

Aleksander B. Skotnicki
Katedra i Klinika Hematologii
Collegium Medium
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Address for correspondence/
Adres do korespondencji:
Prof. dr hab. med.
Aleksander B. Skotnicki
Katedra i Klinika Hematologii
Collegium Medium Uniwersytetu
Jagiellońskiego
ul. Kopernika 17, 31-501 Kraków
tel./fax 12 424 74 26
e-mail: alekskot@cm-uj.krakow.pl

Received: 02.02.2010
Accepted: 01.03.2010
Published: 10.03.2010

Myelo- and immunotropic properties of thymic hormones – clinical use in hematology and oncology

Mielo- i immunotropowe właściwości hormonów grasiczych – zastosowanie kliniczne w hematologii i onkologii

Review article/Artykuł poglądowy

Summary

The concept of using the thymomimetic drugs in haematology and oncology is based on growing body of evidence of the role of thymus and its hormones in control of immune reactivity. Thymic hormones take part in the immune reaction against several pathogens and are important in recognition and immune attack towards cancer cells expressing neoantigens. The present article describes the results of both experimental and clinical studies of calf thymus extract purified and produced in Poland as Thymus Factor X(TFX)* since 1976. TFX express typical activities of thymic hormones and was found to reveal the therapeutic effectiveness in patients with bone marrow insufficiencies of different origin as well as in patients with several malignant diseases improving their clinical status and prolonging survival. Apart from the results of obtained by Polish authors with TFX the article presents also similar observations performed by American, European and Chinese researchers with other thymomimetic preparations.

Key words: thymic hormones, hematopoiesis, leukemias, lymphomas, solid tumors

Streszczenie

Idea zastosowania leków immunotropowych w hematologii i onkologii wiąże się z coraz lepiej poznawaną rolą grasicy i jej hormonów w sterowaniu mechanizmami immunologicznymi. Jak wiadomo mają one istotne znaczenie w reaktywności immunologicznej przeciwko różnym patogenom, jak i pozwalają na rozpoznanie i immunologiczne atakowanie powstających komórek nowotworowych o właściwościach obcoantygennych.

Obecny artykuł przedstawia wyniki tak badań doświadczalnych, jak i wyniki obserwacji klinicznych zastosowania produkowanego w Polsce od roku 1976 preparatu grasiczopochodnego o nazwie THYMUS FACTOR X (TFX)*.

Potwierdzają one aktywność TFX typową dla hormonów grasiczych, jak i wskazują na skuteczność terapeutyczną u chorych z hipoplazją szpiku i cytopenią obwodową, jak również wpływają pozytywnie na stan kliniczny i przedłużenie czasu przeżycia u chorych z różnymi typami nowotworów.

Niezależnie od badań polskich autorów stosujących preparat TFX, w artykule przedstawiono równolegle prowadzone badania autorów amerykańskich, zachodnioeuropejskich i chińskich z podobnymi preparatami grasiczopodobnymi.

Słowa kluczowe: hormony grasicze, krwiotworzenie, białaczki, guzy lite

STATISTIC STATYSTYKA

Word count Liczba słów	2556/2518
Tables Tabele	1
Figures Ryciny	2
References Piśmiennictwo	49

* TFX is a fraction of polipeptides of molecular weight between few and up to teen kD, isolated from calfs' thymic glands with methods like ultrafiltration, molecular filtration and nanofiltration. Among the peptides of TFX thymosin alpha-1, thymosin beta-4 and their chains' fragments were found. The TFX specimen was worked out in POLF Pharmaceuticals, Jelenia Góra in 1976. The technology of preparation of "immune resistance stimulator specimen from calfs' thymic glands" is patented since 1981 (Pat.nr 108714). It was approved for commercial use in 1983 and nowadays in so called EU harmonization process is approved by Pharmaceutical Inspector General since 15.12.2008. Currently in production by Finepharm Ltd. In Jelenia Góra.

TFX jest frakcją polipeptydów o ciężarze cząsteczkowym od kilku do kilkunastu kD izolowanym z grasicy cielęcej z zastosowaniem ultrafiltracji, sączenia molekularnego i nanofiltracji. Wśród peptydów wchodzących w skład preparatu TFX wykryto tyrozynę alfa 1, tyrozynę beta 4 oraz fragmenty tych peptydów. Preparat TFX został opracowany w Zakładach Farmaceutycznych POLFA w Jeleniej Górze w 1976 r. Sposób otrzymywania „preparatu z grasicz cielęcych stymulującego odporność” został opatentowany w 1981 r. (opis patentu nr 108714). Został dopuszczony do obrotu w Polsce w 1983 roku, a obecnie w ramach tzw. harmonizacji w Unii Europejskiej został dopuszczony do obrotu decyzją Głównego Inspektora Farmaceutycznego z dnia 15 XII 2008. Obecnie wytwarzany jest drogą tej samej co wyjściowo technologii przez spółkę Finepharm SA w Jeleniej Górze.

The influence of thymus on hematopoiesis was observed by many authors in various experimental studies. In both neonatally thymectomised mice and lacking thymus naked mice lower mitotic activity and inhibited maturation of bone marrow cells were discovered [1,2]. Morphologic signs of this were increased counts of blastic cells and in functional aspects – impaired colony forming and thus decreased ability to repopulate lethally irradiated syngenic hosts/receptients [3].

A reversal character of thymectomy-induced reduction of proliferation and clonogenic activity of bone marrow cells was experimentally shown in implantation of thymic tissue, while injections of thymic cells were almost ineffective [4]. These experiments proved an important role of thymus on hematopoietic cells population in the marrow. Next studies revealed humoral path, when thymic hormone reversed the suppressive influence of thymectomy on DNA synthesis in colony forming cells of bone marrow [5].

In vitro culture of bone marrow cells from thymectomized mice in the presence of thymic hormone rises the number of stem cells producing DNA to a level comparable to the one observed in normal mice [6]. Stimulation of these cells to enter the cellular cycle by thymic hormone lasts an hour from its introduction to the culture, resembling – from a kinetic point of view – effects of other hormones, pharmaceuticals and PGE2.

The mentioned above observations suggest humoral control of thymus over proliferation and differentiation of hematopoietic cells, independent to already known hormonal activity in lymphocytes' T population.

Coexistence of thymoma and selective erythropoietic hypoplasia in human pathology also postulate the position of thymus in control of hematopoiesis in both children and adults. Proliferative hemocytopathies, mainly lymphomas, in children with inborn thymic dysplasia are also known [7]. Additionally, thymic hypoplasia often appears with congenial plastic anaemia [8], while dysplasia of this organ was stated on autopsies in 17 of 16 cases (8%) of leukemia [9].

The relations between thymus and hematopoiesis inspired us to experimental and clinical studies on the influence of TFX on hemopoiesis [10].

The effect of TFX on hematopoiesis was tested in 7-days cultures of bone marrow in semi-liquid agar. Synthesis of CSF (hematopoietic Colony Stimulating Factor) in human lymphocytes was estimated through the ability of this cytokine to formation of myeloid colonies by mononuclear circulating blood cells. A significant TFX-induced increase of CSF was discovered [11].

Wpływ grasicy na przebieg hemopoezy został zaobserwowany przez wielu autorów w licznych badaniach doświadczalnych. U neonatalnie tymektomizowanych myszy i szczurów oraz u bezgrasiczych nagich myszy zaobserwowano zmniejszoną aktywność mitotyczną i zahamowanie dojrzewania komórek szpiku kostnego (1,2). Wyrażało się to morfologicznie wzrostem liczby blastów, a funkcjonalnie – upośledzeniem zdolności do tworzenia kolonii, a tym samym zmniejszoną zdolnością do repopulacji letalnie napromieniowanych syngenicznych biorców (3).

