

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Szánthó Eszter Judit

**Folyadékbiopsziás biomarkerek vizsgálata immun-alapú
módszerekkel malignus kórképekben**

DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Folyadékbiopsziás biomarkerek vizsgálata immun-alapú
módszerekkel malignus kórképekben**

Dr. Szánthó Eszter Judit

Témavezető:

Dr. Hevessy Zsuzsanna

egyetemi docens



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Bevezetés és irodalmi áttekintés	7
2.1. Immun-alapú módszerek definíciója, története	7
2.1.1. Immunkémiai módszerek	8
2.1.2. Az áramlási citometria elve és alkalmazása a klinikai gyakorlatban	9
2.2. Folyadékbiopsziás módszerek malignus betegségekben.....	11
2.2.1. Perifériás vér.....	13
2.2.2. Csontvelői aspirátum.....	13
2.2.3. Cerebrospinális folyadék.....	14
2.3. A laboratóriumi folyamatok és jellemzőik.....	15
2.3.1. A preanalitikai fázis.....	16
2.3.2. Az analitikai fázis.....	16
2.3.3. A posztanalitikai fázis	17
2.3.4. A laboratóriumi folyamatok lehetséges hibái és indikátorai	17
2.4. Preanalitikai megfontolások akut limfoblasztos leukémiában szenvedő gyermekek mintái kapcsán	18
2.5. Analitikai megfontolások disszeminált tumorsejtek detektálására áramlási citometriával és immunhisztokémiával	20
2.6. Posztanalitikai megfontolások a timidin kináz enzim, mint tumormarker használatáról CLL-ben.....	21
3. Célkitűzések	24
4. Anyagok és módszerek	25
4.1. Preanalitikai fázis: a nem megfelelő minőségű minták felderítésére irányuló tanulmány módszertana	25
4.1.1. ALL-ben szenvedő gyermekek csontvelői mintáinak vizsgálata	25
4.1.2. ALL-ben szenvedő gyermekek likvor mintáinak vizsgálata	26
4.1.3. Natív és stabilizátort tartalmazó mintavételi csőbe vett likvor minták összehasonlítása	26
4.1.4. Áramlási citometriai vizsgálatok.....	26
4.2. Analitikai fázis: disszeminált tumorsejtek kimutatására irányuló tanulmány módszertana	28
4.2.1. Szolid tumor gyanúval vagy igazolt betegséggel bíró csoport	28
4.2.2. Neuroblastoma gyanúval vagy igazolt betegséggel bíró csoport	29
4.2.3. Áramlási citometriai vizsgálatok.....	30
4.2.4. Immunhisztokémiai vizsgálatok.....	31
4.2.5. Szenzitivitás, specificitás, diagnosztikai hatékonyság	32
4.3. Posztanalitikai fázis: a szérumban timidin-kináz enzim életkor-specifikus referencia-tartományainak meghatározására, valamint CLL betegcsoporton történő validálására szolgáló tanulmány módszertana	32
4.3.1. Egészséges populáció a referencia tartományok meghatározásához.....	32
4.3.2. CLL populáció a módszer validálásához.....	33
4.3.3. Laboratóriumi módszerek.....	34

4.3.4. Statisztikai analízis	35
5. Eredmények	36
5.1. Preanalitikai fázis: a nem megfelelő minőségű minták felderítésére irányuló tanulmány eredményei	36
5.1.1. ALL-ben szenvedő gyermekek csontvelői mintáinak eredményei.....	36
5.1.2. ALL-ben szenvedő gyermekek likvor mintáinak eredményei	36
5.1.3. Natív és stabilizátort tartalmazó mintavételi csőbe vett likvor minták összehasonlításának eredményei	39
5.2. Analitikai fázis: disszeminált tumorsejtek kimutatására irányuló tanulmány eredményei.....	40
5.2.1. Szolid tumor gyanúval vagy igazolt betegséggel bíró csoport eredményei	40
5.2.2. Neuroblastoma gyanúval vagy igazolt betegséggel bíró csoport eredményei.....	40
5.2.3. Konkordáns és diszkordáns mintázatok	40
5.2.4. Szenzitivitás, specificitás, diagnosztikai hatékonyság	49
5.3. Posztanalitikai fázis: a szérum timidin-kináz enzim életkor-specifikus referencia-tartományainak meghatározására, valamint CLL betegcsoporton történő validálására szolgáló tanulmány eredményei	50
5.3.1. A szérum timidin kináz aktivitás mérés analitikai teljesítménye	50
5.3.2. Életkor-specifikus referencia tartományok kialakítása egészséges populációban.....	50
6. Megbeszélés	56
6.1. Preanalitikai fázis vizsgálata: a nem megfelelő minőségű minták azonosítása és ezek hatása az eredmények interpretációjára akut limfoblasztos leukémiás gyermekekben.....	56
6.2. Analitikai fázis vizsgálata: disszeminált tumorsejtek kimutatása áramlási citometriával és immunhisztokémiával	59
6.3. Posztanalitikai fázis vizsgálata: a timidin kináz enzim életkor-specifikus referencia tartományainak meghatározása valamint CLL betegcsoporton történő validálása	61
7. Összefoglalás	65
8. Summary	67
9. A disszertáció új eredményei, megállapításai, klinikai jelentősége	68
10. Irodalomjegyzék.....	69
11. Publikációs lista	79
12. Tárgyszavak/Keywords.....	82
13. Köszönetnyilvánítás	83
14. Függelék.....	84

