

Nemzeti Onkológiai Kutatás-Fejlesztési Konzorcium
a daganatos halálozás csökkentésére

1/48/2001

Zárójelentés: 2001. május 15.-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 WTI gén splice variánsai expressziójának meghatározása ALL-ben (Tímár J., OOI)

5./ Különböző rizikócsoportha tartozó ALL WTI expressziós mintázatának meghatározása

6./ Új diagnosztikumok előállítása az ALL staging elősegítésére

B./ A gyermekkori neuroblasztoma szűrővizsgálata

C./ Humán pailloma virus (HPV) lehetséges szerepének vizsgálata gyermekkori daganatok kialakulásában

1. HPV jelenlétének vizsgálata gyermekkori Wilms tumorban

BEVEZETÉS

A gyermekkori rosszindulatú megbetegedések - relative nem nagy abszolút számuk (15-16/100 000 14 év alatti gyermek), és a kezelési eredmények utóbbi évtizedekben bekövetkező javulása ellenére - kiemelt szerepet játszanak a gyermekkori halálozásban: a halálloki statisztikában minden egy év fölötti korcsoportban második helyen állnak a balesetek mögött.

A gyermekkori rosszindulatú betegségek egyharmada leukaemia, további egyharmadát a központi idegrendszeri daganatok adják. Mintegy 14-15%-kal a lymphomák (non-Hodgkin és Hodgkin lymphoma: NHL és HL) szerepelnek, a maradékot a lágyszöveti daganatok és csontdaganatok adják.

A benyújtott munkatervben két téma szerepelt:

1. *Neuroblastoma szűrővizsgálatok és a klinikailag felismert daganatok genetikai jellemzése*

2. *Akut lymphoid leukaemia molekuláris biológiai jellemzése*

1. Neuroblastoma szűrővizsgálatok és a klinikailag felismert daganatok genetikai jellemzése

A neuroblastoma az összes gyermekkori rosszindulatú betegség 8-9%-át adja. A várható évenkénti új esetek száma tehát nem nagy, mégis tanulmányozását az indokolja, hogy míg a csecsemőkori formák spontán differenciálódásra hajlamosak, s így kezelés nélkül gyógyulhatnak („watch and see”), az egy év fölötti esetek prognózisa igen kedvezőtlen. A magas mortalitás csökkentése a daganatok pontos genetikai jellemzésétől, a prognosztikai faktorok alapján kidolgozott differenciált kezeléstől várható.

Ezért a pályázat egyik témájául a gyermekkori neuroblastoma korai felismerése érdekében szűrővizsgálatok bevezetését és a felismert betegségek korszerű genetikai jellemzését tűztük ki célul.

2. Akut lymphoid leukaemia molekuláris biológiai jellemzése:

Az akut lymphoid leukaemia a gyermekkori malignus betegségek leggyakoribb képviselője. Noha az elmúlt évtizedekben az akut lymphoid leukaemia kezelési eredményei óriási mértékben javultak (a betegek 75-80%-a gyógyítható), a gyermekkori malignus betegségek okozta mortalitás további csökkentése elsősorban e betegcsoport kezelési lehetőségeinek további javításától, a kellően, de nem túlzottan agresszív, minél inkább egyénre szabott kezeléstől várható.

Ezért pályázatunkban a leukaemiák 85%-át kitevő akut lymphoid leukaemia (ALL) **molekuláris biológiai jellemzését**, mindenekelőtt a prognózist meghatározó *kezdeti genetikai jellemzők* minél pontosabb meghatározását, *a minimális reziduális betegség* kimutatására szolgáló módszerek bevezetését és alkalmazását, valamint az *in vitro* gyógyszerérzékenységi vizsgálatok rendszeressé tételét tűztük ki célul.

2. Alprojekt. A GYERMEKKORI ACUT LYMPHOBLASTOS LEUKAEMIA SEJT-ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIÁJA

ÖSSZEFOGLALÁS

A Gyermekkori rosszindulatú betegségek egyharmadát kitevő leukaemia mintegy 85%-át akut lymphoblastos leukaemia adja. A betegség terápiás eredményei az elmúlt évtizedekben az agresszív kemoterápiás kezelés, a központi idegrendszeri leukaemia megelőzését szolgáló irradiáció, a javuló szupportív terápia és a biológiai modulátorok alkalmazása eredményeképpen jelentősen javultak. Napjainkban az ALL-es gyermekek 70-75%-a gyógyítható. Ugyanakkor a betegek egy része ma is a terápiával dacoló alapfolyamat, vagy az agresszív terápia mellékhatásai miatt hal meg.

A terápiás eredmények további javítása egy differenciált, individuálisan megválasztott kellően, de nem túlzottan agresszív kezeléstől várható. Ehhez már a betegség elején el kell különítenünk a terápiára jobban és kevésbé reagáló, azaz jobb és rosszabb prognózisú eseteket. Ebben nyújt segítséget a blast sejtek immunológiai jellemzése mellett a kezdeti genetikai eltérések: tumor-specifikus kromoszóma aberrációk, vagy génexpresszió változások kimutatása. 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 program kezdeményezőiként az évenkénti eredményeket, majd az első 10 esztendő tapasztalatait magunk összegeztük.

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. Epidemiológiai vizsgálatok a gyermekkori ALL incidenciájának meghatározására 1973-98 között (Jakab Zsuzsanna, Oláh Éva)
2. Klinikai vizsgálatok (Kiss Csongor, Bárdi Edit, Szegedi István, Oláh Éva)
3. *A gyermekkori ALL kezdeti genetikai eltéréseinek* kimutatása és a betegek genetikai eltérések alapján történő prognosztikai csoportosítása a DE OEC Gyermekklinika Genetikai laboratóriumában (Balogh Erzsébet, Kiss Csongor, Bessenyei Beáta, Újfalusi Anikó, Oláh Éva) :

A csoportosítás alapjául szolgáló vizsgálatok:

- Kariotipizálás
 - DNS index meghatározás (ploiditás vizsgálat)
 - FISH módszer a számfeletti kromoszómák és transzlokációk (TEL/AML1, ABL/BCR) identifikálására
 - t(12;21) (= TEL/AML1 átrendeződés) vizsgálata RT-PCR módszerrel.
4. A kezdeti genetikai vizsgálat diagnosztikai és prognosztikai jelentősége gyermekkori akut lymphoid leukaemiában (ALL): tízéves felmérés tapasztalatai (1993-2002). Az országos adatok szisztematikus értékelése, genetikai adatbázis létrehozása (Jakab Zsuzsanna, Balogh Erzsébet, Oláh Éva és a magyarországi gyermekonkológiai központok)

- 5 *Minimális reziduális betegség* kimutatására szolgáló PCR módszer beállítása és alkalmazása (Scholtz Beáta, B. Julia, Kiss csongor, Szegedi István, Oláh Éva)
- 6 *In vitro gyógyszerrezisztencia* vizsgálatok MTT teszt segítségével (Márkász László, Hajas György, Rajnavölgyi Éva, Oláh Éva)
 - ALL-es betegekben
 - KG1 myeloid sejtvonalon
6. Immunfenotipizálás és ploiditás vizsgálatok akut leukaemiában (Kiss Csongor, Kappelmeier János, Antal Szalmás Péter)
- 7 Cytokinek (PHA-LCM, rhSCF, G-CSF, GM-CSF és IFN-alpha) hatásának vizsgálata sejtkultúrákban (Szegedi István, Kiss Csongor)

Az eredményeket 14 megjelent (ill. közlésre elfogadott) közleményben publikáltuk és két további kézirat van előkészületben.