Wykazano, że zmniejszenie aktywności proliferacyjnej i klonogennej komórek szpiku w wyniku przeprowadzonej tymektomii może zostać odwrócone dzięki implantacji tkanki grasiczej, podczas gdy iniekcje komórek grasiczych nie powodują istotnych zmian (4). Badania te dowodzą, że grasicca wywiera istotny wpływ na populację hemopoetycznych komórek szpiku. Następnie wykazano na drodze humoralnej, że podawanie hormonu grasiczego odwraca supresyjne działanie tymektomii na syntezę DNA w zdolnych do tworzenia kolonii komórkach szpiku (5).

W badaniach przeprowadzonych in vitro zaobserwowano, że hodowla komórek szpiku tymektomizowanych myszy w obecności hormonu grasiczego doprowadza do wzrostu odsetka komórek pnia syntetyzujących DNA do podobnego poziomu, jak u prawidłowych myszy (6). Wprowadzanie tych komórek przez hormon grasiczy do cyklu komórkowego zachodzi w przeciągu godziny od założenia hodowli, przypominając – z kinetycznego punktu widzenia – efekt wywierany przez niektóre hormony, leki i prostaglandynę E2.

Powyższe spostrzeżenia dowodzą humoralnego wpływu grasicy na kontrolowanie przebiegu proliferacji i różnicowania komórek hemopoetycznych, niezależnie od znanego już wpływu hormonalnego na populację limfocytów T.

Również współwystępowanie grasiczaka i wybiórczej hipoplazji układu czerwono-krwinkowego w patologii człowieka stanowi argument na rzecz roli odgrywanej przez grasicę, tak u dzieci jak i u dorosłych w kontrolowaniu krwiotworzenia. Znane jest także częste występowanie proliferacyjnych hemocytopatii – głównie chłoniaków – u dzieci z wrodzoną dysplazją grasicy (7). Ponadto, hipoplazja grasicy często współistnieje z wrodzoną anemią plastyczną (8), podczas gdy dysplazję tego narządu stwierdzono w autopsji u 17 na 16 (8%) chorych cierpiących na białaczkę (9).

Istniejące zależności pomiędzy grasicą i procesem krwiotworzenia skłoniły nas do badań doświadczalnych i klinicznych oddziaływania TFX na hemopoezę (10).

Wpływ TFX na krwiotworzenie badano w 7-dniowych hodowlach szpiku w półpłynnym agarze. Oceniano produkcję CSF (czynnika stymulującego tworzenie kolonii hemopoetycznych) przez ludzkie limfocyty w oparciu o zdolność tej cytokiny do stymulacji tworzenia kolonii mieloidalnych przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej. Stwierdzono, że TFX zwiększał istotnie wytwarzanie CSF (11).

In the next step colony formation by lymphocytes T (L-CFUT) was studied *in vitro*, stimulating murine splenocytes and human blood lymphocytes with phytohemagglutinine (PHA). TFX evoked a statistically significant increase of the lymphoid colonies count *in vitro*. The influence of TFX on human lymphopoiesis was determined by preceding proliferative ability of the lymphocytes in response to PHA stimulation. Whenever the proliferative index was high, TFX did not alter the number of lymphocyte colonies, while in low index situation, application of TFX effectively rose the number of colonies.

Further investigations focused on creation of lymphocytes B colonies (L-CFUB) in splenic cells stimulated with 2-mercaptoethanol. Use of TFX effectively increased the number of created lymphocyte B colonies, especially in 500 ug/ml concentration.

The *in vivo* influence of TFX on hematopoiesis was studied in prepared mice, administered earlier with TFX. In the evaluation of hematopoietic potential of bone marrow and splenic cells, TFX increased lymphopoiesis B and T, as well as myelopoiesis in the spleen, compared to control animals achieving bovine serum albumin.

Later on other authors confirmed the influence of TFX on murine and human myelopoiesis [12,13].

Considering lympho- and granulopoietic properties of TFX, attention was paid to its potentially protective effect against irradiation [14,15].

Intraperitoneal injection of TFX to white Swiss mice (0,5mg per animal) for 7 days increased their survival time after a single exposure to 450 or 550R of gamma radiation (Co60). The effect was not observed in higher doses of radiation: 659, 750, 850R. The effectiveness of TFX became more pronounced, when given before irradiation – the semi-lethal dose LD50/35 could be increased from 390 to 490R. The influence of TFX on longer survival of irradiated mice may relate to bone marrow and immune system stimulation [16]. These observations gave base to clinical application of TFX in the trials of increasing the organic tolerance to ionizing radiation applied for therapeutic purpose [17].

CLINICAL STUDIES

The evaluation of TFX influence on weakened leukopoiesis started before hematopoietic growth factors were achievable. A total of 123 patients with primary plastic anemia, myelodysplastic syndromes, secondary leukopenia, pancytopenia. These resulted from toxic marrow lesions related to application of antibiotics, cytostatics, anticonvulsive, antirheumatic, and antithyroid drugs, as well as irradiation, underwent clinical trials.

Następnie badano tworzenie kolonii limfocytów T (L-CFUT) stymulując *in vitro* fitohemaglutyniną (PHA) mysie splenocyty i ludzkie limfocyty z krwi obwodowej. TFX spowodował statystycznie znamiennej wzrost liczby mysich kolonii limfoidalnych *in vitro*. Wpływ TFX na ludzką limfopoezę był zależny od uprzedniej zdolności proliferacyjnej limfocytów w odpowiedzi na stymulację PHA. Gdy wskaźnik ten był wysoki, TFX nie wpływał na zmianę liczby kolonii limfocytów, a gdy był niski – obecność TFX wydatnie zwiększała liczbę kolonii.

W dalszych doświadczeniach badano tworzenie kolonii limfocytów B (L-CFUB) w wyniku stymulacji komórek śledzionowych 2-merkaptioetanolem. Obecność TFX wydatnie zwiększała liczbę tworzonych kolonii B-limfoidalnych, zwłaszcza przy stężeniu 500 ug/ml.

Wpływ *in vivo* TFX na hemopoezę badano oceniając spreparowane myszy, którym uprzednio podawano TFX. Ocena potencjału hemopoetycznego komórek szpiku i śledziony wykazała wpływ TFX na wzrost limfopoezy T i B oraz mielopoezy w śledzionie w porównaniu do kontrolnej grupy zwierząt, którym podawano surowiczą albuminę bydłą.

Później także i inni autorzy potwierdzili wpływ TFX na przebieg mysiej i ludzkiej mielopoezy (12,13).

Ze względu na limfo i granulopoetyczne właściwości TFX zwrócono uwagę na jego możliwe działanie zabezpieczające przed promieniowaniem radioaktywnym (14,15).

Śródotrzewnowe podawanie TFX białym szwajcarskim myszom (w dawce 0,5 mg na zwierzę) przez okres 7 dni wydłużyło ich czas przeżycia po ekspozycji na pojedynczą dawkę 450 lub 550 R promieniowania gamma (Co60). Podobnego efektu nie zaobserwowano przy zwiększeniu dawki promieniowania do 659, 750 i 850 R. Działanie TFX było bardziej widoczne, gdy preparat podawano przed naświetlaniami – wówczas półletalna – dawka LD 50/35 mogła być zwiększona z 390 do 490 R. Wpływ TFX na wydłużenie czasu przeżycia napromieniowanych myszy może wiązać się ze stymulacją komórek szpikowych i układu immunologicznego (16). Obserwacja ta stanowiła asumpt do badań nad wykorzystaniem TFX w praktyce klinicznej do prób wzmocnienia tolerancji ustroju na dawki promieniowania jonizującego stosowanego z przyczyn terapeutycznych (17).