1. Rövidítések jegyzéke

AFP	alpha feto-protein; alfa-fetoprotein
AIEOP-BFM	Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica – Berlin-Frankfurt-Münster
ALL	acute lymphoid leukemia; akut limfoblasztos leukémia
ALL-IC BFM	Acute Lymphoblastic Leukemia InterContinental Berlin-Frankfurt-Münster
APC	allophycocyanin; allofikocianin
APC-AF750	conjugation allophycocyanin-alexa fluor 750; konjugált allofikocianin-alexa fluor 750
AUC	area under the curve; görbe alatti terület
BCP-ALL	B cell precursor acute lymphoblastic leukemia; prekursor B-sejtes akut limfoblasztos leukémia
CLL	chronic lymphocytic leukemia; krónikus limfocitás leukémia
CD	cluster of differentiation, differenciálódási klaszter
CSF	cerebrospinal fluid; agy-gerincvelői folyadék
CTC	circulating tumor cell; keringő tumorsejt
CV%	percent coefficient of variation, variációs koefficiens
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
DTC	disseminated tumor cell; disszeminált tumorsejt
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid; etilén-diamin-tetraecetsav
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay; enzimmel-kötött immunoszorbens esszé
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule; epithelsejt adhéziós molekula
FITC	fluorescein isothiocyanate; fluoreszcein izotiocianát
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
FMR	Flow Medium Risk, közepes rizikójú áramlási citometriai csoport
FSC	forward scatter; előre szórt fény
FVS	fehérvérsejt
GD2	di-szialo-gangliozid 2

hCG	human chorio-gonadotropin; humán méhlepény-eredetű gonádserkentő hormon
IGHV	immunoglobulin heavy chain variable region; immunglobulin nehézlánc gén variábilis régió
IHC	immunohistochemistry; immunhisztokémia
INSS	International Neuroblastoma Scoring System; Nemzetközi Neuroblasztóma Pontozó Rendszer
MDACC	MD Anderson Cancer Center; MD Anderson Rákközpont
MFC	multicolor flow cytometry; sokszínű áramlási citometria
MFI	mean fluorescence intensity, átlagos fluoreszcencia intenzitás
MRD	minimal residual disease; minimális reziduális betegség
nMYOD	nuclear myoblast determination protein; magban található mioblaszt determináló fehérje
PB	pacific blue, pacific kék
PC5.5	phycoerythrin cyanine 5.5, fikoeritrin cianin 5.5
PC7	phycoerythrin cyanine 7, fikoeritrin cianin 7
PE	phycoerythrin, fikoeritrin
PerCP-Cy5.5	peridinin chlorophyll protein cyanine 5.5, peridinin klorofil fehérje cianin 5.5
PNET	primitive neuroectodermal tumor, primitív neuroektodermális tumor
PO	pacific orange, pacific narancs
PSA	prostate specific antigen; prosztatata-specifikus antigén
QC	quality control, minőségi kontroll
ROC	Receiver Operating Characteristic; vevő működési karakterisztika grafikus módszer
SOP	Standard Operating Procedure; szabványos működési eljárás
SSC	side scatter, oldalra szórt fény
T-ALL	T cell acute lymphoblastic leukemia; T-sejtes akut limfoblasztos leukémia
TK	timidin-kináz
VVT	vörösvértest

