

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Kárai Bettina

**Az áramlási citometriai vizsgálat szerepe a myelodysplasiás
szindróma diagnosztikájában és prognosztikájában**

DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2018

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Az áramlási citometriai vizsgálat szerepe a myelodysplasiás
szindróma diagnosztikájában és prognosztikájában**

Dr. Kárai Bettina

Témavezető:

Dr. Hevessy Zsuzsanna

egyetemi docens



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2018

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés és irodalmi áttekintés	7
2.1. A myelodysplasiás szindróma definíciója, jelentősége	7
2.2. Klasszifikációs rendszerek	8
2.3. Az MDS diagnosztikai algoritmus	12
2.3.1. Az MDS-t megelőző állapotok	13
2.3.2. Minimális diagnosztikai kritériumok	14
2.4. Az MDS prognosztikája	18
2.5. Az MDS diagnózisának felállítását és prognosztikai besorolását segítő további módszerek	22
2.5.1. Szomatikus mutáció vizsgálata	22
2.5.2. Áramlási citometriai analízis	25
2.6. Mastocyták biológiája	30
3. Célkitűzések	31
4. Anyagok és módszerek	33
4.1. A preanalitikai faktorok dysplasiás jelek értelmezésére gyakorolt hatását vizsgáló tanulmány felépítése	35
4.2. Az MDS szűrésére szolgáló áramlási citometriai pontozó rendszer hatékonyságának növelésére irányuló tanulmány kialakítása	37
4.3. Immunfenotípus vizsgálata	38
4.4. A preanalitikai faktorok immunfenotípusra gyakorolt hatásának vizsgálatához szükséges paraméterek azonosítása	41
4.5. MDS szűrésére szolgáló áramlási citometriai pontozó rendszer kialakítása	42
4.6. A mastocyták detektálása áramlási citometriával	43
4.7. Statisztikai analízis	44
5. Eredmények	45
5.1. Preanalitikai faktorok hatása az immunfenotípusra	45
5.1.1. Vizsgált sejtek immunfenotípusának összehasonlítása K ₃ -EDTA-val és Na-heparinnal alvadásgátolt de novo mintáknál	45
5.1.2. A késleltetett mintafeldolgozás okozta immunfenotípus-eltérések	47
5.1.3. Preanalitikai faktorok hatása a myeloidok CD11b expressziójára	53
5.2. MDS szűrésére alkalmas áramlási citometriai pontozó rendszer diagnosztikai és prognosztikai ereje	55
5.2.1. Az áramlási citometriai pontozó rendszer kialakítását célzó tanulmány eredményei	55
5.2.2. A hat paraméterből kialakított áramlási citometriai pontozó rendszer alkalmazhatóságát bizonyító tanulmány eredményei	59
5.3. A mastocyták vizsgálata áramlási citometriával	62
6. Megbeszélés	63
6.1. A késleltetett mintafeldolgozás és az alvadásgátoló típusának hatása az áramlási citometriával detektált dysplasiás jelek értelmezésére	63
6.2. A hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozó rendszer alkalmazása az MDS szűrésében és prognosztikai megítélésében	68

6.3. A preanalitikai faktorok hatása az áramlási citometriai pontozó rendszer hat paraméterére.....	71
6.4. Az áramlási citometria felhasználásának optimalizációja az MDS diagnosztikájában és prognosztikájában	72
7. Összefoglalás	75
8. Summary	76
9. A disszertáció új eredményei, megállapításai, klinikai jelentősége	77
10. Irodalomjegyzék.....	78
9. Publikációs lista.....	90
11. Tárgyszavak/Keywords.....	92
12. Köszönetnyilvánítás	93

1. Rövidítések jegyzéke

AML	acute myeloid leukemia, akut myeloid leukémia
APC	allophycocyanin, allofikocianin
APC-AF750	conjugation allophycocyanin-alexa fluor 750, konjugált allofikocianin-alexa fluor 750
AUC	area under the curve, görbe alatti terület
CCUS	clonal cytopenia of unknown significance, bizonytalan jelentőségű klonális sejtszegénység
CHIP	clonal hematopoiesis of indeterminate potential, bizonytalan jelentőségű klonális vérképzés
CD	cluster of differentiation, differenciálódási klaszter
CI	confidence interval, konfidencia intervallum
CMML	chronic myelomonocytic leukemia, krónikus myelomonocytás leukémia
ELN IMDSFlow	International/European Leukemia Net Working Group for Flow Cytometry in MDS, a Nemzetközi/Európai Leukémia Hálózat Áramlási Citometriai MDS munkacsoport
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid, etilén-diamin-tetraecetsav
FAB	French-American-British, Francia-Amerikai-Brit
FITC	fluorescein isothiocyanate, fluoreszcein izotiocianát
FCSS	flow cytometry scoring systems, áramlási citometriai pontozó rendszerek
FISH	fluorescence in situ hybridization, fluoreszcens in situ hibridizáció

FHR	flow high risk, magas rizikójú áramlási citometriai csoport
FLR	flow low risk, alacsony rizikójú áramlási citometriai csoport
FSC	forward scatter, előre szórt fény
Gran	granulocyte, granulocyta
ICUS	idiopathic cytopenia of undetermined significance, idopátiás sejtszegénység bizonytalan jelentőséggel
IDUS	idiopathic dysplasia of undetermined significance, idopátiás dysplasia bizonytalan jelentőséggel
IPSS	International Prognostic Scoring System, Nemzetközi Prognosztikai Pontozó rendszer
IQR	interquartile range, interkvartilis tartomány
IWG of MDS	International Working Group, MDS Nemzetközi Munkacsoportja
LB	lymphoblast, lymphoblast
Ly	lymphocyte, lymphocyta
MB%	myeloblast percentage, myeloblast százalék
MDS	myelodysplastic syndromes, myelodysplasiás szindróma
MDS-EB	myelodysplastic syndrome with excess blasts, myelodysplasiás szindróma blastszaporulattal
MDS-SLD	myelodysplastic syndrome with single lineage dysplasia, myelodysplasiás szindróma egy sejtvonalat érintő dysplasiával
MDS-MLD	myelodysplastic syndrome with multilineage dysplasia, myelodysplasiás szindróma több sejtvonalat érintő dysplasiával

MDS-RS	myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts, myelodysplasiás szindróma gyűrűs sideroblastokkal
MDS-U	myelodysplastic syndrome-unclassified, myelodysplasiás szindróma másképpen nem osztályozható
MFI	mean fluorescence intensity, átlagos fluoreszcencia intenzitás
MPN	myeloproliferative neoplasm, myeloproliferatív neoplázia
PE	phycoerythrin, fikoeritrin
PC5.5	phycoerythrin cyanine 5.5, fikoeritrin cianin 5.5
PC7	phycoerythrin cyanine 7, fikoeritrin cianin 7
PerCP-Cy5.5	peridinin chlorophyll protein cyanine 5.5, peridinin klorofil fehérje cianin 5.5
PB	pacific blue, pacific kék
PO	pacific orange, pacific narancs
RA	refractory anemia, refrakter anémia
RAEB	refractory anemia with excess blast, refrakter anémia blastszaporulattal
RAEB-T	refractory anemia with excess blasts in transformation, refrakter anémia blastszaporulattal, transzformálódó
RARS	refractory anemia with ringed sideroblasts, refrakter anémia gyűrűs sideroblastokkal
R-IPSS	Revised- International Prognostic Scoring System, módosított Nemzetközi Prognosztikai Pontozó rendszer

RCMD	refractory cytopenia with multilineage dysplasia, refrakter sejt szegénység több sejtvonalat érintő dysplasiával
RCMD-R	refractory cytopenia with multilineage dysplasia and ringed sideroblasts, refrakter sejt szegénység több sejtvonalat érintő dysplasiával és gyűrűs sideroblastokkal
rCV%	robust percent coefficient of variation
RN	refractory neutropenia, refrakter neutropenia
ROC	Receiver Operating Characteristic
RT	refractory thrombocytopenia, refrakter thrombocytopenia
SSC	side scatter, oldalra szórt fény
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, egy nukleotidot érintő polimorfizmus
WHO	World Health Organization, Egészségügyi Világszervezet
WPSS	WHO classification-based prognostic scoring system, WHO alapú prognosztikai rendszer

2. Bevezetés és irodalmi áttekintés

2.1. A myelodysplasiás szindróma definíciója, jelentősége

A myelodysplasiás szindróma (MDS) egy klonális hematológiai megbetegedés, mely a csontvelői hemopoetikus őssejteket érinti. MDS esetében a csontvelői mikrokörnyezet megváltozása, a vérképző sejtek differenciálódásának és érésének károsodása figyelhető meg. A csontvelői elégtelenség egy vagy több sejtvonalat érintő sejtszegénység formájában nyilvánul meg a perifériás vérben, miközben a csontvelő sejtűs. [1].

Az MDS éves incidenciája a világon a teljes populációra 5 eset/100 000 fő. Tekintettel arra, hogy az átlagos életkor MDS esetében 70 év, ha megvizsgáljuk az incidenciát a 60 év feletti korosztályban, akkor az új esetek száma tízszer több is lehet (20-50 új eset/100 000 fő/év) [1]. Amennyiben figyelembe vesszük, hogy az MDS a központi regiszterekben a nem megfelelő jelentések miatt alulreprezentált, továbbá, hogy egy sokszor aluldiagnosztizált betegségről van szó, az MDS incidenciája valójában magasabb, inkább közelíti, sőt, akár meg is haladja a 100 új esetet 100 000 főre vonatkoztatva a 60 év feletti korosztályban [2, 3]. Mivel Európa társadalma öregedő, az MDS-es betegek száma évről évre növekedni fog. A betegség összetettségéből adódóan a kezelési költségek változóak. Az enyhébb lefolyású eseteknél is rendszeres követés javasolt a járóbeteg szakellátás keretein belül. Azoknál a betegeknél, akiknél akut myeloid leukémiába (AML) transzformálódott a betegség, vagy súlyos sejtszegénység figyelhető meg, rendszeres fekvőbeteg ellátásra van szükség [4, 5]. Napjainkban lehetőség van célzott, hatékony, ugyanakkor költséges terápiára is, melynek rendszeres alkalmazása jelentősen javítja a betegek várható élettartamát, ám a terápia elhagyása gyors progressziót eredményez [4-6]. Mindez növekvő terhet ró a társadalomra, mely csak azáltal csökkenthető,

ha minden beteg esetében a legoptimálisabb kezelési stratégia kerül meghatározásra, melyhez nélkülözhetetlen a pontos diagnózis felállítása és a megfelelő prognosztikai besorolás.

2.2. Klasszifikációs rendszerek

A megfelelő diagnózis felállítása és a prognosztika megítélése érdekében az elmúlt évtizedekben klasszifikációs rendszerek segítettek ezen heterogén betegségeken belül homogénebb alcsoportok kialakítását. A klasszifikációs rendszereket az 1. táblázat foglalja össze. Az MDS első klasszifikációs rendszerét a Francia-Amerikai-Brit Társaság (French-American-British, FAB) alakította ki 1982-ben, mely kizárólag morfológiai vizsgálaton alapult. A betegeket öt alcsoportba lehetett besorolni a sejtvonalakat érintő dysplasia és a csontvelőben, valamint perifériás vérben látott myeloblastok százalékos értéke alapján [7]. A FAB rendszer használata során több probléma is adódott. Egyrészt több olyan beteg volt, akiknél az ajánlás nem adott egyértelmű utasításokat: például az 5%-nál kisebb csontvelői blast százalékkal rendelkező betegek esetében, akiknél nem csak az erythroid sejtvonal mutatott dysplastikus vonásokat [8-10]. Másrészt az alcsoportok továbbra is túlságosan heterogénnek bizonyultak túlélés szempontjából [11, 12].

Az évek során összegyűjtött tapasztalatok alapján az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) 2002-ben új ajánlást adott ki az MDS klasszifikációjára vonatkozóan. A korábban egyik csoportba sem besorolható betegek érdekében új alcsoportként létrehozták a „refrakter sejtzegénység több sejtvonalat érintő dysplasiával” kategóriát. Emellett a csoportok egységesítése céljából a „refrakter anémia blast szaporulattal” (RAEB) kategóriát két részre osztották (RAEB-1, RAEB-2). Ezáltal a korábbi, túlságosan tágan bizonyuló, a besorolás kritériumaként szolgáló blastok százalékos érték tartománya (5-20%), 5-9% és 10-19%-ra módosult. Továbbá, az új rendszer már nemcsak morfológiai, hanem

klinikai és citogenetikai adatokat is figyelembe vett. Így szintén új kategóriaként szerepel az ajánlásban az „MDS izolált 5q delécióval”, mely sajátos klinikai megjelenéssel rendelkezik. Az izolált del(5q) esetén a betegeknél nem tapasztaltak emelkedett blast arányt, a thrombocyta számuk normálnak vagy magasabbnak bizonyult és jellemzően hypolobulált megakariocyták voltak megfigyelhetők a csontvelőben. Speciális kezelés (lenalidomide) hatására a kórkép lefolyása kedvező [11, 13-16]. Talán az egyik legnagyobb változás a FAB rendszerhez képest mégis az AML diagnózisához szükséges blast arány 30%-ról 20%-ra történő csökkentése, melynek következtében a „RAEB-transzformációval” kategóriát törölték az MDS klasszifikációs rendszeréből. Az „MDS-ből transzformálódó AML” önálló kategóriaként az AML csoportban szerepel. A 2002-es WHO ajánlás tisztázta a krónikus myelomonocytás leukémia (CMML) helyét is, mely az MDS/MPN (myeloproliferatív neoplázia) csoportba került áthelyezésre, mivel a betegek egy részénél inkább myeloproliferatív kórképekre jellemző vonásokat lehet megfigyelni. Végül a granulocytákat vagy megakarocytákat érintő dysplasiával, sejtszegénységgel és 5%-nál kevesebb csontvelői blast aránnyal rendelkező betegeket az „MDS másképpen nem osztályozható” kategóriába sorolták [15]. Ez utóbbi betegek átsorolása egy újonnan létrehozott, az „egy sejtvonalat érintő refrakter sejtszegénység” kategóriába volt az egyik legnagyobb módosítás a 2008-ban megjelent WHO ajánlásban. Az „MDS másképpen nem osztályozható” kategória sem szűnt meg, ide azon betegek voltak sorolandók, akiknél sejtszegénység mellett MDS-re utaló citogenetikai eltérés figyelhető meg, de a definitív morfológiai eltérés hiányzik [17]. A 2016-ban kiadott WHO ajánlásban nemcsak apró finomításokat, hanem jelentős változásokat figyelhetünk meg az MDS klasszifikációs rendszerében, melynek háttérében az MDS diagnosztikáját segítő módszerek dinamikus fejlődése állt. Nagyobb szerephez jutott az MDS-ben előforduló kiegyensúlyozott és kiegyensúlyozatlan transzlokációk jelenléte, mely dysplasia nélkül is indikálja az MDS diagnózisának felállítását [18]. Noha számos szomatikus mutációt írtak le az elmúlt években

[19, 20], melyek MDS-sel társultan fordulnak elő, jelenleg két mutáció szerepel a WHO ajánlásában. Az egyik, az „MDS gyűrűs sideroblast szaporulattal” kategória esetén a diagnosztikai határértéket befolyásolja: ha jelen van az *SF3B1* génben a mutáció, akkor a diagnózis már 5% gyűrűs sideroblast esetén felállítható, míg hiányában 15% szükséges. A másik eltérés a *TP53* mutáció, melynek segítségével az egyébként jó kórlefyóással járó „MDS izolált del(5q)” kategóriában is azonosítani lehet azokat a betegeket, akiknél várhatóan rossz lesz a terápiás válasz és a prognózis. Ezen változtatások mellett több kategória elnevezésében is megfigyelhetünk eltéréseket a korábbi ajánláshoz képest. A klasszikus „refrakter anémia”, „refrakter sejtzegénység” elnevezés helyett a myelodysplasiás szindróma a használandó (pl.: „MDS egy sejtvonulat érintő dysplasiával”, „MDS blastszaporulattal”), mely módosításnak két magyarázata van. Az egyik az, hogy a dysplasia és blastszaporulat mellett a sejtzegénységnek csak kisebb mértékű a jelentősége az MDS alcsoportjainak kialakításában. A másik, hogy azoknál a betegeknél, akiknél egy sejtvonulat érintő dysplasia van, nem csak az adott sejtvonulat érintő sejtzegénység figyelhető meg [18].

FAB klasszifikáció		WHO klasszifikáció	
1982	2002	2008	2016
RA -anémia -erythroid dysplasia -blastszaporulat nincs ¹	RA -anémia -erythroid dysplasia -blastszaporulat nincs ¹	RCUD RA, RN, RT -sejszegénység (≥1 sejtvonala) -dysplasia (1 sejtvonala) -blastszaporulat nincs ¹	MDS-SLD -sejszegénység (1 vagy 2 sejtvonala) -dysplasia (1 sejtvonala)/ citogenetikai eltérés -blastszaporulat nincs ¹
RARS -anémia -erythroid dysplasia -gyűrűs sideroblast ⁹ -blastszaporulat nincs ¹	RARS -anémia -erythroid dysplasia -gyűrűs sideroblast ⁹ -blastszaporulat nincs ¹	RARS -anémia -erythroid dysplasia -gyűrűs sideroblast ⁹ -blastszaporulat nincs ¹	MDS-RS-SLD -sejszegénység (1 vagy 2 sejtvonala) -dysplasia (1 sejtvonala)/ citogenetikai eltérés -blastszaporulat nincs ¹ - gyűrűs sideroblast ⁹ t
	RCMD -sejszegénység (≥2 sejtvonala) -dysplasia (≥2 sejtvonala) -blastszaporulat nincs ¹	RCMD -sejszegénység (≥1 sejtvonala) -dysplasia (≥2 sejtvonala) -blastszaporulat nincs ¹	MDS-MLD -sejszegénység (1-3 sejtvonala) -dysplasia (2 vagy 3 sejtvonala)/ citogenetikai eltérés -blastszaporulat nincs ¹
	RCMD-RS -sejszegénység (≥2 sejtvonala) -dysplasia (≥2 sejtvonala) -gyűrűs sideroblast -blastszaporulat nincs ¹		MDS-RS-MLD -sejszegénység (1-3 sejtvonala) -dysplasia (2 vagy 3 sejtvonala)/ citogenetikai eltérés -blastszaporulat nincs ¹ -gyűrűs sideroblast
RAEB -anémia -blastszaporulat van ²	RAEB-1 -sejszegénység (>1 sejtvonala) -dysplasia (≥1 sejtvonala) -blastszaporulat van ⁵ -monocytosis nincs	RAEB-1 -sejszegénység (≥1 sejtvonala) -dysplasia (≥1 sejtvonala) -blastszaporulat van ⁷ -monocytosis nincs	MDS-EB-1 -sejszegénység (1-3 sejtvonala) -dysplasia (0-3 sejtvonala)/ citogenetikai eltérés -blastszaporulat van ⁸
	RAEB-2 -sejszegénység (>1 sejtvonala) -dysplasia (≥1 sejtvonala) -blastszaporulat van ⁶ -monocytosis nincs	RAEB-2 -sejszegénység (≥1 sejtvonala) -dysplasia (≥1 sejtvonala) -blastszaporulat van ⁶ -monocytosis nincs	MDS-EB-2 -sejszegénység (1-3 sejtvonala) -dysplasia (0-3 sejtvonala)/ citogenetikai eltérés -blastszaporulat van ⁶
	MDS-U -sejszegénység (>1 sejtvonala) -dysplasia (1 sejtvonala) -blastszaporulat nincs ⁵	MDS-U -sejszegénység (>1 sejtvonala) -dysplasia nincs -blastszaporulat nincs ¹ -citogenetikai eltérés	MDS-U MDS-U 1% blasttal -sejszegénység (1-3 sejtvonala) -dysplasia (1-3 sejtvonala)/ citogenetikai eltérés -blastszaporulat nincs ¹ MDS-U SLD -sejszegénység (3 sejtvonala) -dysplasia (1 sejtvonala)/ citogenetikai eltérés -blastszaporulat nincs ¹ MDS-U citogenetikai eltéréssel -sejszegénység (1-3 sejtvonala) -dysplasia nincs - citogenetikai eltérés -blastszaporulat nincs ¹
RAEB-T -anémia -blastszaporulat van ³			
CMML -monocytosis ¹¹ -blastszaporulat van ⁴			
	MDS izolált del(5q)-val -anémia -blastszaporulat nincs	MDS izolált del(5q)-val -anémia -blastszaporulat nincs	MDS izolált del(5q)-val -anémia -blastszaporulat nincs

1. táblázat. MDS klasszifikációs rendszerei

A táblázat az MDS klasszifikációs rendszereit foglalja össze. Segítségével nyomon követhetők az elmúlt évtizedek során történt változások.

A táblázatban előforduló jelölések jelentése: 1: perifériás vérben a myeloblast százalék (MB%) <1%; csontvelői mintában <5%; 2: perifériás vérben a MB% <5%, csontvelői mintában 5-20%; 3: perifériás vérben a MB% >5%, csontvelői mintában 20-30%; 4.: perifériás vérben a MB% <5%, csontvelői mintában <20%; 5: perifériás vérben a MB% <5%, csontvelői mintában <5%; 6: perifériás vérben a MB% 5-19%, csontvelői mintában 10-19%; 7: perifériás vérben a MB% <5%; csontvelői mintában 5-9%; 8: perifériás vérben a MB% 2-4%, csontvelői mintában 5-9%; 9.: ≥15% gyűrűs sideroblast; 10.: ≥15% gyűrűs sideroblast vagy *SFRBI* mutáció jelenlétekor >5% sideroblast; 11.: >1 G/L monocyta szám

Táblázatban szereplő rövidítések: RA: refractory anemia, RARS: refractory anemia with ringed sideroblasts, RAEB: refractory anemia with excess blast, RAEB-T: refractory anemia with excess blasts in transformation, CMML: chronic myelomonocytic leukemia, RN: refractory neutropenia, RT: refractory thrombocytopenia, RCMD: refractory cytopenia with multilineage dysplasia, RCMD-R: refractory cytopenia with multilineage dysplasia and ringed sideroblasts, MDS-U: myelodysplastic syndrome, unclassified, MDS-SLD: myelodysplastic syndrome with single lineage dysplasia, MDS-MLD: myelodysplastic syndrome with multilineage lineage dysplasia, MDS-RS: myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts, MDS-EB: myelodysplastic syndrome with excess blasts

A táblázat a FAB és WHO ajánlások alapján készült [7, 15, 17, 18].

2.3. Az MDS diagnosztikai algoritmusa

A WHO klasszifikációs rendszere az esetek többségében segítséget nyújt az MDS diagnózisának felállításában. Számos esetben azonban nem teljesülnek maradéktalanul a diagnózishoz szükséges feltételek, ám kizárni sem lehet teljes bizonyossággal az MDS-t. Ilyen esetek például a következők: a betegnél csak sejtszegénység figyelhető meg, ám nincs citogenetikai eltérés vagy jelentős dysplasia; a betegnek van citogenetikai eltérése, de nincs diagnosztikus mértékű dysplasia, és a sejtszegénység is csak igen enyhe; vagy vannak dysplasiás jelek, de nem látható sem sejtszegénység sem jellegzetes citogenetikai eltérés. Ezekben az helyzetekben, az MDS-t megelőző állapotok felismerésében, valamint az MDS diagnózisának felállításához szükséges minimális diagnosztikai kritériumok

megfogalmazásában nyújt segítséget az MDS Nemzetközi Munkacsoportja (International Working Group, IWG of MDS) által kiadott irányelv [21, 22].

2.3.1. Az MDS-t megelőző állapotok

Az elmúlt évtizedben írtak először az MDS-t megelőző állapotokról, a diagnosztikai technika fejlődése pedig tovább árnyalta a képet. Noha valóban ezek az állapotok átalakulhatnak MDS-be, vagy akár AML-be, a betegek egy részénél tartósan fennmaradhatnak klinikai tünetek megjelenése nélkül. Továbbá nemcsak MDS-be transzformálódhatnak, hanem egyéb myeloid malignitásba is, sőt akár lymphoproliferatív kórkép is kialakulhat [22]. A változó kimenetel szempontjából fontos definiálni ezeket az állapotokat és felismerni az esetleges progresszió jeleit.