BADANIA KLINICZNE

Oceniając wpływ TFX na osłabioną leukopoezę – co miało miejsce w okresie przed dostępnością hemopoetycznych czynników wzrostu – przeprowadzono szereg prób klinicznych u ogółem 123 chorych, w tym – z pierwotną anemią plastyczną, zespołami mielodysplastycznymi oraz wtórną leukopenią i pancytopenią spowodowanymi przez uszkodzenie szpiku czynnikami toksycznymi, takimi jak: antybiotyki, cytostatyki, leki przeciwpadaczkowe, przeciwreumatoidalne i przeciwtarczycowe oraz promieniowanie.

Use of TFX brought recovery from iatrogenic marrow lesions in 60-70%. Normalized blood smear and counteracted potential myelosuppressive results of the continued radiotherapy. Increase of granulocytes count preceded thrombocyte restoration. Next tests revealed in most cases increased cellularity and correct maturation of the precursor blood cells, even in patients resistant to earlier conventional long lasting myelotropic therapy (vit. B6, folic acid, lithium, androgens, glucocorticoids) [18].

In the patients with chronic lymphocytic leukemia, treated with TFX to stimulate their weak immune reactivity, decrease of total lymphocytosis and increase of lymphocytes rate as well as higher level of immunoglobulins and reversion of the negative Tb-test were observed, repeatable increase of reticulocytosis and in consequence erythrocytosis developed [19,20].

Other medical centers turned their attention to both immune and myelostimulating potential of the thymus-derived preparations [21]. Applications in various groups of patients were tested, especially with neoplasms after antiproliferative treatment [22,23]. The studies ran in Lublin and Warsaw on 25 patients with multiple myeloma in remission after chemotherapy, revealed that TFX given for 37 months improves life quality and reduces rate of infectious complications. Reversion of tuberculin anergy was also stated. These authors emphasized also, that maintaining remission with chemotherapeutic cycles alternately with TFX-based immunomodulatory treatment improved both hematologic and immunologic tolerance of the next cycles and reduced the risk of metastasis and thus prolonged patients' survival [24].

The research in Cracow showed, that even in advanced (stage III or IV) malignant granulomatosis, use of TFX increased absolute lymphocytes count (even in patients with histological lymphocyte depletion), improved lymphocyte T-dependent cellular resistance (reversion of skin tuberculine anergy and DNCB, increased in vitro proliferative response to PHA) and better hematologic tolerance in patients given radiotherapy or cytostatic drugs at a time.

Application of TFX in patients with co-existing bacterial or viral infection became a positive augmentation of anti-infection treatment [25].

Advanced malignant granulomatosis, referred to as hypolymphocytic hypothyroid syndrome seemed to be most susceptible to therapy with thymus-derived factors, applied either together with or after conventional therapy [26].

Podanie TFX przyniosło odbudowę jatrogennych uszkodzeń szpiku w 60-70% badanych przypadków. Spowodowało również normalizację obrazu krwi obwodowej i przeciwdziałało potencjalnym mielosupresyjnym skutkom kontynuowanego napromieniowania. Wzrost liczby granulocytów poprzedzał wzrost liczby płytek krwi. Kolejne badanie obrazu szpiku wykazało, w większości przypadków, zwiększoną komórkowość i prawidłowe dojrzewanie prekursorowych komórek krwi, nawet u pacjentów uprzednio opornych na wielotygodniowe konwencjonalne leczenie mielotropowe [wit B6, kwas foliowy, lit, androgeny, glikokortykoidy] (18).

U chorych z **przewlekłą białaczką limfocytową**, którym podawano TFX w celu stymulacji osłabionej reaktywności immunologicznej, obserwowano zmniejszenie całkowitej limfocytozy, wzrost odsetka limfocytów jak i poziom immunoglobulin oraz rewersje ujemnych testów skórnych na Tuberkulozę, obserwowano powtarzalny wzrost liczby retikulocytów, a w konsekwencji erytrocytów (19,20).

Również w innych ośrodkach zwrócono uwagę na nie tylko immuno-, ale i mielostymulujący wpływ preparatów grasiczopochodnych (21). Oceniano go w różnych grupach chorych, zwłaszcza u pacjentów ze schorzeniami nowotworowymi poddanych chemioterapii antyproliferacyjnej (22,23). Badania przeprowadzone przez ośrodek warszawski i lubelski u 25 chorych ze **szpiczakiem mnogim** w okresie pochemioterapeutycznej remisji choroby wykazały, że podawanie TFX przez 37 miesięcy wpływa na poprawę jakości życia oraz zmniejsza częstość powikłań infekcyjnych. Stwierdzono ponadto rewersję anergii tuberkulinowej. Autorzy podkreślają, że podtrzymywanie remisji choroby cyklami chemioterapii podawanymi naprzemiennie z leczeniem immunomodulacyjnym za pomocą TFX poprawia hematologiczną i immunologiczną tolerancję kolejnych cykli chemioterapii i zmniejsza ryzyko nawrotu schorzenia, tym samym przedłużając czas przeżycia (24).

Obserwacje przeprowadzone w ośrodku krakowskim wykazały u chorych z **zaawansowaną postacią ziarnicy złośliwej** (stadium III i IV) podawanie TFX powodowało wzrost bezwzględnej liczby limfocytów (nawet u pacjentów z histologicznym obrazem deplekcji limfocytarnej), wzrost odporności komórkowej zależnej od limfocytów T (rewersja ujemnych testów skórnych na tuberkulinę i DNCB, zwiększenie odpowiedzi proliferacyjnej in vitro na fitohemaglutyninę) oraz poprawę tolerancji hematologicznej u chorych poddawanych równocześnie radioterapii lub otrzymujących leki cytostatyczne.

Podawanie TFX chorym z współistniejącym zakażeniem bakteryjnym lub wirusowym okazało się pełnić pozytywną rolę wspomagającą leczenie przeciwinfekcyjne (25).

Zaawansowana postać ziarnicy złośliwej, określana jako zespół hipolimfocytarnego hipotyzmu wydaje się być najbardziej podatną na wpływ terapii czynnikami grasiczopochodnymi, stosowanymi łącznie lub po zakończeniu konwencjonalnej terapii (26).

An opened randomized prospective clinical trial was done in Medical University of Poznan. A total number of 135 patients with primary lung cancer were introduced into the study. In histological samples, there were 96 cases of non-differentiated cancer, 37 squamous cell carcinomas, 2 adenocarcinomas. In randomization 53 patients were elected to TFX-group, while 82 remained in the control group [27].

Twelve patients in TFX group and 28 in the control group were given conventional treatment for cancer dissemination or another co-existing disease. In the control group patients were given symptomatic treatment only, in the TFX group – intramuscular injections of TFX were given twice a week, for total 10 weeks period.

Application of TFX caused both subjective and objective improvement in 10 of 12 patients. The improvement correlated with inhibition of local growth of tumor and metastases to the mediastinal lymph nodes and other organs. In 3 patients regression of tumor mass was observed. The 6-months survival rate in TFX group was 42%, compared to 7% in the control group.

Patients with less advanced bronchial cancer (N=95) underwent cobalt radiotherapy (Co60). They were randomly divided to a either control group and achieved only radiotherapy (N=54) or to study group given TFX for 5 months (N=41). Use of TFX increased both 6- and 12-months survival rates (69% and 38%) when compared to the irradiated only (31% and 7% respectively).