2. Bevezetés és irodalmi áttekintés

2.1. Immun-alapú módszerek definíciója, története

Az élő szervezetek működését molekulák közötti kölcsönhatások határozzák meg. Ezek egyik formája az antigén-antitest reakció. Antigén lehet minden olyan anyag, melynek egyes részeivel (ún. epitópjaival) specifikusan reagálni képes antitestek képződhetnek. Az antitesteket az antigén-stimulus hatására az immunrendszer sejtjei termelik (*McPherson, R. A., & Pincus, M. R. (2011). Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods 22nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders (továbbiakban: Henry's), 851. oldal*).

Az antigén-antitest reakciók specificitása immunanalitikai eljárások kifejlesztését is lehetővé tette. Ennek gyökerei egészen 1896-ig nyúlnak vissza, amikor Gruber és Durham leírták, hogy kolerában és tífuszban szenvedő betegek széruma a betegséget okozó baktériumok tenyésztését agglutinálja (*Gruber, 1896*), megteremtve a precipitációs immunesszék alapjait. A hasonlóan nagyméretű antigén-antitest komplexek (immunkomplexek) mennyiségi meghatározására napjainkban a turbidimetriás és nefelometriás immunanalitikai módszereket alkalmazzák, melyek fejlesztése az 1930-as évektől kezdődött. Ezen metódusok az immunkomplex mennyiségét közvetlenül határozzák meg, így direkt immunanalitikai eljárásoknak is nevezzük őket (*Henry's, 855. oldal*). A latex-szemcséket tartalmazó turbidimetria az automatizált klinikai kémiai laboratóriumokban széles körben használt eljárás különféle plazmafehérjék kimutatására (*Henry's, 858. oldal*).

A turbidimetriás és nefelometriás eljárások érzékenysége korlátozott; 1-5 mg/L-nél alacsonyabb koncentrációban jelen lévő anyagok kimutatása indirekt immunanalitikai módszerekkel történhet, melyekben az analit kimutatásához valamilyen nyomjelző anyag is szükséges (*Henry's, 854. oldal*). Berson és Yalow az 1950-es években kidolgozott, állati és humán inzulin kimutatására képes, ¹³¹I-izotópot alkalmazó analitikai eljárása az első, kompetitív immunesszé volt. A vizsgált mintához ismert mennyiségű, ¹³¹I-jelölt, kristályosított szarvasmarha inzulint adva papírkromatográfiás elektroforézis segítségével meg tudták határozni a minta inzulin-koncentrációját. A humán inzulin kimutatására tengerimalacban termeltetett anti-szarvasmarha inzulin antitesteket használtak, melyek erős keresztreakciót mutattak a humán inzulinnal (*Yalow, 1959*).

Berson és Yalow munkája nyomán (*Yalow, 1960*) az 1960-as években a kutatók egy sor újabb analit kimutatására dolgoztak ki radio-immunoesszéket, és a módszert is tovább fejlesztették: 1968-ban Miles és Hales a humán inzulin kimutatására nem az antigént, hanem az antitesteket jelölték radioaktív izotóppal (radio-immunometria) (*Miles, 1968*).

A radioaktív izotópok alkalmazása azonban számos problémát is felvetett (pl. a laboratóriumi személyzet biztonsága, a radioaktív hulladék kezelése), így az 1970-es évektől kezdődően a kutatók az immunanalitikai módszerek fejlesztésében ezek lehető kiváltására törekedtek; radioaktív izotópok helyett inkább enzimek alkalmazását helyezték előtérbe. 1971-ben Engvall és Perlmann írták le először az enzim-kötött immunoszorbens esszét (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) (*Engvall, 1971*); amely a mai napig széles körben alkalmazott módszer.

Az enzimek mellett fluoreszcens és kemilumineszcens anyagok is egyre gyakrabban kerültek nyomjelzőként az immunanalitikai reakciókban a radioaktív izotópok helyére. A fluoreszcens anyagokat (fluorofórokat) a rájuk jellemző, meghatározott hullámhosszúságú fényel történő megvilágítás gerjesztett állapotba hozza, melyből fény (foton) kibocsátásával térnek vissza alapállapotba. A fluoreszcens anyagot alkalmazó immunanalitikai eljárások esetében a fluorofór által kibocsátott fényt detektálja a készülék (*Henry's, 853. oldal*).