RÉSZLETES ISMERTETÉS

Ad 1. Epidemiológiai vizsgálatok a gyermekkori daganatos betegségek felderítésére Észak-kelet Magyarországon, különös tekintettel a leukaemiákra:

Munkacsoportunk a Magyar Gyermekorvosok Társasága (MGYT) Gyermekonkológiai Szekció (GYOS) megalakulása óta annak tagjaként működik. Központunkban folyik az Észak-kelet magyarországi régió, elsősorban Hajdú-Bihar és Szabolcs-Szatmár-Bereg megye betegeinek gyermekonkológiai kivizsgálása, gyógykezelése, gondozása. Betegellátó tevékenységünk mellett részt veszünk a graduális és posztgraduális képzésben. Évente mintegy 30 új magyar daganatos gyermeket kezelünk. A projekt keretében retrospektív tanulmány keretében mértük fel a régió gyermekonkológiai epidemiológiai helyzetét 1973-1998 között. A régió epidemiológiai helyzete hasonló az észak-amerikai kontinens és a nyugat-európai országok helyzetéhez, kivéve a központi idegrendszeri daganatok gyakoribb előfordulását. A 0-14 éves korcsoport életkorra standardizált átlagos éves tumor-incidenciája 120,7/millió. A gyakori gyermekkori malignitásoké: leukaemia: 37,3/millió, központi idegrendszeri daganatok: 31,6/millió, a perifériás idegrendszer daganatai: 12,5/millió, lymphomák: 12,2/millió, gyermekkori vesedaganatok: 8,8/millió.

Az éves átlagos incidencia a 70-es évek közepe óta egyenletes, évi 2,6%-os, szignifikáns növekedést mutat. Az incidencia mintázatában észlelt változások a leukaemiák területén sajtószerű képet mutattak: az akut myeloid leukaemia (AML) incidenciájában a vizsgált időszakban nem találtunk változást, míg az akut lymphoblastos leukaemia (ALL) incidenciája 1991-ig fokozatosan emelkedett, ebben az évben 48,7/millió értéken tetőzött, majd folyamatos csökkenést mutatott. Az észlelt változás nem hozható ok-okozati összefüggésbe a Csernobil-effektussal, noha, az akut sugárbaleseteket követően fellépő leukaemia 1-6 éves látencia-periódusát tekintetbe véve figyelemreméltó.

Publikáció:

Jakab Z, Balogh E, Kiss C, Olah E: Epidemiologic studies in a population based childhood cancer registry in North-East Hungary. *Med Pediatr Oncol*, 2002, 38, 338-344. IF: 1.114

A továbbiakban munkánkat az 1999-2002 évek retrospektív kiegészítésével, majd 2003-tól prospektív vizsgálattal folytattuk. A deskriptív epidemiológia mellett vizsgálatainkat laboratóriumi, elsősorban genetikai vizsgálatokkal egészítettük ki (ld. 2.pont) a leukemogenezisben szerepet játszó etiológiai tényezők jobb megismerésére. Kezdeményeztük

a hazaihoz hasonló gyermektumor regiszter létrehozását a Román Gyermekonkológiai Társaság felé. A két ország szomszédos és a Kárpátok által elválasztott régióinak epidemiológiai vizsgálata ígéretes kutatási eredmények explorálását tenné lehetővé.

Ad 2. Klinikai vizsgálatok

De novo leukaemiás betegek vizsgálata az utolsó évben

2000. november és 2004. 12. 30 között 30 de novo leukémiás és myelodysplasiás gyermeket (22 ALL, 7 AML és 1 MDS) diagnosztizáltunk. A csontvelői és perifériás össejtek 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. Hat ALL-es, 3 AML-es és egy myelodysplasiás betegünk volt.

Az ALL-es betegek közül ALL-BFM 95 protokoll szerint történt 5 beteg kezelése, 1 csecsemőkorú beteget az INTERFANT 98 protokoll szerint, 2 L3-as morfológiájú beteget az NHL-BFM 95 protokoll II terápiás csoportja szerint, a 2002. november 1-et követően diagnosztizált csecsemőkoron túli, BCP- és T-ALL betegeket (14) az ALL IC-BFM 2002 protokoll szerint kezeltünk. 1 beteget veszítettünk el a remissziós kezelés befejezése előtt az alapbetegség szövődménye miatt, 10/11 beteg az indukciós kezelési ciklus végére remisszióba került, remissziójukat tartják. Betegeink közül 19/22 ALL-es gyermek él, 18/19 első remisszióban. A 3 AML-es és egy MDS-es gyermek közül 3-at elvesztettünk. 1 ALL-es gyermeknél sikeres idegen donoros össejt átültetés történt.

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)

Előadás nemzetközi kongresszuson:

Oláh É.: Early diagnosis of childhood malignancies. *Europediatrics*, 2003, Prága

A gyermekkori leukaemias 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. A vesefunkciós eltérések eredhetnek a vese tumoros infiltrációjából, a vese parenchymából kiinduló tumorokból, a tumor húgyúti obstrukciót okozó hatásából, a tumor lízis szindrómából ill. létrejöhetnek a sebészi, az irradiációs, a citosztatikus sőt a szupportív terápia következtében is.

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 szérum és vizelet ozmolaritás mérésével és elektrolit ürítéssel határoztuk meg. Továbbá meghatároztuk a gyermekek ACE receptor gén polimorfizmusát.

Vizsgálataink során a cystatin C és kreatinin koncentrációkat 1466 szérum 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 szérum kreatinin érték mellett, amelyet a kreatinin tubuláris szekréciója magyaráz és rávilágít arra tényre, hogy a cysC a krónikus vesebetegek esetén is alkalmasabb a GFR megítélése, mint a szérum 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 illetőleg a 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 vizeletét 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 szeptikus shock incidenciája és kórlefordása 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 kórlefordását 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, vércép, vérsajt-süllyedés, CRP, és Astrup vizsgálatokat végeztünk valamint regisztráltuk az intenzív osztályon eltöltött napok számát. A 164 közül 158 betegen 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 légzéstámogatást 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 szeptikus 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 ki-
menetelt csak a DD genotípusú betegben figyeltünk meg.

Eredményeinket nemzetközi folyóirathoz küldött publikációban foglaltuk össze.

**Ad 3. A gyermekkori ALL kezdeti genetikai eltéréseinek kimutatása és a betegek ge-
netikai eltérések alapján történő prognosztikai csoportosítása a DE OEC Gyer-
mekklinika genetikai laboratóriumában**

A DE OEC Gyermekklinika Genetikai Munkacsoportja a klinika Haema-
tológiai/Onkológiai osztályán kezelt ALL-es gyermekek részletes genetikai vizsgálatát végzi.
Az alkalmazott módszerek:

Klasszikus citogenetika csontvelőből stimuláció nélkül
DNS index meghatározás (áramlásos citometriával a KBMPI-ben)
FISH vizsgálatok
 Számfeletti kromoszómák és
 ABL/BCR valamint TEL/AML1 meghatározásra
RT-PCR TEL/AML1 átrendeződés kimutatására

A pályázati periódus négy éve alatt 22 ALL-es gyermek genetikai vizsgálatát végeztük
el: 2002-ben 10, 2003-ban és 2004-ben hat-hat újonnan diagnosztizált gyermek vizsgálatára
került sor. A kezdeti genetikai diagnózis alapul szolgált a betegek prognosztikai megíté-
lésére: a hyperdiploid B csoportba tartozó (>51 kromoszómaszámú) és a TEL/AML1 átrend-
ződésű betegek prognózisa kedvező, míg a Ph pozitív és az MLL érintettséget (11q23) mu-
tatók kedvezőtlen kórlefojással járnak.

Citogenetikai vizsgálatot minden esetben elvégeztük, nyolc betegben sikertelenül.
Ezekben az esetekben a betegek prognosztikai jellemzésekor a DNS index értékére támasz-
kodtunk. A 16 sikerrel vizsgált beteg eredménye a következő volt:

	diploid (normal): 3
Összes citogenetilailag	hyperdiploid A (47-51): 0
sikeresen vizsgált beteg: 16	hyperdiploid B (>51): 2
	pseudodiploid: 7
	tetra-/közel-tetraploid: 2

A pseudodiploid betegek között egy egy esetben t(8;14) és t(1;19) transzlokációt, két
továbbiban 11q23 deléciót igazoltunk. A számfeletti kromoszómák között – várákozásunknak
megfelelően – a 17, 18 és 21 fordult elő.

A **DNS index** alapján 12 beteg tartozott a diploid, három a hyperdiploid B, egy a
tetraploid csoportba. A citogenetikai és DNS vizsgálat eredménye néhány esetben eltérést mu-
tatott, aminek oka, hogy a DNS index alapján az eltérő kisebb sejt populációk nem különíthe-
tők el.