Az idiopátiás sejtszegénység bizonytalan jelentőséggel (idiopathic cytopenia of undetermined significance, ICUS) volt az első állapot, melyről úgy gondolták, hogy az MDS előhírnöke lehet [21, 23]. Ezekben az esetekben más hematológiai- vagy egyéb betegséggel nem magyarázható, egy vagy több sejtvonalat érintő tartós sejtszegénység (>4 hónapja fennálló) mellett dysplasia nem látható. A betegek egy részénél fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH), áramlási citometriai vagy citogenetikai vizsgáló módszerrel ki lehet mutatni egy kis klonális sejtpopulációt. Amennyiben a betegeknél molekuláris genetikai eltérés detektálható, ahol a mutáns allél előfordulási aránya eléri vagy meghaladja a 2%-ot, a betegeket át lehet sorolni CCUS kategóriába (clonal cytopenia of unknown significance). Minél több mutáció detektálható egy betegnél, annál nagyobb az esélye az MDS-be történő transzformációnak [22, 24]. Egy másik MDS-t megelőző állapot az idiopátiás dysplasia bizonytalan jelentőséggel (idiopathic dysplasia of undetermined significance, IDUS). Ebben az esetben molekuláris módszerrel detektálható eltérés nincs, sejtszegénység pedig, ha elő is fordul, nem teljesíti az

ICUS kritériumát, ugyanis csak enyhe, vagy átmeneti a sejtszegénység. A betegeknél ilyenkor követés javasolt, emellett az egyéb, dysplasiát okozó reaktív folyamatok kizárása szükséges [23, 25, 26]. Végezetül, ha a betegnél nem látható sejtszegénység vagy dysplasiás morfológiai vonás, de a perifériás vérben 2%-ot meghaladja a mutáns allél előfordulása, bizonytalan jelentőségű klonális vérképzésről (clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP) beszélhetünk [24, 27, 28]. Az MDS-t megelőző állapotok típusos megjelenési formáját és kritériumait a 2. táblázat foglalja össze.

	ICUS	IDUS	CHIP	CCUS
csontvelői blast százalék	<5%	<5%	<5%	<5%
monoklonális/oligoklonális	-/+	+/-	+	+
dysplasia	-	+	-	-
sejtszegénység	+	-	-	+
áramlási citometriai eltérés	-/+	-/+	-/+	-/+
citogenetikai eltérés	-/+ ¹	-/+ ¹	-/+	-
molekuláris genetikai eltérés	-	-	+	+

2. táblázat. MDS-t megelőző állapotok

A táblázatban előforduló rövidítések, jelölések: ICUS: idiopathic cytopenia of undetermined significance, IDUS: idiopathic dysplasia of undetermined significance, CHIP: clonal hematopoiesis of indeterminate potential CCUS: clonal cytopenia of undetermined significance, 1: az esetek egy részénél kisméretű klónban MDS-sel összefüggő eltérés detektálható

A táblázat 2017-ben megjelent MDS Nemzetközi Munkacsoportjának (International Working Group, IWG of MDS) ajánlása alapján készült [22].

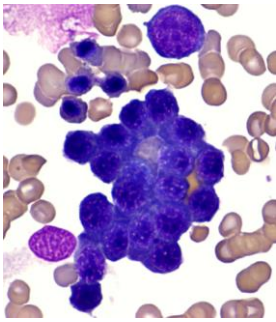
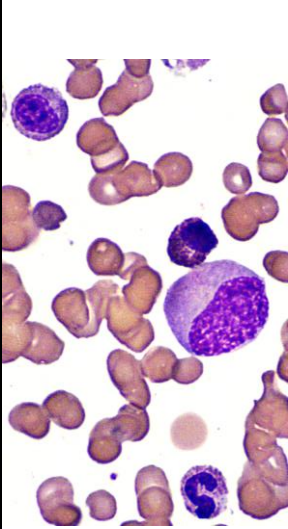
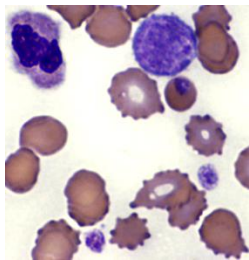
2.3.2. Minimális diagnosztikai kritériumok

Az MDS diagnózisának felállításához szükséges minimális diagnosztikai kritériumokat a Nemzetközi MDS Munkacsoport 2007-ben írta le [21], majd tíz év tapasztalatait figyelembe véve 2017-ben praktikus, a rutin diagnosztika lehetőségeihez jobban illeszkedő finomításokat hajtott végre [22]. Az MDS diagnosztikai algoritmusának első lépcsőfoka két előfeltétel teljesülése: egyrészt tartós sejtszegénységnek kell fennállnia, másrészt minden egyéb

sejtszegénységet és dysplasiát okozó betegséget ki kell zárni. A tartós sejtszegénység definíciója a legújabb ajánlásban megváltozott. Hat hónap helyett elegendő négy hónapja fennálló sejtszegénység, sőt blastszaporulat, vagy MDS-sel összefüggő citogenetikai eltérés jelenléte esetén a diagnózis azonnal felállítható, nem szabad megvárni a négy hónapot. A sejtszegénység megítélését illetően – figyelembe véve az etnikai, a korból és a nemből adódó eltéréseket – a jelenlegi javaslat az, hogy a helyi referenciahatárokat kell figyelembe venni a sejtszegénység megítélésekor. Amennyiben ez a két feltétel teljesül, átléphetünk a következő lépcsőfokra, ahol három MDS-sel összefüggő kritérium van, melyből, ha egy is teljesül, a diagnózis felállítható. A három kritérium a következő: (i). a sejtek több mint 10%-át érintő dysplasiás vonás (3. táblázat), mely érinthet egy vagy több sejtvonalat vagy 15% feletti (*SF3BI* mutáció jelenlétekor 5% feletti) gyűrűs sideroblast jelenléte; (ii). MDS-sel összefüggő citogenetikai eltérés (4. táblázat); (iii). 5-19% blast a csontvelőben. Az új ajánlás a blastszaporulat tekintetében elfogadja a perifériás vérben detektálható 2-19% myeloblast jelenlétét is a kritérium teljesítéséhez. A sideroblastok és myeloblastok morfológiai megítélésére egyértelmű ajánlások vannak. A sideroblastok arányát 100 erythroid prekurzorra kell megadni. A nemzetközi munkacsoport a sideroblastoknak három típusát különíti el: 1. típus: 5-nél kevesebb sziderotikus granulum van a citoplazmában; 2. típus: 5-nél több sziderotikus granulum van a citoplazmában, de nem perinukleárisan; 3. típus: legalább 5 vagy annál több sziderotikus granulum van perinukleárisan, mely minimum a mag kerületének egyharmadát lefedi [29]. Az MDS diagnosztikai algoritmusában szereplő gyűrűs sideroblastnak csak a 3. típus felel meg, tehát a 3. típusú sideroblastok (gyűrűs sideroblastok) arányának 100 erythroid prekurzorra vonatkoztatva kell 15% vagy *SFRBI* mutáció jelenlétekor 5% felettinnek lennie [22]. A myeloblastok számát perifériás vérmintánál 200, csontvelői mintánál 500 magvas sejtre vonatkoztatva szükséges megadni. A myeloblastok nagy mag/citoplazma aránnyal, jól

látható nucleolussal, finom, „csipkés” kromatinnal jellemezhető. MDS esetében a citoplazma lehet agranuláris vagy granuláris, ám ez utóbbit el kell különíteni a promyelocytától [29].

Ha a diagnosztikai algoritmus második lépcsőfokának kritériumai nem teljesülnek, további vizsgálómódszerek segítik a diagnózis felállítását, úgymint a biopsziával nyert csontvelői minta hisztológiai/immunhisztológiai vizsgálata, áramlási citometriai analízis vagy szomatikus pontmutáció jelenléte. A csontvelői működés megítélésére szolgáló kolóniaképződést vizsgáló módszert a jelenlegi ajánlásból kivették, mivel ez a metodika a rutin diagnosztika számára kevésbé elérhető [21, 22].

	perifériás kenet	csontvelői kenet	
erythroid sejtvonal	<ul style="list-style-type: none"> • dimorf vörösvérsejtpopuláció ovalomacrocycytákkal • anisocytosis • poikilocytosis • dacryocyták • fragmentocyták • céltábla-(target-)sejtek • normoblastok • Howell-Jolly-testek • basophil punctatio 	<ul style="list-style-type: none"> • magok, maglebenyek közötti hídképződés (bridging) • sejtmag bimbószerű lefűződése • maglebenyezettség • magfragmentáció (karyorrhexis) • két- vagy többmagvú előalakok • nagyobb megaloblastoid előalakok • basophil punctatio • citoplazma inhomogenitás • vakuolizáció • atípusos mitózisok • gyűrűs sideroblastok (berliniké-reakció) 	
myeloid sejtvonal	<ul style="list-style-type: none"> • hipolobulált neutrophilek • pseudo-Pelger-Huet-sejtek • kerek vagy ovális magvú neutrophilek • gyűrű alakú magvú neutrophilek • kétmagvú neutrophilek • óriás, hiperlobulált magvú neutrophilek • durván tagolt kromatinszerkezetű magok • mag/citoplazma érési aszinkronia • egyenetlen eloszlású granuláció • hipogranulált/agranuláris (granuláció nélküli) neutrophilek 	<ul style="list-style-type: none"> • hasonló, mint a periférián, (a granuláció anomáliák a promyelocytáktól kezdve valamennyi fejlődési formában megjelenhetnek) 	
megakariocita	<ul style="list-style-type: none"> • óriás, hipogranulált vagy hipergranulált thrombocyták • megakariocita fragmentumok 	<ul style="list-style-type: none"> • kis, egymagvú megakariocita • kis, két- vagy többmagvú megakariocita • nagy, egymagvú, (hipolobulált), érett citoplazmájú megakariocita 	

3. táblázat. MDS-ben előforduló jellegzetes morfológiai eltérések

A táblázat a perifériás és csontvelői kenet morfológiai vizsgálata során MDS-ben leggyakrabban előforduló dysplásiás jeleket foglalja össze az erythroid, myeloid és megakariocita sejtvonalon. A képek a gyakran látható morfológiai eltéréseket reprezentálják.

A táblázat Matolcsy A., Udvardy M., Kopper L. Hematológiai betegségek atlasza és saját közlemény, míg a mikroszkópos felvételek saját morfológiai képi anyag alapján készült [30, 31].

	MDS	t-MDS
kiegyensúlyozatlan transzlokáció		
+8*	10%	
-7 vagy del(7q)	10%	50%
del(5q)	10%	40%
del(20q)*	5-8%	
-Y*	5%	
i(17q) vagy t(17p)	3-5%	
-13 vagy del(13q)	3%	
del(11q)	3%	
del(12p) vagy t(12p)	3%	
del(9q)	1-2%	
idic(X)(q13)	1-2%	
kiegyensúlyozott transzlokáció		
t(11;16)(q23.3;p13.3)		3%
t(3;21)(q26.2;q22.1)		2%
t(1;3)(q26.2;q22.1)	1%	
t(2;11)(p21;q23)	1%	
inv(3)(q21.3q;26.2)/	1%	
t(3;3)(q21.3;q26.2)		
t(6;9)(p23;q34.1)	1%	

4. táblázat. MDS-ben előforduló jellegzetes citogenetikai eltérések

A táblázat az MDS-sel társultan detektálható kiegyensúlyozott és kiegyensúlyozatlan transzlokációkat (első oszlop) és azok előfordulását mutatja be általánosságban MDS-ben (második oszlop) és terápiával összefüggő MDS-ben (t-MDS, harmadik oszlop).

A táblázatban előforduló rövidítések és jelölések: t-MDS: therapy-related MDS; *Morfológiai eltérés nélkül ezek az eltérések önmagukban nem indikálják az MDS diagnózisának felállítását

A táblázat a 2016-os WHO ajánlás alapján készült [18].

2.4. Az MDS prognosztikája

Az MDS esetében megkülönböztethetünk a beteggel és a betegséggel összefüggő prognosztikai faktorokat. A betegek kora, fizikai állapota, mentális státusza és a társbetegségek nagyban befolyásolják a kórlefolymást [11, 32-35]. A betegekkel kapcsolatos tényezők, ezen belül is a társbetegségek fennállásának jelentőségét hangsúlyozza a 2011-ben megjelent, Della Porta és munkatársai által kialakított pontozó rendszer. Tanulmányuk során először felmérték, hogy mely betegségek fordulnak elő leggyakrabban MDS-ben, majd többváltozós analízis

segítségével megnézték, hogy ezek közül melyek független prognosztikai tényezői a nem leukémiával kapcsolatos halálozásnak. Végül a pontozó rendszerüket a következő társbetegségek jelenléte alapján alakították ki: kardiovaszkuláris betegségek, a májat, tüdőt és vesét érintő kórképek, valamint MDS mellett előforduló szolid tumorok. Az alacsony, közepes és magas rizikójú csoportok között nemcsak a nem leukémiával kapcsolatos túlélésben, hanem a teljes túlélésben is szignifikáns különbséget találtak [36].

Tekintettel arra, hogy az MDS egy igen heterogén megbetegedés, számos betegséggel összefüggő tényezőt azonosítottak, mely hozzájárul a kórkép prognosztikai megítéléséhez [19, 20, 33, 37-44]. Éppen ezért a WHO klasszifikációs rendszerénél, mely leginkább morfológián alapul és egyéb hasznos paramétereket csak kismértékben vesz figyelembe, az egyes alcsoportba tartozó betegek esetében a kórlefolyás elég heterogénnek bizonyult [44]. Ezért a rutin diagnosztikában és a terápiára vonatkozó irányelveknél széles körben használt a Nemzetközi Prognosztikai Pontozó rendszer (International Prognostic Scoring System, IPSS) illetve annak módosított változata, az R-IPSS (Revised IPSS) [11, 38]. Mindkét pontozó rendszer a blastok százalékát, a kariotípust és a sejtszegénység mélységét vizsgálja. Az R-IPSS előnye, hogy nagy esetszámú tanulmányon alapul (IPSS n=816, R-IPSS n=7012), így a ritkábban előforduló citogenetikai eltérések és azok prognosztikai jelentősége is vizsgálhatóvá vált. Ezáltal a betegeket nem négy, hanem öt csoportba lehet sorolni, így sokkal homogénebbek a prognosztikai kategóriák. Az R-IPSS mellett gyakran feltüntetik a betegek WHO alapú prognosztikai rendszerének (WHO classification-based prognostic scoring system, WPSS) kategóriáját is [33]. A WPSS többletinformációt nyújt a betegség természetéről azáltal, hogy nem egy adott időpontban mért sejtszegénység mértékét vizsgálja, hanem egy tágabb időintervallumban tanulmányozza a transzfúzióigényt, mely önálló független prognosztikai tényező. Transzfúzió igényről definíció szerint akkor beszélhetünk, ha a beteg négy hónapos periódus során legalább egy alkalommal transzfúzióra szorul nyolc hetente. A prognosztikai

rendszereket az 5. táblázat foglalja össze. A diagnosztikai algoritmushoz hasonlóan a prognosztikánál is pontosabb megítélést tesznek lehetővé az olyan új módszerek, mint a szomatikus mutáció vizsgálata és az áramlási citometria eredményei, melyek kiegészítik a klasszikus módszerek segítségével kapott információkat. Mindkét újabb módszerre igaz, hogy minél több eltérés detektálható ezekkel a módszerekkel, annál rosszabb a betegség kimenetele [19, 20, 45-48].

	IPSS		WPSS		R-IPSS	
prognosztikus változók	<i>csontvelői blast (%)</i>	<i>pont</i>	<i>WHO kategória</i>	<i>pont</i>	<i>csontvelői blast (%)</i>	<i>pont</i>
	• <5	0	• RA, RARS, del(5q-)	0	• ≤2	0
	• 5-10	0,5	• RCMD, RCMD-RS	1	• >2-<5	1
	• 11-20	1,5	• RAEB-1	2	• 5-10	2
• 21-30	2	• RAEB-2	3	• >10	3	
<i>kariotípus*</i>	<i>pont</i>	<i>kariotípus*</i>	<i>pont</i>	<i>kariotípus*</i>	<i>pont</i>	
• jó	0	• jó	0	• nagyon jó	0	
• közepes	0,5	• közepes	1	• jó	1	
• rossz	1	• rossz	2	• közepes	2	
<i>cytopenia</i>	<i>pont</i>	<i>transzfúziós igény</i>	<i>pont</i>	• rossz	3	
• 0/1	0	• nincs	0	• nagyon rossz	4	
• 2/3	0,5	• rendszeresen szükséges	1	<i>hemoglobin (g/l)</i>	<i>pont</i>	
				• ≥100	0	
				• 80-<100	1	
				• <80	1,5	
				<i>thrombocyta (G/l)</i>	<i>pont</i>	
				• ≥100	0	
				• 50-<100	0,5	
				• <50	1	
				<i>ANC (G/l)</i>	<i>pont</i>	
				• ≥0,8	0	
				• <0,8	0,5	
rizikó csoportok		<i>rizikó pontok</i>		<i>rizikó pontok</i>		<i>rizikó pontok</i>
	<i>alacsony</i>	0	<i>nagyon alacsony</i>	0	<i>nagyon alacsony</i>	≤1,5
	<i>közepes-1</i>	0,5-1	<i>alacsony</i>	1	<i>alacsony</i>	>1,5-3
	<i>közepes-2</i>	1,5-2	<i>közepes</i>	2	<i>közepes</i>	>3-4,5
	<i>magas</i>	≥2	<i>magas</i>	3-4	<i>magas</i>	>4,5-6
		<i>nagyon magas</i>	5-6	<i>nagyon magas</i>	>6	
kariotípus*	<i>jó</i>	• normál • izolált -Y • izolált del(5q) • izolált del(20q)	<i>jó</i>	• normál • izolált -Y • izolált del(5q) • izolált del(20q)	<i>nagyon jó</i>	• izolált -Y • izolált del(11q)
	<i>közepes</i>	• +8 • egyéb izolált eltérés • kettős abnormitás	<i>közepes</i>	• +8 • egyéb izolált eltérés • kettős abnormitás	<i>jó</i>	• normál • izolált del(5q) • izolált del(20q) • izolált del(12p) • kettős eltérés del(5q)-val
	<i>rossz</i>	• ≥3 abnormitás • 7. kromoszóma anomáliák	<i>rossz</i>	• ≥3 abnormitás • 7. kromoszóma anomáliák	<i>közepes</i>	• del(7q) • +8 • +19 • i(17q) • egyéb izolált/kettős független klónok
					<i>rossz</i>	• -7 • inv(3)/t(3q)/del(3q) • kettős eltérés -7/del(7q)-val • komplex 3 abnormitás
				<i>nagyon rossz</i>	• komplex >3 abnormitás	

5. táblázat. Nemzetközi prognosztikai pontozó rendszerek MDS-ben

A táblázat az MDS-ben használt prognosztikai pontozó rendszereket foglalja össze. A táblázatban előforduló rövidítések: IPSS: International Prognostic Scoring System, R-IPSS: Revised- International Prognostic Scoring System, WPSS: WHO classification-based prognostic scoring system, RA: refractory anemia, RARS: refractory anemia with ringed sideroblasts, RAEB: refractory anemia with excess blast, RCMD: refractory cytopenia with multilineage dysplasia. A táblázat az IPSS, R-IPSS, WPSS ajánlások alapján készült [11, 33, 38].

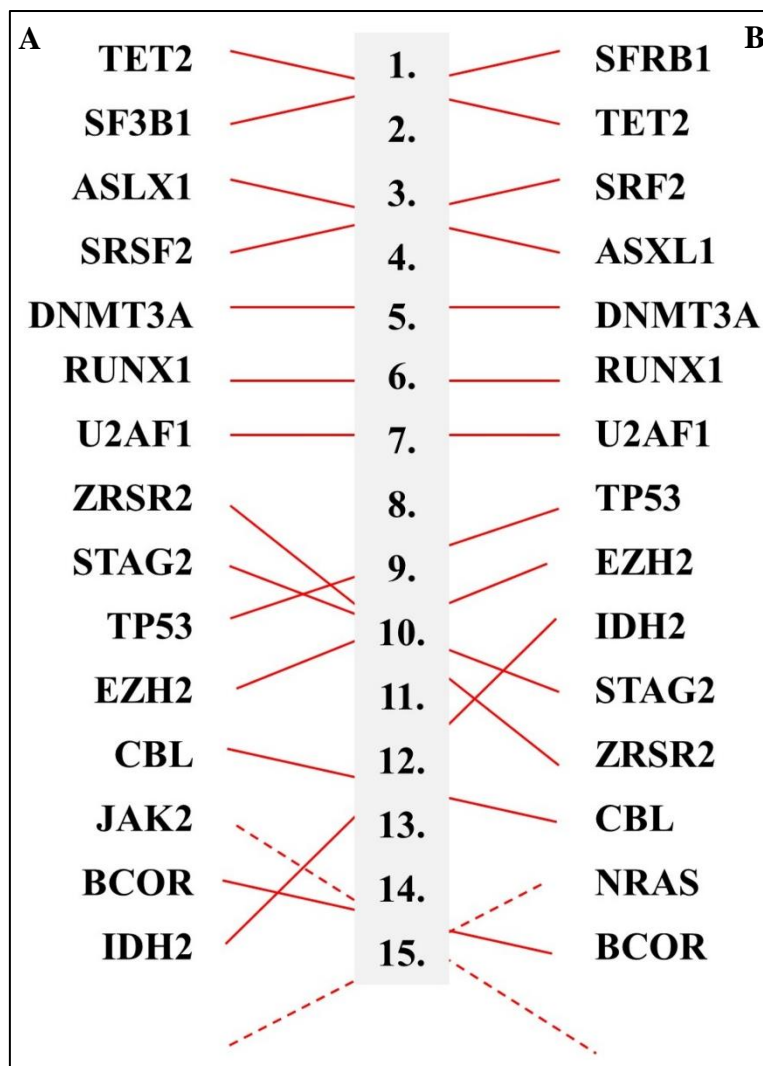
2.5. Az MDS diagnózisának felállítását és prognosztikai besorolását segítő további módszerek

Az MDS diagnózisának felállításában és a prognosztika megítélésében a morfológiai és citogentikai vizsgálatok klasszikus módszerekként alapvető jelentőséggel bírnak, minden diagnosztikai és prognosztikai klasszifikációs rendszer alapját képezik. Azonban napjainkban egyre nagyobb figyelmet kapnak egyéb módszerek is, mint a szomatikus mutáció vizsgálata és az áramlási citometriai analízis, melyek egyre nagyobb szerephez jutnak a normál, reaktív és klonális hematopoesis differenciálásában, ezáltal az MDS diagnózisának felállításában és prognosztikai besorolásának pontosításában [4, 5, 22].

2.5.1. Szomatikus mutáció vizsgálata

Az első pontmutációt MDS-ben, mely az *NRAS* onkogént érintette, 1987-ben írták le [49]. Az ezt követő években számos szomatikus mutációt írtak le, melyek az MDS-sel társultan fordultak elő. Az MDS-hez kapcsolódó szomatikus mutáció vizsgálata tekintetében a következő mérföldkő 2014-ben volt, amikor egymástól függetlenül két munkacsoport közölte eredményeit. Mindkét vizsgálat célja az volt, hogy nagy esetszámú betegmintán (Papaemmanuil és munkatársai tanulmányánál $n=738$; Haferlach és munkatársai tanulmányánál $n = 944$) új generációs szekvenálással felmérjék az MDS-ben előforduló szomatikus mutációkat

[19, 20]. Az általuk leírt 15 leggyakrabban detektálható mutáció közül tizennégy ugyanaz a mutáció volt a két tanulmányban, ezek előfordulási sorrendje is nagyban megegyezett (1. ábra). Az első négy génmutáció a betegek több mint 10%-ánál fordult elő és elsősorban az RNS splicing-ot vagy DNS metilációs útvonalakat érintik. A jelenlegi ajánlások szerint míg CHIP esetében a diagnózishoz a mutáns allél előfordulási arányának 2%-nak kellett lennie, MDS esetében inkább 10% feletti az elfogadott határérték [22]. Ma már több mint 40 mutáció ismert, melyek nemcsak a klonalitás megítélését, az MDS és az azt megelőző állapotok azonosítását segítik, hanem előrevehetik a kórkép lefolyását és a terápiára adott válaszkészséget [19, 20].



1. ábra Két nemzetközi tanulmány alapján a tizenöt leggyakrabban előforduló szomatikus mutáció MDS-ben

Az ábra két, egymástól független nemzetközi tanulmányban talált tizenöt MDS-ben leggyakrabban előforduló szomatikus mutációt és azok sorrendjét mutatja. Az A oszlop a Haferlach T. és munkatársainak, a B oszlop Papaemmanuil E. és munkatársainak eredményét mutatja be. A szomatikus mutációk pozíciójának változását az előfordulási rangsorban a piros vonalak jelölik. Piros szaggatott vonal mutatja azt a mutációt, mely csak az egyik tanulmányban került a tizenöt leggyakoribb mutáció közé.

Készült Papaemmanuil E. és munkatársai, valamint Rose D. és munkatársainak közleménye alapján [19, 20, 50].