Az immunanalitikai eljárásokhoz szükséges specifikus antitestek előállítására a kezdeti időszakban különféle állatfajokban történt; az antitestek poliklonálisak voltak, és korlátozott mennyiségben álltak csak rendelkezésre. 1975-ben Kohler és Milstein új eljárásról számoltak be: egereket immunizáltak antigénnel, majd a lépükből izolált B-sejteket szintén egerből származó myeloma-sejtvonal sejteivel fuzionáltatták, hybridomákat hozva létre, melyek közül a megfelelő antitestet termelő hybridomát felszaporították (*Kohler, 1975*). Ilyen módon monoklonális antitesteket nyertek, melyek az adott antigén egy-egy epitópjára specifikusak.

2.1.1. Immunkémiai módszerek

Az *in vitro* ligand (kötés) típusú eljárásokkal különösen a kis molekulák mérése vált lehetővé. Ma már az így meghatározható anyagok száma 1000 fölött van, ezek legtöbbször fehérjék, peptid hormonok, szteroid hormonok, gyógyszerek, keringő antitestek, tumormarkerek, vitaminok, vírus antigének.

A módszerben a detektálhatóságot egy jól mérhető jelet hordozó reagens (tracer) biztosítja. Az eljárás jellemzője a nagy érzékenység (10^{-10} - 10^{-21} mol/L), specificitás és automati-

zálhatóság. Az immunoassay-k alapelve az immunkomplex-képződés folyamata. A meghatározandó anyag (antigén) és specifikus kötőágens (antitest) között egyensúlyi vagy kinetikus kötődési reakció játszódik le.

Az immunoesszék lehetnek kompetitív vagy nem kompetitív jellegűek. A kompetitív esszék jellemzője a korlátozott mennyiségű specifikus antitestkötőhely. Ide tartozik a radioimmunoesszé, az enzimimmunoesszé, a fluoreszcens immunoesszé és a lumineszcens immunoesszé. A nem kompetitív esszék jellemzője, hogy a reagens (antitest) feleslegben van a rendszerben, nincs vetélkedés, a jelzett komponens az antitest. Ezeket a módszereket immunometrikusnak nevezik. Ide tartozik az immunoradiometrikus, enzimimmunometrikus, immunofluorometrikus és az immunoluminometrikus esszé. A leggyakrabban használt változat az ún. „szendvics-technika”, amelyben két, az antigén különböző epitópjaira specifikus antitest: elfogó és jelölő reagál az antigénnel, ezért a módszer specifikusabb, mint az egy antitestes módszerek (Lequin, 2005).

Az immunoesszék osztályozhatók homogén és heterogén eljárásokra. A homogén eljárások során az immunreakció minden komponense folyadékfázisban van, szeparálás nem szükséges. Enzim- vagy fluoreszcens jelzéseknél az antitesthez kötődve megváltozik a jelzett antigén vagy enzim aktivitása, vagy fluoreszkáló, lumineszkáló képessége, ennek alapján a kötődés mértéke, illetve a vizsgált antigén koncentrációja meghatározható. Kis molekulák mérésében használt kisebb érzékenységgű (10^{-10} mol/L), de gyors, könnyen automatizálható, költségkímélő módszerek. A heterogén eljárások során a reakció közege nem egynemű, a folyadékközegben az ellenanyag legtöbbször valamilyen szilárd fázisú hordozóhoz kötött. A keletkező antigén-antitest komplexet (kötött frakció) a szabad frakciótól mérés előtt szeparálni kell. Néhány precipitációs eljárástól eltekintve jelenleg szinte kizárólagosak a szilárd fázisú elválasztó módszerek. A szilárd fázisok lehetnek: polisztrén csőfal-, mikroplate üreg belső felülete, latex partikulák-, papírkorong-, üveggyöngy-, paramágneses részecskék felszíne, stb. (Wu, 2006; Henry's, 851. és 875. oldal).

2.1.2. Az áramlási citometria elve és alkalmazása a klinikai gyakorlatban

Az áramlási citometria szuszpenzióban lévő sejtek vizsgálatára alkalmas analitikai módszer. Az áramlási rendszerben a mintafolyadékot ún. köpenyfolyadék öleli körül. A két folyadék laminárisan áramlik, vagyis nem keveredik egymással.

