk MDS prekursor sejtek és a B-lymphoid vonalat reprezentáló lymphoblast sejt kulturák felhasználásával:

Félfolyékony primer és szekunder metilcellulóz kultúrában tanulmányoztuk 3 B-sejtes leukaemia sejt vonal, a JY, BL-41 és a humán herpesvirus-8 (HHV-8)-fertőzött BCBL-1 sejtek kolónia képzését. Az IFN α -2b és a bcl-2 antiszenz oligonukleotid egyaránt szignifikánsan, dózis-függő módon gátolta mindhárom sejt vonal kolóniaképzését primer, és az önmegújulást reprezentáló szekunder kultúrákban. A proliferáció-gátló hatással párhuzamosan szuszpenziós kultúrákban tanulmányozva, szignifikánsan fokozódott az apoptotikus sejtek aránya és emelkedett a sejt felszíni Fc γ RII (CD 32) kifejeződésének a mértéke. Az utóbbi jelenség a B-sejtek érését jelzi. Egészséges újszülöttek köldökzsinór vér-eredetű érett B-lymphocytáinak in vitro apoptózisát gátolta az IFN α . A bcl-2 antiszenz oligonukleotid alkalmazása, Western blot módszerrel kimutatva, csökkentette a bcl-2 protein kifejeződését a sejt vonalakban és 2 de novo ALL sejt mintában. Eredményeink arra utalnak, hogy az IFN α és a bcl-2 antiszenz oligonukleotid hatékonyan gátolja a leukaemiás B-sejtek önmegújulási képességét, miközben fokozza terminális differenciálódásukat. Az IFN α gátló hatása a HHV-8-fertőzött BCBL-1 sejtekben volt a legkifejezettebb. Itt a közvetlen antiproliferatív effektus mellett a malignus transzformációban és a daganatsejtek expansziójában oki szerepet játszó HHV-8 fertőzés elleni antivirális hatás is szerepet játszik. Az in vitro észlelt hatás terápiásan kiaknázható, mert a leukaemia sejtekkel szemben az IFN α gátolja az egészséges B-limfociták apoptózisát. De novo leukaemia sejtek szaporodásának in vitro vizsgálata tisztázhatja az IFN α potenciális hatékonyságát a B-sejt vonal gyermekkori rosszindulatú betegségeiben.

Hasonlóan a B-sejtes leukaemia sejt vonalakhoz, az IFN α hatékonyan és dózis-függő módon gátolta valamennyi vizsgált gyermekkori myelodysplasiás minta (3 RAEB és 1 JMML) PHA-LCM által indukált kolónia képződését. Egy betegünk esetében a tenyésztést az in vivo IFN α kezeléssel párhuzamosan, több alkalommal is elvégeztük. Megállapítottuk, hogy az IFN α gátló hatása csökkent az in vivo IFN α kezelés során, majd az eredeti szintre emelkedett az in vivo IFN α terápia felfüggesztését követően. Eredményeink szerint az IFN α hatékony adjuváns kezelési lehetőséget jelent gyermekkori MDS-ben. Tartós in vivo monoterápiás alkalmazása során relatíve rezisztens klón szelektálódásával kell számolnunk.

Eredményeinket nemzetközi folyóiratban tervezzük publikálni (kézirát előkészületben).

B. alprojekt: Neuroblastoma szűrővizsgálatok a daganat korai felismerése céljából.

A program eredeti célkitűzése: A neuroblastoma szűrése és a kiszűrt, valamint a klinikailag felismert daganatok pontos genetikai jellemzése, s az észlelték összevetése a tumor szövettani jellemzőivel és a kórlefolyással.

A vizsgálati periódus utolsó évében a feladat módosult: a Magyar Gyermekonkológiai Munkacsoport döntése értelmében a neuroblastoma genetikai vizsgálatát a Pécsi Tudományegyetem Patológiai Intézete centralizáltan végzi. A mintákat minden hazai gyermekonkológiai központ az említett intézetbe küldi. Így saját munkánk a szűrővizsgálatok folytatására és a négy év eredményeinek értékelésére korlátozódott.