2.5.2. Áramlási citometriai analízis

Az áramlási citometriai vizsgálat az MDS diagnosztikai irányelve alapján a kötelező, ajánlott és javasolt kategóriák közül az ajánlott módszerek között szerepel (6. táblázat) [22].

vizsgáló módszer	diagnosztikai értéke	ajánlási szint
perifériás kenetértékelés	-dysplasia -blast százalék	kötelező
aspirációval nyert csontvelői minta kenetértékelés	-dysplasia -blast százalék -gyűrűs sideroblast százalék	kötelező
biopsziával nyert csontvelői minta lenyomata	-cellularitás megítélése -fibrosis megítélése -CD34+ sejtek százaléka	kötelező
citogentikai vizsgálat	MDS-sel asszociált genetikai eltérések meghatározása	kötelező
FISH	ismételt sikertelen kariotípus meghatározás után célzott eltérések detektálása	ajánlott
áramlási citometria	immunfenotípus eltérések detektálása az érett és éretlen sejteken	ajánlott
SNP array	nagy felbontású detektálása a szubkromoszóma eltéréseknek metafázis analízis mellett	javasolt
mutáció analízis	célzott génpanel vizsgálata az MDS diagnosztikájában és prognosztikájában szerepet játszó szomatikus mutációk azonosítására	javasolt

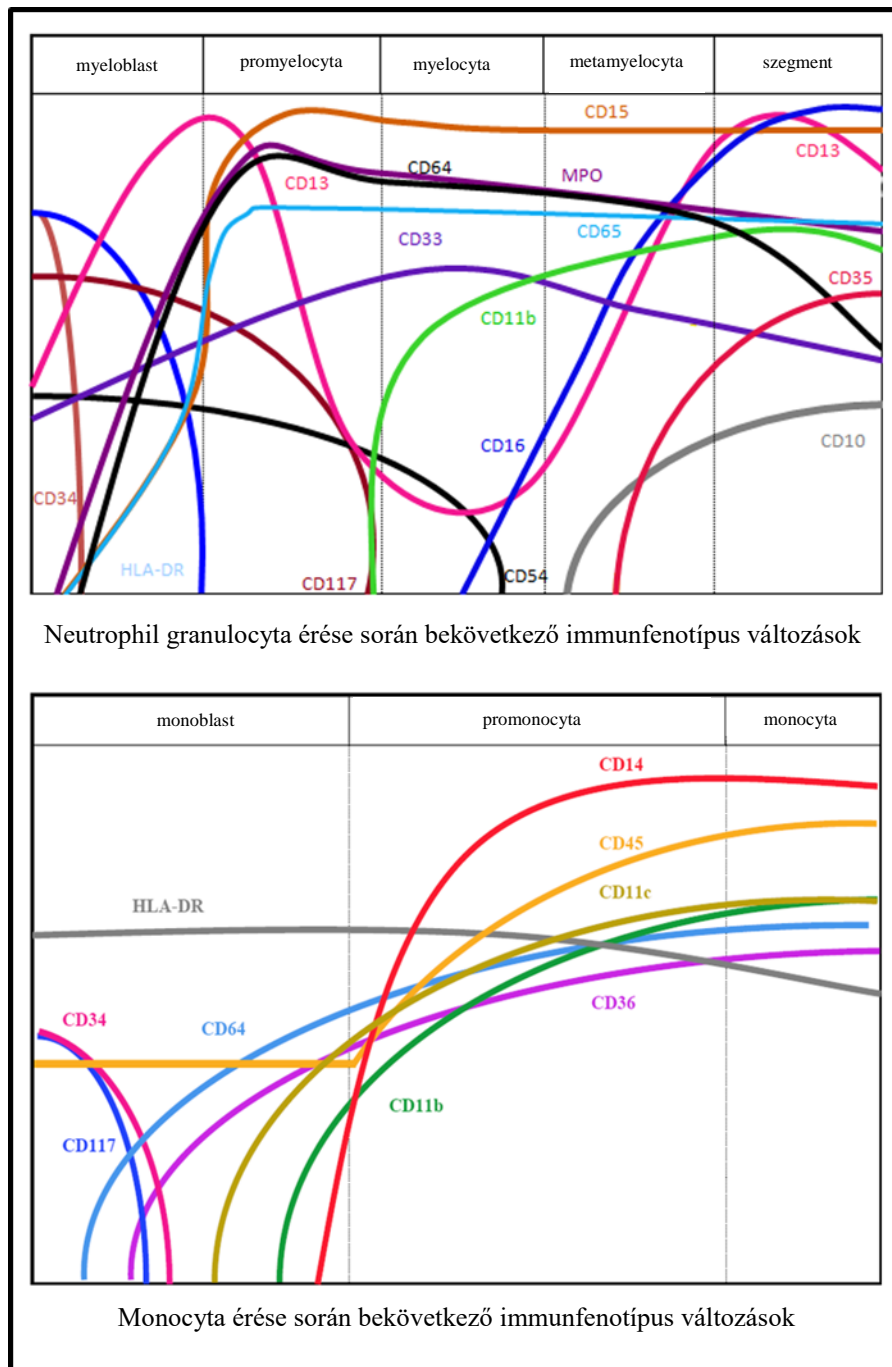
6. táblázat. Az MDS Nemzetközi Munkacsoportja (International Working Group, IWG of MDS) diagnosztikai kivizsgálás ajánlása

A táblázat az MDS Nemzetközi Munkacsoportja (International Working Group, IWG of MDS) irányelvében felsorolt diagnosztikai módszerek és azok MDS diagnózisában betöltött szerepét, valamint a módszer ajánlásának szintjét foglalja össze.

A táblázatban előforduló rövidítések: FISH: Fluorescent in situ hybridization, SNP: Single Nucleotide Polymorphism

Készült az MDS Nemzetközi Munkacsoportja (International Working Group, IWG of MDS) ajánlása alapján [22].

A felszíni és intracelluláris antigének expressziójának változása a normál hematopoiesis során jól ismert (2. ábra) [51, 52].



2. ábra. Normál hemopoesis során látott immunfenotípus eltérések

Az ábrán a különböző antigéneket jelölő CD markerek expressziójának intenzitás-változásai láthatóak a normál érés során neutrophil granulocytákon és monocytákon.

Az ábrán előforduló rövidítések CD: cluster of differentiation

Készült Orfao A, ELNet Flow MDS 2008 előadása alapján

Az elmúlt évtizedekben számos tanulmány írt le a normál expressziós mintázattól eltérő immunfenotípust, mely MDS-ben gyakran fordult elő és segíteni tudta az MDS diagnózisát és prognosztikai besorolását [53, 54]. A 7. táblázat foglalja össze azon immunfenotípus-eltéréseket, melyeket a jelenlegi ajánlások szerint kötelező vizsgálni [55]. Jóllehet, nincs egyetlen olyan immunfenotípus jel sem, amely önmagában elegendő a diagnózishoz, azonban a gyakran előforduló eltérések alapján ki lehet alakítani áramlási citometriai pontozó rendszereket (Flow cytometry scoring system, FCSS), melyek akár még szenzitívebbek is lehetnek a dysplasia megítélésében a morfológiai vizsgálatnál [39, 45-48, 56-61]. Ezen pontozó rendszerekkel nemcsak az előrehaladott, jelentős dysplasiával, blastszaporulattal rendelkező esetek azonosíthatóak, hanem segítséget tudnak nyújtani az enyhe dysplasiával jellemezhető MDS azonosításában is. Kifejezetten az alacsony rizikójú esetek elkülönítésére alakította ki Ogata és munkatársai az úgynevezett „mini-panelt”, mely mindössze négy paraméterből áll: 1. myeloblast százalék (MB%), 2. granulocytá és lymphocytá oldalra szórt fényének (side scatter, SSC) aránya, 3. lymphoblastok (LB) aránya a CD34 pozitív sejteken belül, 4. lymphocyták és a myeloblastok CD45 expressziójának átlagos fluoreszcencia intenzitása (mean fluorescence intensity, MFI) hányadosa [47]. A szűrő panel reprodukálhatóságát, magas szenzitivitását és jó specificitását több nemzetközi tanulmány bizonyította magas esetszámú populáció vizsgálatával [61, 62]. Az évtizedek alatt összegyűjtött tapasztalatok alapján a Nemzetközi/Európai Leukémia Hálózat Áramlási Citometriai MDS munkacsoportja (International/European Leukemia Net Working Group for Flow Cytometry in MDS, ELN IMDSFlow) célul tűzte ki, hogy az áramlási citometriai vizsgálat a WHO által is elismerten, még nagyobb hangsúlyt kapjon az MDS diagnózisának felállításában és a betegek prognosztikai besorolásában [55]. Ennek a célnak eléréséhez nélkülözhetetlen az MDS irányú áramlási citometriai módszer standardizálása, harmonizálása és az ELN ajánlásainak szigorú betartása [63, 64]. A jelenleg érvényben lévő ajánlás szerint az MDS-ben előforduló immunfenotípus

eltérések analízisének a mintavételt követően 24 órán belül meg kell történnie. A vizsgálatra a legalkalmasabb a nátrium (Na)-heparinnal alvadásgátolt csontvelői aspirációval nyert minta, alternatívaként etilén-diamin-tetraecetsav (K_3 -EDTA)-val alvadásgátolt minta is használható [64]. Ennek hátterében két dolog áll. Egyrészt az nyilvánvaló, hogy a megkésített mintafeldolgozás a sejtek apoptózisához, majd nekrozisához vezet, másrészt az is ismert jelenség, hogy a K_3 -EDTA és Na-heparin eltérő módon hat a sejtek életképességére. Több tanulmány bebizonyította, hogy az EDTA gyorsítja a sejtek elhalását [65-67]. Apoptosis során a sejtek magja, a citoskeletális rendszer és a sejtek membránja jellegzetes változáson megy keresztül [68, 69]. Ezen változások a markerek expressziós mintázatában olyan eltérést okozhatnak, melyek utánozhatják a dysplásiára jellemző jeleket és tévesen MDS diagnózisát támogató jelenséggé lehet értelmezni. Az ELN ajánlás betartásával ki lehet küszöbölni vagy minimalizálni lehet ezen in vitro létrejött változásokat, így csökkenthető a hibás interpretáció lehetősége. Ugyanakkor számos helyzetben elkerülhetetlen a minta szállítása, és ezáltal a késői mintafeldolgozás. Az áramlási citometriai vizsgálatához szükséges eszközöket és az eredmények interpretálásához a munkaerőt az országos centrumok tudják biztosítani, így a centrumtól távoli helyeken működő szakellátásról a minták szállítása elkerülhetetlen.

paraméterek	myeloid progenitor	neutrophil granulocyta	monocyta	lymphoid progenitor	erythroid prekurzor
SSC	nagyobb SSC	csökkent SSC	csökkent SSC		
CD45	csökkent expresszió	csökkent expresszió	csökkent expresszió		
CD117	csökkent expresszió	fokozott expresszió			fokozott expresszió
CD34	atípusos arányok	aszinkron érési jel	aszinkron érési jel	atípusos arányok	
HLA-DR	atípusos arányok	fokozott expresszió	csökkent expresszió		
CD11b	fokozott expresszió		csökkent expresszió		
HLA-DR/CD11b		atípusos mintázat	atípusos mintázat		
CD11b/CD16		atípusos mintázat	atípusos mintázat		
CD13/CD11b		atípusos érési mintázat			
CD13/CD16		atípusos érési mintázat			
CD13/CD33	atípusos arányok	atípusos arányok	atípusos arányok		
CD14			csökkent expresszió		
CD15	aszinkron érési jel	aszinkron érési jel			
CD15/CD10		atípusos mintázat			
CD19		aberráns expresszió		csökkent expresszió	
CD19/CD10				csökkent arány	
CD36		fokozott expresszió	aberráns expresszió		inhomogén expresszió, csökkent expresszió
CD36/CD14			atípusos mintázat		
CD5	aberráns expresszió	aberráns expresszió	aberráns expresszió		
CD56	aberráns expresszió	aberráns expresszió	aberráns expresszió		
CD7	aberráns expresszió	aberráns expresszió	aberráns expresszió		
CD71					inhomogén expresszió, csökkent expresszió
CD71/CD235					atípusos mintázat

7. táblázat. A Nemzetközi/Európai Leukémia Hálózat Áramlási Citometriai MDS munkacsoport ajánlása

A táblázat a Nemzetközi/Európai Leukémia Hálózat Áramlási Citometriai MDS munkacsoport ajánlását foglalja össze a myeloid-, lymphoid progenitor sejteken, valamint az erythroid prekursorokon, érett granulocytákon és monocytákon vizsgálandó markerek expressziójának, illetve azok kombinációjának mintázatára vonatkozóan.

Ábrán előforduló rövidítések: CD: cluster of differentiation, SSC: side scatter.

Készült a Nemzetközi/Európai Leukémia Hálózat Áramlási Citometriai MDS munkacsoport ajánlása alapján [55]

2.6. Mastocyták biológiája

A csontvelő pluripotens őssejtjeiből származó mastocytá irányába elkötelezett progenitor sejtek a véráram útján jutnak el a szervezet különböző szöveteibe, ahol bekövetkezik az érésük. A mastocyták végleges jellege – milyen ingerek hatására képes aktiválódni és aktiváció során milyen anyagokat szekretál – szövetspesifikus, így a mastocyták egy igen heterogén populációnak tekinthetők. Ebből adódóan eltérő élettani folyamatokban vesznek részt, mint például az öröklött és szerzett immunválaszban, a szövetkárosodás esetén a helyreállító folyamatokban (sebgyógyulás, fibrosis, angiogenesis) [70, 71]. Azonban, ha a mastocyták tartós stimulációja következik be, akkor a normál funkciók hatása fokozottan jelentkezik, így a mastocyták szerepet játszanak számos megbetegedés kialakulásában. Ezek egy része krónikus gyulladáshoz, autoimmun folyamatokhoz [72], míg másik része fokozott fibrosishoz köthető [73], mely érintheti például a tüdőt [74], emésztő rendszert [75], központi idegrendszert [76]. Emellett a mastocyták emelkedett számát találták különböző malignus folyamatokban is. A mastocyták nemcsak közvetlenül a tumoros sejtek növekedésének fokozása által, hanem a megnövekedett angiogenesis és a felszabaduló proteázok hatására bekövetkező invázióval is hozzájárulnak a tumor progresszióhoz [77, 78].

Morfológiai vizsgálattal a mastocyták emelkedett csontvelői százalékát találták MDS esetében is. Azt is kimutatták, hogy a triptázt expresszáló mastocyták aránya emelkedett [79, 80]. Ezzel összhangban a szérumban a triptáz szintjének meghatározását, mint nem invazív, új biomarkert, a

myeloproliferatív kórképek diagnosztikájában ajánlják [81, 82]. A mastocyták szerepe az MDS-ben tisztázatlan.

3. Célkitűzések

Munkánk során a rutinszerűen alkalmazott áramlási citometriai vizsgálat használatakor felmerülő gyakorlati kérdésekre kerestük a választ. Célunk az volt, hogy az MDS irányú áramlási citometriai vizsgálat eredményének helyes interpretálását segítsük, és a módszer nyújtotta lehetőségeket a lehető legjobban kihasználva javítsuk felhasználhatóságát az MDS rutin kivizsgálása és prognosztikai besorolása során.

1. A központi, speciális hematológiai laboratóriumokba való szállításból adódó késői mintafeldolgozás a rutin diagnosztikában gyakran előfordul, ezért munkánk során célul tűztük ki, hogy a markerek széles spektrumát felhasználva megvizsgáljuk a késői mintafeldolgozás okozta immunfenotípus eltéréseket. Tekintettel arra, hogy az áramlási citometriával rutinszerűen 100.000 sejt is vizsgálható, így nemcsak a myeloid, hanem az alacsony százalékban előforduló sejteken bekövetkező változásokat is elemeztük.
2. Mivel az áramlási citometriai vizsgálatot Na-heparinnal és K₃-EDTA-val alvadásgátolt mintából is el lehet végezni, így arra a kérdésre is kerestük a választ, hogy az alvadásgátló típusa hogyan befolyásolja a vizsgált sejtek immunfenotípusát.
3. A nemzetközi irodalomban eltérő információ van a sejtek elhalása során bekövetkező CD11b expressziójának változásáról. Ezért külön figyelmet fordítottunk arra, hogy az antikoaguláns típusa és a CD11b expressziójának

vizsgálatára szolgáló antitest klónja hogyan befolyásolja a CD11b expressziójának intenzitását a myeloid populációba tartozó sejteken.

4. Az MDS szűrésére szolgáló „mini-panel” elsősorban a myeloid populációt érintő eltérések vizsgálatán alapul. A hipotézisünk az volt, hogy ha az MDS-ben gyakran érintett erythroid sejtvonalról és a mastocytákról információt adó paramétereket is beleveszünk a „mini-panelbe”, akkor egy MDS vizsgálatára szenzitívebb pontozó rendszert alakíthatunk ki.
5. További célunk volt, hogy a CD71 expressziójának variációs koefficiensével (CD71 rCV%) és a mastocyták százalékaival (MC%) kiegészített „mini-panel” MDS szűrésére való alkalmazhatóságát egy második vizsgálati csoporton is elemezzük nyolcszínű jelölési technikával.
6. Végezetül célunk volt annak vizsgálata, hogy milyen körülmények között lehet legpontosabban meghatározni a mastocyták százalékát áramlási citometriai vizsgálattal.

4. Anyagok és módszerek

A tanulmány a hazai és nemzetközi előírásoknak megfelelően készült az Egészségügyi Tudományos Tanács jóváhagyásával (az engedély száma: 20582-2/2017/EKU).

A munkánk során felhasznált vegyszerek, műszerek, szoftverek:

anti-CD4 Pacific Blue	Becton Dickinson, San Jose, CA
anti-CD7 Pacific Blue	Beckman Coulter, Marseille, France
anti-CD10 APC	Becton Dickinson, San Jose, CA
anti-CD11b FITC	Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA
anti-CD11b PE	Dako, Glostrup, Denmark
anti-CD11b PE	Becton Dickinson, San Jose, CA
anti-CD13 PC7	Beckman Coulter, Marseille, France
anti-CD14 FITC	Becton Dickinson, San Jose, CA
anti-CD15 FITC	Becton Dickinson, San Jose, CA
anti-CD16 APC-AF750	Beckman Coulter, Marseille, France
anti-CD33 PC5.5	Beckman Coulter, Marseille, France
anti-CD34 PerCPCy5.5	Becton Dickinson, San Jose, CA
anti-CD34 APC	Beckman Coulter, Marseille, France
anti-CD38 APC-H7	Becton Dickinson, San Jose, CA
anti-CD45 APC	Becton Dickinson, San Jose, CA
anti-CD45 Pacific Orange	Exbio, Praha, Czech Republic

anti-CD56 PC7	Beckman Coulter, Marseille, France
anti-CD64 APC-AF750	Beckman Coulter, Marseille, France
anti-CD71 FITC	Becton Dickinson, San Jose, CA
anti-CD117 PE	Becton Dickinson, San Jose, CA
anti-CD123 PE	Beckman Coulter, Marseille, France
anti-CD300e APC	Becton Dickinson, San Jose, CA
anti-HLA-DR PerCPCy5.5	Becton Dickinson, San Jose, CA
anti-HLA-DR Pacific Blue	BioLegend, San Diego, CA
FacsLysing Solution	Becton Dickinson, San Jose, CA
FACSDiva CS&T IVD Beads	Becton Dickinson, San Jose, CA
NaCl	VWR Chemicals, Leuven, Belgium
Na ₂ HPO ₄ X2H ₂ O	VWR Chemicals, Leuven, Belgium
KCl	VWR Chemicals, Leuven, Belgium
KH ₂ PO ₄	VWR Chemicals, Leuven, Belgium
Paraformaldehyd	Sigma, St. Louis, MO
K ₃ -EDTA-val alvadásgátolt vérvételi cső	
3,0 mL, műanyag cső, referencia szám: 368857, Becton Dickinson and Company, BD Franklin Lakes, NJ, USA	
Na-heparinnal alvadásgátolt vérvételi cső	
6,0 mL, műanyag cső, referencia szám: 367876, Becton Dickinson and Company, BD Franklin Lakes, NJ, USA	

FACS Calibur áramlási citométer	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS Canto II áramlási citométer	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS Diva 6.1.3 analizáló szoftver	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA
Kaluza 1.2 analizáló szoftver	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
SPPS 20.0	Chicago, IL, USA
GraphPad Prism 6.0	San Diego, CA, USA

4.1. A preanalitikai faktorok dysplásiás jelek értelmezésére gyakorolt hatását vizsgáló tanulmány felépítése

Ebben a prospektív tanulmányban két betegcsoportot alakítottunk ki. Az első betegcsoportba 23 MDS-re vagy MPN-re utaló klinikai képpel rendelkező beteget soroltunk be, akiknek a mintáit 2014. január és 2015. február között küldték a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Laboratóriumi Medicina Intézetébe (DE ÁOK LMI). A betegek klinikai és laboratóriumi adatait foglalja össze a 8. táblázat. Minden betegől három cső csontvelői mintát vettek diagnosztikus célból. Egy K₃-EDTA-val alvadásgátolt csövet a morfológiai, áramlási citometriai és molekuláris onkológiai vizsgálatok elvégzésére, és két cső Na-heparinnal alvadásgátolt csövet, melyből kariotípus meghatározás történt. Munkánk során a diagnosztikai vizsgálatok elvégzése után megmaradt mintákat használtuk. A vizsgálat sorozat elvégzésére mind a 23 betegnek maradt K₃-EDTA-val alvadásgátolt csontvelői mintája, míg Na-heparinnal alvadásgátolt minta 16 esetben volt elegendő. Annak érdekében, hogy felmérjük az alvadásgátló immunfenotípusra gyakorolt hatását a K₃-EDTA-val és Na-heparinnal alvadásgátolt mintákból áramlási citometriai vizsgálatot végeztünk a beérkezés napján (de novo minta). Ezután két egymást követő napon újra megjelöltük és analizáltuk a mintákat, hogy

nyomon kövessük a késői mintafeldolgozás során bekövetkező változásokat. A minták a vizsgálat teljes ideje alatt szobahőmérsékleten voltak tárolva.

A második betegcsoportba nyolc olyan beteget válogattunk be, akiknél a hematológiai betegség fennállása kizárásra került. Minden betegnek volt K₃-EDTA-val és Na-heparinnal is alvadásgátolt perifériás vérmintája, melyeket párhuzamosan vizsgáltunk a beérkezés napján és két egymást követő napon. Ennél a betegcsoportnál a myeloid populáció CD11b expressziójának változását vizsgáltuk. A jelölések két különböző klónnal rendelkező monoklonális antitesttel történtek.

MDS-re vagy MPN-re utaló klinikummal rendelkező betegek (n=23)	
betegek száma	23
végső diagnózis	
MDS	6
MPN	4
AML	3
vas, B12 vagy folsav hiány	6
egyéb (lymphoma, szepszis)	4
kor (év)	60 (23-87)
nem (nő/férfi)	11/12
fehérvérsejtszám (G/L)	5.2 (0.74-14.4)
haemoglobin-koncentráció (g/L)	103 (64-171)
thrombocytaszám (G/L)	206 (11-568)
abszolút neutrophil szám (G/L)	3.3 (0.59-9.16)

8. táblázat A preanalitikai faktorok dysplásiás jelek értelmezésére gyakorolt hatását vizsgáló tanulmányba beválogatott betegek klinikai és laboratóriumi paraméterei

A táblázat a betegek klinikai és laboratóriumi adatait foglalja össze. A táblázatban előforduló rövidítések: MDS: myelodysplasiás szindróma, MPN: myeloproliferatív neoplázia, AML: akut myeloid leukémia.

4.2. Az MDS szűrésére szolgáló áramlási citometriai pontozó rendszer hatékonyságának növelésére irányuló tanulmány kialakítása

Ennél a tanulmánynál is két vizsgálati csoport volt, egy az új áramlási citometriai pontozó rendszer kialakítását szolgálta, míg egy másikon teszteltük a rendszer hatékonyságát. Mivel az elmúlt években az MDS irányú áramlási citometriai vizsgálatnál átállás történt négyről nyolcszínű jelölési technikára, így míg az első csoportban a pontozó rendszer kialakítását négy színű jelöléssel végeztük, addig a második csoportnál a rendszer paramétereit nyolcszínű jelöléssel detektáltuk, így azt is vizsgáltuk, hogy a technika változtatásának van-e hatása az áramlási citometriai pontozó rendszer használatára. A betegek beválogatása az anamnesztikus adatok, a morfológiai, citogenetikai és áramlási citometriai vizsgálatok eredményei alapján történtek. Az első csoportba tartozó mintákat 2009 decembere és 2014 januárja között küldték a DE ÁOK LMI-be. A második csoport esetében a diagnosztikai kivizsgálás 2014 májusa és 2015 májusa között történt. Az adatokat retrospektíven elemeztük. A kontroll csoportba 25 fő tartozott (18 nő és 7 férfi), akiknél a végső diagnózisok a következők voltak: szisztémás autoimmun kórkép (n=3), immunthrombocytopenia (n=7), terápiával összefüggő megbetegedés (sejtszegénység) (n=9), vashiány (n=2), krónikus veseelégtelenség (n=2) és infekció (n=2). A kontroll alcsoportban az átlagéletkor 53 év volt (23-80 év). Az MDS-es betegek klinikai és laboratóriumi paramétereit a 9. táblázat foglalja össze. Az áramlási citometriai vizsgálatok minden esetben K₃-EDTA-val alvadásgátolt csontvelői mintából történtek a mintavételt követő 1-2 órában.