Fenti vizsgálatainkat az utolsó két évben egyre nagyobb számban végzett **FISH és RT-PCR**
vizsgálattal egészítettük ki. A FISH-t centromer-specifikus próbák alkalmazásával a számfe-
letti kromoszómák meghatározására, gén-specifikus próbákkal a TEL/AML1, az ABL/BCR

átrendeződés és MLL transzlokáció/deléciónak igazolására használtuk. A TEL/AML1 átrendeződést RT-PCR-rel is igazoltuk.

Az egyidejűleg elvégzett FISH előnye, hogy a nem transzlokálódott allél deléciójának kimutatására is alkalmas.

A FISH két betegben MLL érintettséget, egy betegben TEL/AML1 átrendeződést mutatott.

RT-PCR vizsgálatot 13 betegben végeztünk: nyolc esetben negative, öt betegben pozitív eredményt kaptunk.

A különböző módszerekkel kapott eredmények összevetése igazolja, hogy pontos genetikai diagnózishoz a különböző módszerek párhuzamos elvégzése szükséges. Ó.

A 2002-ben vizsgált betegek prognosztikai adatai az országos program részeként kerültek értékelésre. Az utóbbi két év prognosztikai értékelése folyamatban van.

A FISH és RT-PCR összehasonlító elemzését nemzetközi folyóiratban kívánjuk közzéadni.

ALL-es betegek genetikai vizsgálatának eredményei (2002-2004)

betegek	citogenetika	DNS index	FISH	TEL/AML1 RT-PCR
2002				
1/02	47,XY,+1/46,XY,+1q-, -21/46,XY,+1q-,t(8;14)	1,04	Nem volt	Negatív
2/02	46,XY,-2,+mar/46,XY,+1,-2,-12,+mar	0,85	Nem volt	Negatív
3/02	83-92/46,XX	2,01	Nem volt	Pozitív
4/02	46,XY	Nem volt	Nem volt	Pozitív
5/02	Nem sikerült	0,97	Nem volt	Negatív
6/02	87-88/XXYY/45,XY,+mar[t(9;21)?]/46,XY	0,97	Nem volt	Negatív
7/02	46,XY/54-56,XY	1,19	Nem volt	Nem volt
8/02	Nem sikerült	Nem volt	Nem volt	Nem volt
9/02	46,XX,del(11)(q23)	1,04	MLL tran- szlokáció és deléción	Nem volt
10/02	46,XY	Nem volt	MLL génátren- deződésre negatív	Nem volt
2003				
1/03	46, XY,del(11)(q23)	1,00	Nem volt	Nem volt
2/03	52,XY,+17,+18,+21,+21,+22,+mar[67%] /46,XY [23%]	1,10	Nem volt	Nem volt
3/03	46,XX,-1,-B,-B,-D,+4mar[75%]/46,XX [25%]	1,11	Nem volt	Nem volt
4/03	sikertelen	1,24	Nem volt	Nem volt
5/03	sikertelen	1,02	Nem volt	Negatív
6/03	sikertelen	0,99	Nem volt	Pozitív
7/03	46,XX/46,XX, der(4)	0,97	Nem volt	Nem volt
2004				
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 tet- rasomia X trisomia	Nem volt
5/04	sikertelen	0,96	TEL/AML1 pozitív	pozitív
6/04	sikertelen	Nem volt	Nem volt	Negatív

4. A kezdeti genetikai vizsgálat diagnosztikai és prognosztikai jelentősége gyermekkori akut lymphoid leukaemiában (ALL): Az országos program 10 éves eredményeinek értékelése (1993-2002)

Előzmények, módszer

A gyermekkori akut leukaemia kezdeti genetikai diagnosztikája szerves része annak az általunk kezdeményezett országos programnak, amit 1993-ban indítottunk el a Magyar Gyermekorvosok Társasága Gyermekonkológiai Szekciója tíz központjának részvételével azzal a céllal, hogy minden hazánkban diagnosztizált akut lymphoid leukaemiás (ALL-es) gyermek kezdeti genetikai vizsgálata megtörténjen. Elsődleges célunk a kedvező prognózisú hyperdiploid (51 fölötti kromoszómaszámú), valamint az ugyancsak kedvező prognózisú t(12;21) transzlokációjú esetek elkülönítése és a szokásosnál kevésbé agresszív kezelése volt. Emellett jelentős a kedvezőtlen prognózisú Ph pozitív (ABL/BCR pozitív), valamint a t(4;11) –t (MLL/AF4 átrendeződést) hordozó esetek meghatározása a csontvelő transzplantáció szükségessége miatt.

Vizsgálati stratégiaként minden betegben a cytogenetikai vizsgálat és a DNS index meghatározás egyidejű elvégzését javasoltuk a diagnózis felállítása idején: sikertelen, vagy nem megfelelő minőségű kromoszóma preparátum esetén a számfeletti kromoszómák kimutatására a vizsgálat FISH módszerrel egészítendő ki. A t(12;21) transzlokáció, valamint az ABL/BCR átrendeződés kimutatására az RT-PCR és FISH módszer szolgál.

Az egyes genetikai alcsoportok betegeinek túlélését Kaplan-Meier szerint elemeztük, majd több prognosztikai faktor (kor, nem, kezdeti fvs, diagnózis ideje és helye, immunfenotípus, kezelés) figyelembe vételével multivariancia analízist végeztünk.

Az adatok részletes elemzésére a kiegészítő információk (túlélési adatok, folyamatban lévő vizsgálatok, stb.) összegyűjtése után 2004-ben volt lehetőségünk.

Eredmények:

Az 1993-2002 között 588 újonnan diagnosztizált ALL-es gyermek közül 537 esetében (91%) történt citogenetikai vizsgálat, 391 betegnél sikeresen (73%). A DNS-index meghatározására 265 (45%), a FISH elvégzésére 74 (13%), TEL/AML RT-PCR vizsgálatára 215 esetben (37%) került sor. A fenti vizsgálatok segítségével 456 betegben (78%) sikerült genetikai diagnózishoz jutnunk. A várhatóan kedvező prognózisú hiperdiploid B betegek aránya (80/456) mindössze 18% volt (irodalom: 30%), TEL/AML átrendeződést is csak 45/215 (18%) esetben igazoltunk. Univariancia analízissel a TEL/AML pozitív (82%) és a hiperdiploid B (76%) esetek eseménymentes túlélése szignifikánsan jobb volt a hipodiploid (54%), pseudodiploid transzlokációs (48%) és a tetraploid ill. TEL/AML szerkezeti eltéréssel társuló esetekénél (45%). Multivariancia analízissel legfontosabb negatív prognosztikai hatást a fejlődési rendellenességek, a magas kezdeti fvs, a kezelés késése ill. a specifikus transzlokációk hordozták.

A fenti eredmények alapján az alábbi megállapításokat tettük:

1. Az évek során egyre növekvő számban végeztek az egyes központokban citogenetikai vizsgálatokat és javult a sikeres vizsgálatok aránya.
2. A kóros kariotípusú esetek aránya elmarad az irodalmi adatoktól (30-35% vs 70%).
3. A felismert szerkezeti aberrációk aránya kisebb a vártnál, hiányos a finom aberrációk felismerése.
4. Kisebb a kedvező prognózisú esetek aránya feltételezett okok:

technikai nehézségek (rossz minőségű, kisszámú metafázis)

normál metafázisok szelekciója az értékelés során
DNS index hiánya (hyperdiploid esetek elkülönítésében, kóros populációk arányának meghatározásában stb. hasznos)

FISH kiegészítés döntő lehet:

- a hyperdiploid A és B, illetve hypodiploid DNS indexű esetek pontosításában,
 - a citogenetikailag sikertelen, vagy nem vizsgált esetek tisztázásában,
 - az egyedi kromoszómák identifikálásában
 - a transzlokációk kimutatásával (ABL/BCR, TEL/AML1, MLL) a diploid és pseudodiploid esetek elkülönítésében
5. Jelentősen nőtt a molekuláris genetikai vizsgálatok aránya (nélkülözhetetlen a Ph pozitív, az MLL, a TEL/AML1 esetek azonosításában, a MRD felismerésében).
6. A genetikailag eltérő alcsoportok prognózisa szignifikánsan különbözik:
legkedvezőbb a t(12;21) = TEL/AML1 átrendeződést hordozók, valamint a hyperdiploid B csoportba tartozók túlélése;
legrosszabb a pseudodiploid betegek prognózisa (Ph pozitív, t(4;11), tetraploiditás, komplex eltérések, t(12;21) tetraploid vagy pseudodiploid kariotípus mellett;

Eredményeink megerősítik azt a véleményünket, hogy a pontos genetikai diagnózishoz a citogenetikai vizsgálat, a DNS index meghatározás és a kiegészítő FISH vizsgálat párhuzamos elvégzése szükséges. Az értékelés során a vizsgálatok kombinációjának előnyét ki kell használni.