Interestingly, in 39% of TFX group patients (total dose 300mg) reversion of skin tuberculin anergy developed, in comparison to 12% in the control group. Restoration of cellular resistance was linked with longer mean survival time from 13,2 months to 18,4 months in patients scheduled for both radiotherapy and TFX. In the control group analogous periods were 7,2 and 8,8 months.

A major improvement of hematologic tolerance to radiotherapy was observed as well. With a combined radiotherapy and TFX application less patients experienced anemia and leukopenia [28].

In conclusion, therapy with TFX of myelo-and immune stimulating potential can result in better hematologic and immunologic tolerance in radio- and chemotherapy of malignant tumors.

In 50 patients with inoperative colon cancer a prolonged therapy with TFX gave rise of granulocytes and lymphocytes count and longer survival time [29].

W Akademii Medycznej w Poznaniu przeprowadzono otwartą randomizowaną prospektywną próbę kliniczną w grupie 135 chorych z **pierwotnym rakiem płuca**. Histologicznie grupa ta składała się z 96 przypadków raka niezróżnicowanego, 37 przypadków raka płaskokomórkowego i 2 przypadków raka gruczołowego. Losowo wybrano grupę 53 chorych do grupy TFX, podczas gdy 82 chorych tworzyło grupę kontrolną (27).

Dwunastu chorych z grupy TFX i 28 z grupy kontrolnej poddano leczeniu konwencjonalnemu z powodu rozsiewu procesu chorobowego lub współwystępowania innej choroby. W grupie kontrolnej pacjenci ci otrzymywali tylko leczenie objawowe, w grupie TFX – dwa razy w tygodniu lek wstrzykiwano domięśniowo, łącznie przez okres 10 tygodni.

Podawanie TFX spowodowało subiektywną i obiektywną poprawę stanu klinicznego u 10 na 12 chorych. Poprawa ta korelowała z zahamowaniem rozrostu miejscowego tkanki nowotworowej i tworzenia przerzutów do węzłów chłonnych śródpiersia i innych organów. U 3 pacjentów zaobserwowano regresję masy guza. 42 % chorych z grupy TFX osiągnęło 6-miesięczny czas przeżycia, w porównaniu do 7% z grupy kontrolnej.

Chorzy z mniej zaawansowanym rakiem oskrzela (N=95) zostali poddani terapii kobaltem (Co60). Zostali oni podzieleni losowo na grupę kontrolną, otrzymującą tylko naświetlania (N=54) i grupę otrzymującą dodatkowo TFX przez 5 miesięcy (N=41). Zaobserwowano, że podawanie TFX zwiększyło odsetek pacjentów uzyskujących 6 i 12 miesięczny czas przeżycia (69% i 38%) w porównaniu do grupy poddanej jedynie naświetlaniom (odpowiednio 31% i 7%).

Interesująca jest obserwacja, że u 39% chorych z grupy TFX (łączna dawka 300mg) podczas radioterapii doszło do rewersji ujemnych testów skórnych na tuberkulinę, w porównaniu do 12% pacjentów z grupy kontrolnej. Odbudowa odporności komórkowej wiązała się z przedłużeniem średniego czasu przeżycia z 13,2 mies. do 18,4 mies. u chorych otrzymujących naświetlania i TFX. W grupie kontrolnej otrzymującej tylko naświetlania analogiczne dane wynosiły odpowiednio 7,2 miesięcy i 8,8 miesięcy.

Obserwowano również znaczną poprawę tolerancji hematologicznej na naświetlania. Przy równoczesnym podawaniu TFX i Co60 u mniejszej liczby pacjentów dochodziło do anemii i leukopenii (28).

Podsumowując można stwierdzić, że terapia z zastosowaniem TFX o właściwościach mielo i immunostymulujących może spowodować wzrost tolerancji hematologicznej i immunologicznej radio i chemioterapii nowotworów złośliwych.

W grupie 50 chorych z nieoperacyjną postacią **raka jelita grubego** długotrwałe podawanie TFX powodowało wzrost liczby granulocytów i limfocytów, wzrost odporności komórkowej, poprawę stanu klinicznego oraz wydłużenie czasu przeżycia (29).

U 12 chorych poddanych immunoterapii z zastosowaniem TFX zaobserwowano zmiany histologiczne w utka-

In 12 patients, after immune therapy with TFX histological changes in tumor were observed, like inflammation, granulomatous and fibroblastic reactions with local calcification and tumor necrosis. Similar microscopic findings in the tumor matrix were observed in spontaneous tumor atrophy and are referred to as natural response of an organism to a neoplastic tissue. It seemed likely, that longer survival of the observed patients resulted from induction of local defensive reaction against tumor tissues by TFX [30,31].

According to the published results of 15 years experience in 457 patients on application of TFX in therapy for alimentary tract malignant tumors and breast cancer, the same authors reported that use of TFX before and after surgery reduced rate of complications, gave better wound healing and longer survival in comparison to patients not achieving immune therapy [32].

In one case of gastric cancer, a prolonged application of TFX resulted in regression of metastases, as observed in autopsy [33].

These clinical observations were experimentally proven. Inhibitory potential of TFX on transplanted neoplasm in mice was discovered [34].

Italian authors from University of Modena evaluated the influence of conventional chemotherapy given with thymostimulin (TS) in patients with nongranulomatous lymphoma of intermediate and high malignancy. A total of 150 patients were observed. Half of them achieved chemotherapeutic cycles with TFX. The rate of complete remission was higher in the group treated with complex therapy than in chemotherapy alone (59,1% vs 42,2%; $p=0,05$).

Complex therapy resulted also in 64,5% 4-year survival in the complex therapy group, comparing to 43% in the control group. A remark was made on application of TS 7 days before chemotherapy as linked with significantly higher rate of complete remissions. The effect of TS was more apparent in a group of intermediate malignancy and below 60y.o. Patients in good general condition, with normal levels of hemoglobin. In these patients TS seemed to force patients reaction against the tumor, through increasing the activity of NK-cells and production of cytokines. Improvement of the chemotherapeutic effectiveness through combination with TS might also relate to myeloprotective activity of thymic extract [35].

The oncologists from University of Trieste studied the combination of fluorouracil with TS in a multicenter randomized clinical trial, which covered 211 cases of disseminated colon cancer.

ni guza z cechami zapalenia i reakcją ziarniakowo-fibroblastyczną z miejscowym zwapnieniem i martwicą tkanki nowotworowej. Podobne mikroskopijne zmiany w obrębie tkanki podścieliska nowotworu obserwuje się w przypadkach spontanicznego zaniku guza i są one uważane za przejaw naturalnej odpowiedzi ustroju na pojawienie się tkanki nowotworowej. Wydaje się prawdopodobne, że wydłużenie czasu przeżycia u obserwowanych chorych wynikało z pobudzenia przez TFX miejscowej reakcji obronnej tkanki na rozwój guza (30,31).

W opublikowanych następnie danych podsumowujących 15 lat badań (457 chorych) nad zastosowaniem TFX w leczeniu złośliwych nowotworów układu pokarmowego i guzów piersi, ci sami autorzy podają, że stosowanie TFX przed i po przeprowadzeniu różnych zabiegów operacyjnych wiązało się ze zmniejszeniem występowania komplikacji pooperacyjnych, lepszym gojeniem się ran i wydłużonym czasem przeżycia w porównaniu do podobnych przypadków nie poddawanych immunoterapii (32).