	MDS vizsgálata négyszínű jelölési technikával	MDS vizsgálata nyolcszínű jelölési technikával
betegek száma	51	36
kor (év)	68 (30-98)	68 (43-84)
nem (nő/férfi)	24/27	21/15
neutropenia	5/51 (9.8%)	18/36 (50%)
anemia	31/51 (61%)	26/36 (72%)
thrombocytopenia	17/51 (33%)	7/36 (19%)
kóros kariotípus	10/51 (19.6%)	10/36 (28%)
<i>WHO klasszifikáció</i>		
MDS egy sejtvonal érintettségével	22 (43%)	18 (50%)
MDS több sejtvonal érintettségével	8 (16%)	11 (31%)
MDS blastszaporulattal	20 (39%)	5 (14%)
MDS izolált del(5q)	1 (2%)	2 (5%)

9. táblázat. Az MDS szűrésére szolgáló áramlási citometriai pontozó rendszer hatékonyságának növelésére irányuló tanulmányba beválogatott MDS-es betegek klinikai és laboratóriumi adatai

A táblázat a betegek klinikai és laboratóriumi adatait foglalja össze. A neutropéniát, anémiát, és thrombocytopéniát a módosított Nemzetközi Prognosztikai Pontozó Rendszer (R-IPSS) alapján definiáltuk. Neutropénia: az abszolút neutrophil szám: <0,8 G/L; anémia: hemoglobin-koncentráció <100 g/L; thrombocytopenia: a thrombocyta szám <100 G/L. A betegeket a WHO ajánlása (2016) alapján soroltuk be. A táblázatban előforduló rövidítések: MDS: myelodysplasiás szindróma

4.3. Immunfenotípus vizsgálata

A preanalitikai irányú vizsgálatokhoz, valamint az MDS szűrésére szolgáló pontozó rendszer paramétereinek detektálásához szükséges marker kombinációkat a 10. táblázat foglalja össze. A preanalitikai faktorok immunfenotípusra gyakorolt hatásának tanulmányozása során a mintákat részletesen vizsgáltuk MDS irányába. A sejteket három cső felhasználásával nyolcszínű jelölési technikával analizáltuk. Az első cső a monocyták, a második cső a granulocyták, a harmadik cső pedig elsősorban a myeloblastok vizsgálatához szükséges markereket tartalmazza (10/A táblázat). A CD11b expressziójának megkészt

mintafeldolgozás következtében létrejött változását két cső segítségével vizsgáltuk, melyek a granulocyták és monocyták azonosítását szolgáló markeren kívül különböző fluoreszcens festékekkel jelölt és klónnal rendelkező CD11b antitesteket tartalmaznak (10/B táblázat). A hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozó rendszer paramétereinek meghatározása egy-egy csővel történt, nyolc- (10/A táblázat) illetve négyszínű (10/C táblázat) jelölési technika felhasználásával. Mindhárom panel esetében a jelölés menete hasonló volt. Egy cső esetében négy vagy nyolc marker együttes vizsgálata történt. Az antitesteket minden csőnél 50 mikroliter aspirációval nyert csontvelői mintához adtuk, melynek sejtszámát előzetesen 1×10^6 -ra állítottuk be. Ezt követően sötétben 15 percig inkubáltuk a mintákat, majd a vörösvértestek lizálása érdekében 1 mL FacsLysing oldatot adtunk minden csőhöz és ismét inkubáltuk a mintákat 8 percig. Végül 1 mL foszfát-puffer oldattal történt mosás után 500 mikroliter 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk a sejteket. A mintákat négyszínű jelölés esetén FACS Calibur, nyolcszínű jelölésnél FACS Canto II áramlási citométeren mértük. Minden csőnél 100 000 eseményt gyűjtöttünk be. Annak érdekében, hogy az eredmények összevethetőek legyenek egymással, az áramlási citométereket a gyártó utasításainak megfelelően minden nap fluoreszcens mikrogyöngyökkel kalibráltuk. Az adatok analízisét FACS Diva 6.1.3. és Kaluza 1.2 szoftverrel végeztük.

A	MDS irányú részletes immunfenotípus vizsgálat nyolcszínű jelölési technikával								
	1. cső			2.cső			3.cső		
fluoreszcens festék	marker	klón	µl	marker	klón	µl	marker	klón	µl
FITC	CD71 (16x)	(LO1.1)	5	CD15 (20x)	(MMA)	6	CD14 (30x)	(MoP9)	6
PE	CD117	(104D2)	5	123	(SSDCLY107D2)	6	CD11b	(D12)	6
PerCP-Cy5.5/PC5.5	CD33 (16x)	(D3HL60.251)	5	CD34	(8G12)	5	HLA-DR	(L243)	5
PC7	CD56	(N901)	5	CD13	(Immu 103.4)	5	CD13	(Immu 103.4)	5
APC	CD34	(UPH2)	2,5	CD10	(HI10a)	2,5	CD300e	(UP H2)	2,5
APC-AF750	CD38	(HB7)	2,5	CD16 (30x)	(3G8)	5	CD64 (2x)	(22)	2,5
PB	CD7	(8H8.1)	2,5	HLA-DR	(L243)	1	CD4 (16x)	(RPA-T4)	5
PO	CD45 (4x)	(HI30)	2,5	CD45 (4x)	(HI30)	2,5	CD45 (4x)	(HI30)	2,5
B	CD11b expresszió vizsgálata								
FITC	-			CD11b	(ICRF44)	6			
PE	CD11b	(D12)	6	-					
PerCP-Cy5.5/PC5.5	CD33 (16x)	(D3HL60.251)	5	CD33 (16x)	(D3HL60.251)	5			
PC7	CD13	(Immu 103.4)	5	CD13	(Immu 103.4)	5			
APC	CD10	(HI10a)	2,5	CD10	(HI10a)	2,5			
APC-AF750	CD64 (2x)	(22)	2,5	CD64 (2x)	(22)	2,5			
PB	HLA-DR	(L243)	1	HLA-DR	(L243)	1			
PO	CD45 (4x)	(HI30)	2,5	CD45 (4x)	(HI30)	2,5			
C	Áramlási citometriai pontozó rendszer paramétereinek megállapítása négy színű jelölési technikával								
FITC	CD71 (16x)	(LO1.1)	5						
PE	CD117	(104D2)	5						
PerCP-Cy5.5	CD34	(8G12)	5						
APC	CD45 (4x)	(2DI)	5						

10. táblázat. A preanalitikai irányú vizsgálatokhoz, valamint az MDS szűrésére szolgáló pontozó rendszer paramétereinek detektálásához szükséges panelek

Az első panel a nyolcszínű jelölési technikával történt MDS irányú részletes immunfenotípus vizsgálatához szükséges markerek kombinációját mutatja be (A). A CD11b expressziójának vizsgálata a második pannellel történt (B). A hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozó rendszer paramétereinek meghatározása egy-egy csővel történt, markerei, melyek a nyolc- (A) illetve négy színű (C) jelöléshez szükségesek, dőlt betűtípussal vannak kiemelve. A táblázatban használt rövidítések: FITC: fluorescein isothiocyanate, PE: phycoerythrin, PerCP-Cy5.5: peridinin chlorophyll protein cyanine 5.5, PC5.5: phycoerythrin cyanine 5.5, PC7: phycoerythrin cyanine 7, APC: allophycocyanin, APC-AF750: conjugation allophycocyanin-alexa fluor 750, PB: pacific blue, PO: pacific orange.

4.4. A preanalitikai faktorok immunfenotípusra gyakorolt hatásának vizsgálatához szükséges paraméterek azonosítása

Részletes MDS irányú áramlási citometriai vizsgálat esetén a sejtek azonosítása a következő kapuzás szerint történt: Első lépésként az előre (FSC) és oldalra (SSC) szórt fényt ábrázoló kétváltozós dot-plot-on kizártuk azon eseményeket, melyek a fényszórási karakterük alapján nem tekinthetők valósnak. A myeloblastokat (MB) és lymphoblastokat (LB) az SSC, valamint a CD117 és CD34 expressziójának intenzitása alapján azonosítottuk (MB: CD117+/CD34+/ közepes oldalszórás; LB: CD117-/CD34+/alacsony oldalszórás), majd a CD45 és SSC kétváltozós dot-ploton visszakupuztunk, hogy biztosan csak a MB és LB populációt jelöljük ki. A lymphocytákat, monocytákat és granulocytákat az SSC és CD45, CD33, CD64 vagy HLA-DR expressziójának intenzitása alapján kapuztuk (granulocyta: nagy oldalszórású, CD45+/CD33+/CD64-/HLA-DR-; monocyta: közepes oldalszórású, CD33++/CD64+/HLA-DR+/CD45+; lymphocyta: kis oldalszórású, CD45+/CD33-/CD64-/HLA-DR-+). Az erythroid prekurzorok a CD45-/CD71+ immunfenotípussal jellemezhetők. A plazmasejtek az élénk CD38 expressziójuk alapján különülnek el a többi sejttypustól.

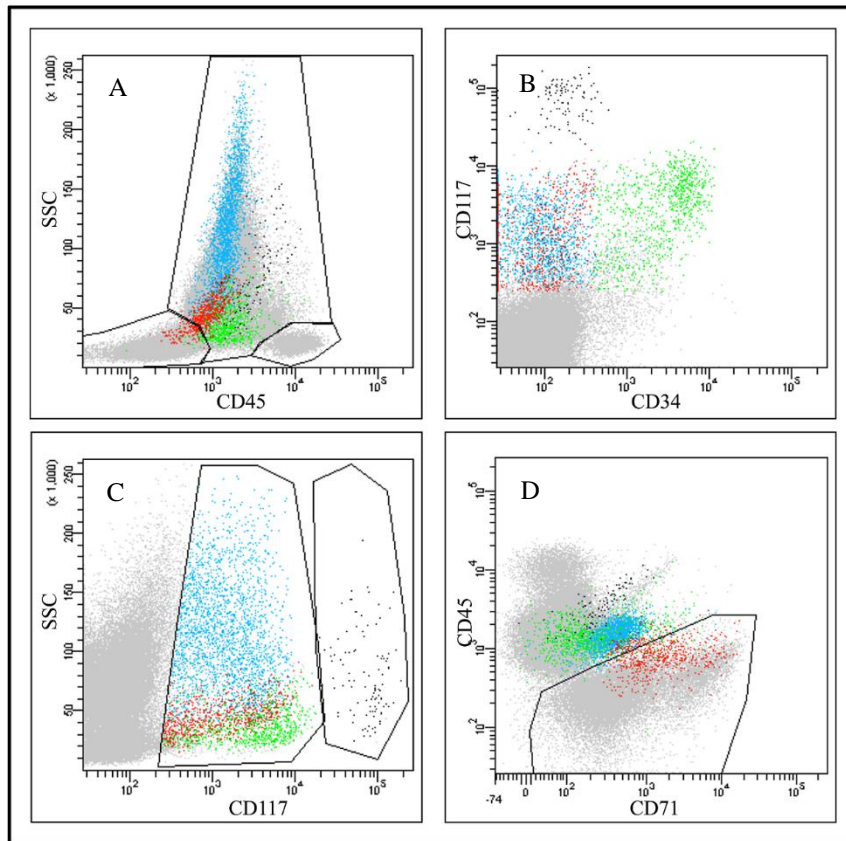
Miután a sejttypusokat minden cső esetében azonosítottuk, 37 különböző paramétert vizsgáltunk mind az K₃-EDTA-val mind a Na-heparinnal alvadásgátolt minták esetében. A beérkezés napján mért paramétereket, melyek magukban foglalták számos marker átlagos fluoreszcencia intenzitásának (MFI), a CD71 marker variációs koefficiensének és több sejtpopuláció százalékanak vizsgálatát, az első és második napon újrajelölés után mért paraméterekhez hasonlítottuk.

A tanulmány második felében a granulocyták és monocyták CD11b expresszióját vizsgáltuk. Nemcsak önmagában az alvadásgátlónak és a késői mintafeldolgozásnak a hatását akartuk feltárni, hanem arra is kerestük a választ, hogy a monoklonális antitest klónja hogyan

befolyásolja a preanalitikai faktorok okozta változásokat. A fluoreszcein isotiocianát (FITC) festékkel jelölt CD11b antitest klónja ICRF44, míg a fikoeritrin (PE) festékkel jelzett antitest klónja D12. A fényszórási karakterük alapján nem valós események kizárása után a monocyták és granulocyták kapuzása az első tanulmányhoz hasonlóan SSC és CD33, CD64, CD45 és HLA-DR expressziójának intenzitása alapján történt.

4.5. MDS szűrésére szolgáló áramlási citometriai pontozó rendszer kialakítása

A 10. táblázatban látható az a négy- és nyolcszínű cső, melynek segítségével nemcsak az Ogata és munkatársai által kialakított „mini-panel” négy paramétere határozható meg [47], hanem információt kaphatunk az erythroid prekurzorokról és mastocyták százalékos arányáról is. A valós eseményeket itt is a fényszórási karakterek alapján azonosítottuk, majd kijelöltük a vizsgálni kívánt populációkat: MB (CD34+/CD117+/CD45dim/közepes oldalszórás), LB (CD34+/CD117-/alacsony oldalszórás), granulocytá (CD45+/nagy oldalszórás), lymphocytá (CD45+/alacsony oldalszórás), erythroid prekurzor (CD71+/CD45-), mastocytá (CD117++) (3. ábra). A „mini-panel” négy paraméterénél az eredeti, a panel kidolgozásánál használt határértékeket vettük figyelembe, míg az erythroidok CD71 rCV és a mastocyták százalékánál új határértékeket állapítottuk meg a kontroll csoport adatai alapján (CD71 rCV: 85,8%, MC%: 0.039%). Amennyiben egy adott mintánál a vizsgált paraméterek eltértek a határértéktől, egy pontot adtunk. Ezt követően az így kialakult hat paraméterből álló pontozó rendszer diagnosztikai és prognosztikai hatékonyságát vizsgáltuk két betegcsoporton.



3. ábra. Myeloblast, mastocytá és erythroid prekursor azonosítását szolgáló reprezentatív dot-plotok

A myeloblastokat, az erythroid prekursorokat és mastocytákat reprezentáló dot-plot-ok. Zöld szín jelöli a myeloblastokat, kék a promyelocytákat, piros az erythroblastokat, fekete a mastocytákat (A, B, C). Az erythroid prekursorok CD71 rCV% értékére utaló mintázatot a CD45/CD71 kétváltozós dot-ploton lehet megfigyelni (D).

4.6. A mastocyták detektálása áramlási citometriával

Mivel korábban a mastocyták százalékát nem vették bele áramlási citometriai pontozó rendszerbe, így ezt a paramétert részletesebben is megvizsgáltuk. A mastocyták élénk CD117 expressziójuk alapján jól elkülönülnek a többi sejtípustól. Egyrészt vizsgáltuk a preanalitikai faktorok hatását a CD117 expressziójának intenzitására és a mastocyták százalékára 7 beteg K₃-EDTA-val és Na-heparinnal alvadásgátolt csontvelői mintájának vizsgálatával. Másrészt, az MDS szűrésére szolgáló áramlási citometriai pontozó rendszer hatékonyságának növelésére

irányuló tanulmány betegcsoportjainak részletesebb vizsgálatával ellenőriztük, hogy a mastocyták emelkedett aránya az MDS-es betegeknel összefüggést mutat-e reaktív folyamatra utaló jelekkel (perifériás fehérvérsejtszám, csontvelői plazmasejt százalék), ugyanis a mastocyták aránya reaktív folyamatoknál emelkedhet. Továbbá megnéztük, hogy az emelkedett mastocyták szám és az aspirációval nyert csontvelői magvas sejtek száma között van-e kapcsolat.

4.7. Statisztikai analízis

A preanalitikai faktorok immunfenotípusra gyakorolt hatását vizsgáló tanulmányánál az alacsony esetszámra való tekintettel nem parametrikus tesztekkel használtunk. Két összetartozó csoport esetében az elemzéseket Wilcoxon-teszttel, míg több összetartozó csoportnál a Friedman-teszttel végeztük, post-hoc tesztként a Dunn-tesztet alkalmaztuk. Az áramlási citometriai pontozó rendszerről szóló tanulmányban az adatok megoszlását Shapiro-Wilk-teszttel ellenőriztük. Két független csoport adatainak vizsgálatakor normál eloszlásnál a Student-féle t tesztet, míg nem normál eloszlásnál a Mann-Whitney U tesztet végeztük a számításokat. Szignifikánsnak tekintettünk egy különbséget, ha a p értéke kisebb, mint 0,05. Az áramlási citometriai pontozó rendszer specificitásának és szenzitivitásának meghatározása a ROC (Receiver Operating Characteristic) analízissel történt, az IPSS-el való korrelációt pedig Spearman-teszttel végeztük. Khí négyzet-próbát használtunk a diszkrét változók közötti összefüggés vizsgálatára. Az eseménymentes túlélés becslését Kaplan-Meier-féle analízissel végeztük, a különbséget log-rank tesztet vizsgáltuk. A számításokhoz és az ábrák elkészítéséhez SPSS 20.0 és GraphPad Prism 6.3 statisztikai programokat használtunk.

5. Eredmények

5.1. Preanalitikai faktorok hatása az immunfenotípusra

5.1.1. Vizsgált sejtek immunfenotípusának összehasonlítása K₃-EDTA-val és Na-heparinnal alvadásgátolt de novo mintáknál

Amikor önmagában az alvadásgátló típusának immunfenotípusra gyakorolt hatását vizsgáltuk a mintavételt követően 1-2 órán belül, a K₃-EDTA-val és Na-heparinnal alvadásgátolt mintáknál 14 paraméternél találtunk szignifikáns különbséget, melyeket a 11. táblázat foglal össze. A Na-heparinnal alvadásgátolt mintáknál mérthez képest hat paraméter szignifikánsan magasabb a K₃-EDTA-val alvadásgátolt mintáknál: a CD4 MFI érték a monocytákon, a CD117 MFI érték a myeloblastokon, a CD45 MFI érték a lymphocytákon, CD71 rCV%-a az erythroid prekurzorokon és a plazmasejtek százaléka és CD38 MFI értéke. Nyolc paraméter szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a K₃-EDTA-val alvadásgátolt mintáknál: az SSC és a CD45, CD11b, valamint CD33 expressziójának átlagos intenzitása a granulocytákon, a CD11b, CD13 MFI érték a monocytákon, a CD34 MFI érték a myeloblastokon és a CD71 MFI érték az erythroid prekurzorokon. Annak ellenére, hogy a CD34, CD117 és CD71 markerek expressziójának intenzitása szignifikáns különbséget mutatott a K₃-EDTA és Na-heparinnal alvadásgátolt minták között, az ezen markerek segítségével kijelölt myeloblast, lymphoblast és erythroid prekurzorok százaléka nem tért el szignifikánsan a kétféle módon alvadásgátolt mintákban.

		Na-heparin			K ₃ -EDTA			P érték
		medián	IQR		medián	IQR		
granulocytá n=16	SSC	160346	133356	177111	146635	129971	153327	0.003
	CD45 MFI	3964	3271	4569	3113	2696	4324	0.013
	CD15 MFI	5743	4329	6828	6803	4177	7924	0.134
	HLA-DR MFI	179	93	390	243	197	286	0.155
	CD11b MFI	10389	7208	14936	1990	1593	3299	<0.001
	CD13 MFI	1754	1398	2576	1786	1102	2288	0.079
	CD16 MFI	1764	1342	2119	1755	1395	2878	0.836
	CD10 MFI	1215	977	1641	931	801	1692	0.179
	CD33 MFI	1334	992	1670	1194	878	1705	0.044
	CD16%	45.5	40.1	61.3	47.5	38.0	58.9	0.641
CD10%	34.5	29.2	49.5	34.9	31.5	54.3	0.733	
monocytá n=16	SSC	75758	68211	80506	73891	67578	80301	0.125
	CD64 MFI	1330	1140	2051	1584	1105	2368	0.776
	CD4 MFI	455	369	543	496	323	753	0.036
	CD15 MFI	1072	799	1502	1114	987	1528	0.433
	HLA-DR MFI	7178	4578	7955	6165	4420	7139	0.078
	CD11b MFI	13545	11385	20306	4001	3453	5080	0.001
	CD13 MFI	3522	1339	7092	3322	1106	4792	0.031
	CD14 MFI	889	812	1482	971	720	1254	0.078
	CD300e MFI	1052	724	1914	1070	789	1804	0.955
	CD33 MFI	7086	5827	9495	6790	5119	8390	0.078
CD14%	55.4	41.3	62.5	57.3	47.8	62.8	0.842	
CD300e%	39.1	24.2	58.8	41.5	26.0	59.0	0.272	
myeloblast n=16	százalék	0.88	0.62	2.30	1.06	0.73	2.08	0.451
	CD45 MFI	3571	3019	3951	3581	2820	3938	0.877
	CD34 MFI	3017	2276	4231	2495	1959	3125	0.008
	CD117 MFI	2599	2178	5455	3321	2805	5956	0.001
lymphoblast n=7	százalék	0.10	0.06	0.20	0.08	0.06	0.16	0.061
preB sejt n=9	CD10%	0.50	0.25	0.95	0.90	0.40	1.11	0.172
lymphocytá n=16	százalék	9.70	6.25	15.45	10.30	6.03	14.88	0.82
	SSC	20777	19017	21783	20427	18451	21907	0.352
	CD45 MFI	15833	12913	18175	16742	13839	21026	0.004
erythroid prekurzor n=16	százalék	18.80	10.33	31.25	19.40	11.83	31.25	0.776
	CD71 MFI	6158	3767	8283	3564	2201	5261	0.003
	CD71rCV	79.5	53.8	112.3	102.7	81.0	117.7	0.049
plazmasejt n=15	százalék	0.2	0.2	0.5	0.5	0.3	0.9	0.005
	CD38 MFI	29173	25738	32208	35393	29221	38793	0.002

11. táblázat. Az alvadásgátló típusának hatása az immunfenotípusra de novo mintánál

A táblázatban az egyes markerek átlagos fluoreszcencia intenzitása és a diagnosztikai szempontból releváns sejtpopulációk százalékanak átlaga és interkvartilis tartománya van feltüntetve. A P értékeknél félkövér betűtípussal a szignifikáns különbségek ($P < 0,05$) vannak kiemelve. Az egyes sejtpopulációk eltérő számosságának háttérben az áll, hogy bizonyos esetekben a ritkán előforduló sejtpopulációk százaléka a detektálhatóság alá esik (érzékenység 0,03%). A táblázatban használt rövidítések: MFI: mean fluorescence intensity, SSC: side scatter, IQR: interquartile range.

5.1.2. A késleltetett mintafeldolgozás okozta immunfenotípus-eltérések

A késleltetett mintafeldolgozás okozta immunfenotípus-eltéréseket K_3 -EDTA alvadásgátló használatánál a 12/A, míg Na-heparin alvadásgátló alkalmazásakor a 12/B táblázat összegzi. Egy nappal később történt mintafeldolgozás következtében a K_3 -EDTA-val alvadásgátolt mintáknál tíz, míg a Na-heparinnal alvadásgátolt mintáknál csak négy paraméternél figyeltünk meg szignifikáns változást. Ezen paraméterek közül kettő bizonyult a legérzékenyebbnak: a myeloblastok CD117 és a plazmasejtek CD38 expressziójának intenzitása. Mindkét markernél az alvadásgátló típusától függetlenül jelentősen csökkent az expresszió intenzitása a késői mintafeldolgozás okozta változások következtében.

Újabb egy nap eltelte után, a második napra, ugyanolyan mértékű immunfenotípus eltérést láttunk a K_3 -EDTA-val és Na-heparinnal alvadásgátolt mintáknál. A megvizsgált paraméterek közül tizenöt esetben tapasztaltunk szignifikáns csökkenést a K_3 -EDTA alvadásgátló használatakor. A Na-heparinnal alvadásgátolt mintáknál három paraméter esetében szignifikáns emelkedést, míg tizenkettőnél szignifikáns csökkenést detektáltunk. Kilenc paraméter változott szignifikánsan az alvadásgátló típusától függetlenül: a granulocyták oldalra szórt fényének karaktere, a monocyták CD4, CD64, CD33 expressziójának intenzitása és a CD14 pozitív monocyták aránya, a preB karakterű sejtek és lymphocyták százaléka, a lymphocyták CD45 és erythroid prekursorok CD71 MFI értéke.

A mintavételtől számított két nappal később elvégzett áramlási citometriai vizsgálatkor a K_3 -EDTA-val történt alvadásgátló használatakor tizenkettő, Na-heparinnál tizennyolc paraméter volt változatlan a mintavétel után 1-2 órán belül, friss mintából történt analízis eredményeihez képest.