Fontos az egyes központokban végzett vizsgálatok koordinálása, a FISH vizsgálatok kiterjesztése és lehetőség szerinti centralizálása, továbbá mFISH előnyeinek kihasználása. Ehhez a kromoszóma lemezek -20°C -on tartása szükséges.

Publikáció:

Oláh, É.: Oncohaematológiai betegségek diagnosztikájának újabb lehetőségei. Gyermekanaesthesiológiai és Intenzív Terápia I. évf. No:1, pp.4-10., 2001.

Oláh, É., Jakab, Zs., Pajor L., Balogh E. és a Magyar Gyermekorvosok Társasága Gyermekonkológiai Szekciójának vezetői: Genetikai vizsgálatok diagnosztikai és prognosztikai jelentősége gyermekkori akut lymphoid leukaemiában (ALL) A szerkesztő felkérésére írt közlemény. Fókusz 2002

A 10 év tapasztalatainak összefoglalását a *Pediatr Blood Cancer* c. lapban kívánjuk közzé tenni (kézirat benyújtás előtt).

Ad 5. Minimális reziduális betegség (MRD) kimutatása

Az ALL-es betegek 75.80%-a remisszióba kerül, s többségük véglegesen gyógyul. A betegek egy részénél azonban relapszus következik be, végzetes kimenetellel. A relapszus azokból a reziduális tumorsejtekből indul ki, amelyek a csontvelő szokásos morfológiai vizsgálatával nem mutathatók ki. E tumorsejtek jelenlétének igazolására szolgál a real-time kvantitatív PCR.

A nemzetközi ajánlások figyelembe vételével a DE OEC Genetikai Központjával együttműködésében beállítottuk a MRD kimutatására szolgáló fenti módszert.

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 detektálásának érdekében, a központi adatbázis nagyban elősegíti a biztonságos, hosszú távú adattárolást, és az esetleges új munkatársak számára is azonnal áttekinthető, egyértelmű információs forrást biztosít.

Az adatbázisban jelenleg 23 páciens 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, beteg-specifikus szekvenciáját. Az II/5.-1. táblázat foglalja össze az eddig azonosított leukémia-specifikus génátrendeződéseket, betegek szerinti felbontásban. Ezek a szekvenciák szolgálták alapul a megfelelő RQ-PCR assay páciens-specifikus, forward primerjének megtervezéséhez. Ezek után az RQ-PCR assay-t karakterizáltuk és a reakciókörülményeket optimalizáltuk és a következő szempontok és elvárások szerint:

- A). Az assay érzékenysége: pontos **kvantitálást** tegyen lehetővé lehetőleg 10^{-4} -szeres hígításnál is, illetve a leukémiás sejteket egyértelműen, a poliklonális (PBMC, egészséges) háttértől jól elkülöníthetően **detektálja** 10^{-4} -szeres vagy 10^{-5} -szeres hígításnál.
- B). Az assay ne detektáljon poliklonális génátrendeződéseket, vagy a PCR ebből eredő háttere igen alacsony legyen.
- C). A PCR hatékonysága közel 100% legyen, azaz a kalibrálási egyenes meredeksége legyen -3.33 ; a $-3/-3.9$ tartományba eső értékek még elfogadhatók, amennyiben a korrelációs koefficiens ≥ 0.95 .

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 – illetve, hogy betegenként legalább egy megfelelő minőségű QPCR assay áll rendelkezésünkre a betegség monitorozásához.

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

Az előadás címe:

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

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 végezhetünk. 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. Figyelemreméltó, hogy a D15 mintában a két QPCR assay szignifikánsan különböző számú blasztsejtet detektált (tízszeres különbség!), ami arra enged következtetni, hogy a leukémiás sejtpopuláció oligoklonális.

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

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

II/5.-1. táblázat

II/5.-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

Ad 6. In vitro gyógyszerrezisztencia vizsgálatok gyermekkori akut lymphoid leukaemiában MTT teszt segítségével.

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

In vitro gyógyszerrezisztencia vizsgálatok gyermekkori akut lymphoid leukaemiában MTT teszt segítségével.

A témaválasztás indoklása

A gyermekkori ALL kedvező terápiás eredményei ellenére a betegek egy kisebb csoportja (25-30%) ma is terápia rezisztens betegségben, vagy az agresszív terápia toxikus mellékhatásai miatt hal meg. A terápia sikertelenségének hátterében a leukaemiás sejtek citosztatikum rezisztenciája, kedvezőtlen farmakokinetikai tényezők, valamint az intenzív kemoterápia korai mellékhatásai (csontvelő aplasia következményes infekciókkal és vérzésekkel) állnak. Mindezek mellett a kezelés késői toxikus mellékhatásaival (növekedési reatrdáció, gonad dysfunctio, cardiális toxicitás, második tumor stb.) is számolnunk kell. A kérdést, hogy mely esetekben szükséges az agresszív kemoterápia kockázatát vállalni, illetve mikor lehet eredményes egy enyhébb kezelési kombináció is, az un. prognosztikai faktorok, köztük a beteg biológiai sajátosságai (kor, nem, veleszületett genetikai betegség, immundeficiencia), a kórfolyamat előrehaladott volta (kezdeti fehérvérsejtszám, blasztarány, hepatosplenomegalia mértéke), a leukaemiás sejtek immunológiai és genetikai jellemzői alapján dönthetjük el (lásd 2.pont).

Valószínűsíthető, hogy a genetikailag különböző alcsoportok eltérő prognózisa azok eltérő gyógyszerérzékenységével függ össze. Ez a genotípusnak megfelelően megválasztott, genotípus-specifikus kezelés jelentőségére hívja fel a figyelmet. A daganatellenes terápia individualizálása céljából több celluláris citosztatikum rezisztenciát meghatározó in vitro módszer került kifejlesztésre.

Akut lymphoid leukémiában nem volt megbízható in vitro rezisztencia assay mindaddig, amíg számos laboratórium be nem vezette az MTT (metil-tiazol-tetrazólium) assay-t a lymphoid leukémiás sejtek gyógyszerérzékenységének tanulmányozására és nem optimalizálta a teszt körülményeit. A kolorimetriás teszt elve, hogy a sárga színű metil-tiazol tetrazólium festéket csak az életképes sejtek tudják arányos mértékben kék színű formazánná

alakítani. Kimutatták, hogy az ALL-es betegekben a diagnózis idején MTT teszttel igazolt gyógyszerérzékenység/rezisztencia összhangban van az in vivo gyógyszerérzékenységgel, azaz a betegség késői prognózisával.

Munkánk során a klinikánkon diagnosztizált ALL-es betegek MTT teszttel 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.

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 13 új ALL-es és 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:

Az alkalmazott módszert a 2004-es részbeszámolóban részletesen ismertettük.

Eredmények

2002. október és 2004. május között 10 új ALL-es és 3 relapsusos beteg esetében végeztünk sikeres gyógyszerrezisztencia meghatározást MTT teszt segítségével. Esetenként igen kevés sejt állt rendelkezésre, ezért ezekben a betegekben nem tudtuk a teljes citosztikumrezisztencia profilt vizsgálni. Elsősorban T sejtés ALL-ekben tapasztaltuk, hogy a kóros sejtek nehezebben voltak in vitro körülmények között életben tarthatók. A 4 napos inkubálás során a jelentős in vitro sejtszaporodás nem volt észlelhető.