Elméleti háttér, célkitűzések

A gyermekkori rosszindulatú betegségek 8-10%-át adó neuroblastoma incidenciája: 10,5/1 millió 15 év alatti gyermek. A betegség prognózisát a tumor biológiai jellemzőin (a tumor stádiuma, szövettani és genetikai jellemzők) túl az életkor alapvetően meghatározza: A csecsemőkori forma a gyakori, mintegy 60%-ban bekövetkező spontán regresszió miatt kedvező prognózisú, míg a későbbi életkorban csak a korán felismert daganat kezelhető eredményesen. A korai felismerés elősegítése tette indokolttá a szűrővizsgálatok bevezetését, amit az elmúlt három év munkájának folytatásaként a 15 hónapos MMR oltáshoz kapcsolva végeztünk.

A szűrés kivitelezése:

A szűrés kivitelezése az előző években bevezetett módon történt.

A mintákat a szülők vitték be a városi laboratóriumba, ahol fagyasztva tárolás után szállították át a Gyermekklinika szűrést végző biokémiai laboratóriumába.

A szűrővizsgálatok elvégzése Dr. V. Oláh Anna irányításával történik, aki az elvégzett munkáról 2002. 05.25.-én, 2002.07.03.-án, 2002. 09.28.-án és 2004. október 15.-én készített összefoglalót.

VMA/kreatinin arány meghatározás módszere

Neuroblastoma, phaeochromocytoma, ganglioneuroma esetén a katecholaminok koncentrációjával együtt változik ezek közös metabolitjának, a vanilmandulasavnak (VMA) a koncentrációja a vizeletben.

A szűrésre a reggeli első vizelet kreatinin értékre vonatkoztatott VMA meghatározását használtuk, a gyanús eredményt HPLC-s meghatározással ellenőriztük.

A vizelet VMA meghatározására alkalmazott Biosystem assay módszert korábbi beszámolóinkban ismertettük. A referencia tartomány felső határaként a kanadai szerzők által 0-1 éves korosztályra HPLC-s analízissel 1981-ben leírt 95 percentiles értéket: 2,2mg/mmol VMA/kreatinin indexet tekintettük (S. Soldin, 1981).

A 95%-os konfidencia és az előltti cutoff (esetünkben 2,2-3,0 mg/mmol) érték megbízhatóságát támasztja alá, hogy a fenti szerzők 10 neuroblastomás gyermekben (koruk: 1-3 év) 5-162mg/mmol közötti VMA indexet találtak, amely tartomány nem fed át az általunk javasolt referencia tartománnyal, illetve cutoff értékkel. Eszerint a betegekben 2-50-szeres emelkedést várhatunk a normál tartományhoz képest. Soldin vizsgálatai szerint az 1-3 éves neuroblastomás gyermekek vizeletében a VMA index átlaga 48,7mg/mmol (SD:57 mg/mmol), vagyis az emelkedés mértéke átlagosan 20-szoros, de egyénileg változó lehet. Ezért már a 2x-es értéknél javasoljuk a 24-órás vizeletgyűjtést és az ismételt vizsgálatot.

A kreatininre vonatkoztatott érték kiküszöböli a katecholamin szint napszakonkénti váltakozásából származó fals értékeket s elkerülhetővé teszi a 15 hónapos gyermekekben nehezen kivitelezhető 24 órás vizelet gyűjtést.

A reggeli első vizelet vizsgálata egyidejűleg lehetőséget nyújtott e gyermekek húgyúti infekció, diabetes mellitus irányába történő szűrésére.

Eredmények

A pályázati periódus utolsó, beszámolási évében, 2003. október 1. - 2004. október 15. között 174 15 hónapos gyermek esetében végeztünk vizelet katecholamin meghatározást kiegészítve a rutin vizeletvizsgálattal.