A mai áramlási citométerek kifejlesztése felé az első jelentős lépést Andrew Moldavan tette 1934-ben: mikroszkóp és ahhoz csatlakoztatott fotoelektronikus apparátus segítségével kapilláriscsőben áramló vörösvértesteket számolt meg (Moldavan, 1934). Wallace H. Coulter

1953-ban nyert szabadalmat impedancia-elven működő sejt- és részecskeanalizátorára. Készülékében a sejtek egy néhány mikrométer átmérőjű nyíláson haladtak át, miközben a nyílás két széle között a vezetőképességet mérte. Amikor a nyíláson egy sejt vagy egyéb részecske haladt át, megváltoztatta a vezetőképességet, és elektromos impulzust generált, melyek száma a sejtek számával, nagyságuk a sejt térfogatával volt arányos. A napjainkban használt hematológiai automata analizátorok jelentős része működik továbbra is ezen az elven. Louis Kamensky 1965-ben új típusú spektrofotométer kifejlesztéséről számolt be, mellyel szuszpenzióban lévő sejtek egyes alkotóit tudta mérni, és az adatokat számítógép segítségével kétdimenziós formában megjeleníteni (*Kamensky, 1965*).

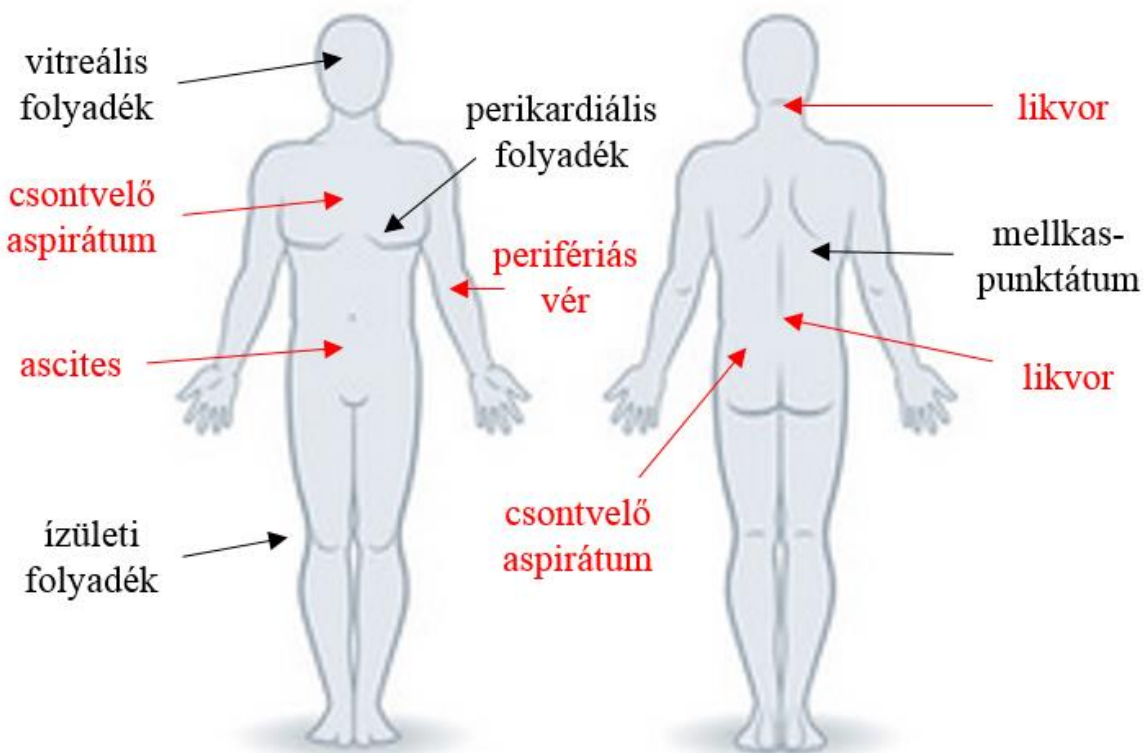
Az áramlási citométerek főbb részei: a) a lézer fényforrás, mely lehet 1, 2 vagy 3 lézer; b) az optika, mely szűrőkből és dikroikus tükrökből áll, célja, hogy az emittált fényt a detektorhoz továbbítsa; c) a detektorok, melyek az emittált fényt érzékelik, és elektromos jellé alakítják, amit továbbítanak a számítógép felé, ahol az adatok ún. list mode file-okban tárolódnak. Annak érdekében, hogy a lézer előtt a sejtek egyesével haladjanak el, a hidrodinamikus vagy az ultrahangos fókuszálás technikát alkalmazzák a műszerekben. Egy sejtről a fényszórási tulajdonságok (előre és oldalra szórt fény) mellett a fluoreszcens csatornák jelei kerülnek regisztrálásra. A mai áramlási citométerek alkalmasak 8-10 fluoreszcens szignál egyidejű vizsgálatára is, és nem csak a fehérvérsejtek, vörösvértestek és vérlemezkék analizálhatóak, hanem a nagyszámú esemény begyűjtése miatt olyan ritka sejt típusok is, mint a keringő endothelsejt vagy a keringő tumorsejt (*Tanqri, 2013*).