A vizsgált betegek klinikai (kor, nem), haematológiai adatait (rizikócsoporthoz, prednison válasz), a genetikai és immunológiai jellemzőket összevetettük az in vitro gyógyszerérzékenységi adatokkal. A kapott LC50 értékek jelentős inter-individuális különbségeket mutattak. (II/6.-1.táblázat)

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

Ugyanakkor meglepő volt, hogy a magas rizikócsoporthoz 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. K.R					50	320	50		2.5
2. J.M.	4.7				50				
3. S.B.	0.05	0.0078	0.0845	0.208	0.499	54.37		0.000935	
4. M.V.	0.078		25.7	0.156					
5. H.R.	0.00142	0.0032	0.141	0.143	3.125	162.5	4.687	6	0.6
6. P.A.	0.5	0.4	35.4	0.105	0.78	480	4.843		2.5
7. Sü.B.	0.181	10	26.041	0.125					
8. Kó.Er	0.002861		1.885	0.0502					
9. Dév. A		0.016		0.00983		203.99		0.0078	
10. Bu.Jó	0.201	0.01039	10.442	0.1164					
11. BaR	0.203								
12. T.A.	0.000311		1.953		0.1953	113.5		0.1109	
13. K.L.	0.234	0.07174		0.0825				0.005563	

II/6.-1.táblázat

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

A témaválasztás indoklása

A leukémiák kezelése során alkalmazott cytostaticumok okozta cytopeniás időszak csökkentésére, a csontvelői regeneráció elősegítésére az adjuváns terápia részeként csontvelői stimuláló faktorokat, Granulocytá Colonia Stimuláló Faktort (G-CSF), Granulocytá-Monocytá Colonia Stimuláló Faktort (GM-CSF) alkalmaznak. Az alkalmazás empirikus módon megállapított dózisa és időtartama mellett nincs adat arra vonatkozóan, vajon módosítják-e és amennyiben igen, hogyan módosítják a növekedési faktorok a leukémiás sejtek cytostaticum érzékenységét, azaz a következő kezelés (cytostaticus blokk) eredményességét.

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 sejt vonal gyógyszerérzékenysége

KG-1 myeloid sejt vonalon 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. $3,1 \times 10^{-2}$ µg/ml
6. $7,8 \times 10^{-3}$ µg/ml

A sejt vonal érzékenynek bizonyult daunorubicinre, a sejt vonal 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.

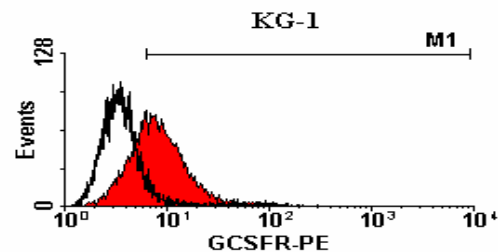
A jelenség magarázatát keresve, vizsgáltuk, vajon igazolható-e G-CSF receptorok jelenléte a KG1 sejtek felszínén? Vizsgálatunk során a KG1 sejtek felszínén G-CSF receptor jelenlétét igazoltuk (II/6.-1. ábra).

II/6 -1. ábra

G-CSF receptor meghatározás KG-1 sejt vonalon

Jelmagyarázat:

Piros tele: GCSF-R - PE
Fekete üres: IgG1 izotípus kontroll



A G-CSF esetleges *differenciáló hatásának* megítélésére a sejt felszíni 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.

A továbbiakban a receptor-szám, illetve affinitás változást kívánjuk vizsgálni.

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. Emellett kiemelendő, hogy az in vitro kapott LC50 értékekből nem következtethetünk a gyógyszerek egyedi alkalmazási dózisaira, ugyanis az in vivo jelenlévő gyógyszerkoncentrációk farmakokinetikai és farmakodinamikai tényezők befolyása alatt állnak. A teszt nem ad információt a gyógyszerek interakciójáról sem.

A Debreceni Gyermekklínika 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 sejt vonal modelljén tanulmányoztuk. A sejt vonal alkalmazásának előnye a vizsgálatok reprodukálhatósága.

A KG-1 sejt vonal érzékenynek bizonyult daunorubicinre, a G-CSF receptor jelenléte a sejtfelszínen antitest segítségével bizonyítható volt, ami alkalmassá tette citosztatikum-citokin interakció modellezésére.

A sejt vonal 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 ezt a hatást a G-CSF előkezelés tovább erősítette. A jelenség hatásmechanizmusának értelmezése céljából szükségesnek tartjuk vizsgálni a sejtfelszíni G-CSF receptor-szám 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 közölni (*Pediatr Blood Cancer*)

ad 7. Immunfenotípus és ploiditás vizsgálatok:

A munkacsoportunk által 1997 óta rutin-szerűen alkalmazott, kettős jelöléssel folytatott áramlási citometriát a továbbiakban a nemzetközi BFM munkacsoport ALL tanulmányának „non-MRD” ágát folytató országokkal együtt a minimális reziduális betegséget (MRD) kettős immunfluoreszcens jelölést követő áramlási citometriás detektáláson alapuló „mini-mini” pilóta-tanulmány ajánlásai szerint módosítottuk, bevezettük a leukaemiás lymphoblastok négy színű immunfluoreszcens analízisét. A kettős jelöléssel kapott adatokat prospektív módon összevetjük a Széchenyi projekt támogatásával kifejlesztett négyes jelölési technikával és a MRD vonatkozásában immunfluoreszcens módszerekkel nyert eredményeket összevetjük az időközben már beállított IgH nehézlánc gén és TCR gén átrendeződésének PCR-es meghatározásán alapuló molekuláris módszer adataival. Az eredmények kiértékelése a nemzetközi tanulmány részeként, annak befejezését követően lesz lehetséges.

A pályázat kapcsán az ALL-nél nehezebben vizsgálható AML differenciáldiagnosztikájára és az AML MRD vizsgálatára alkalmas immunfluoreszcens módszert fejlesztettünk ki:

Az immunfenotípus meghatározása AML-ben kevésbé hatékony differenciáldiagnosztikai és prognosztikai segítséget nyújt mint ALL-ben. Különösen kevésbé megbízható az M1/M2 FAB típusok elkülönítése az M4/M5 FAB típusoktól differenciálódási antigén expressziós profiljuk alapján. Vizsgálatunkban a leukocyták endotél felszínén való tovaördülésében („rolling”) alapvető szerepet játszó sejtadhéziós molekula, a PSGL-1 kifejeződését tanulmányoztuk kvantitatív áramlási citometriás módszerrel egészséges és kóros neutrophil granulocytákon, monocytákon, illetőleg csontvelői prekurzor sejtjeiken. Eredményeink szerint az egészséges, érett neutrophil sejtek felszínén $26\ 500 \pm 4\ 500$, a monocitákén $47\ 200 \pm 9\ 900$ PSGL-1 molekula található. Az AML M1 és M2 esetekből származó mieloblastok felszínén szignifikánsan kevesebb PSGL-1 molekula fejeződik ki ($12\ 000 \pm 5\ 300$) mint az egészséges neutrophil sejteken. Három, Ph1-pozitív CML akcelerációs fázisában szenvedő beteg mintáit tanulmányozva lehetőségünk nyílt olyan kevert sejtpopulációban tanulmányoznunk a PSGL-1 kifejeződés mértékét, amelyben jelentős arányban voltak jelen promyelocyták, myelocyták és metamyelocyták. A PSGL-1 molekulák száma ezeken a sejteken a myeloblastokon és az érett neutrophil granulocytákon meghatározott értékek közé esett. AML M4 és M5 eseteiben a leukaemiás monocyták és prekurzorai felszínén meghatározható PSGL-1 expresszió nem tért el szignifikánsan az egészséges monocytákétól és nem mutatott átfedést a leukaemiás myeloblastokkal. AML M4-ben PSGL-1 kifejeződésük alapján el tudtuk különíteni a leukaemiás myeloblastok és monoblastok szubpopulációit. Az azonos betegből származó csontvelői és perifériás véréredetű leukaemia sejtek PSGL-1 kifejeződése között nem volt különbség. Ezek alapján a kvantitatív PSGL-1 kifejeződés meghatározása hatékony segítséget nyújt az AML M1/M2 és az AML M4/M5 áramlási citometriával történő elkülönítésében.