A következő tizenegy paraméternél sem a késői mintafeldolgozásnak sem az alvadásgátló típusának nincs hatása: a granulocyták CD10, CD16 és CD33 MFI értéke; a CD10

pozitív granulocyták százaléka, a monocyták HLA-DR MFI értéke; a myeloblastok CD45 és CD34 MFI értéke; a lymphoblastok, erythroid prekurzorok és plazmasejtek százaléka, valamint az erythroidok CD71 rCV% értéke.

		0. nap			1. nap			2. nap			P ¹	P ²
		median	IQR		median	IQR		median	IQR		0.nap-1.nap	0.nap-2.nap
granulocyta n=23	SSC	153327	138520	176341	149831	134405	172463	124668	110787	148576	>0.999	<0.001
	CD45	3000	2739	3753	4141	3313	4472	3610	2787	3972	0.037	>0.999
	CD15	3900	2199	7126	4681	2203	6913	3734	2473	6290	>0.999	0.554
	HLA-DR	235	185	285	269	233	341	324	261	452	0.037	<0.001
	CD11b	2795	1709	3613	1566	887	2406	642	436	1082	0.117	<0.001
	CD13	1845	1185	2308	2538	1875	3073	2607	2162	3296	0.006	0.001
	CD16	2179	1491	2930	2102	1750	3000	1780	1003	2727	0.554	0.554
	CD10	1183	847	1627	1178	1001	1768	976	807	1285	0.231	0.231
	CD33	1212	815	1717	1349	917	1773	1188	754	1678	0.055	>0.999
	CD16%	49.0	42.0	60.8	51.0	43.0	56.2	50.0	40.7	59.0	0.029	0.715
CD10%	38.1	31.0	47.0	41.0	34.4	49.5	38.4	31.7	45.0	0.081	>0.999	
monocyta n=23	SSC	79099	71934	83805	68674	64864	75911	62401	60160	67200	0.117	<0.001
	CD64	1596	1107	1886	1441	1052	1757	973	732	1544	0.117	<0.001
	CD4	579	422	691	512	341	712	418	324	552	>0.999	0.024
	CD15	967	280	1290	632	281	836	564	309	924	0.081	0.024
	HLA-DR	6320	5487	7790	5779	4291	10731	5109	3969	7598	>0.999	0.315
	CD11b	4700	3712	6538	716	342	1026	325	209	406	<0.001	<0.001
	CD13	4190	1403	6409	2873	1156	5090	2928	2035	4448	0.006	0.024
	CD14	1121	777	1571	777	627	1023	556	377	718	0.037	<0.001
	CD300e	1423	1055	1787	767	556	1263	523	379	925	0.081	<0.001
	CD33	6747	5015	8633	5270	3750	8869	4045	3101	5355	>0.999	<0.001
CD14%	60.0	50.0	65.8	53.0	40.0	59.0	25.0	17.0	44.0	0.231	<0.001	
CD300e%	43.4	26.5	56.0	31.3	25.0	47.0	27.7	13.1	36.0	0.037	<0.001	
myeloblast n=23	százalék	0.92	0.73	1.47	0.81	0.54	1.35	0.76	0.57	0.97	0.196	0.008
	CD45	3555	2383	3838	3242	2286	3992	3034	2636	4113	0.421	0.315
	CD34	3023	2262	3709	2976	1987	3484	2318	1829	3860	0.554	0.231
	CD117	3148	2781	3745	2411	2128	3523	1876	1532	2592	0.006	<0.001
lymphoblast n=12	százalék	0.17	0.06	0.23	0.15	0.05	0.17	0.09	0.06	0.16	0.554	0.459
preB sejt n=17	CD10%	0.90	0.23	1.64	0.50	0.19	1.02	0.40	0.16	0.70	0.215	<0.001
lymphocyta n=23	százalék	10.9	6.6	16.2	10.0	5.7	14.7	8.3	4.9	12.8	0.554	<0.001
	SSC	21410	19704	22477	19611	17655	20994	18366	16682	19817	0.055	<0.001
	CD45	15962	14646	19342	14898	12197	17206	13087	9894	16167	0.081	<0.001
erythroid prekurzor n=23	százalék	14.3	9.2	27.7	14.1	10.0	29.0	13.9	9.4	28.0	0.715	>0.999
	CD71	4896	2448	6486	3164	1888	4449	2486	1792	3552	0.315	0.015
	CD71rCV	95	80	108.9	88.9	68.7	113.2	84.4	63	103.4	>0.999	>0.999
plazmasejt n=22	százalék	0.50	0.32	0.70	0.50	0.30	0.63	0.46	0.30	0.74	0.457	>0.999
	CD38	36019	31070	39660	28946	24769	33504	25467	21210	31042	0.001	<0.001

12/A táblázat. A késleltetett mintafeldolgozás okozta immunfenotípus-eltérések K₃-EDTA alvadásgátló használatánál

A táblázatban az egyes markerek átlagos fluoreszcencia intenzitása és a diagnosztikai szempontból releváns sejtpopulációk százalékanak átlaga és interkvartilis tartománya van feltüntetve. A P értékeknél félkövér betűtípussal a szignifikáns különbségek ($P < 0,05$) vannak kiemelve. P¹ A mintavételt követően azonnal és egy nap eltelte után mért eredmények összehasonlítása. P² A mintavételt követően azonnal és két nap eltelte után mért eredmények összehasonlítása. Az egyes sejtpopulációk eltérő számosságának hátterében az áll, hogy bizonyos esetekben a ritkán előforduló sejtpopulációk százaléka a detektálhatóság alá esik (érzékenység 0,03%). A táblázatban használt rövidítések: MFI: mean fluorescence intensity, SSC: side scatter, IQR: interquartile range.

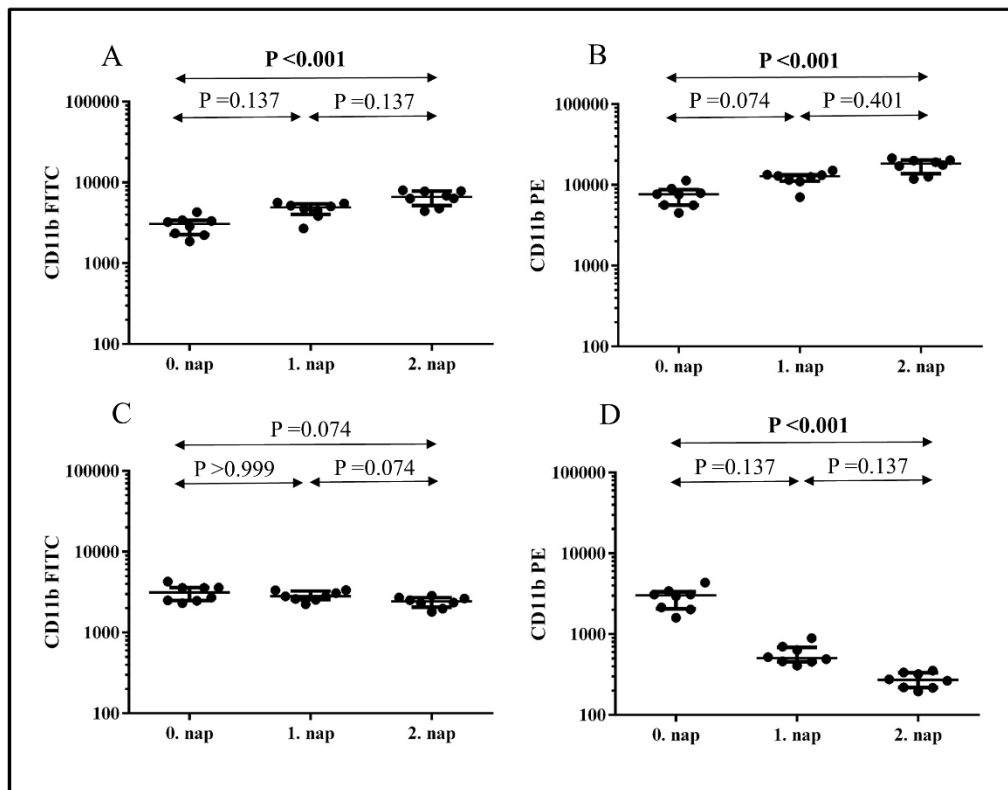
		0. nap			1. nap			2. nap			P ¹	P ²
		medián	IQR		medián	IQR		medián	IQR		0.nap-1.nap	0.nap-2.nap
granulocyta n=16	SSC	160346	133356	177111	146104	125819	176537	129252	109198	163244	>0.999	0.004
	CD45	3964	3271	4569	4680	3576	5277	4039	3437	4859	0.335	>0.999
	CD15	5743	4329	6828	5245	3720	6371	4398	2832	5335	0.867	0.024
	HLA-DR	179	93	390	197	118	302	290	171	492	>0.999	0.024
	CD11b	10389	7208	14936	11877	9311	16119	10517	7569	13451	0.867	>0.999
	CD13	1754	1398	2576	2218	1641	2680	2111	1869	3250	0.648	0.008
	CD16	1764	1342	2119	1939	1229	2618	1467	643	2142	>0.999	0.102
	CD10	1215	977	1641	1222	924	1805	997	667	1341	0.867	0.335
	CD33	1334	992	1670	1531	1071	1891	1403	932	1827	0.472	>0.999
	CD16%	46	40	61	47	38	59	40	31	52	>0.999	0.014
CD10%	35	29	50	37	30	49	36	25	46	>0.999	0.752	
monocyta n=16	SSC	75758	68211	80506	76178	70576	81870	72624	66219	81805	>0.999	>0.999
	CD64	1330	1140	2051	1434	898	1966	1369	808	1803	0.156	<0.001
	CD4	455	369	543	344	276	590	261	208	421	0.335	<0.001
	CD15	1072	799	1502	751	593	1249	681	496	829	0.024	<0.001
	HLA-DR	7178	4578	7955	8003	4743	11516	7402	5690	8140	0.472	>0.999
	CD11b	13545	11385	20306	10174	7165	12797	7428	4317	12032	0.232	<0.001
	CD13	3522	1339	7092	2859	1195	5494	2559	1530	4105	0.335	0.867
	CD14	889	812	1482	878	650	1008	637	545	907	>0.999	0.014
	CD300e	1052	724	1914	1116	708	1528	783	644	1273	0.867	>0.999
	CD33	7086	5827	9495	5658	4675	8438	4443	3817	5897	0.232	<0.001
CD14%	55.4	41.3	62.5	50.5	38.8	59.8	36.5	22.3	45.5	>0.999	<0.001	
CD300e%	39.1	24.2	58.8	41.9	24.5	50.8	32.0	24.0	52.3	>0.999	>0.999	
myeloblast n=16	százalék	0.88	0.62	2.30	0.74	0.50	1.95	0.73	0.42	2.12	0.279	0.065
	CD45	3571	3019	3951	3554	2594	4571	3484	2780	4096	>0.999	>0.999
	CD34	3017	2276	4231	2624	1535	3053	2137	1680	2812	0.335	0.102
	CD117	2599	2178	5455	1973	1355	3308	1524	1186	2572	0.004	<0.001
lymhoblast n=8	százalék	0.09	0.05	0.18	0.07	0.03	0.14	0.07	0.02	0.10	>0.999	0.508
preB sejt n=9	CD10%	0.50	0.25	0.95	0.52	0.25	0.85	0.30	0.17	0.70	>0.999	0.001
lymphocyta n=16	százalék	9.7	6.3	15.5	7.7	4.5	13.2	6.9	3.3	10.0	0.279	0.001
	SSC	20777	19017	21783	17295	15546	20467	17232	15318	18176	0.024	<0.001
	CD45	15833	12913	18175	12204	9853	17172	9948	8465	14071	0.472	0.002
erythroid prekurzor n=16	százalék	18.8	10.3	31.3	20.1	10.8	31.5	19.2	10.4	33.8	>0.999	0.867
	CD71	6158	3767	8283	4367	2268	7238	3479	2233	7007	0.156	0.002
	CD71rCV	79.5	53.75	112.3	82.05	67.5	114.3	80.9	61.3	107.3	>0.999	>0.999
plazmasejt n=15	százalék	0.20	0.20	0.50	0.20	0.10	0.50	0.30	0.10	0.50	0.166	>0.999
	CD38	29173	25738	32208	19312	17781	27495	17022	14953	18877	0.032	<0.001

12/B táblázat. A késleltetett mintafeldolgozás okozta immunfenotípus-eltérések N-heparin alvadásgátló használatánál

A táblázatban az egyes markerek átlagos fluoreszcencia intenzitása és a diagnosztikai szempontból releváns sejtpopulációk százalékanak átlaga és interkvartilis tartománya van feltüntetve. A P értékeknél félkövér betűtípussal a szignifikáns különbségek ($P < 0,05$) vannak kiemelve. P¹ A mintavételt követően azonnal és egy nap eltelté után mért eredmények összehasonlítása. P² A mintavételt követően azonnal és két nap eltelté után mért eredmények összehasonlítása. Az egyes sejtpopulációk eltérő számosságának hátterében az áll, hogy bizonyos esetekben a ritkán előforduló sejtpopulációk százaléka a detektálhatóság alá esik (érzékenység 0,03%). A táblázatban használt rövidítések: MFI: mean fluorescence intensity, SSC: side scatter, IQR: interquartile range.

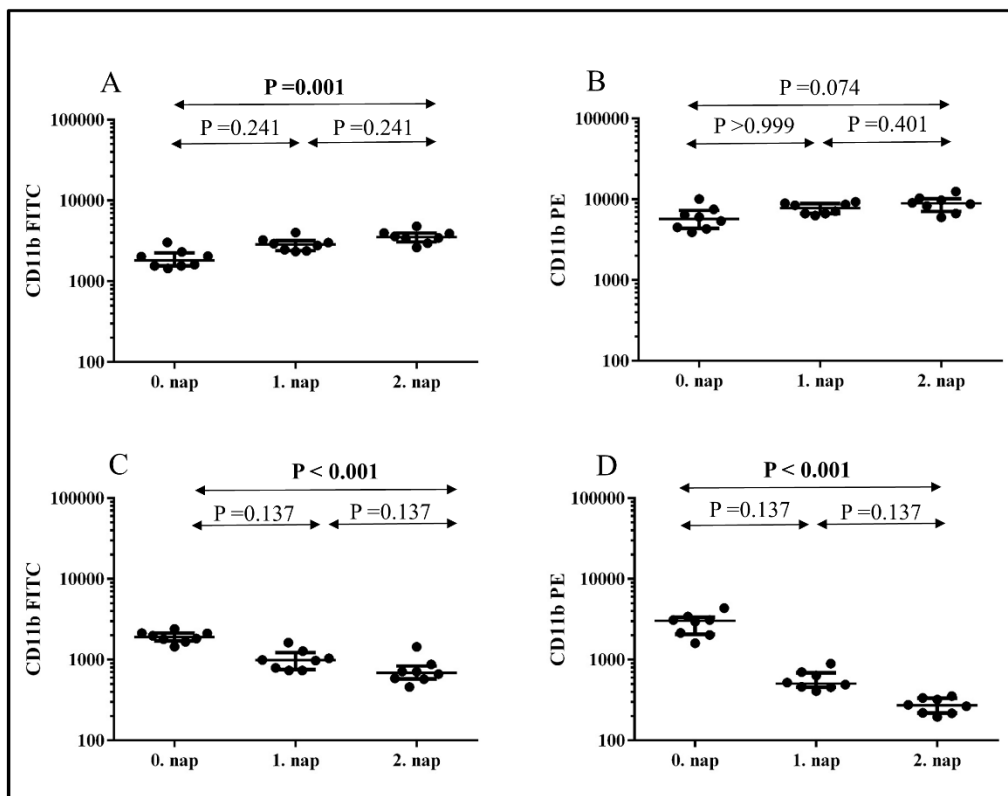
5.1.3. Preanalitikai faktorok hatása a myeloidok CD11b expressziójára

A mintavétel után azonnal és a mintavétel után két nappal történt analízis eredményeit összehasonlítva eltérő jelenséget figyeltünk meg a CD11b expressziója tekintetében a különböző típusú alvadásgátlók használatakor. K₃-EDTA-val alvadásgátolt mintáknál a CD11b expresszió MFI értéke napról napra csökkent a myeloidokon, míg Na-heparinnál emelkedő tendenciát mutatott. D12 klónnal rendelkező, phycoerythrin (PE) fluoreszcens festékkel konjugált CD11b monoklonális antitest használatakor a granulocytákon szignifikáns változást figyeltünk meg a két nappal később történt mintafeldolgozás esetében függetlenül az alvadásgátló típusától. Míg a fluorescein isothiocyanate (FITC) fluoreszcens festékkel jelölt, ICRF44 klónnal rendelkező monoklonális antitest esetén a K₃-EDTA-val alvadásgátolt mintáknál a CD11b expressziójának intenzitása stabil maradt (4. ábra). Monocytáknál ennek az ellenkezőjét találtuk (5. ábra): ennél a sejtpopulációnál a D12 klón használatakor a Na-heparinnal alvadásgátolt minta esetében nem volt hatása a késői mintafeldolgozásnak.



4. ábra. A CD11b expressziójának változása granulocytákon a megkésett mintafeldolgozás következtében

Az ábra a késleltetett mintafeldolgozás következtében a CD11b expressziójának intenzitásánál detektálható eltéréseket mutatja be a *granulocytákon* teljes perifériás vér analízisekor. Az ábra A és B része a Na-heparinnal, C és D része a K₃-EDTA-val alvadást gátló minták eredményeit mutatják. Nemcsak azt vizsgáltuk, hogy az alvadást gátló típusa hogyan befolyásolja a megkésett mintafeldolgozás során létrejövő változásokat, hanem azt is, hogy a monoklonális antitestek klónjának milyen hatása van. Az ábra A és C része a FITC-el konjugált CD11b (klón: ICRF44) a B és D ábra a PE-konjugált CD11b (klón: D12) használatakor létrejövő változásokat ábrázolja. Az ábrán látható rövidítések: FITC: fluorescein isothiocyanate, PE: phycoerythrin.



5. ábra. A CD11b expressziójának változása monocytákon a megkésett mintafeldolgozás következtében

Az ábra a késleltetett mintafeldolgozás következtében a CD11b expressziójának intenzitásánál detektálható eltéréseket mutatja be a *monocytákon* teljes perifériás vér analízisekor. Az ábra A és B része a Na-heparinnal, C és D része a K₃-EDTA-val alvadást gátló minták eredményeit mutatják. Nemcsak azt vizsgáltuk, hogy az

alvadásgátló típusa hogyan befolyásolja a megkésett mintafeldolgozás során létrejövő változásokat, hanem azt is, hogy a monoklonális antitestek klónjának milyen hatása van. Az ábra A és C része a FITC-el konjugált CD11b (klón: ICRF44) a B és D ábra a PE-konjugált CD11b (klón: D12) használatakor létrejövő változásokat ábrázolja. Az ábrán látható rövidítések: FITC: fluorescein isothiocyanate, PE: phycoerythrin.

5.2. MDS szűrésére alkalmas áramlási citometriai pontozó rendszer diagnosztikai és prognosztikai ereje

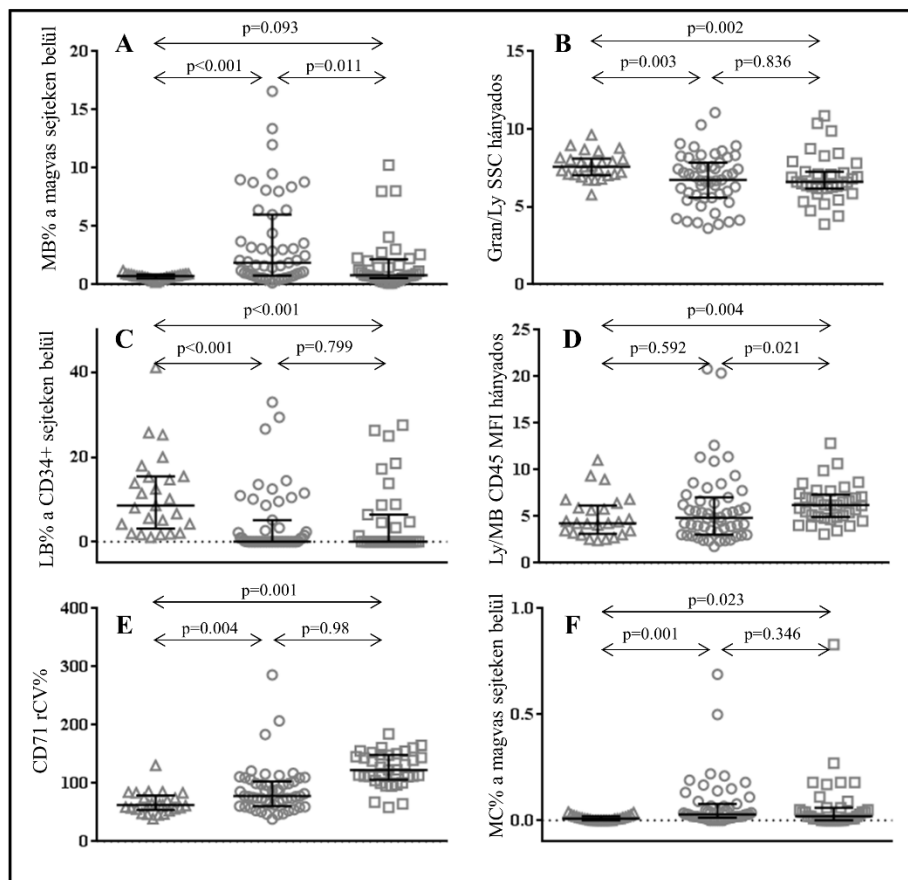
5.2.1. Az áramlási citometriai pontozó rendszer kialakítását célzó tanulmány eredményei

Az áramlási citometriai pontozó rendszer kialakítását segítő kontroll és MDS-es betegcsoport laboratóriumi eredményei közül a hemoglobin-koncentrációnál, a fehérvérsejtszámnál és az abszolút neutrophil számnál találtunk szignifikáns különbséget. A thrombocyták szám nem tért el egymástól jelentősen, melynek magyarázata az lehet, hogy a kontroll csoportba hét ITP-s beteget is beválogattunk.

5.2.1.1. A négyszínű jelölési technikával kialakított hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozó rendszer diagnosztikai hatékonysága

Első lépésként az áramlási citometriai pontozó rendszer hat paraméterének alakulását vizsgáltuk meg a kontroll és az MDS-es betegcsoport között. Szignifikáns különbséget találtunk a következő paramétereknél: MB%-nál ($p < 0,001$), a granulocyták és lymphocyták SSC hányadosánál ($p = 0,003$), a CD34 pozitív sejteken belül a LB%-nál ($p < 0,001$), az erythroid prekursorok CD71 rCV%-ánál ($p = 0,004$), és a mastocyták százalékánál ($p = 0,001$). Egy paraméternél, a lymphocyták és myeloblastok CD45 MFI értékének hányadosánál, nem volt szignifikáns különbség a két csoport között (6. ábra). Ennek hátterében az állhat, hogy MDS-

nél, dysplastikus jelként, a CD45 expressziójának intenzitása nőhet és csökkenhet is a myeloblastokon.

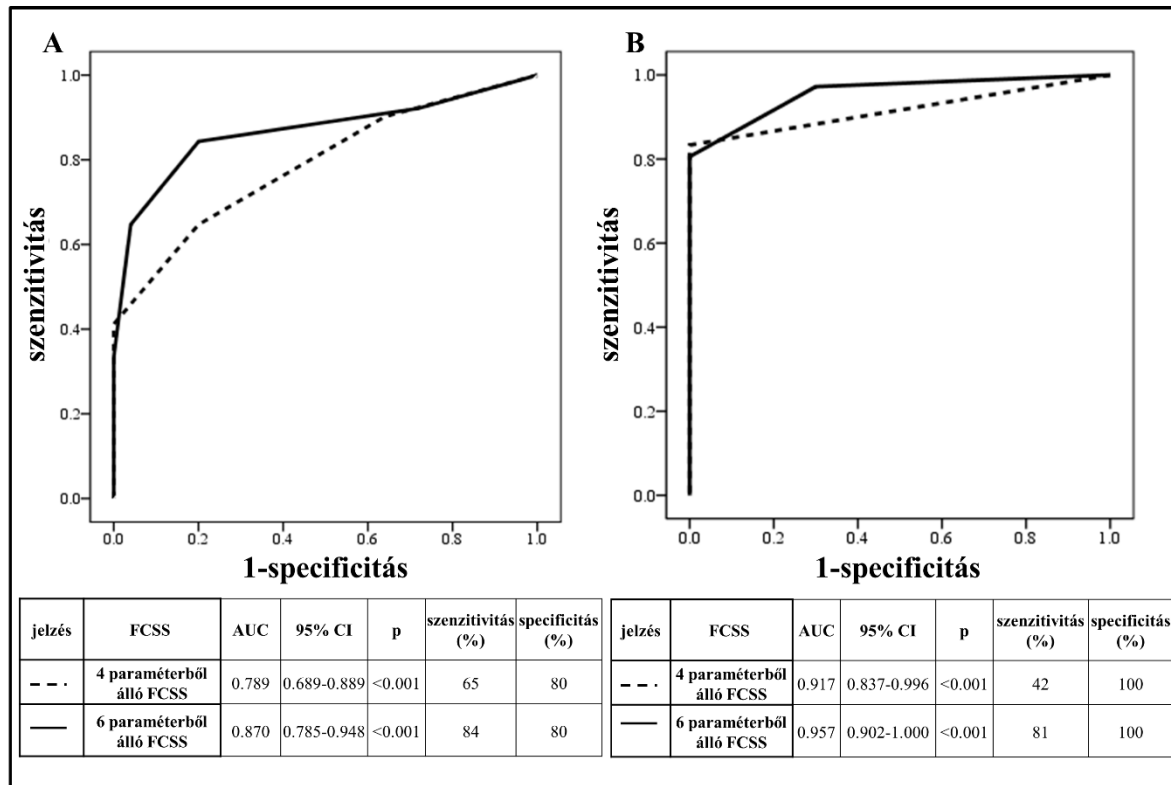


6. ábra. MDS-es betegek négy- és nyolcszínű jelölési technikával meghatározott áramlási citometriai paramétereinek összehasonlítása kontroll mintával

Az áramlási citometriai pontozó rendszer hat paraméterének összehasonlítása: 1. myeloblast százalék (A), 2. granulocyta és lymphocyta oldalra szórt fényének hányadosa (B), 3. lymphoblastok aránya a CD34 pozitív sejteken belül (C), 4. lymphocyták és a myeloblastok CD45 expressziójának átlagos fluoreszcencia intenzitásának hányadosa (D), 5.: erythroid prekurzorok CD71 rCV%-a (E), 6.: mastocyták százaléka (F). Kör jelöli a négy színű, háromszög a nyolcszínű jelölési technikával vizsgált MDS-es betegek mintáinak eredményét. Háromszög mutatja a kontroll csoport eredményeit. Az ábrán látható rövidítések: MFI: mean fluorescence intensity, SSC: side scatter, MB: myeloblast, LB: lymphoblast, Gran: granulocyta, Ly: lymphocyta, MC: mastocyta.