A sejt felszíni és citoplazmatikus markerek detektálása gyors és objektív vizsgálat, melynek alkalmazása ma már elengedhetetlen a leukémia-diagnosztikában. Lényege a sejt vonalakra és a sejt érési fázisára specifikus CD markerek (CD=cluster of differentiation) azonosítása a patológiás sejteken, fluoreszcens festékkel jelölt monoklonális antitestekkel (*van Dongen, 2012*). Mivel ezek az antigének már az éretlen sejteken is jelen vannak, a módszer lehetővé teszi a differenciálatlan sejtek pontos analizisét és a vizsgált populáción belül alcsoportok meghatározását (*de Haas, 2018*). A CD marker analizis során információt kapunk a lymphoid populáción belül a T-, B- és NK-sejtek arányáról, a CD4+/CD8+ T-sejt arányról, a monocyta- és granulocyta-arányról, továbbá hogy vannak-e blastok a periférián vagy a csontvelőben, és ha igen, milyen arányban (*Craig, 2008*). Az akut leukémiák diagnosztikájában az elsődleges cél a blastok jellemzése sejt vonal és érettség szempontjából, ill. kóros marker-expressziók kimutatása a blastokon (pl. lymphoid és myeloid markerek együttes expressziója egy sejten) (*Dworzak, 2018*). Ez a karakterizálás lehetővé teszi a leukémiás sejtek célzott keresését kezelést kö-

vetően (minimális reziduális betegség, MRD). A kóros mintázat felismeréséhez elengedhetetlen, hogy a normál csontvelői sejtvonalakérését ismerjük, az azokra jellemző CD markerek intenzitásához hasonlítsuk a vizsgált mintában kapott eredményt. (Stewart, 2000)

2.2. Folyadékbiopsziás módszerek malignus betegségekben

A tumoros betegségek diagnosztizálásának alapvető módszere a (szolid) tumorból (ill. a betegség terjedésének megítélésére a tumor környéki nyirokcsomókból) vett minta szövettani elemzése. Malignus betegség fennállása esetén tumorsejtek megjelenhetnek a különféle testfolyadékokban is: a perifériás vérben, a csontvelőben, a cerebrospinális folyadékban, hasi, mellkasi, perikardiális folyadékgyülemekben, vitreális vagy ízületi folyadékban, melyekből vagy maguk a tumorsejtek, vagy örökítőanyaguk kimutatható (**1. ábra**). A folyadékbiopsziás eljárások a nem szolid biológiai mintából történő anyagvétel és analízis lehetőségeit foglalják magukba. Előnyük, hogy többségük non-invazív, a beteg számára kisebb traumát jelent a minta nyerése, mint a szolid biopsziás vagy műtéti módszerek esetében.



1. ábra: A folyadékbiopsziás mintavétel lehetséges lokalizációi

Munkánk során a piros színnel jelölt mintákat vizsgáltuk, célunk a malignus sejtek jelenlétének kimutatása, kvantitálásuk és jellemzésük volt. Az ábra saját szerkesztésű.