Az alábbi vizsgálatok történtek:

- vanilinmandulasav meghatározás (10 lépésben oszlopkromatográfia és UV fotometria)
- kreatinin érték (Jaffe módszer)
- kvalitatív vizeletvizsgálat Uricont analízátorral
- vizelet üledék vizsgálat

A 174 gyermek közül *kilenc* (5%) esetben az 1. mintában emelkedett VMA/kreatinin indexet kaptunk, ezért a vizsgálatot megismételtük. A kilenc közül háromtól kaptunk megfelelően gyűjtött kontroll vizeletmintát, amelyekben normál kreatinin érték mellett a VMA/kreatinin érték is a referencia tartományba (0-2,2mg/mmol, cut off 3mg/mmol) esett. Ez arra utal, hogy az első vizsgálat kóros eredménye valószínűleg a vizelet alacsony kreatinin koncentrációjával (túlzott folyadékbevitel a gyűjtés előtt) függött össze.

Egyetlen gyermeknél közepesen koncentrált vizeletben találtunk emelkedett VMA/kreatinin értéket (vizelet kreatinin: 2,56mmol/l, VMA/kreatinin: 4,88mg/mmol). A diéta betartását követően gyűjtött vizelet minta HPLC vizsgálata azonban negatív eredményt adott.

Vizelet kvalitatív vizsgálat:

A kapott vizeletmintákat valamennyi esetben 9-10 tesztcsikkal (Gen 9 ill. Uricont) egyéb húgyúti problémák irányában is megvizsgáltuk. A 174 mintából 34 esetben találtunk kóros terméket a vizeletben (fehérjét, ketonokat, glükózt, fokozott ubg-t, nitritet, illetve vvt-t, bakteriuriát, leukocyturiát).

Az eltérésről a gyermekek házi gyermekorvosát értesítettük és további vizsgálatokat kértünk. A kóros leletek aránya 20% volt.

Következtetések:

- 174 gyermek vizeletmintájának VMA vizsgálata során kilenc esetben észleltünk magas VMA/kreatinin arányt, ami 5%-nak felel meg. A magas VMA/kreatinin arányt az alacsony kreatinin érték okozta, ami a vizeletgyűjtés nem megfelelő voltából adódott (túlzott folyadékbevitel a gyűjtés előtt). Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy neuroblastomára utaló kórosan magas VMA indexet egyik minta sem mutatott. Ez összhangban van a betegség alacsony incidenciájával. A neuroblastoma incidenciáját figyelembe véve 500 alatti esetszámnál még nem feltétlenül várható pozitív eset. Mégis hasznosnak ítéljük az elvégzett vizsgálatokat, mivel segítséget nyújtottak a gyermekkori vizeletgyűjtés problémáját megoldó random vizeletből való mérési technika kidolgozásában.
- Meghatároztuk a hazai egészséges gyermekpopulációra a VMA index referencia tartományát, amely közel azonos a HPLC-s analízissel kapottal.
- A 20%-ban előforduló kóros leletek megerősítik a (kis)gyermekkori szűrő jellegű kvalitatív vizeletvizsgálatok jelentőségét. E vizsgálatok jelentősen javítanak az 1-3 éves korosztályban fellépő húgyúti fertőzések, egyéb vesebetegségek és a diabetes mellitus korai felismerését.

Irodalom:

S. Soldin: Application of LC in Children's Hospital „Biological application of liquid chromatography”, International Liq. Chrom. Symposium (Ed: G.L. Hawk), Vol.20, pp: 135-141, 1981.

2004-es PUBLIKÁCIÓK

1. Árvai K., Tóth J., Németh T., **Kiss Cs.**, Molnár P., **Oláh É.**: Csecsemőkori nyaki lokalizációjú neuroblastoma. Csecsemőkori nyaki lokalizációjú neuroblastoma. Magyar Onkológia, 2004, 48, 89-95
2. Bárdi E, Oláh VA, Bartyik K, Endreffy E, Jenei C, Kappelmayer J, **Kiss C**: Late effects on renal glomerular and tubular function in childhood cancer survivors. *Pediatr Blood Cancer* 43: 668-673, 2004. **IF: 1,737**
3. Bárdi E, Bobok I, Oláh VA, **Oláh É.**, Kappelmayer J, **Kiss C**: Cystatin C is a suitable marker of glomerular function in children with cancer. *Pediatr Nephrol* 19:1145-1147, 2004. **IF: 1,219**
4. Kiss C, Benkő I, Kovács P: Leukemic cells and the cytokine patchwork. *Pediatr Blood Cancer*, 2004, 42, 113-121. **IF: 1,737**