Második lépésként összehasonlítottuk az eredetileg négy paraméterből álló és a módosított, hat paraméter alapján kialakított áramlási citometriai pontozó rendszer ROC

görbét. Azt találtuk, hogy ha a kardinális négy paramétert kiegészítjük a mastocyták százalékaival és az erythroid populációról információt adó CD71 rCV% értékkel, akkor a szenzitivitás 65%-ról 84%-ra emelkedett, miközben a specificitás magas (80%) maradt. A görbe alatti terület ennek megfelelően 0,789-ről (95% CI: 0,689-0,889) 0,87-re (95% CI: 0,785-0,948) növekedett (7. ábra).

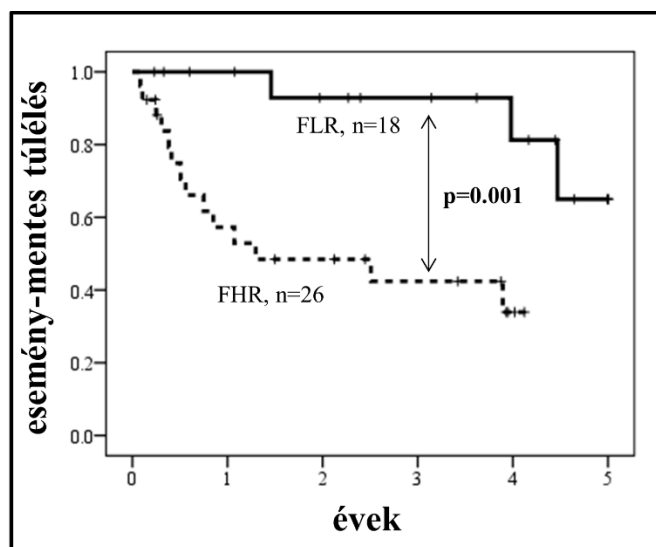


7. ábra. Áramlási citometriai pontozó rendszerek ROC görbéi

Az ábra A része a négyszínű jelölési technikával a B része a nyolcszínű jelölési technikával meghatározott paraméterekből felépülő áramlási citometriai pontozó rendszer ROC görbéit mutatja. Folytonos vonal a hat paraméterből álló, szaggatott a négy paraméterből álló pontozórendszer görbéje. Az ábrán használt rövidítések: FCSS: flow cytometry scoring systems, AUC: area under the curve, 95% CI: 95% confidence interval

5.2.1.2. A négyszínű jelölési technikával kialakított hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozó rendszer prognosztikai jelentősége

A morfológiai vizsgálat, citogenetikai analízis és az anamnesztikus adatok alapján MDS csoportba sorolt betegeket az áramlási citometriai pontozórendszer alapján további két rizikócsoportba soroltuk. A betegek 37%-a ($n=19$), akik 0, 1, vagy 2 pontot értek el a hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozó rendszer alapján, az alacsony rizikójú (flow low risk, FLR) csoportba került. A többi beteget ($n=32$), akiknek több mint 2 pontjuk volt, a magas rizikócsoportba (flow high risk, FHR) soroltuk. Az általános laboratóriumi paraméterek közül szignifikánsan alacsonyabb hemoglobin-koncentráció látható a FHR csoportban. Ezzel összhangban azt találtuk, hogy az FHR csoportba tartozó betegek szignifikánsan nagyobb eséllyel kaptak transfúziót (OR=3,51, 95% CI: 1,07-11,59, $p=0,036$). A myeloblastok százaléka, mely nemcsak az áramlási citometriai pontozó rendszerek, hanem minden az MDS prognosztikájának vizsgálatára kialakított rendszer alapeleme, szignifikánsan különbözött a két rizikócsoportnál ($p=0,009$). Habár a citogenetikai eltérések tekintetében nem volt statisztikailag jelentős eltérés a két rizikócsoport között, a legsúlyosabb, komplex kariotípus eltéréssel rendelkező betegek az FHR csoportba tartoztak. Az esemény-mentes túlélés vizsgálatához 46 betegnek az adatai álltak rendelkezésünkre, közülük kettő csontvelő-transzplantáción átesett beteg került kizárásra. Így a 44 betegnél a hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozó rendszer alapján felállított két rizikócsoport között vizsgáltuk az esemény-mentes és teljes túlélést, mely szignifikáns különbséget mutatott ($p=0,001$, $p=0,008$, 8. ábra).



8. ábra. Áramlási citometriai pontozó rendszer alapján felállított két rizikócsoporthoz tartozó esemény-mentes túlélés

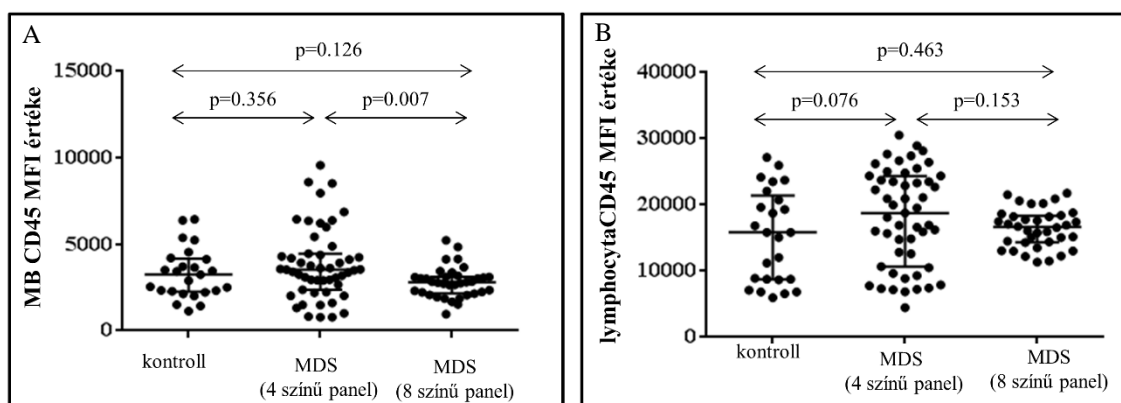
Az ábrán a hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozórendszer eredménye alapján felállított két rizikócsoporthoz tartozó eseménymentes túlélése közötti szignifikáns ($p=0,001$) különbség látható. Ábrán látható rövidítések: FLR: flow low risk, FHR: flow high risk.

5.2.2. A hat paraméterből kialakított áramlási citometriai pontozó rendszer alkalmazhatóságát bizonyító tanulmány eredményei

Amennyiben összehasonlítjuk a hat paraméterből álló pontozórendszer kialakítását szolgáló négy színű jelölési technikával vizsgált MDS-es csoport és a rendszer alkalmazhatóságának vizsgálatára létrehozott nyolcszínű jelölési technikát használó MDS csoport között a hat paramétert, kettő esetben láttunk szignifikáns különbséget: MB% ($p=0,011$) és a lymphocyt/MB CD45 MFI értékének hányadosa esetén ($p=0,021$) (6. ábra). A nyolcszínű jelölési technikával analizált MDS csoportba több alacsonyabb rizikójú beteg került besorolásra, ez okozza a szignifikánsan alacsonyabb MB%-ot. Amikor részletesebben vizsgáltuk a lymphocyt/MB CD45 MFI értékének hányadosát, azt találtuk, hogy a lymphocyták esetében, melyek jól használhatóak az MDS-nél belső kontroll populációnak,

nincs szignifikáns különbség a csoportok között, míg az MB CD45 MFI értéke szignifikánsan alacsonyabb a nyolcszínű jelöléssel vizsgált MDS csoportnál (9. ábra). Tehát a magasabb lymphocyta/MB CD45 MFI hányados leginkább az MDS heterogenitásából adódik, nem az eltérő fluoreszcens festék típusa vagy az áramlási citométer beállítása okozza. A granulocyta és lymphocyta SSC hányadosánál ($p=0,002$), a CD34 pozitív sejteken belül a LB%-nál ($p<0,001$), az erythroid prekursorok CD71 rCV%-ánál ($p=0,001$), és a mastocyták százalékánál ($p=0,023$) ennél a csoportnál is szignifikáns különbséget találtunk a kontrollhoz képest (6. ábra).

Az áramlási citometriai pontozó rendszer diagnosztikai hatékonyságának vizsgálata érdekében ROC analízis segítségével összehasonlítottuk a két MDS csoportnál a négy és hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozó rendszer specificitását és szenzitivitását. A négy paraméterből álló pontozó rendszer esetében a több alacsony rizikójú beteget tartalmazó nyolcszínű jelölési technikával vizsgált MDS-es csoportnál a szenzitivitás alacsonyabbnak (42%) bizonyult, mint a másik MDS csoportnál (65%). Ezzel szemben a hat paraméteren alapuló pontozórendszerrel az érzékenység nem tért el jelentősen a két MDS csoportnál (84%-négy színű jelölési technikán alapuló, 81%-nyolcszínű jelölési technikát alkalmazó MDS csoport). Hat paraméter használata esetén nemcsak az érzékenység, hanem a görbe alatti terület is növekedett, 0,917-ről (95% CI: 0,837-0,996) 0,957-re (95% CI: 0,902-1,00) (7. ábra). Ez alapján megállapítható, hogy a hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozó rendszer jobban el tudja különíteni az egyéb hematológiai betegségben szenvedő betegeket az MDS-es betegektől még az alacsony rizikóval rendelkező MDS-es eseteknél is.



9. ábra. CD45 MFI értékének vizsgálata myeloblastokon és lymphocytákon

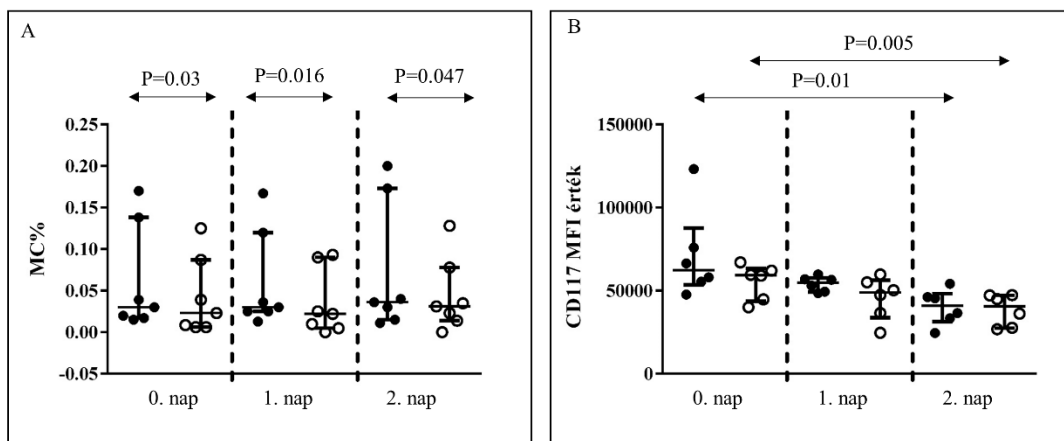
Az ábrán a myeloblastok (A) és lymphocyták (B) CD45 MFI értékének összehasonlítása látható a négyszínű-, nyolcszínű jelölési technikával vizsgált MDS-es betegcsoport és a kontroll csoport között. Az ábrán látható rövidítések: MFI: mean fluorescence intensity, MB: myeloblast.

Az új áramlási citometriai pontozó rendszer eredménye alapján a második MDS csoportot is két részre osztottuk, hogy megvizsgálhassuk a rendszer prognosztikai jelentőségét. Az előző tanulmányhoz hasonlóan itt is szignifikáns különbséget találtunk a hemoglobinkoncentráció és az MB% esetében az FLR és FHR rizikócsoportok között. A hemoglobinszint szignifikánsan alacsonyabb ($p=0,021$) az MB% magasabb ($p=0,02$) volt. A transzfúzióigény is az előző tanulmánynál látottakhoz hasonlóan alakult. Az FLR rizikócsoportban a betegek 38%-ánál, míg az FHR csoportnál a betegek 58%-ánál volt szükség rendszeres transzfúzióra. Citogenetikai eltérés szempontjából ennél az MDS csoportnál sem találtunk szignifikáns különbséget a rizikócsoportok között.

Végezetül megnéztük a korrelációt a hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozó rendszer és az R-IPSS között. A négyszínű jelölési technika alkalmazásakor $r=0,32$, $p=0,02$, míg nyolcszínű jelölési technikával meghatározva a paramétereket $r=0,507$, $p=0,02$.

5.3. A mastocyták vizsgálata áramlási citometriával

Hét aspirációval nyert csontvelői mintánál tudtunk mastocytákat azonosítani, melynek százaléka nagyban függött az alvadásgátló típusától. A K_3 -EDTA-val alvadásgátolt mintáknál szignifikánsan magasabb mastocytá százalékat mértünk a Na-heparinnal alvadásgátolt mintákhoz képest, mind a mintavételt követő azonnali, mind az egy, illetve két nappal később mért minták esetében. Megvizsgálva a CD117 expressziójának intenzitását a kétféle alvadásgátló esetében, nem látható szignifikáns eltérés. Habár a CD117 expressziójának intenzitása a második npra az alvadásgátló típusától függetlenül csökkent, a mastocyták százalékat nem befolyásolta, ugyanis a kései mintafeldolgozás nem volt hatással a mastocyták százalékára (10. ábra). Tehát nem a mastocyták azonosítását szolgáló marker expressziójának változása okozza a különböző százalékos értéket a K_3 -EDTA-val és Na-heparinnal alvadásgátolt mintáknál.



10. ábra. Preanalitikai faktorok hatása a mastocytá detektálására

Az ábra A részén a mastocyták százaléka, B részén a mastocyták CD117 MFI értékének változása látható a késői mintafeldolgozás során. Fekete pontok jelölik a K_3 -EDTA-val, fehér pontok a Na-heparinnal alvadásgátolt minták eredményeit. Az ábrán látható rövidítések: MC: mastocytá, MFI: mean fluorescence intensity.

A mastocyták MDS-es betegeknél detektált magasabb százalékanak vizsgálata érdekében a hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozó rendszer kialakítását szolgáló MDS csoportot két részre osztottuk az alapján, hogy a mastocyták aránya határérték (0,039%) alatt vagy felett volt. Ezt követően megvizsgáltuk a két csoport betegeinek perifériás fehérvérsejtszámát, az aspirációval nyert csontvelői minta magvas sejtjeinek számát és a csontvelői plazmasejtek százalékát. Egyik esetben sem találtunk szignifikáns különbséget a magas (n=21) és az alacsony (n=30) mastocytákkal rendelkező betegek között.

6. Megbeszélés

6.1. A késleltetett mintafeldolgozás és az alvadésgátló típusának hatása az áramlási citometriával detektált dysplásiás jelek értelmezésére

A preanalitikai faktorok immunfenotípusra gyakorolt hatását vizsgáló tanulmány legfontosabb megállapítása, hogy az alvadésgátló típusa jelentősen befolyásolja a késői mintafeldolgozás következtében kialakult immunfenotípus-eltérések számát és azok mértékét. Továbbá az alvadésgátló típusa már a kiindulási antigén expressziós mintázatra is hatással van, amikor még nincs, vagy csak minimális mennyiségben van jelen apoptotizáló sejt. Az ELN alvadésgátló típusára tett ajánlásának megfelelően azt tapasztaltuk, hogy a Na-heparin használata esetén a különböző sejtípusok antigénjeinek expressziós intenzitása stabilabb [63, 64]. Jóllehet, még Na-heparin alkalmazásakor is detektáltunk néhány esetben szignifikáns eltérést akár csak egy nappal később történt mintafeldolgozás esetén is. Amennyiben az áramlási citometriai eredmény interpretálását végző személy nincs tisztában azzal, hogy az alvadésgátló típusa vagy a késői mintafeldolgozás mely markerek expressziójának intenzitását, milyen irányban és mértékben képes megváltoztatni, akkor ezeket az eltéréseket könnyen

dysplastikus jelként értelmezheti. Ezáltal tévesen MDS-re utaló eredményt adhat ki, vagy sokkal előrehaladottabb stádiumba való besorolást indikálhat.

Legjobb tudásunk szerint most először történt a preanalitikai faktorok hatásának vizsgálata a markerek széles spektrumán, különböző sejttípusokon, nyolcszínű jelölési technika alkalmazásával. Korábbi nemzetközi tanulmányokban általában a myeloid populációra koncentráltak és csak egy vagy néhány marker változását vizsgálták. Ezen tanulmányok eredményei alapján néhány paraméter esetében egyértelmű, hogy a késői mintafeldolgozás hogyan fogja megváltoztatni az adott paramétert függetlenül a mintánál használt alvadásgátló típusától. Ilyen paraméter a granulocyták oldalra szórt fényének karaktere, melynek intenzitása apoptózis hatására konzekvensen csökkent. Ezt morfológiai vizsgálattal is igazolhatjuk, hisz például jól ismert jelenség az apoptózis során kialakuló piknotikus mag [67]. Citráttal, heparinnal vagy EDTA-val alvadásgátolt teljes vér, illetve izolált fehérvérsejtek esetén is az apoptotizáló myeloidokon csökkent intenzitású CD16, CD43 és élénkebb CD45 expressziót detektáltak [83-85]. Ugyanakkor a késői mintafeldolgozás következtében apoptotizáló sejteknél a CD11b expressziójának intenzitás változásáról ellentmondásos információkat olvashatunk a nemzetközi irodalomban: néhány tanulmány fokozott, míg mások csökkent CD11b expressziót írtak le a megkésett mintafeldolgozás következményeként [84, 86, 87]. Az eredmény a tanulmányokban használt minta típusától, a mintafeldolgozástól, és a vizsgálat kivitelezésétől függött. A CD11b fehérje a neutrophil granulocyták granulumaiban tárolódik, így az expresszió intenzitása nagymértékben függ a granulocytá aktivációjától [88]. A neutrophilek aktivációja bekövetkezhet a mintafeldolgozás során (pl.: fehérvérsejtek szeparálása) vagy a vizsgálat kivitelezésekor is, például ha nem spontán apoptózist, hanem mesterségesen kiváltott apoptózist vagy apoptózis elősegítő technikákat alkalmaznak [89]. Azonban, ahogy azt a Saxton és munkatársai által végzett tanulmány eredményei is sugallják az aktiváció kiváltó oka nem mindig egyértelmű. Vizsgálatuk során hat EDTA-val alvadásgátolt teljes perifériás

vérmintát analizáltak sejtstabilizáló oldat jelenlétében (Cyto-Chex) és anélkül. Azt találták, hogy négy óra eltelte után vizsgálva a szobahőmérsékleten tartott, stabilizáló oldatot nem tartalmazó mintáknál a granulocyták CD11b expressziójának intenzitása nőtt [90]. Ugyanakkor Hodge és munkatársai azt találták, hogy a fehérvérsejteken az Annexin V jelölődés, mely az apoptózis során a sejt felszínre áthelyeződő foszfatidil-szerinhez kötődik, hat óra eltelte után detektálható [67]. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a Saxton és munkatársai által a nem stabilizált, de nyugalomban hagyott mintákon detektált fokozott CD11b expresszió háttérben nem apoptózis, hanem inkább az intracellulárisan elhelyezkedő CD11b fehérjének a sejtmembrán külső felszínére történő spontán kihelyeződése állhat. Tehát az apoptózis előtt és alatt bekövetkező aktiváció következményeit mindig figyelembe kell venni.

Munkánk során azt láttuk, hogy a CD11b expressziójának intenzitása az alvadásgátló típusának függvényében változott a megkésett mintafeldolgozás során: Na-heparin használatakor fokozódott, míg K₃-EDTA esetében csökkent az antigén expressziója. Eredményeink alátámasztják azt, hogy a minta típusa megszabja a CD11b expressziójának viselkedését. Az alvadásgátló típusa nemcsak a sejtek életképességére hat, hanem az antigén-antitest között létrejövő kötés kialakulását is meghatározza. Repo és munkatársai által végzett tanulmány rámutatott arra, hogy hogyan tudja az alvadásgátló befolyásolni a myeloidokon detektált CD11b expressziójának intenzitását. Kimutatták ugyanis, hogy a D12 klónnal rendelkező monoklonális antitest antigénhez kötődéséhez kétértékű kation szükséges, melyet az EDTA megköt, így akadályozza az antigén-antitest közötti kötés kialakulását [91]. Repo és munkatársai vizsgálatának eredményét támogatják a mi eredményeink is, hiszen a D12 monoklonális antitest használatakor kation kelátor, EDTA, jelenlétében a CD11b expressziójának intenzitása már a kiindulási mintán csökkentnek bizonyult a Na-heparinnal alvadásgátló mintákhoz képest. A CD11b csökkent expressziója markánsan tovább csökkent egy nap eltelte után. Amikor egy másik klónt, az ICRF44-t használtuk, az EDTA-val

alvadásgátolt mintákban nem változott a CD11b expressziójának intenzitása a granulocytákon a késői mintafeldolgozás hatására. Emellett vizsgálataink eredménye a CD11b expresszióját befolyásoló újabb aspektusra mutatott rá. A csontvelői mintáknál a Na-heparinnal alvadásgátolt minták esetében a késői mintafeldolgozás következtében csökkent a CD11b expressziója a monocytákon, míg a granulocytákon nem változott. Ezzel szemben a Na-heparinnal alvadásgátolt teljes perifériás vérminta vizsgálatok szignifikánsan fokozott CD11b expressziót detektáltak a monocytákon és granulocytákon a napok múlásával. A csontvelői és perifériás vérminta vizsgálata során látott eltérő jelenség háttérében az állhat, hogy a két mintatípus esetében eltérő sejtpopulációkat vizsgáltunk, melyeknek különböző lehet az intracelluláris CD11b tartalékuk. A perifériás vérmintánál egyrészt normál minták voltak, másrészt csak érett granulocytá és monocytá alakok voltak jelen. Ezzel ellentétben a csontvelői mintáknál patológiás mintákat vizsgáltunk, melyben a minta természetéből adódóan myeloid előalakok (promyelocytá, myelocytá, promonocytá) is voltak.

A legtöbb általunk vizsgált markernél korábban nem vizsgálták a preanalitikai faktorok hatását. Ezek közül talán a legfontosabb a CD117 expressziójának változása a késői mintafeldolgozás során, mely mindkét típusú alvadásgátló esetén előfordult. A CD117, a CD34 és CD45 mellett, az egyik legfontosabb marker, amelynek segítségével a myeloblastokat azonosítani lehet. A myeloblastok százalékanak megállapítására az áramlási citometriai vizsgálat a WHO által ajánlott módszerek között szerepel [18]. Ezért megnéztük, hogy a myeloblastok százalékat befolyásolta-e a CD117 markáns változása. Az MB% egy nap eltelte után stabil maradt és csak a második napra változott szignifikánsan a K₃-EDTA-val alvadásgátolt mintában.