Hármas immunfluoreszcens jelölés részeként a halvány PSGL-1 jelölődés pozitív CD 7 és CD 34 jelölődéssel korrelált, a myeloid prekurzorok erőteljes PSGL-1 festődése a CD 45 expresszió mértékével volt párhuzamos. A PSGL-1 kifejeződés vizsgálata 3-as, illetőleg 4-es immunfluoreszcens jelölési protokoll részeként lehetőséget nyújt az aberráns koexpressziót mutató reziduális leukaemia sejtek érzékeny kimutatásához, a minimális reziduális betegség detektálásához. A legalacsonyabb PSGL-1 kifejeződést ($6\ 000$ /sejt) két, lymphoid marker koexpressziót mutató kevert fenotípusú AML-es betegünk blaszt sejtjein észleltünk. A PSGL-1 expresszió vizsgálata értékes adatokat szolgáltathat ennek a betegcsoportnak a tanulmányozása során.

Eredményeinket nemzetközi folyóiratban közöltük.

Publikáció:

Kappelmayer J, Kiss A, Karászi É, Jakó J, Kiss C: Identification of P-selectin glycoprotein ligand-1 as a useful marker in acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol*, 2001, 115, 903-909. (IF: 2.815)

Ad.8. 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 myelopoietikusnak 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 proliferációt 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 következté-

ben. 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 (kézirat 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 sejtkulturák felhasználásával:

Félfolyékony primer és szekunder metilcellulóz kultúrában tanulmányoztuk 3 B-sejtes leukaemia sejtvonalt, 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 sejtvonalt 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 sejtfelszíni 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 sejtvonalakban és 2 de novo ALL sejtmintában. 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 expanziójában 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-sejtvonalt gyermekkori rosszindulatú betegségeiben.

Hasonlóan a B-sejtes leukaemia sejtvonalakhoz, 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.

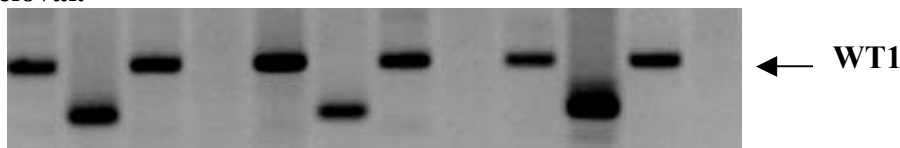
Eredményeinket nemzetközi folyóiratban tervezzük publikálni (kézirat előkészületben).

RP6.a. A minimális reziduális betegség monitorozása ALL-ben a WT1 expresszió alapján (Rásó E.-OOI).

A Gyermekonkológiai Munkacsoporttal kollaborációban tanulmányoztuk, hogy a WT1 expresszió nukleinsav-alapú (RT-PCR) kimutatása a perifériás vérben alkalmas-e a minimális

reziduális betegség kimutatására. Vizsgálatunkba 56 akut limfoid leukémiás (ALL) gyermeket és 22 más hematológiai betegségben szenvedő gyermeket vontunk be akik közül 20-at 2 éven át követtünk gyakorlatilag havonkénti vizsgálatokkal. Kimutattuk, hogy a WT1 expresszió csak leukémiában jelenik meg a perifériás vérben és még GM-CSF kezelés után sem jelennek meg ilyen sejtek a periférián. Az ALL-es betegek 96%-a bizonyult WT1+-nak ami függetlennek bizonyult a rizikócsoportoktól. Az indukciós kezelés végére amikor teljes klinikai remisszió alakult ki az esetek 8%-ban volt még WT1+-ás a periférián (molekuláris relapszus). A két év során a remisszióban lévő betegekben csak átmeneti (max. 2-hónapos) WT1+ volt észlelhető, míg a recidivált esetekben a WT1 expresszió hónapokkal megelőzte a betegség klinikai kiújulását és legalább 6 hónapos ismételt molekuláris relapszussal járt. Mindezek alapján megállapítottuk, hogy a WT1 expresszió molekuláris vizsgálata hatékony eszköze az ALL monitorozásának és fontos klinikai segítség a relapszus előrejelzésére (Magyarosy et al. 2002).

11. ábra. WT1 expresszió kimutatása ALL-es betegek perifériás vérében RT-PCR reakcióval.



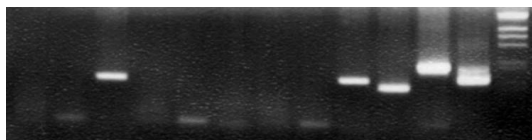
1,3,5,7,9,11= β -aktin kontroll, 2= K562 WT1+ kontroll, 4=7. eset, 6,8= 8.eset (D0 és D33), 10= 13.eset, 12= 17.eset

RP6/c. Humán papilloma vírus (HPV) lehetséges szerepének vizsgálata gyermekkori daganatok kialakulásában (Rásó E-OOI)

A gyermekkori Wilms tumor kialakulásának etiológiája nem ismert eltekintve a ritka familiáris formáktól (WT1 mutáció). Kísérleti rendszerben (újszülött patkány) bemutattuk, hogy HPV-fertőzött humán daganatsejtek transzplantálásával állati Wilms tumor indukálható, amelyben kimutatható a HPV E6E7 eleme. Jelen vizsgálataink során 22 arhivált Wilms tumor patológiai mintájában és 9 kontroll nem tumoros vesében vizsgáltuk meg az onkogén HPV E6E7 elemeit. Kimutattuk, hogy a kontroll vesékben HPV nincs jelen, míg a 22 Wilms tumoros szövetből 15-ben a HPV16/18/33 valamelyike molekuláris módszerekkel kimutatható (1. Ábra). Mindezek alapján felmerül, hogy az anyai HPV fertőzöttségnek gyermek-onkológiai jelentősége is lehet (Rásó et al.2001).

1. ábra. HPV-E6 expressziójának kimutatása humán Wilms tumorban (RT-PCR).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



1-2-3:case 1, 4-5-6: case 2, 7-8-9:case 3, 10:HPV16+, 11:HPV18+, 12:HPV33+ kontr

Az 1. és 3. esetben HPV33-E6 expresszió észlelhető.

Közlemények:

Magyarosy E, Sebestyén A, Tímár J. Expression of metastasis associated proteins CD44v3 and NM23-H1 in pediatric acute lymphoid leukemia. Anticancer Res 21:819-824, 2001

Rásó E, Tímár J, Gallai M, Szentirmay Z, Kovalszky I. Association of HPV-E6-E7 with an experimental rat and sporadic unilateral human Wilms' tumour. Med Ped Oncol 37:237, 2001 (abstract)

Magyarosy E, Varga N, Tímár J, Rásó E. Follow-up of minimal residual disease in acute childhood lymphoblastic leukemia by WT1 gene expression in the peripheral blood: The Hungarian Experience. Ped Hemat Oncol 20:65-74,2003

I. Alprojekt: Neuroblastoma szűrővizsgálatok a daganat korai felismerése céljából

ÖSSZEFOGLALÁS

A neuroblastoma minél korábbi stádiumban való felismerése céljából szűrővizsgálatot végeztünk Debrecen város 15 hónapos gyermekeiben a vizelet VMA koncentrációjának meghatározása segítségével. A vizeletgyűjtés nehézségeinek elkerülésére a vizsgálatot reggeli első vizeletből végeztük és kreatinin koncentrációra vonatkoztattuk. A meghatározás Biosystem assay segítségével történt.

A vizsgálat előkészítése (etikai engedély, ÁNTSZ engedély beszerzése, házi gyermekorvosok, védőnők és rajtuk keresztül a szülők tájékoztatása, ismertető, "Betegtájékoztató" elkészítése, a mintavételhez szükséges eszközök beszerzése és a módszer beállítása) 2000. második fél évében történt.