U jednego z chorych poddanemu długotrwałemu leczeniu za pomocą TFX zaobserwowano ustąpienie zmian przerzutowych nowotworu żołądka potwierdzone w autopsji (33).

Powyższe obserwacje kliniczne potwierdziły badania eksperymentalne wykazujące hamujące działanie preparatu TFX na rozwój przeszczepianego nowotworu u myszy (34).

Autorzy włoscy z Uniwersytetu w Modenie oceniali wpływ konwencjonalnej chemioterapii podawanej równocześnie z tymustymuliną (TS) u chorych z **chłoniakami nieziarniczymi** o pośrednim i wysokim stopniu złośliwości. Badaniem objęto 150 pacjentów, z których połowa otrzymywała cykle chemioterapii łącznie z TS. Wśród pacjentów poddanych terapii skojarzonej współczynnik całkowitej remisji był wyższy niż u chorych poddanych wyłącznie chemioterapii (59,1% vs 42,2%; $p=0,05$).

Czteroletnie przeżycie osiągnęło 64,5% chorych poddanych terapii skojarzonej, a tylko 43,0% w grupie kontrolnej. Zwrócono również uwagę, że zastosowanie TS podczas 7 dni przed chemioterapią wiązało się ze znacznie większą częstością całkowitej remisji. Wpływ TS był wyraźniej zaznaczony u chorych z chłoniakami o pośrednim stopniu złośliwości w grupie poniżej 60 r.ż. w dobrym stanie klinicznym oraz z prawidłowym poziomem hemoglobiny. U chorych tych TS wydaje się potencjalizować reakcję chorego przeciwko nowotworowi między innymi na drodze zwiększenia aktywności komórek NK i wytwarzania cytokin. Zwiększenie efektywności chemioterapii skojarzonej z TS może również wiązać się z aktywnością mieloprotekcyjną wyciągu grasiczego (35).

Onkolodzy z uniwersytetu w Trieście oceniali wpływ skojarzenia fluorouracylu z tymustymuliną w randomizowanej wielośrodkowej próbie klinicznej obejmującej 211 chorych z **rozszianym rakiem jelita grubego**.

The objective response was diverse between the groups with and without TS (30% vs. 18% response rate; $p=0,02$). In addition, patients with TS suffered less from mucositis and diarrhea ($p=0,03$). The authors emphasized the possibility of increased response to chemotherapy in advanced stages of colon cancer avoiding increased toxicity [36].

The results from University of Rome showed the effect of TS on immunologic response in patients with bronchial cancer. Immunotherapy resulted in objective improvement in 46% of patients with almost 90% of the subjective judgement. No pulmonary, nor other infections were diagnosed. As the results of TS immunotherapy developed statistically significant improvement (24-100%) of blood parameters (CD3+, CD4+, CD8+, CD8+, IgG, Iga, IgM). These changes were observed in 28-56% of patients. The increased count of CD4 cells was accompanied by reversion of negative Mantoux skin test in 44,5% of cases. Inhibited progression of the disease or remission were linked with high levels of CD16 cells, whereas progression with high CD8 and low CD16 levels [37].

Spanish authors in Barcelona tested the effect of TS on hematologic toxicity of high doses of mitoxantrone in 54 patients with breast cancer. In the prospective controlled studies the influence of G-CST and G-CSF with TFX on restoration of granulopoiesis after a single infusion of mitoxantrone (28 µg/m²) was studied.

Combination of both factors shortened mean number of days with leukopenia from 10 to 2, faster recovery of lymphocytes above 500/µl from 9 to 2 days, lower incidence of neutropenic fever from 59,3% to 22,2% of the patients, shorter duration of infections - 10 days to 5,5 days, faster recovery of erythro- and thrombocytopenia [38].

American studies proved benefits of thymosin alpha-1 in patients with inoperative hepatocellular cancer (HCC) undergoing transcatheter arterial chemoembolisation (TACE) with doxorubicin. thymosin alpha-1 was applied 5 days a week for 24 weeks. Mean survival time in the TACE-only group was 399 days, while in TACE + thymosine alpha-1 – 774 days. More patients from the latter group qualified for liver transplantation than in the TACE-only [39].

According to Italian findings, combination of chemotherapy (doxorubicin) with thymosin alpha-1 significantly prolonged survival from 41% to 82% after 7 months. The benefit of application of thymosin alpha-1 was observed throughout 3 years of follow-up [40].

In Chinese research on TACE with vs without thymosin alpha-1 in patients with HCC in annual 7- and 12-month check-ups survivals in the thymosin alpha-1 achieving group were 92% and 78%, while in TACE-only 78% and 64% [41].

Stwierdzono różnicowanie obiektywnej odpowiedzi w grupach z, i bez TS (30% vs 18% odpowiedzi; $p=0,02$). Ponadto u chorych otrzymujących TS zmniejszała się częstość mucositis i biegunki ($p=0,03$). Autorzy podkreślają znaczenie możliwości zwiększenia odpowiedzi na chemioterapię u chorych z zaawansowanym rakiem jelita grubego bez zwiększenia toksyczności leczenia (36).

Badania z uniwersytetu w Rzymie wykazały wpływ tymostymuliny na odpowiedź immunologiczną u chorych z **rakiem oskrzela**. Stosowanie immunoterapii wiązało się z obiektywną poprawą u 46% chorych, a subiektywną u prawie 90%. Podczas obserwacji nie stwierdzono płucnych ani pozapłucnych infekcji. Następstwem immunoterapii TS była m.in. statystycznie znamienne poprawa (24-100 %) parametrów krwi obwodowej (liczby limfocytów komórek CD3+, CD4+, CD8+, CD8+, IgG, Iga, IgM). Powyższe zmiany stwierdzono u 28-56% chorych. Zwiększeniu liczby komórek CD4 towarzyszyła rewersja ujemnego testu skórno Mantoux w 44,5% przypadków. Zahamowanie progresji choroby lub remisja wiązały się ze zwiększeniem liczby komórek CD16, a progresja z wysoką wartością CD8 i niską CD 16 (37).

Autorzy hiszpańscy z Barcelony badali wpływ tymostymuliny na hematologiczną toksyczność wysokich dawek mitoksantronu u 54 chorych z zaawansowanym **rakiem sutka**. W prospektywnych badaniach kontrolowanych oceniano wpływ G-CSF oraz G-CSF + TFX na odbudowę granulopozy po jednorazowej infuzji mitoksantronu (28 µg/m²).

Skojarzenie obu czynników wiązało się ze skróceniem średniej liczby dni z leukopenią z 10 do 2 dni, przyspieszeniem odbudowy leukocytozy powyżej 500/mikrolitr z 9 dni do 2 dni, zmniejszeniem częstości występowania gorączki neutropenicznej z 59,3% do 22,2 % chorych, skróceniem czasu trwania infekcji z 10 dni do 5,5 dnia jak również z przyspieszeniem odbudowy liczby płytek i erytrocytów (38).

Badania autorów amerykańskich dowiodły korzyści z zastosowania tymozyny α 1 u chorych z nieoperacyjnym rakiem wątroby (**Hepatocellular carcinoma = HCC**) poddanych procedurze chemoembolizacji naczyniowej (transcatheter arteria chemoembolization – TACE) z użyciem doxorubicyny. T α 1 była podawana przez 5 dni w tygodniu przez 24 tygodni. Średni czas przeżycia poddanych tylko procedurze TACE wynosił 399 dni, a w grupie ze skojarzeniem TACE+T α 1 – 774 dni.