Jelen tanulmánynak több korlátja van. Noha homogén betegcsoportot szeretnénk volna megvizsgálni, az MDS heterogenitásából adódóan az MDS/MPN gyanúval küldött betegeknel a végső diagnózis több esetben sem MDS volt. Ugyanakkor a dysplastikus jelek detektálása

nemcsak az MDS-es betegeknél kardinális - akiknél a diagnózis felállítása mellett a prognosztikai besorolást is befolyásolják - hanem a normál, MPN vagy AML esetén is kulcskérdés. MDS-ből transzformálódott AML a WHO ajánlásban külön entitásként szerepel, és rossz prognózissal társul [18]. Így a preanalitikai hibából adódó elváltozások helytelen értelmezése nemcsak téves diagnózishoz, hanem helytelen prognosztikai megítéléshez, ezáltal nem megfelelő kezelési stratégia meghatározásához is vezethetnek. Végezetül tanulmányunkba csak korlátozott számban tudtunk betegeket beválogatni, így az eredményeink igazolására egy nagyobb esetszámú tanulmány szükséges.

Összefoglalva elmondható, hogy összesen 37 paramétert vizsgáltunk meg a myeloid, erythroid és lymphoid sejtvonalakon, érett és éretlen sejteken egyaránt. Az alvadásgátló típusától függően, már a kiindulási immunfenotípusnál eltéréseket detektáltunk. Mivel áramlási citometriai vizsgálat során dysplastikus jelként értékelünk mindent, ami a normál mintázattól eltér, ezért minden esetben figyelembe kell venni a vizsgálatra küldött minta alvadásgátlójának típusát, amikor a normál mintázathoz hasonlítunk. Ezt legegyszerűbben úgy lehet kivitelezni, ha egy laboratórium csak egyféle alvadásgátlót fogad el vizsgálatra. Tekintettel arra, hogy a preanalitikai hibák, mint megkésett mintafeldolgozás, jelentős immunfenotípus eltérést tudnak okozni, és ezáltal postanalitikai hibához, vagyis az eredmények helytelen interpretálásához vezethetnek, így az ajánlások szigorú betartását javasoljuk. Amennyiben a regionális ellátó helyekről a minta szállítása elkerülhetetlen, úgy egyrészt a Na-heparinnal alvadásgátló mintát szükséges előnyben részesíteni, másrészt az általunk végzett vizsgálat alapján stabilnak bizonyult markerek változását kell jobban figyelembe venni az áramlási citometriai eredmény értékelése során.

6.2. A hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozó rendszer alkalmazása az MDS szűrésében és prognosztikai megítélésében

Az általunk kialakított és vizsgált áramlási citometriai pontozó rendszer használatának legnagyobb előnye, hogy mindössze hat, célzottan kiválasztott paraméter segítségével képes differenciálni a normál, reaktív és az akár csak egy sejtvonalat érintő, alacsony rizikójú MDS-es betegek között. Információt kapunk nemcsak a myeloid, hanem a lymphoid és erythroid sejtvonalról is. A négy színű jelölési technikával kapott eredmények jól reprodukálhatóak a nyolcszínű jelölési technika használatakor is, tehát az eredményeket a fluoreszcens festék típusa, az áramlási citométer beállításai nem befolyásolták. A kialakított pontozó rendszer nemcsak a diagnosztikában, hanem a prognosztikában is alkalmazható. Minél több pontot értek el a betegek, annál előrehaladottnak bizonyult a betegségük. A hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozó rendszer és az R-IPSS közötti korreláció a korábbi tanulmányokban összehasonlított áramlási citometriai pontozó rendszerek és R-IPSS korrelációjának megfelelően alakult [39, 60]. Az áramlási citometriai pontozó rendszerek és az R-IPSS közötti különbségek összevetésekor két dolgot azonban fontos figyelembe venni: Egyrészt azt, hogy az R-IPSS esetén a myeloblastok százalékanak meghatározása morfológia vizsgálat alapján történik, mely a dysplastikus csontvelő bizonyos eseteinél, ahol a myeloblastok, monocyták morfológiája és immunfenotípusa jelentősen atípusos, az áramlási citometriai vizsgálattal objektívebb módon lehetséges. Másrészt az R-IPSS egyik kardinális paramétere a sejtzegénység mértéke [4]. Ugyanakkor jelen tanulmányunkban és általában a rutin diagnosztikába is sokszor érkezik olyan betegektől minta áramlási citometriai vizsgálatra, akik korábban, akár a vizsgálatot megelőző hetekben, transzfúzióban részesültek. Ez hatással lehet a terápia megkezdése után számított R-IPSS pontszámra, míg az áramlási citometriai pontozó rendszer eredményére nincs hatással.

Az elmúlt évtizedekben számos MDS-re jellegzetes immunfenotípus eltérést írtak le, azonban az MDS heterogenitásából adódóan nincs egy olyan eltérés sem, amely önmagában egyértelműen MDS-re utalna. Emiatt különböző marker kombinációkból felépülő pontozórendszereket dolgoztak ki. Ezek a pontozórendszerek több szempontból is eltértek egymástól. A pontozórendszereknél különbözött a vizsgált sejtpopuláció. Általában a myeloid populációra fókuszáltak, míg egy-egy tanulmány kifejezetten az erythroid prekursorokat vette górcső alá, ugyanakkor csak elvétve volt olyan vizsgálat, amely a megakariocytá vonalat elemezte. A paraméterek számának tekintetében is nagy különbségeket láthatunk, vannak olyan rendszerek, melyek mindössze 3-4 paraméterből állnak, míg mások az áramlási citometria nyújtotta lehetőségeket felhasználva 83 paraméter alapján alakították ki pontozó rendszerüket. Eltérő a rendszerek kialakítását szolgáló betegcsoport számossága és összetétele is. A rendszerek specificitása általában magas (90-100%), míg a szenzitivitása 50-100% között mozog [39, 45-48, 56-61]. Az ELN IMDSFlow irányelve az áramlási citometriai pontozó rendszerek közül az Ogata és munkatársai által kialakított „mini-panel”-t emeli ki, mely jól alkalmazható a költségek csökkentése érdekében MDS szűrésére [55]. Ha részletesebben megnézzük az Ogata és munkatársai által kialakított pontozórendszer elemeit, megfigyelhetjük, hogy miben rejlik ennek a rendszernek az egyedisége, hogy mi alapján emelkedik ki ez a pontozó rendszer a többi közül. Ogata és munkatársai számos paraméter vizsgálata után választotta ki azt a négyet, amely alapján a „mini-panel” felépül. Amikor tíz csontvelői mintát három részre osztottak és azokat különböző laboratóriumokban, ezáltal különböző mintafeldolgozási körülmények és áramlási citometriai beállítások alkalmazásával, megvizsgáltak, azt találták, hogy a „mini-panel” négy paraméterénél nem volt számottevő különbség a laboratóriumok által mért eredmények között [47]. Ha alaposabban megvizsgáljuk a négy paramétert, abból egy, a myeloblast százalék az, melynek meghatározását a WHO ajánlásban is áramlási citometriával javasolják. Két paraméter esetében pedig (granulocytá és lymphocytá

oldalra szórt fényének aránya, lymphocyták és a myeloblastok CD45 expressziójának MFI hányadosa) a mintán belüli belső kontrollként lymphocytákat használtak, mellyel csökkenthető az eltérő körülmények hatása. A negyedik paraméter (LB aránya a CD34 pozitív sejteken belül) a myeloblastok vizsgálatához hasonlóan, szintén egy progenitor százalékának meghatározása. Ennek köszönhetően a pontozó rendszerhez felállított határértékeket minden laboratóriumban biztonsággal lehet használni, az eredmények függetlenek a vizsgálati körülményektől. Tanulmányunkban ezt a jól reprodukálható rendszert egészítettük ki mindössze két paraméterrel, mely a szenzitivitást jelentősen megnövelte. Mindkét paraméter további információt nyújt a csontvelő működésének eltéréséről, melyek segítségével a heterogén betegcsoport tagjainak nagyobb része válik azonosíthatóvá.

Ha csak azt vesszük figyelembe, hogy a refrakter anémia az MDS definiálása óta klasszikus és népes alcsoportját alkotta az MDS-nek [7, 15, 17, 18], belátható, hogy az erythroid vonal gyakran érintett az MDS esetében. Így az erythroid prekursorok CD71 rCV% értéke kiválóan alkalmas ezen betegek szűrésére [46], még olyan áron is, hogy ennél a paraméternél nem lehet állandó határértéket felállítani, hanem minden laboratóriumnak külön szükséges ezt meghatározni. Ez egyben a tanulmányunk egyik korlátja is, mivel nem lehet az általunk használt határértéket előzetes vizsgálat nélkül bárhol használni, hiszen a négy- és nyolcszínű jelölési technikánál láhattuk, hogy ennek módosítására volt szükség (négy színű analízis: 85,8%, nyolcszínű analízis: 115,5%). A másik új paraméterünknek, a mastocyták százalékának, korábbi áramlási citometriai pontozó rendszerek nem tulajdonítottak különösebb jelentőséget, annak ellenére nem, hogy az emelkedett mastocytá arányt MDS-ben más metodikákkal is bizonyították, és hasznos diagnosztikai paraméternek tartották [79-82]. A mastocyták százalékának áramlási citometriai vizsgálata nem igényel a „mini panel”-nél használt markereken kívül egyéb CD markert, tehát nem jelent plusz vizsgálati költséget, és a vizsgálati körülmények, eltérő beállítások sem befolyásolták az általunk beállított határértéket sem.

Összefoglalva tehát elmondható, hogy a mindössze egyetlen csővel, néhány markerrel vizsgálható hat paraméterből álló áramlási citometriai vizsgálat hasznos segítséget nyújthat az MDS diagnosztikájában és prognosztikai megítélésben. Alkalmas az MDS-es betegek szűrésére azáltal, hogy információt nyújt nemcsak a myeloid, de a lymphoid és erythroid vonalról is, sőt a mastocyták által közvetett módon információhoz juthatunk a csontvelőben történő pathológiás folyamatokról is.

6.3. A preanalitikai faktorok hatása az áramlási citometriai pontozó rendszer hat paraméterére

Az alvadásgátló típusa szignifikánsan befolyásolta a granulocyták oldalra szórt fény karakterét, az erythroid prekursorok CD71 rCV% értékét és a mastocyták százalékát. Ezen paraméterek közül az alvadásgátló típusának leginkább a mastocyták százalékának megítélésénél van jelentősége. Az K₃-EDTA-val alvadásgátolt mintánál szignifikánsan magasabb értéket mértünk, így – mivel a mastocytá ritka eseménynek számít – előfordulhat olyan eset, hogy a Na-heparinnal alvadásgátolt mintában nem detektálható mastocytá míg K₃-EDTA alvadásgátló használatkor igen.

A mastocyták százalékát, az erythroid prekursorok CD71 rCV% értékét és a lymphoblastok százalékát nem befolyásolta a késleltetett mintafeldolgozás. Az MB% két nappal később történt mintafeldolgozás esetén szignifikánsan csökkent a K₃-EDTA-val alvadásgátolt mintában. A granulocyták és lymphocyták SSC karaktere, valamint a lymphocyták CD45 MFI értéke az alvadásgátló típusától függetlenül csökkent két nap eltelte után.

Összességében tehát megállapítható, hogy a hat paraméterből álló áramlási citometriai vizsgálatra a K₃-EDTA-val alvadásgátolt minta a legalkalmasabb és az egy nappal később történt mintafeldolgozás még nem befolyásolja ezen paraméterek megítélését.

6.4. Az áramlási citometria felhasználásának optimalizációja az MDS diagnosztikájában és prognosztikájában

Az MDS egy heterogén betegségcsoport, ezért a kórlefolyás változatos lehet [18]. Napjainkban lehetőség van célzott kezelésre, például hipometiláló szerek alkalmazásával, melyek nemcsak az eseménymentes, hanem a teljes túlélést is javítani tudják. Az igen költséges, de hatékony hipometiláló kezelésnél két dolgot azonban érdemes figyelembe venni: Egyrészt a terápiás választ biztonságosan hat hónap eltelte után lehet megítélni, így a betegek szempontjából egy rossz terápiás válasz idővesztést okoz. Másrészt a hipometiláló szerek nem pusztítják el a betegségért felelős malignus klónt, így a terápia befejezésekor gyors relapszus várható [4-6, 92-99].

Ezekből az okokból kifolyólag az MDS esetében a pontos diagnózis felállítása, a kezelési stratégia alapját képező prognosztikai megítélés, és a terápiás válaszkészség előrevetítése a legfontosabb mind a beteg, mind pedig a társadalom szempontjából. Ezen három elvárás teljesítéséhez a klasszikus módszerek mellett két metodika tud hasznos információkat szolgáltatni, a szomatikus mutáció vizsgálata és az áramlási citometria [4-6, 40, 55, 92-102]. A szomatikus mutáció módszertanának dinamikus fejlődését mutatja az, hogy míg 2013-ban az ELN ajánlásban ez a módszer a javasolt, ajánlott és kötelező kategóriák közül a javasoltak között szerepelt [5], addig 2016-ban a WHO ajánlás már kiemelt két mutációt, melyet mindenképp érdemes vizsgálni [18]. Továbbá 2017-ben a Nemzetközi MDS Munkacsoport irányelvében már számos szomatikus mutáció említésre került, és azok vizsgálata szerves részét

képezi az MDS-t megelőző állapotok és az MDS diagnózisa felállításának [22]. A metodika fejlődésének hátterében az áll, hogy nemcsak objektív vizsgálatról van szó, hanem egy könnyen standardizálható módszerről is. Ilyen mértékű fejlődést az elmúlt években az áramlási citometriai analízisnél nem láthattunk. Az áramlási citometria már 2006-ban mint MDS-t támogató kritérium szerepelt a Nemzetközi MDS munkacsoport ajánlásában [25], és ez a 2017-es új ajánlásban sem változott [22]. A 2016-ban megjelent WHO ajánlásban az áramlási citometriai vizsgálat hasznos, de még a részletes immunfenotípus-vizsgálat sem elegendő önmagában az MDS diagnózisának felállításához, az eredmények csak MDS-re jellegzetes morfológiai vagy citogenetikai eltéréssel együtt indikálhatják a diagnózis felállítását [18]. Ha megvizsgáljuk, hogy mi áll annak hátterében, hogy az igen magas specificitással és szenzitivitással rendelkező pontozó rendszerek sem jutottak nagyobb szerephez a nemzetközi ajánlásokban, a következő megállapításokat tehetjük. Noha komoly törekvések voltak az áramlási citometriai vizsgálatok standardizálására és harmonizálására [55, 63, 64], feltehetően gazdasági okokból nem született konszenzus a mintatípus, mintakezelés, jelölés, mérés és analízis szempontjából, melyet széleskörűen szerte a világban egységesen használnának. Másrészt, habár egy objektív módszerről van szó, az eredmények helyes interpretálása hosszú betanulási időt igényel, melyet mi sem bizonyít jobban, mint a jelenlegi áramlási citometriai ajánlás. MDS esetében 58 immunfenotípus eltérést szükséges vizsgálni, ahol pozitív eredménynek nem egy adott marker expressziója vagy hiánya, hanem a csökkent vagy emelkedett intenzitása, vagy az atípusos mintázat számít [55]. Ezen nehézségek áthidalására új irányvonal az analizáló szoftverek fejlesztése, melyek képesek arra, hogy több normál minta immunfenotípusát rögzítsék és azok egyesített adataihoz hasonlítani tudják egy adott beteg adatát, sőt konkrét számértékként meg tudják mondani, hogy az átlagtól hány SD-vel tér el egy marker expressziója. Ezáltal egyszerűbbé és egyértelművé válik az analízis, továbbá ha minden laboratórium a saját beállításai szerint mért normál mintákat használ referenciának, akkor még

eltérő mintafeldolgozás esetén is létrejöhet egy standard interpretálási protokoll. Tanulmányainkkal az áramlási citometria széleskörű használatát szeretnénk segíteni, eredményeinkkel támogatni a Nemzetközi MDS Munkacsoport törekvéseit. A preanalitikai faktorok következtében kialakult immunfenotípus-eltérések részletes vizsgálatával és a nemzetközi irodalomban a CD11b tekintetében látható ellentmondás tisztázásával szeretnénk volna egyrészt rávilágítani a standardizálás fontosságára, másrészt az ajánlások kialakítását segíteni. Továbbá felvetődik annak a lehetősége, hogy ha az új analizáló szoftverek tárolni tudják a normál minta adatait, akkor arra is képesek lehetnek idővel, hogy a felhasználó megválassza az analizálni kívánt minta alvadásgátlójának típusát, vagy a mintavételtől számított mintafeldolgozás időpontját. Az áramlási citometriai pontozó rendszerek közül jelenleg a „mini-panel” az egyetlen, amely standardnak tekinthető, hiszen eredményére nincs hatással a vizsgálat kivitelezésének körülménye. Tanulmányunk bebizonyította, hogy ha további két paramétert hozzáteszünk ehhez a panelhez, akkor a többletköltségek növelése nélkül tudjuk fokozni a pontozó rendszer szenzitivitását.

7. Összefoglalás

Az MDS egy heterogén megbetegedés, mely természetéből adódóan változatos klinikai kimenetellel társul. Az áramlási citometriai vizsgálat hasznos segítséget tud nyújtani a diagnózis felállításában, a prognózis megítélésben, sőt a terápiára adott válasz előrejelzésében is. Munkánk célja egyrészt az volt, hogy a preanalitikai faktorok immunfenotípusra gyakorolt hatását felmérjük, másrészt javítsuk az MDS szűrésére kialakított „mini-panel” érzékenységét.

A preanalitikai faktorok közül vizsgáltuk az alvadásgátló típusától függő immunfenotípus eltéréseket a kiindulási és késleltetett mintafeldolgozás során. Az analíziskor a markerek széles spektrumát felhasználva nemcsak a myeloid, hanem a lymphoid, erythroid sejtvonalat, sőt a ritka eseményeket is vizsgáltuk. Az ELN ajánlásnak megfelelően a Na-heparinnal alvadásgátolt mintáknál kevesebb immunfenotípus eltérés adódott a késleltetett mintafeldolgozás következtében. Emellett kimutattuk, hogy az antitest klónja is befolyásolhatja az immunfenotípust és annak változását.

A „mini-panel”-t két további paraméterrel kiegészítve (CD71 rCV%, mastocyták százaléka) egy érzékenyebb áramlási citometriai pontozó rendszert kapunk, melynek segítségével az alacsony rizikójú MDS-es betegek is hatékonyan azonosíthatóak. A rendszer paramétereinek négy- vagy nyolcszínű jelölési technikával történő vizsgálata nem befolyásolja a rendszer használhatóságát. Továbbá a paraméterek detektálása egy nappal később történt mintafeldolgozás során is megbízhatóak függetlenül az alvadásgátló típusától. Ugyanakkor, mivel a mastocyták detektálására a K₃-EDTA-val alvadásgátolt vér az optimálisabb, így a hat paraméterből álló „mini-panel” használatakor a K₃-EDTA alvadásgátló választása javasolt. A kialakított rendszer nemcsak a diagnózis felállításához, hanem a prognózis megítéléshez is hozzájárulhat.

Munkánkkal szerettünk volna támogatni a Nemzetközi Áramlási Citometriai Munkacsoport áramlási citometriai vizsgálat standardizálására és széleskörű használhatóságára vonatkozó törekvéseit.

8. Summary

MDS is a heterogeneous disease with understandably variable clinical outcomes. Flow cytometric examination can provide useful contributions to the diagnosis, prognostic assessment, and the anticipation of the therapy's effectiveness. Our objectives were assessing the impact of preanalytical factors on immunophenotype and improving the sensitivity of the "mini-panel" applied for the screening of MDS.

Of preanalytical factors, we examined the immunophenotypic alterations dependent on the type of anticoagulant by immediate and delayed sample handling. Applying a wide spectrum of markers, we analyzed not only the myeloid but also the lymphoid and erythroid cell lineages and even rare events. In accordance with the recommendations of ELN, samples anticoagulated with Na-heparin showed fewer immunophenotypic alterations as a consequence of delayed sample handling. We also demonstrated that the clone of the antibody can influence the immunophenotype and its alterations.

Complementing the „mini-panel” with two additional parameters (CD71 rCV%, mastocytes %) resulted in a more sensitive flow cytometric scoring system that can identify even low-risk MDS patients efficiently. Examining the system's parameters with either 4- or 8-color staining method does not influence the applicability of the system. Furthermore, detecting the parameters remains reliable even with a 1-day delay in sample processing, regardless of the type of anticoagulant. Nevertheless, the bone marrow samples collected in K₃-EDTA proved to be the most applicable to detection of mast cells, therefore it is recommended to collect samples

in K₃-EDTA for the determination of the “mini-panel” based on six parameters. Our amended system can contribute not only to the diagnosis but also the prognostic assessment of MDS cases.

With our study, we intended to support the International Flow Cytometric Working Group in their efforts to standardize and promote flow cytometric examination in the diagnosis of MDS.

9. A disszertáció új eredményei, megállapításai, klinikai jelentősége

1. Legjobb tudásunk szerint most először történt a preanalitikai faktorok hatásának vizsgálata a markerek széles spektrumán (37 paraméter), különböző sejttípusokon, nyolcszínű jelölési technika alkalmazásával. Azt találtuk, hogy az alvadásgátló típusa jelentősen befolyásolja a késői mintafeldolgozás következtében kialakult immunfenotípus-eltérések számát és azok mértékét. Azonosítottuk a stabil és érzékeny markereket.
2. Az alvadásgátló típusa már a kiindulási antigén expressziós mintázatra is hatással van, amikor még nincs, vagy csak minimális mennyiségben van jelen apoptotizáló sejt.
3. Tisztáztuk a sejtek elhalása során bekövetkező CD11b expressziójának változásáról a nemzetközi irodalomban talált eltérő információk okát: Eredményeink alátámasztják azt, hogy az alvadásgátló típusa, a minta származási helye (perifériás, csontvelői minta) és a vizsgálathoz használt antitest klónja megszabja a CD11b expressziójának viselkedését késői mintafeldolgozás során.
4. Hipotézisünknek megfelelően azt találtuk, hogy ha a „mini-panel”-t további két paraméterrel kiegészítettük - a CD71 expressziójának variációs koefficiensével (CD71 rCV%) és a mastocyták százalékával (MC%) – egy szenzitívebb pontozórendszer tudunk kialakítani, miközben a specificitás magas maradt.

5. A négyszínű jelölési technikával meghatározott hat paraméterből álló „mini-panel” eredményei jól reprodukálhatóak a nyolcszínű jelölési technika használatakor is, tehát az eredményeket a fluoreszcens festék típusa, az áramlási citométer beállításai nem befolyásolták.
6. Bizonyítani tudtuk, hogy a kialakított pontozó rendszer nemcsak az MDS diagnosztikáját, de a prognosztikai besorolást is segíteni tudta.
7. A négy paraméterből álló „mini-panel” elemeit az antikoaguláns típusa és az egy nappal később történt mintafeldolgozás nem befolyásolta.
8. Eredményeink rávilágítottak arra, hogy a mastocyták áramlási citometriával történő meghatározására a K₃-EDTA-val alvadásgátolt csontvelői minta a legalkalmasabb. Így a hat paraméterből álló „mini-panel” vizsgálatára a K₃-EDTA-val alvadásgátolt csontvelői minta a legmegfelelőbb, melynek paraméterei egy napig stabilak.

10. Irodalomjegyzék

- [1] C.E. Swerdlow SH, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, in: C.E. Swerdlow SH, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J (Ed.), WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC, Lyon, 2017, pp. 97-121.
- [2] C.R. Cogle, B.M. Craig, D.E. Rollison, A.F. List. Incidence of the myelodysplastic syndromes using a novel claims-based algorithm: high number of uncaptured cases by cancer registries. *Blood*. 2011; **117**: 7121-5.
- [3] S.L. Goldberg, E. Chen, M. Corral, A. Guo, N. Mody-Patel, A.L. Pecora, M. Laouri. Incidence and clinical complications of myelodysplastic syndromes among United States Medicare beneficiaries. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010; **28**: 2847-52.

- [4] P.L. Greenberg, R.M. Stone, A. Al-Kali, S.K. Barta, R. Bejar, J.M. Bennett, et al. Myelodysplastic Syndromes, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2017; **15**: 60-87.
- [5] L. Malcovati, E. Hellstrom-Lindberg, D. Bowen, L. Ades, J. Cermak, C. Del Canizo, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*. 2013; **122**: 2943-64.
- [6] M. Cabrero, E. Jabbour, F. Ravandi, Z. Bohannon, S. Pierce, H.M. Kantarjian, G. Garcia-Manero. Discontinuation of hypomethylating agent therapy in patients with myelodysplastic syndromes or acute myelogenous leukemia in complete remission or partial response: retrospective analysis of survival after long-term follow-up. *Leukemia research*. 2015; **39**: 520-4.
- [7] J.M. Bennett, D. Catovsky, M.T. Daniel, G. Flandrin, D.A. Galton, H.R. Gralnick, C. Sultan. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *British journal of haematology*. 1982; **51**: 189-99.
- [8] N. Gattermann, C. Aul, W. Schneider. Two types of acquired idiopathic sideroblastic anaemia (AISA). *British journal of haematology*. 1990; **74**: 45-52.
- [9] U. Germing, N. Gattermann, M. Aivado, B. Hildebrandt, C. Aul. Two types of acquired idiopathic sideroblastic anaemia (AISA): a time-tested distinction. *British journal of haematology*. 2000; **108**: 724-8.
- [10] S. Rosati, R. Mick, F. Xu, E. Stonys, M.M. Le Beau, R. Larson, J.W. Vardiman. Refractory cytopenia with multilineage dysplasia: further characterization of an 'unclassifiable' myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 1996; **10**: 20-6.
- [11] P. Greenberg, C. Cox, M.M. LeBeau, P. Fenaux, P. Morel, G. Sanz, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997; **89**: 2079-88.
- [12] J. Vardiman. The classification of MDS: from FAB to WHO and beyond. *Leukemia research*. 2012; **36**: 1453-8.
- [13] P. Mathew, A. Tefferi, G.W. Dewald, S.L. Goldberg, J. Su, H.C. Hoagland, P. Noel. The 5q- syndrome: a single-institution study of 43 consecutive patients. *Blood*. 1993; **81**: 1040-5.