2000 októbertől 2004. októberig **468** gyermek vizeletének vizsgálatára került sor. A vizsgálati periódus alatt folyamatos kapcsolatot tartottunk a mintákat küldő debreceni házi gyermekorvosokkal. A Városi Egészségügyi Szolgálat közreműködésével elláttuk a rendelőket mintavevő eszközökkel, a kóros leleteket postáztuk, elvégeztük és értékeltük a vizsgálatokat, jeleztük a kontroll vizsgálatok eredményét. Évenként jelentést készítettünk az addigi eredményekről.

Valamennyi esetben 0,3-2,5mg/mmol közötti VMA indexet kaptunk, amely irodalmi adatok alapján (Soldin és mtsai, 1981) normális értéknek tekinthető.

A kapott vizeletmintákat 9-10 tesztsikkal (Gen 9 ill. Uricont) egyéb húgyúti problémák irányában is megvizsgáltuk. Két-két betegben fehérjét és ketonokat, 3 esetben gennyet, további egy-egy esetben nitritet, illetve vvt-t, valamint leukocyturiát igazoltunk.

Az eltérésekről a gyermekek házi gyermekorvosát értesítettük és további vizsgálatokat kértünk

Előzetes eredményeink alapján az alábbi következtetésekhez jutottunk:

- Neuroblastomára utaló kórosan magas VMA indexet egyik minta sem mutatott. Ez összhangban van a betegség alacsony incidenciájával.
- Meghatároztuk a hazai egészséges gyermekpopulációra a VMA index referencia tartományát, amely közel azonos a HPLC-s analízissel kapott értékekkel.
- Az általunk választott oszlopchromatographiás-fotometriás módszer beállítása és a referencia tartomány meghatározása előrelépést jelent a jövőben a szűrővizsgálatok értékelésében és a neuroblastomás betegek kezelésének nyomonkövetésében.
- Az egyéb vizeletanalízis eredményei alapján a gyermekkori vizeletvizsgálatok szűrő jellegű elvégzésének jelentőségét is hangsúlyozzuk.

RÉSZLETES ISMERTETÉS

A program lényege: 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.

Elméleti háttér, célkitűzések

A neuroblastoma (NBL) a primitív velőbarázda sejtjeiből kiinduló idegszövet eredetű daganat, amely gyermekkorban a leggyakoribb extracraniális neurogén szolid tumor. A gyermekkori malignus betegségek 8-10%-át adja. A betegek átlag életkora 2 év, a betegség incidenciája évente 10,5/1 millió 15 év alatti fehér gyermekek körében.

A betegség prognózisát a tumor biológiai jellemzőin (a tumor stádiuma, szövettani és genetikai jellemzők) túl az életkor alapvetően meghatározza: A csecsemőkori forma gyakori (kb.60%-ban) spontán regressziójával, benignus tumorrá történő spontán vagy indukált differenciálódásával szemben a későbbi életkorban csak az időben felismert daganat kezelhető eredményesen. Ez indokolta a szűrővizsgálatok bevezetését, amit az osztrák, amerikai és japán munkacsoportok 3 hetes és 6 hónapos csecsemőkben a vizelet katecholamin meghatározásával végeztek. A kiszűrt esetek spontán regressziója eredményeképpen az egy év fölötti neuroblastomás esetek száma nem változott.

A fenti megfigyelés alapján a projekt részeként szűrővizsgálatot kívántunk bevezetni a NBL korai kimutatására a fentieknél későbbi, 15 hónapos életkorban. Az időpont megválasztásában az a szempont vezetett bennünket, hogy a hazai oltási rendnek megfelelően 15 hónapos korban minden kisdad MMR védőoltást kap, s így mindenképpen felkeresi házi gyermekorvosát. A hazai védőoltások közel 100%-os lefedettsége biztosítékot látszott adni arra, hogy a szűrésben is teljes számban vesznek részt.

Elméletileg és klinikailag egyaránt fontosak a NBL-ás sejtek genetikai/biológiai tulajdonságainak feltárása. Ismert, hogy a tumorsejtekben jellemző, a prognózist meghatározó genetikai eltérések mutathatók ki.

A tumor-specifikus genetikai jellemzők:

- DNS index (diploid és tetraploid tumor kedvezőtlen, a triploid, illetve közel-triploid kedvező prognózisú)
- 1p deléció (jelenléte kedvezőtlen prognózist jelez)
- 17q duplikáció: legújabb adatok szerint a – törésponttól függően – a legfontosabb negatív prognosztikai paraméter
- N-myc amplifikáció

Az egyes daganatokra, sőt egy daganaton belüli különböző területekre a genetikai heterogenitás jellemző. Ezért az egyes daganatok részletes feldolgozása a prognózis meghatározása szempontjából alapvetően fontos.

A fentiek alapján az alprojekt célkitűzései a következők voltak:

1. *Szűrővizsgálatok végzése* 15 hónapos gyermekekben a vizelet vanil-mandulasav (VMA) ürítésének meghatározásával Debrecen városban.
Felelős: Dr V. Oláh Anna tud. főmunkatárs (laborvezető)
Közreműködők: a debreceni házi gyermekorvosok Dr Szövetes Margit vezetésével
2. A klinikailag felismert neuroblastoma genetikai jellemzése a prognózis meghatározása és az eredményesebb kezelés céljából
Felelős: Dr Oláh Éva
Közreműködők: Dr Szentirmay Zoltán (Országos Onkológiai Intézet)
Dr Németh Tamás (DE OEC Pathológiai Intézet)
Bessenyei Beáta (DE OEC Gyermekklinika, Genetikai Laboratórium)
Dr. P. Szabó Gabriella (klinikai orvos)
Dr. Árvai Krisztina (klinikai orvos)

BESZÁMOLÓ AZ ELVÉGZETT MUNKÁRÓL

Ad 1. Szűrővizsgálatok

A munka előkészítése, módszerek (2001. második félév):

- Engedélykérés a helyi ÁNTSZ-től a szűrés bevezetésére, illetve a védőnőkkel való kapcsolatfelvételre
- Kapcsolat teremtés a házi gyermekorvosokkal: tájékoztató elkészítése a projekt céljáról és az alkalmazandó módszerről, majd személyes találkozás kapcsán a program ismertetése
- Tájékoztató és betegbeleegyező nyilatkozat elkészítése
- Engedélykérés a DE OEC Kutatásetikai Bizottságtól
- Mintavételhez szükséges eszközök beszerzése
- Módszer beállítása.

A szűrés kivitelezése: (2002. január-2004. október)

A mintavétel módjáról a házi gyermekorvos kollégákat, s közvetítésükkel a szülőket tájékoztattuk.

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 összefoglalókat.

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 katecholaminok HPLC-s meghatározásának magas fajlagos költsége (4-6eFt/minta) miatt.

A vizelet VMA meghatározására alkalmazott Biosystem assay módszert (1 eFt/minta) lásd a korábbi részbeszámolómban! 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 előlötti cutoff (esetünkben 2,2-3,0 mg/mmol) közé ismétlés után 5 minta esett, amelyek a túlzott folyadékbevitel miatti alacsony kreatinin-nel, vagy a diéta elmulasztásával függhetnek össze.

A 3mg/mmol kreatinin körüli cutoff 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 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 fertőzés, diabetes mellitus irányába történő szűrésére.

Eredmények

VMA szűrés:

2000. októbertől 2004. októberig 468 15 hónapos gyermek vizeletmintájának vizsgálatára került sor.

2002. január 1. - 2002. szeptember 30.: 162

2002. október 1. - 2003. szeptember 30.: 132

2003. október 1. - 2004. október 15. : 174

Az alábbi vizsgálatok történtek:

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

Míg az első vizsgálati periódus 162 gyermeke mindegyikében 0,3-2,5mg/mmol közötti VMA indexet kaptunk, amely irodalmi adatok alapján (Soldin és mtsai, 1981) normális értéknek tekinthető, a második periódus 132 gyermeke közül *négyben (3%)* (1.táblázat), az utolsó periódus 174 gyermeke közül *kilenc (5%)* esetben az 1. mintában emelkedett VMA/kreatinin indexet számítottunk, ezért a vizsgálatot megismételtük. A négy gyermek közül kettőtől, az utóbbi 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.