W grupie z TACE+T α 1 więcej chorych zakwalifikowało się do przeszczepu wątroby (4 na 14) niż w grupie poddanej tylko TACE (39).

Badania autorów włoskich wykazały, że skojarzenie chemioterapii (doxorubicyna) z tymozyną α 1 istotnie przedłużało czas przeżycia chorych z 41-82% po 7 miesiącach. Korzyść z zastosowania T α 1 utrzymywała się aż do 3 lat trwania obserwacji (40).

W badaniach autorów chińskich u chorych z HCC poddanych procedurze TACE z i bez T α 1 stwierdzono w punktach corocznych 7 i 12 miesięcy przeżycia

Use of thymosin alpha-1 as an adjuvant in conventional radiotherapy for NSCLC was related to longer survival and reduction of toxicity of the conventional chemotherapy [44].

Advanced malignant melanoma with metastases is resistant to most forms of therapy. Dacarbazine (DTIC) remains the only active pharmaceutical with a response rate of 17-30% of patients, still being short and with no influence on overall survival. Any complex therapy with other cytostatics shows no better efficacy over dacarbazine. A combination of DTIC with biologic response modulators (BRM) like IL-2, IFN or thymosin alpha-1 increases the effect of the cytostatic.

Application of thymosin alpha-1 or IFN alpha as supplement for DTIC chemotherapy gave total response rate of 50% with a mean time of response 13,5 months [42].

Immunotherapy with thymosin alpha-1 and IL-2 led to 36% of objective responses with average time to progression 5,5 months and mean survival time - 11 months [43]. In these studies thymosin alpha-1 evoked increase in T-cells and activity of NK cells [44].

These observations led to multicenter randomized clinical trials involving 488 patients with stage IV malignant melanoma in 64 European centers [45].

Most patients suffered from metastases to liver, lungs, skin or lymph nodes. According to the observation, introduction of thymosin alpha-1 to DTIC chemotherapy tripled the response rate and rose overall survival by 3 months in comparison to combination of DTIC with IFN alpha.

Such results caused FDA to approve in USA (March 2009) registration phase III trial of thymosin alpha-1 in therapy for malignant melanoma in clinical stage IV [46].

The mechanisms of thymosin alpha-1 activity seems to be linked with its influence on immunologic effector cells, like tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and anti-melanoma specific cytotoxic lymphocytes T (CTLs). An indirect effect of increased expression of MHL class I antigens as well as tumor-specific antigens should be considered [47].

In conclusion, non-specific immunotherapy with thymus-derived extracts in patients with bone marrow insufficiency as well as with various other types of tumors may become an important supplement for conventional anti-neoplastic therapy, considering its lack of toxicity, and improve overall therapeutic success rate [48,49].

w grupie z T α 1 92 i 78% a w grupie bez T α 1 tylko 78 i 64% (41).

Zastosowanie tymozyny α 1 jako adjuwantu do konwencjonalnej radioterapii u chorych z **niedrobnokomórkowym rakiem płuca NSCLG**, wiązało się z przedłużeniem czasu przeżycia, jak również ze zmniejszeniem toksyczności konwencjonalnej chemioterapii (44).

Zaawansowana postać czerniaka z przerzutami jest oporna na większość form terapii. Jedynie dakarbazyna (DTIC) pozostaje aktywnym lekiem dającym odpowiedź u 17-30% pacjentów choć o krótkim czasie trwania i bez wpływu na całkowite przeżycie. Terapia kombinowana z innymi cytostatykami nie wykazuje wyższej skuteczności niż sama dakarbazyna. Natomiast połączenie DTIC z modulatorami odpowiedzi biologicznej (BRM) takimi jak IL-2, IFN czy tymozyna α 1 zwiększa efekt samego cytostatyku.

Zastosowanie tymozyny α 1 i IFN α jako uzupełnienie terapii DTIC wiązało się z całościową odpowiedzią u 50% chorych ze średnim czasem odpowiedzi 13,5 miesiąca (42).

Również immunoterapia przy pomocy tymozyny α 1 i IL-2 doprowadziła do obiektywnej odpowiedzi u 36% chorych ze średnim czasem do progresji 5,5 mcy i średnim przeżyciem 11 miesięcy (43). W powyższych badaniach tymozyna α 1 doprowadziła do wzrostu liczby komórek T, oraz aktywności naturalnych kilerów-komórek NK (44).

Obserwacje powyższe doprowadziły do przeprowadzenia wieloośrodkowych, randomizowanych badań klinicznych, które objęły 488 pacjentów z IV stopniem zaawansowania czerniaka w 64 ośrodkach europejskich (45).

Większość chorych miała przerzuty do wątroby, płuc, skóry lub węzłów chłonnych. Przeprowadzone obserwacje wykazały, że dołączenie do chemioterapii DTIC tymozyny α 1 wiązało się z potrojeniem całkowitej odpowiedzi i przedłużeniem całkowitego przeżycia o 3 miesiące w porównaniu do DTIC w kombinacji z IFN α .

Wyniki te spowodowały, że FDA zatwierdziła w USA (marzec 2009) badanie rejestracyjne III fazy tymozyny α 1 w leczeniu chorych z IV stopniem zaawansowania czerniaka (46).

Mechanizm działania tymozyny α 1 wydaje się wiązać z wpływem na immunologiczne komórki efektorowe takie jak limfocyty infiltrujące guz (TILs - Tumor-infiltrating lymphocytes) i swoiste anti-melanoma cytotoksyczne limfocyty T (CTLs). Również efekt pośredni wiążący się ze zwiększeniem ekspresji antygenów MHL klasy I i antygenów specyficznych dla guza - należy brać pod uwagę (47).

Podsumowując można stwierdzić, że immunoterapia niespecyficzna preparatami grasiczopochodnymi - u chorych z niewydolnością szpiku jak i różnymi typami nowotworów - może stanowić istotne uzupełnienie przy braku jej toksyczności konwencjonalnego leczenia przeciwnowotworowego - zwiększając jego hematologiczną toksyczność i poprawę wyników leczenia (48, 49).