- [14] G. Sokal, J.L. Michaux, H. Van Den Berghe, A. Cordier, J. Rodhain, A. Ferrant, et al. A new hematologic syndrome with a distinct karyotype: the 5 q--chromosome. *Blood*. 1975; **46**: 519-33.
- [15] J.W. Vardiman, N.L. Harris, R.D. Brunning. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002; **100**: 2292-302.
- [16] A.A. Giagounidis, U. Germing, S. Haase, B. Hildebrandt, B. Schlegelberger, C. Schoch, et al. Clinical, morphological, cytogenetic, and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q) including band q31. *Leukemia*. 2004; **18**: 113-9.
- [17] J.W. Vardiman, J. Thiele, D.A. Arber, R.D. Brunning, M.J. Borowitz, A. Porwit, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009; **114**: 937-51.
- [18] D.A. Arber, A. Orazi, R. Hasserjian, J. Thiele, M.J. Borowitz, M.M. Le Beau, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; **127**: 2391-405.
- [19] T. Haferlach, Y. Nagata, V. Grossmann, Y. Okuno, U. Bacher, G. Nagae, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014; **28**: 241-7.
- [20] E. Papaemmanuil, M. Gerstung, L. Malcovati, S. Tauro, G. Gundem, P. Van Loo, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013; **122**: 3616-27; quiz 99.
- [21] P. Valent, H.P. Horny, J.M. Bennett, C. Fonatsch, U. Germing, P. Greenberg, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leukemia research*. 2007; **31**: 727-36.
- [22] P. Valent, A. Orazi, D.P. Steensma, B.L. Ebert, D. Haase, L. Malcovati, et al. Proposed minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes (MDS) and potential pre-MDS conditions. *Oncotarget*. 2017; **8**: 73483-500.
- [23] P. Valent, B.J. Bain, J.M. Bennett, F. Wimazal, W.R. Sperr, G. Mufti, H.P. Horny. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain

- significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS. *Leukemia research*. 2012; **36**: 1-5.
- [24] D.P. Steensma, R. Bejar, S. Jaiswal, R.C. Lindsley, M.A. Sekeres, R.P. Hasserjian, B.L. Ebert. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015; **126**: 9-16.
- [25] P. Valent, H.P. Horny. Minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes and separation from ICUS and IDUS: update and open questions. *European journal of clinical investigation*. 2009; **39**: 548-53.
- [26] P. Valent, E. Jager, G. Mitterbauer-Hohendanner, L. Mullauer, I. Schwarzinger, W.R. Sperr, et al. Idiopathic bone marrow dysplasia of unknown significance (IDUS): definition, pathogenesis, follow up, and prognosis. *American journal of cancer research*. 2011; **1**: 531-41.
- [27] M.K. Hahn, R.D. Blakely. Monoamine transporter gene structure and polymorphisms in relation to psychiatric and other complex disorders. *The pharmacogenomics journal*. 2002; **2**: 217-35.
- [28] P. Valent, D. Bonnet, R. De Maria, T. Lapidot, M. Copland, J.V. Melo, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature reviews. Cancer*. 2012; **12**: 767-75.
- [29] G.J. Mufti, J.M. Bennett, J. Goasguen, B.J. Bain, I. Baumann, R. Brunning, et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica*. 2008; **93**: 1712-7.
- [30] U.M. Matolcsy A., Kopper L., Hematológiai betegségek atlasza, in: U.M. Matolcsy A., Kopper L. (Ed.), Hematológiai betegségek atlasza, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2006, pp. 156-73.
- [31] B. Kárai, Jakó, J., Szánthó, E., Kappelmayer, J., Hevessy, Z. A myelodysplasiás szindróma diagnosztikája, a prognózis megítélése. *Hematológia-Transzfúziológia*. 2013; **46**: 93-102.
- [32] M.G. Della Porta, L. Malcovati. Clinical relevance of extra-hematologic comorbidity in the management of patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2009; **94**: 602-6.
- [33] L. Malcovati, U. Germing, A. Kuendgen, M.G. Della Porta, C. Pascutto, R. Invernizzi, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in

- myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007; **25**: 3503-10.
- [34] L. Malcovati, M.G. Porta, C. Pascutto, R. Invernizzi, M. Boni, E. Travaglini, et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005; **23**: 7594-603.
- [35] E. Zipperer, D. Pelz, K. Nachtkamp, A. Kuendgen, C. Strupp, N. Gattermann, et al. The hematopoietic stem cell transplantation comorbidity index is of prognostic relevance for patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2009; **94**: 729-32.
- [36] M.G. Della Porta, L. Malcovati, C. Strupp, I. Ambaglio, A. Kuendgen, E. Zipperer, et al. Risk stratification based on both disease status and extra-hematologic comorbidities in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2011; **96**: 441-9.
- [37] F. Sole, B. Espinet, G.F. Sanz, J. Cervera, M.J. Calasanz, E. Luno, et al. Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. Grupo Cooperativo Espanol de Citogenetica Hematologica. *British journal of haematology*. 2000; **108**: 346-56.
- [38] P.L. Greenberg, H. Tuechler, J. Schanz, G. Sanz, G. Garcia-Manero, F. Sole, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012; **120**: 2454-65.
- [39] B.L. Scott, D.A. Wells, M.R. Loken, D. Myerson, W.M. Leisenring, H.J. Deeg. Validation of a flow cytometric scoring system as a prognostic indicator for posttransplantation outcome in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2008; **112**: 2681-6.
- [40] T.M. Westers, C. Alhan, M.E. Chamuleau, M.J. van der Vorst, C. Eeltink, G.J. Ossenkoppele, A.A. van de Loosdrecht. Aberrant immunophenotype of blasts in myelodysplastic syndromes is a clinically relevant biomarker in predicting response to growth factor treatment. *Blood*. 2010; **115**: 1779-84.
- [41] M. Cazzola, L. Malcovati. Myelodysplastic syndromes--coping with ineffective hematopoiesis. *The New England journal of medicine*. 2005; **352**: 536-8.

- [42] M.G. Della Porta, L. Malcovati, E. Boveri, E. Travaglino, D. Pietra, C. Pascutto, et al. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009; **27**: 754-62.
- [43] L. Malcovati, M.G. Della Porta, C. Strupp, I. Ambaglio, A. Kuendgen, K. Nachtkamp, et al. Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). *Haematologica*. 2011; **96**: 1433-40.
- [44] M.F. van Spronsen, G.J. Ossenkoppele, T.M. Westers, A.A. van de Loosdrecht. Prognostic relevance of morphological classification models for myelodysplastic syndromes in an era of the revised International Prognostic Scoring System. *European journal of cancer*. 2016; **56**: 10-20.
- [45] S. Matarraz, A. Lopez, S. Barrena, C. Fernandez, E. Jensen, J. Flores, et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia*. 2008; **22**: 1175-83.
- [46] S. Mathis, N. Chapuis, C. Debord, A. Rouquette, I. Radford-Weiss, S. Park, et al. Flow cytometric detection of dyserythropoiesis: a sensitive and powerful diagnostic tool for myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2013; **27**: 1981-7.
- [47] K. Ogata, M.G. Della Porta, L. Malcovati, C. Picone, N. Yokose, A. Matsuda, et al. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica*. 2009; **94**: 1066-74.
- [48] D.A. Wells, M. Benesch, M.R. Loken, C. Vallejo, D. Myerson, W.M. Leisenring, H.J. Deeg. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2003; **102**: 394-403.
- [49] H. Hirai, Y. Kobayashi, H. Mano, K. Hagiwara, Y. Maru, M. Omine, et al. A point mutation at codon 13 of the N-ras oncogene in myelodysplastic syndrome. *Nature*. 1987; **327**: 430-2.

- [50] D. Rose, A. Kohlmann, Y. Nagata, S. Ogawa, C. Haferlach, W. Kern, et al. A robust molecular pattern for myelodysplastic syndromes in two independent cohorts investigated by next-generation sequencing can be revealed by comparative bioinformatic analyses. *British journal of haematology*. 2014; **167**: 278-81.
- [51] B. Wood. Multicolor immunophenotyping: human immune system hematopoiesis. *Methods in cell biology*. 2004; **75**: 559-76.
- [52] E.G. van Lochem, V.H. van der Velden, H.K. Wind, J.G. te Marvelde, N.A. Westerdal, J.J. van Dongen. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*. 2004; **60**: 1-13.
- [53] P.A. Kuiper-Kramer, C.M. Huisman, J. Van der Molen-Sinke, A. Abbes, H.G. Van Eijk. The expression of transferrin receptors on erythroblasts in anaemia of chronic disease, myelodysplastic syndromes and iron deficiency. *Acta haematologica*. 1997; **97**: 127-31.
- [54] A.F. Sandes, M. Yamamoto, S. Matarraz, L. Chauffaille Mde, S. Quijano, A. Lopez, et al. Altered immunophenotypic features of peripheral blood platelets in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2012; **97**: 895-902.
- [55] A. Porwit, A.A. van de Loosdrecht, P. Bettelheim, L.E. Brodersen, K. Burbury, E. Cremers, et al. Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes-proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. *Leukemia*. 2014; **28**: 1793-8.
- [56] M. Stetler-Stevenson, D.C. Arthur, N. Jabbour, X.Y. Xie, J. Molldrem, A.J. Barrett, et al. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2001; **98**: 979-87.
- [57] S. Cherian, J. Moore, A. Bantly, J.A. Vergilio, P. Klein, S. Luger, A. Bagg. Peripheral blood MDS score: a new flow cytometric tool for the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*. 2005; **64**: 9-17.

- [58] L. Malcovati, M.G. Della Porta, M. Lunghi, C. Pascutto, L. Vanelli, E. Travaglino, et al. Flow cytometry evaluation of erythroid and myeloid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2005; **19**: 776-83.
- [59] K. Ogata, Y. Kishikawa, C. Satoh, H. Tamura, K. Dan, A. Hayashi. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2006; **108**: 1037-44.
- [60] A.A. van de Loosdrecht, T.M. Westers, A.H. Westra, A.M. Drager, V.H. van der Velden, G.J. Ossenkoppele. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood*. 2008; **111**: 1067-77.
- [61] V. Bardet, O. Wagner-Ballon, J. Guy, C. Morvan, C. Debord, F. Trimoreau, et al. Multicentric study underlining the interest of adding CD5, CD7 and CD56 expression assessment to the flow cytometric Ogata score in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2015; **100**: 472-8.
- [62] M.G. Della Porta, C. Picone, C. Pascutto, L. Malcovati, H. Tamura, H. Handa, et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica*. 2012; **97**: 1209-17.
- [63] A.A. van de Loosdrecht, C. Alhan, M.C. Bene, M.G. Della Porta, A.M. Drager, J. Feuillard, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2009; **94**: 1124-34.
- [64] T.M. Westers, R. Ireland, W. Kern, C. Alhan, J.S. Balleisen, P. Bettelheim, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia*. 2012; **26**: 1730-41.
- [65] P.H. Carter, S. Resto-Ruiz, G.C. Washington, S. Ethridge, A. Palini, R. Vogt, et al. Flow cytometric analysis of whole blood lysis, three anticoagulants, and five cell preparations. *Cytometry*. 1992; **13**: 68-74.

- [66] M.T. Elghetany, B.H. Davis. Impact of preanalytical variables on granulocytic surface antigen expression: a review. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*. 2005; **65**: 1-5.
- [67] G.L. Hodge, R. Flower, P. Han. Optimal storage conditions for preserving granulocyte viability as monitored by Annexin V binding in whole blood. *Journal of immunological methods*. 1999; **225**: 27-38.
- [68] S.P. Hart, J.A. Ross, K. Ross, C. Haslett, I. Dransfield. Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: implications for functional downregulation and recognition by phagocytes. *Cell death and differentiation*. 2000; **7**: 493-503.
- [69] M.K. Whyte, L.C. Meagher, J. MacDermot, C. Haslett. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *Journal of immunology*. 1993; **150**: 5124-34.
- [70] B. Frossi, F. Mion, R. Sibilano, L. Danelli, C.E.M. Pucillo. Is it time for a new classification of mast cells? What do we know about mast cell heterogeneity? *Immunological reviews*. 2018; **282**: 35-46.
- [71] M. Krystel-Whittemore, K.N. Dileepan, J.G. Wood. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Frontiers in immunology*. 2015; **6**: 620.
- [72] V.J. Costela-Ruiz, R. Illescas-Montes, R. Pavon-Martinez, C. Ruiz, L. Melguizo-Rodriguez. Role of mast cells in autoimmunity. *Life sciences*. 2018;
- [73] P. Bradding, G. Pejler. The controversial role of mast cells in fibrosis. *Immunological reviews*. 2018; **282**: 198-231.
- [74] H. Virk, G. Arthur, P. Bradding. Mast cells and their activation in lung disease. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2016; **174**: 60-76.
- [75] S.C. Bischoff. Mast cells in gastrointestinal disorders. *European journal of pharmacology*. 2016; **778**: 139-45.
- [76] D. Kempuraj, G.P. Selvakumar, R. Thangavel, M.E. Ahmed, S. Zaheer, S.P. Raikwar, et al. Mast Cell Activation in Brain Injury, Stress, and Post-traumatic Stress Disorder and Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Frontiers in neuroscience*. 2017; **11**: 703.
- [77] D. Ribatti. Mast cells in lymphomas. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2016; **101**: 207-12.

- [78] A. Aponte-Lopez, E.M. Fuentes-Panana, D. Cortes-Munoz, S. Munoz-Cruz. Mast Cell, the Neglected Member of the Tumor Microenvironment: Role in Breast Cancer. *Journal of immunology research*. 2018; **2018**: 2584243.
- [79] C.H. Dunphy. Evaluation of mast cells in myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2005; **129**: 219-22.
- [80] H.P. Horny, A. Greschniok, J.H. Jordan, D.M. Menke, P. Valent. Chymase expressing bone marrow mast cells in mastocytosis and myelodysplastic syndromes: an immunohistochemical and morphometric study. *Journal of clinical pathology*. 2003; **56**: 103-6.
- [81] W.R. Sperr, A. El-Samahi, M. Kundi, M. Girschikofsky, S. Winkler, D. Lutz, et al. Elevated tryptase levels selectively cluster in myeloid neoplasms: a novel diagnostic approach and screen marker in clinical haematology. *European journal of clinical investigation*. 2009; **39**: 914-23.
- [82] P. Valent, W.R. Sperr, K. Sotlar, A. Reiter, C. Akin, J. Gotlib, et al. The serum tryptase test: an emerging robust biomarker in clinical hematology. *Expert review of hematology*. 2014; **7**: 683-90.
- [83] I. Dransfield, A.M. Buckle, J.S. Savill, A. McDowall, C. Haslett, N. Hogg. Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *Journal of immunology*. 1994; **153**: 1254-63.
- [84] J. Jones, B.P. Morgan. Apoptosis is associated with reduced expression of complement regulatory molecules, adhesion molecules and other receptors on polymorphonuclear leucocytes: functional relevance and role in inflammation. *Immunology*. 1995; **86**: 651-60.
- [85] A. Stenberg, J. Sehlin, P.A. Oldenborg. Neutrophil apoptosis is associated with loss of signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) from the cell surface. *Journal of leukocyte biology*. 2013; **93**: 403-12.
- [86] I. Dransfield, S.C. Stocks, C. Haslett. Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis. *Blood*. 1995; **85**: 3264-73.
- [87] P. Nusbaum, C. Laine, M. Bouaouina, S. Seveau, E.M. Cramer, J.M. Masse, et al. Distinct signaling pathways are involved in leukosialin (CD43) down-regulation, membrane blebbing,

- and phospholipid scrambling during neutrophil apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2005; **280**: 5843-53.
- [88] H. Sengelov, L. Kjeldsen, M.S. Diamond, T.A. Springer, N. Borregaard. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *The Journal of clinical investigation*. 1993; **92**: 1467-76.
- [89] P.P. Youssef, B.X. Mantzioris, P.J. Roberts-Thomson, M.J. Ahern, M.D. Smith. Effects of ex vivo manipulation on the expression of cell adhesion molecules on neutrophils. *Journal of immunological methods*. 1995; **186**: 217-24.
- [90] J.M. Saxton, A.G. Pockley. Effect of ex vivo storage on human peripheral blood neutrophil expression of CD11b and the stabilizing effects of Cyto-Chex. *Journal of immunological methods*. 1998; **214**: 11-7.
- [91] H. Repo, S.E. Jansson, M. Leirisalo-Repo. Anticoagulant selection influences flow cytometric determination of CD11b upregulation in vivo and ex vivo. *Journal of immunological methods*. 1995; **185**: 65-79.
- [92] P. Fenaux, G.J. Mufti, E. Hellstrom-Lindberg, V. Santini, C. Finelli, A. Giagounidis, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The Lancet. Oncology*. 2009; **10**: 223-32.
- [93] M. Lubbert, S. Suci, L. Baila, B.H. Ruter, U. Platzbecker, A. Giagounidis, et al. Low-dose decitabine versus best supportive care in elderly patients with intermediate- or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) ineligible for intensive chemotherapy: final results of the randomized phase III study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group and the German MDS Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011; **29**: 1987-96.
- [94] D.P. Steensma, M.R. Baer, J.L. Slack, R. Buckstein, L.A. Godley, G. Garcia-Manero, et al. Multicenter study of decitabine administered daily for 5 days every 4 weeks to adults with myelodysplastic syndromes: the alternative dosing for outpatient treatment (ADOPT) trial.

Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2009; **27**: 3842-8.

- [95] H. Kantarjian, Y. Oki, G. Garcia-Manero, X. Huang, S. O'Brien, J. Cortes, et al. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood.* 2007; **109**: 52-7.
- [96] H. Kantarjian, J.P. Issa, C.S. Rosenfeld, J.M. Bennett, M. Albitar, J. DiPersio, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer.* 2006; **106**: 1794-803.
- [97] E. Jabbour, G. Garcia-Manero, N. Batty, J. Shan, S. O'Brien, J. Cortes, et al. Outcome of patients with myelodysplastic syndrome after failure of decitabine therapy. *Cancer.* 2010; **116**: 3830-4.
- [98] T. Prebet, S.D. Gore, B. Esterni, C. Gardin, R. Itzykson, S. Thepot, et al. Outcome of high-risk myelodysplastic syndrome after azacitidine treatment failure. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2011; **29**: 3322-7.
- [99] R. Itzykson, S. Thepot, V. Eclache, B. Quesnel, F. Dreyfus, O. Beyne-Rauzy, et al. Prognostic significance of monosomal karyotype in higher risk myelodysplastic syndrome treated with azacitidine. *Leukemia.* 2011; **25**: 1207-9.
- [100] A. Porwit. Is There a Role for Flow Cytometry in the Evaluation of Patients With Myelodysplastic Syndromes? *Current hematologic malignancy reports.* 2015; **10**: 309-17.
- [101] E. Hellstrom-Lindberg, T. Ahlgren, Y. Beguin, M. Carlsson, J. Carneskog, I.M. Dahl, et al. Treatment of anemia in myelodysplastic syndromes with granulocyte colony-stimulating factor plus erythropoietin: results from a randomized phase II study and long-term follow-up of 71 patients. *Blood.* 1998; **92**: 68-75.
- [102] R. Bejar, A. Lord, K. Stevenson, M. Bar-Natan, A. Perez-Ladaga, J. Zaneveld, et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood.* 2014; **124**: 2705-12.

9. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/278/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kárai Bettina
Neptun kód: Y6ALN3
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kárai, B.**, Miltényi, Z., Gergely, L., Széles, M., Kappelmayer, J., Hevessy, Z.: The impact of delayed sample handling and type of anticoagulant on the interpretation of dysplastic signs detected by flow cytometry.
Biochem Med (Zagreb). 28 (2), 1-13, 2018.
IF: 3.653 (2017)
2. **Kárai, B.**, Bedekovics, J., Miltényi, Z., Gergely, L., Szerafin, L., Ujfalusi, A., Kappelmayer, J., Hevessy, Z.: A single-tube flow cytometric procedure for enhancing the diagnosis and prognostic classification of patients with myelodysplastic syndromes.
Int. J. Lab. Hematol. 39 (6), 577-584, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/ijlh.12700>
IF: 1.919
3. **Kárai, B.**, Szánthó, E., Kappelmayer, J., Hevessy, Z.: Flow cytometry in the diagnosis of myelodysplastic syndromes.
E-JIFCC. 23 (4), [1-8], 2012.





További közlemények

4. Szánthó, E., **Kárai, B.**, Ivády, G., Bedekovics, J., Szegedi, I., Petrás, M., Ujj, G., Ujfalusi, A., Kiss, C., Kappelmayer, J., Hevessy, Z.: Comparative Analysis of Multicolor Flow Cytometry and Immunohistochemistry for the Detection of Disseminated Tumor Cells.

Appl. Immunohistochem. 26 (5), 305-315, 2018.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/PAI.0000000000000519>

IF: 2.042 (2017)

5. **Kárai, B.**, Hevessy, Z., Szánthó, E., Csáthy, L., Ujfalusi, A., Gyurina, K., Szegedi, I., Kappelmayer, J., Kiss, C.: Expression of Coagulation Factor XIII Subunit A Correlates with Outcome in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia.

Pathol. Oncol. Res. 24 (2), 345-352, 2018.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-017-0236-0>

IF: 1.935 (2017)

6. **Kárai, B.**, Jakó, J., Szánthó, E., Kappelmayer, J., Hevessy, Z.: A myelodysplasiás szindróma diagnosztikája, a prognózis megítélése.

Hematol. Transzfuziol. 46 (2), 93-102, 2013.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,549

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,572**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.08.13.



11. Tárgyszavak/Keywords

myelodysplasiás szindróma/myelodysplastic syndromes

áramlási citometria/flow cytometry

preanalitikai faktorok/preanalytical factors

áramlási citometriai pontozó rendszer/flow cytometry scoring system

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Hevessy Zsuzsannának, Témavezetőmnek, hogy egy új világot tárt felt előttem és bevezetett az áramlási citometriai vizsgálat rejtelseibe. Önálló munkára sarkallt, melynek köszönhetően fejlődhettem a legtöbbet. Mindig engedte és odaforduló támogatásával biztosította, hogy új dolgokat próbáljak ki. Az évek során mindvégig precíz munkára ösztönzött. Munkámat nemcsak szakmai módon támogatta, hanem mindig mögöttem állt.

Köszönettel tartozom Dr. Kappelmayer János Professzor Úrnak a DE ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézet Igazgatójának, nemcsak biztosította a feltételeket a tanulmányhoz, hanem mindvégig figyelemmel is kísérte. Segítő szakmai tanácsai mindig átsegítették az adódó nehézségeken. Megtanított arra, hogy noha az ördög a részletekben rejlik, a részleteket el kell helyezni a nagy egészben.

Köszönöm Dr. Ujfalusi Anikónak a betegekről és betegségekről való érdekes beszélgetéseket. Tudása és szemléletmódja más megvilágításba helyezte a dolgokat.

Külön köszönettel tartozom az Áramlási Citometriai Részleg minden dolgozójának. Azon ritka képességgel rendelkeznek, akik a fehér falak és műszerek moraja között a legdolgosabb napokon is meg tudják teremteni az otthon érzését.

Köszönettel tartozom szerzőtársaimnak Száraz-Széles Mariannak, Dr. Bedekovics Juditnak, Dr. Gergely Lajosnak, Dr. Mitényi Zsófiának, Dr. Szerfin Lászlónak.

Hálásan köszönöm a Laboratóriumi Medicina Intézet minden munkatársának segítségét.

Külön köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak, barátnőimnek, a szobának. Tudásukat, idejüket és véleményüket az oszd meg és uralkodj szellemében mindig megosztották velem, hálás vagyok érte.

Végezetül köszönöm családomnak, hogy mindvégig mellettem álltak, támogattak, türelmesek voltak és türelemre intettek, amikor kellett. Nélkülük nem jöhetett volna létre ez a munka.