Az utóbbi periódus egyetlen gyermekénél 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 negatív eredményt adott.

I/1. táblázat

1.	1. minta: VMA/kreat.: 4,01 mg/mmol,	v. kreat: 0,7 mmol/l
	2. minta: VMA/kreat.: 1,57mg/mmol	3,6 mmol/l
2.	1. minta: VMA/kreat.: 4,9mg/mmol	v.kreat.: 4,5mmol/l
	2. minta: VMA/kreat.: 0,7mg/mmol	v.kreat.: 8,9mmol/l
3.*	1. minta: VMA/kreat.: 10,2mg/mmol	v.kreat.: 0,28mmol/l
4.*	1.minta: VMA/kreat.: 3,35mg/mmol	v.kreat.: 1,063mmol/l

* A 3. és 4. gyermektől kontroll mintát nem kaptunk, de a kreatinin az ő esetükben is alacsony volt.

Vizelet kvalitatív vizsgálat:

A kapott vizeletmintákat valamennyi esetben 9-10 tesztsíkkal (Gen 9 ill. Uricont) egyéb húgyúti problémák irányában is megvizsgáltuk. A 468 mintából 41 esetben találtunk

kóros terméket a vizeletben: fehérjét és ketonokat, egy-egy esetben glükózt és fokozott ubg-t, három betegben nitritet, illetve vvt-t, valamint bakteriális fertőzést, leukocyturiát igazoltunk. Az eltérésről a gyermekek házi gyermekorvosát értesítettük és további vizsgálatokat kértünk. A kóros leletek aránya **20%** volt.

Következtetések:

- 468 gyermek vizeletmintájának VMA vizsgálata során 13 esetben észleltünk magas VMA/kreatinin arányt, ami 2,7%-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.
- Az általunk választott oszlopchromatographiás-fotometriás módszer beállítása és a referencia tartomány meghatározása előrelépést jelent a jövőben a szűrővizsgálatok értékelésében és a neuroblastomás betegek kezelésének nyomonkövetésében.
- 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.

Költség ráfordítás:

A vizsgálat betegenként 2467 német pontot jelent, ez összesen: 1 154 556 pont.

$1\,154\,556 \times 0,9 \text{ Ft} = 1\,039\,100 \text{ Ft}$.

A fenti feladatot négy laboratóriumi dolgozó végezte.

Emellett dologi kiadásként merül fel a műszerbeszerzés költsége: a használt fotométer a DE OEC KBMPI tulajdonában van.

Publikáció:

Árvai K, Tóth J, Németh T, Kiss C, Molnár P, Oláh É: Csecsemőkori nyaki lokalizációjú neuroblastoma. Magyar Onkológia, 2004, 48, 89-95.

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.

Ad 2. A klinikailag diagnosztizált neuroblastomás gyermekek genetikai vizsgálata

A tervezett vizsgálat az elmúlt 5 évben klinikánkon kezelt NBL-ás gyermekek parafinos blokkjainak retrospektív vizsgálatát, másrészt az újonnan diagnosztizált esetek műtétilag eltávolított daganatmintáinak vizsgálatát foglalta volna magába.

2002: Előkészítő munka:

- A Gyermekklinika haematológiai/onkológiai osztályán elmúlt években kezelt NBL-ás gyermekek névsorának összeállítása
- A Pathológiai Intézet munkatársának (Dr Németh Tamás) közreműködésével az említett gyermekek korábbi szövettani mintáinak összegyűjtése.
- A paraffinba ágyazott blokkokból metszetek készítése
- A genetikai vizsgálatokhoz szükséges próbák beszerzése
(1p36-specifikus, 1cen-specifikus
17q több régiójára specifikus és 17 cen specifikus próbák
N-myc és 2cen-specifikus próbák beszerzése)
- Módszerek beállítása:
DNS index meghatározás: Feulgen reakció (Pathológiai Intézet)
1p deléció és 17q duplikáció: double colour FISH
N-myc amplifikáció: PCR és in situ hibridizáció

A vizsgálatok végzése (2002.szept- 2003):

A fenti módszerek a laboratóriumban rendelkezésre állnak. A munkatársak szakmailag a feladat elvégzésére felkészültek. A vizsgálati minták előkészítése megtörtént.

Időközben a hazai Gyermekonkológiai Munkacsoport döntése értelmében a neuroblastoma genetikai vizsgálatára országos központként a Pécsi Tudományegyetem Pathológiai Intézetét jelölték ki. Ezért a neuroblastomás blokkok vizsgálata helyett a munkacsoport aktivitását a 2. sz. Alprojekt, az akut lymphoblastos leukémia vizsgálatára helyeztük át.

A témához kapcsolódó publikáció:

Árvai K., Tóth J., Németh T., Kiss Cs., Molnár P., Oláh É.: csecsemőkori nyaki lokalizációjú neuroblastoma. Magyar Onkológia, 2004, 48, 89-95

A PÁLYÁZATHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

1. Árvai K., Tóth J., Németh T., **Kiss Cs.**, Molnár P., **Oláh É.**: 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. I. Benkő, P. Kovács, I. Szegedi, A. Megyeri, A. Kiss, E. Balogh, **É. Oláh**, J. Kappelmayer, **Cs. Kiss**: Effect of myelopoietic and pleiotropic cytokines on colonyformation by blast cells of children with acute lymphoblastic leukemia. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363:5, 499-508, 2001. (IF: 2,869)
5. Gyórfy A, Kovács T, Szegedi I, Oláh E, Kiss C: Sweet Syndrome Associated with 13-cis-retinoic acid (Isotretinoin) Therapy. *Med Pediatr Oncol* 2003, 40, 135-136. (IF: 1.737)
6. Z. Jakab, E. Balogh, **C. Kiss, É., Oláh**: Epidemiologic studies in a population-based childhood registry in North-East Hungary. *Med. Pediatr. Oncol.* 38:338-344, 2002. (IF: 1,216)
7. Z. Jakab, E. Balogh, **É. Karászi**, J. Kappelmayer, **Cs. Kiss, É. Oláh**: Variant translocation of 11q23 in Infant Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL): Do Outcomes Differ From t(4;11)? *Med. Ped. Oncol.* 39:63-65, 2002 (IF: 1,216)
8. 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)
9. Z. Jakab, E. Balogh, **C. Kiss, É. Oláh**: Drug resistance testing by MTT-assay in childhood acute lymphoid leukemia. *Cytometry* 46/3: 209, 2001. (IF: 2,843)
10. Kappelmayer J, Kiss A, Karászi É, Jakó J, **Kiss C**: Identification of P-selectin glycoprotein ligand-1 as a useful marker in acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol*, 2001, 115, 903-909. (IF: 2.815)
11. Kiss C, Kiss M, Szegedi I, Árvai K, Tóth J, Oláh E: Interferon-alpha Therapy in Children with Malignant Diseases: Clinical Experiences in 24 Patients treated in a Single Pediatric Oncology Unit. *Med Pediatr Oncol*, 2002, 39, 15-119. (IF:1.216)
12. Kiss C, Benkő I, Kovács P: Leukemic cells and the cytokine patchwork. *Pediatr Blood Cancer*, 2004, 42, 113-121. (IF: 1,737)
13. **Oláh, É.**: Oncohaematológiai betegségek diagnosztikájának újabb lehetőségei. *Gyermekanaesthesiológiai és Intenzív Terápia* I. évf. No:1, pp.4-10., 2001.
14. **Oláh, É.**, Jakab, Zs., Pajor L., Balogh E.. és a Magyar Gyermekorvosok Társasága Gyermekonkológiai Szekciója Központjainak vezetői: Genetikai vizsgálatok diagnosztikai és prognosztikai jelentősége gyermekkori akut lymphoid leukaemiában (ALL) A szerkesztő felkérésére írt közlemény. *Fókusz* 2002, IV.évf. 3.szám, 19-27.

Összesített IF: 19, 821

Előadás nemzetközi kongresszuson:

Oláh É.: Early diagnosis of childhood malignancies. *Europediatrics*, 2003, Prága

Oláh É.: Late effects of cancer chemotherapy in long-term survivors. What are the reasons for the generalist? *Europediatrics* 2003, Prága