Fig. 1. The influence of thymic hormones on ontogenesis of lymphocytes T

Ryc. 1. Wpływ hormonów grasiczych na ontogenezę limfocytów T

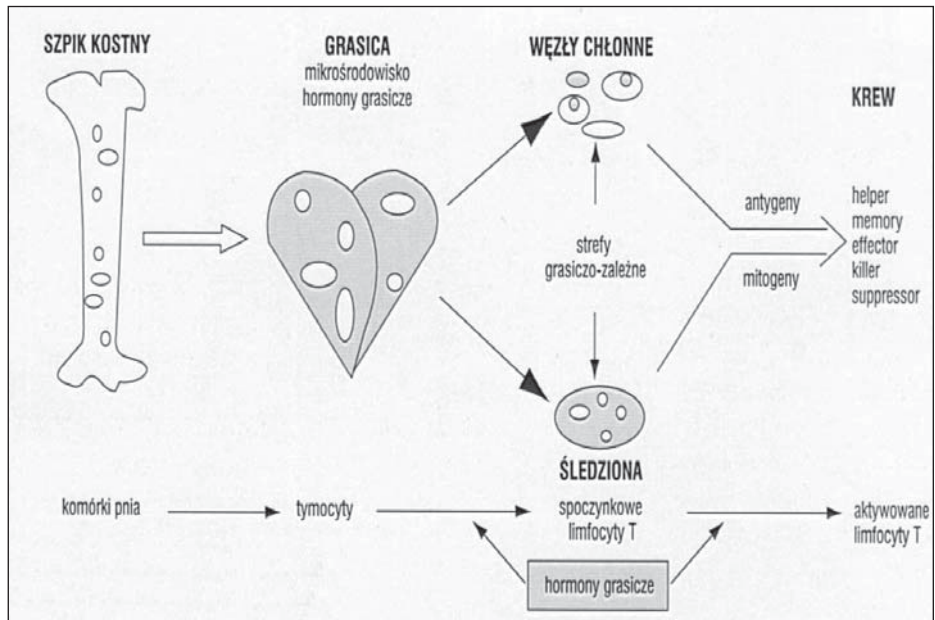
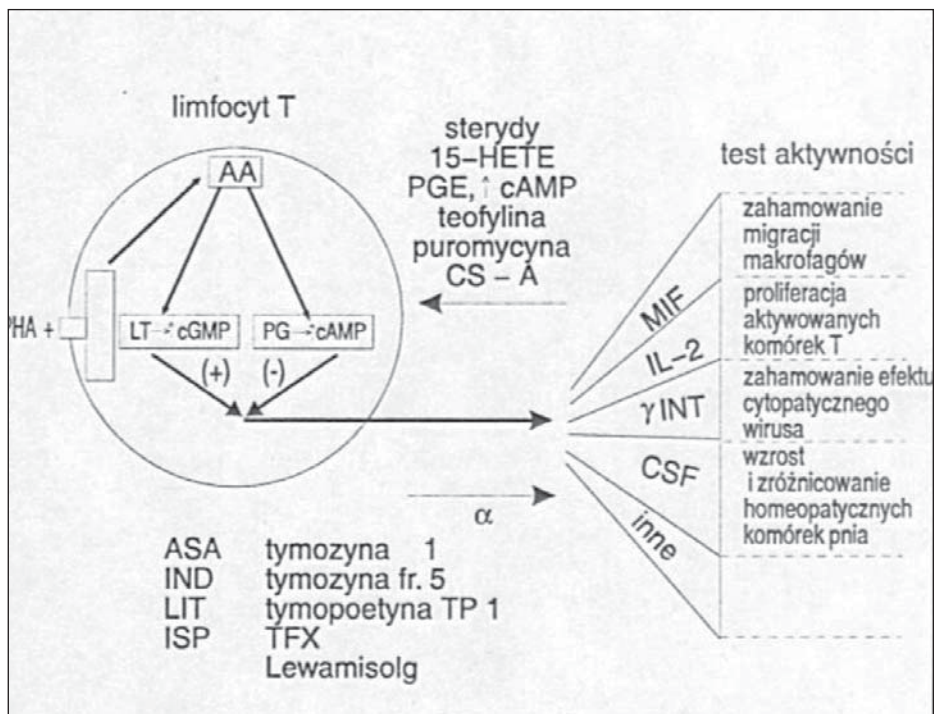


Fig. 2. Endocrine role of activated lymphocytes T

Ryc. 2. Endokrynną rolą aktywowanych limfocytów T



Tab. 1. Thymus-derived specimens

Name	Country of origin
Tymozyna frakcja 5 (TF5)	USA
Tymozyna α1 (Tα1)	USA
Tymozayna β4 (T4β)	USA
Thymopoietin (TP)	USA
Thymopentin (TP5)	USA
Thymic humoral factor (THF)	Israel
Thymulin (FTS-Zn)	France
Thymostimulin (TP-1)	Italy
Thymic Factor X (TFX)	Poland
Thymomodulin (TMD)	Italy

Tab. 1. Preparaty grasiczopochodne

Preparat	Kraj producenta
Tymozyna frakcja 5 (TF5)	USA
Tymozyna α1 (Tα1)	USA
Tymozayna β4 (T4β)	USA
Thymopoietin (TP)	USA
Thymopentin (TP5)	USA
Thymic humoral factor (THF)	Izrael
Thymulin (FTS-Zn)	Francja
Thymostimulin (TP-1)	Włochy
Thymic Factor X (TFX)	Polfa
Thymomodulin (TMD)	Włochy

References/Piśmiennictwo:

1. **Corsi A., Giusti G.V.** „Cellular distribution in the bone marrow after thymectomy, *Nature*, 1967, 216, 493-495
2. **Zipori D, Trainin N.** „Defective capacity of bone marrow from nude mice to restore lethally irradiated recipients”, *Blood*, 1973, 42, 671
3. **Trainin N, Resnitzky P.** „Influence of neonatal thymectomy on cloning capacity of bone marrow cells in mice”; *Nature*, 1969, 221, 1154
4. **Zipori D, Trainin N.** „Impaired radioprotective capacity and reduced proliferation of bone marrow from neonatally thymectomized mice”; *Exp Hemat*, 1975, 3, 1-11
5. **Zipori D, Trainin N.** „The role of thymic humoral factor in the proliferation of bone marrow CFU-S from thymectomized mice”; *Exp. Hemat*, 1975, 3, 389-398
6. **Cerny J.** „Stimulation of bone marrow haematopoietic stem cells by factor from activated T cells”, *Nature*, 1974, 249, 63-65
7. **Gatti R.A, Good R.A.** „Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases”; *Cancer*, 1971, 28, 89-94
8. **Utsumi K., Kuribayashi N.** „An autopsy case of congenital aplastic anemia associated with intensive hypoplasia of thymus gland”, *Acta Path. Jap.*, 1967, 17, 145
9. **Watanabe H, Tmaoki N.** „Thymic abnormalities and their complications in human material”; *Acta Haem., Jap.*, 1971, 34, 411
10. **Skotnicki AB.** „Thymus extract – TFX – in the treatment of bone marrow hypoplasia”, *Erfahrungsheilkund* 1980, 29, 73
11. **Górski A., Skotnicki A.B., Gaciong Z, Korczak G.** „The effect of calf thymus extract (TFX) on human and mouse hemopoiesis”, *Thymus* 1981, 3: 129-141
12. **Miszta H, Dąbrowski Z, Zduńczyk A, Skotnicki A.B., Piastucka B.** „Biological response modifiers influence the PHA –induced production of CSF by human peripheral blood lymphocytes”. In *Symposium Haematologikum, Zakopane 1984, Nov 6-7, Abstracts 45*
13. **Raberger G, Gieldanowski J.** „The influence of thymus factor X (TFX) and its fraction V on the haemodynamic and haemopoietic functions”. *Arch. Immunol. Ther. Exp* 1985,33: 319 -324
14. **Aleksandrowicz J., Turowski G, Cybulski L., Szmigiel Z., Skotnicki AB.** „Immunohematological and clinical response in patients with malignant diseases after repeated administration of thymus extract TFX” *Ann. Immunol.* 1975, 7: 97
15. **Jaszcz W., Rzepecki W., Wojciechowski Z., Piotrowska K.** „The effect of TFX on the picture of blood and lymphatic organs of thymectomized mice in the post – neonatal period”. *Pathol. Pol.*1980, 31: 273-285
16. **Ważewska-Czyżewska M. , Aleksandrowicz J., Szybinski Z, Kulig D, Płonka I, Skotnicki A.** „Wpływ wyciągu z grasic cielecych (TFX) na przeżywalność myszy poddanych działaniu promieniowania jonizującego”. *Pol. Przegl. Rad. i Med. Nukl.*, 1977,1, 51-55.
17. **Żeromski J, Słowik-Gabrielska A, Krzyżko R.** „The preliminary evaluation of TFX administration in advanced bronchogenic carcinoma” In *Anstracts. Seminar on Cellular and Humoral Immunity in Lung Diseases. Poland, Poznań 1976; 44-46*
18. **Aleksandrowicz J., Turowski G., Cybulski L., Szmigiel Z., Skotnicki A.B.** „Thymic Factor X (TFX) as a biologically active extract TFX”. *Ann. Immunol.* 1975, 7: 97
19. **Skotnicki A.B., Dąbrowska-Bernstein K.B, Dąbrowski M.P. i wsp.** „Biological Properties and Clinical Use of Calf Thymus Extract TFX-Polfa”. W: “Thymic hormones and Lymphokines”. Wyd: a.l. Goldstein, Plenum Press, NewYork, 1984, 545- 564.
20. **Skotnicki A.B., Blicharski J. Lisiewicz J i wsp.** „Wpływ preparatu TFX na parametry hematologiczne i immunologiczne u chorych z leukopeniami”; *Terapia i Leki*, 1987, 4-5, 95- 104.
21. **Balleari E., Massa G., Musselli C.** „In vivo effects of thymostimulin on hematopoiesis of mice treated with cyclofosfamide”. *Clinical Immunol Immunopathol*, 1993, 68: 363-367
22. **Cangemi V, Volpino P, D’Andrea N., Gentili S.** „Thymostimulin effect on the immune response in pulmonary carcinoma with or without surgical treatment”, *Panminerva Medica*, 1993, 35: 224-230
23. **Pilch J, Siles K.** „TFX (Polfa) w immunologii raka krtańni”, *Ann. Acad. Med .Siles*, 1994, 28: 103-111
24. **Kraj M., Dmoszyńska A., Maj S. i wsp.** „Chemioterapia i leczenie immunomodulacyjne u chorych na szpiczaka plazmocytoowego”, *Acta Hem Pol* 1991, 22: 4-20
25. **Mariańska-Radziszewska J, Bicz-Cieciałowa M, Szmigiel Z, Skotnicki AB,** „Application of the thymic extract in patients suffering from Hodgkin’s disease” In: *Abstracts, XI Congress of the Polish Haematological Society, Gdansk 1975; 118*
26. **Aleksandrowicz J., Skotnicki A.B.** „The role of the thymus and thymic humoral factors in immunotherapy of aplastic and proliferative diseases of hemopoietic system”, *Acta Med. Pol*, 1976, 17, 1-17.
27. **Żeromski J, Słowik-Gabrielska A, Krzyżko R.** „The preliminary evaluation of TFX administration in advanced bronchogenic carcinoma” In *Anstracts. Seminar on Cellular and Humoral Immunity in Lung Diseases. Poland, Poznań 1976; 44-46*
28. **Krzyżko R, Słowik-Gabrielska A.** „TFX in primary bronchial cancers and some indices of its activity”. *Immunol. Pol.* 1981, 7: 152-159
29. **Turowski G, Cybulski L, Politowski M, Turaszewski T, Zubek M.** „First trial of immunopotentialiation by thymic extract (TFX) in surgical patients with malignant diseases” *Acta Med. Pol.* 1976, 17: 19-39
30. **Urban A, Turowski G, Cybulski L,** „The histological changes of the stroma of colon and rectum cancer observed in patients after immunopotentialiation by thymus extract (TFX)”, *Patol. Pol* 1977, 28: 47-59
31. **Cybulski L, Turowski G, Politowski M i wsp.** „Initial observations on the application of thymus extract (TFX) in patients with alimentary tract neoplasm” *Pol. Med. Sci. Hist. Bull.* 1976, 15: 47-49
32. **Cybulski L, Turowski G,** „The effect of TFX on surgical therapy. Clinical consideration based on 14 years observations” In *Immunomodulation. S. Chyrek- Borowska (Ed), Polish Immunological Society, Białowieża 1987, 42*
33. **Hryniewiecki J, Kiczka W,** „Regression of gastric cancer with metastases following immunostimulation treatment confirmed by autopsy” *Int. J. Immunother.*1985, 1:47-49
34. **Chłap Z, Jaszcz w, Turowski G,** „The influence of calf thymus extract (TFX-Polfa) on growth of the subcutaneous transplant of Ehrlich’s carcinoma” *Materia Med. Pol.* 1984, 17: 37-42

35. **Federico M., Gobbi PG., Morreti G i wsp.** „Effects of thymostimulin with combination chemotherapy in patients with aggressive non – Hodgkin’s lymphoma. A raport from the Italian Lymphoma Study Group (GISL)” *Am J Clin Oncol* 1995, 18:8-14
36. **Mustacchi G., Pavesi L., Milani S., Iaffaioli V** „High – dose folinic acid (FA) and fluorouracil (FU) in colorectal cancer: results of randomized multicenter clinical trial” *Anticancer Res.* 1994, 14, 617-619
37. **Cangemi V., Volpino P., D’Andrea N., Gentili S.** „Thymostimulin effect on the immune response in pulmonary carcinoma with or without surgical treatment”, *Panminerva Medica*, 1993, 35: 224-230
38. **Sanchiz F., Milla A.** „A randomised study comparing granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) with G-CSF plus thymostimulin in the treatment of haematological toxicity dose mitoxantrone therapy”. *Eur J Cancer* 1996, 32 A: 52-56
39. **Gish R, Rustgi V, Nelson D et al.** „Thymalfasin (thymosin α 1) with trans arterial chemoembolization (TACE) in the treatment of adult patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a Phase -II trial”. Presented at Asia Pacific Association for the Study of Liver Diseases, 2009
40. **Stefanini GF, Foschi FG, Castelli E et al.** „Alpha-1-thymosin and transcatheter arterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma patients: a preliminary experience”. *Hepatogastroenterol* 1998, 45:209-215
41. **Li ZS.** „HCC Patients treated with TACE combined with thymalfasin – one year follow up” Presented at: Millennium National Meeting on Vitral Hepatitis in Shanghai, China 2000
42. **Rasi G, Terzoli E, Izzo F et al.** „Combined treatment with thymosin α 1 and low dose interferon- α after dacarbazine in advanced melanoma”. *Melanoma Res* 2000, 10: 189-192
43. **Lopez M, Carpano S, Cavaliere R et al** „Biochemotherapy with thymosin α 1, interleukin- 2 and dacarbazine in patients with metastatic melanoma: clinical and immunological effects” *Ann Oncol* 1994, 5: 7410746
44. **Garaci E, Pica F, Rasi G et al.** „Thymosin α 1 in the treatment of cancer: from basic research to clinical application” *Int J Immunopharmacol* 2000, 22: 1067-1076
45. **Camerini R, Mackiewicz A, Testori A et al.** „A large first- line randomized dose- finding, phase II study on thymosin α (IFN α) compared to DTIC plus IFN α in stage IV melanoma. Tumor response and survival results” *ASCO meeting Abstracts* 2007, 25: 8535
46. *Sci Clone Reaches Agreement With FDA on Spetial Protocol Assessment for Phase 3 Thymalfasin Trial in Stage IV Melanoma*, *Sci Clone Press Release*, 24 March 2009
47. **Goldstein Allan. L., Goldstein Adam L.** „From Lab to bedside: emerging clinical applications of thymosin α 1”; *Expert Opinion. Biol. Ther.* 2009. 9(5): 593- 608.
48. **Skotnicki A.B.** TFX-Jelfa. Właściwości immunofarmakologiczne i zastosowanie kliniczne wyciągu z grasic cięłych. *Wyd. Jelfa, Kraków, Jelenia Góra* 1996.
49. **Skotnicki A.B.:** Kliniczne zastosowanie wyciągu grasiczego TFX. Wskazania i dotychczasowe doświadczenia. *Medycyna po Dyplomie, czerwiec* 1998, 10-24.