Tumorsejteket vérből (*post mortem*) először Thomas Ashworth mutatott ki 1869-ben mikroszkóppal (*Asworth, 1869*), azonban közel száz évnek kellett eltelnie, mire a keringő tumorsejtek (circulating tumor cells, CTC) detektálásában komolyabb eredmények is születtek. Racila és munkatársai 1998-ban írták le a napjainkban is gyakran alkalmazott immunológiai alapú mágneses szeparálás módszerét a keringő tumorsejtek elkülönítésére (*Racila, 1998*). Mivel a keringő tumorsejtek a perifériás vérben igen kis mennyiségben vannak jelen, esetenként 1 tumorsejt a több millió normál vérsejt között, ezért dúsításukra különböző eljárásokat dolgoztak ki: fizikai tulajdonságok (méret, töltés, denzitás, deformabilitás) vagy a specifikus sejtfelszíni marker expresszió alapján. Az elkülönítés és dúsítás módszere pozitív vagy negatív szelekció lehet; negatív szelekció során eltávolítják a CD45+ hemopoietikus sejteket. Ezen módszer előnye, hogy a szeparálás során a keringő tumorsejtekre nem kerül antitest, hátránya, hogy az így kapott sejtszuspenzió jóval kevésbé tiszta, mint a pozitív szelekció során nyert. A pozitív szelekció hátrányai, hogy a szeparáláskor a tumorsejtre került antitest későbbi eltávolítása nehéz, és a megfelelő sejtfelszíni marker megválasztása sem könnyű feladat, (*Ferreira, 2016*) már csak azért sem, mert a betegség lefolyása során és a kezelés hatására is a tumorsejtek egyre heterogénebbé válnak (*Strotman, 2016*).

Az intakt tumorsejtek mellett a testfolyadékokban a belőlük származó nukleinsavak is megjelenhetnek, szabadon vagy extracelluláris vezikulákban. Ezek kimutatása és tanulmányozása egyrészt pontosabban visszatükrözi a tumor heterogenitását, másrészt kevésbé invazív és költséghatékonyabb vizsgálómódszer a betegség lefolyása során nem mindig, vagy nem egyszerűen kivitelezhető klasszikus szövettani mintavételnél (*Strotman, 2016*).

A folyadékbiopsziák esetében a legfőbb hátráltató tényező, hogy a valóban a tumorból származó sejteket, extracelluláris vezikulákat, nukleinsavakat elkülönítsük a benignus eredetűektől. Mindemellet ezekben a testfolyadékokban rendszerint igen kis mennyiségben vannak jelen; a rendelkezésre álló technológiai háttér ezért csak a közelmúlttól tette lehetővé alaposabb tanulmányozásukat. Tumoros betegek vérében a szabadon keringő nukleinsavak mennyisége jelentősen magasabb: több kutatócsoport egészségesekben milliliterenként mintegy 30 ng, tumoros betegekben 180 ng nukleinsavat talált. Az intakt tumorsejtek szelekciójához hasonlóan számos cég gyárt szabadon keringő nukleinsavak analizálására alkalmas kiteket, melyek a napjainkban elérhető legérzékenyebb technológiák, a digitális PCR és az újgenerációs szekvenálás felhasználásán alapulnak. (*Strotman, 2016*)

Az extracelluláris vezikulák elkülönítése és analizálása egészen új terület, számos, még meg nem válaszolt kérdéssel. Biogenezisük feltérképezése jelenleg is zajlik, a kutatók jelenleg

a 100 nm alatti átmérőjű exoszómákat, a 100-2000 nm-es mikrovezikulákat, az 50-5000 nm-es apoptotikus testeket és az 1-10 µm-es onkoszómákat különböztetik meg. A jövőben ezek akár célzott terápiák hordozó eszközeivé is válhatnak. Izolálásuk jelenlegi aranystandard módszere az ultracentrifugálás, azonban ultracentrifugát nem igénylő módszerek is folyamatos fejlesztés alatt állnak, pl. ELISA-alapú vagy kromatográfiás kitek. (Strotman, 2016)

2.2.1. Perifériás vér

A perifériás vér a legkönnyebben hozzáférhető minta, melyből keringő tumorsejteket, azok DNS-ét vagy tumor markereket mutathatunk ki. A keringő tumorsejtek tanulmányozása többek között elősegítheti a malignus betegségekben a kezelésre adott válasz, illetve a betegség esetleges visszatérének mintegy valós idejű (real-time) monitorozását, a malignus betegség terjedésének, az áttétek képződésének jobb megértését. Egyes szolid tumortípusok esetében már egyértelműen bizonyított, hogy a nagyobb számú keringő tumorsejt rosszabb prognózissal társul. Kimutatásuk azonban nem egyszerű feladat, mivel a perifériás vérben rendkívül alacsony arányban vannak jelen, és sejtfelszíni ill. citoplazmatikus markereik is nagy heterogenitást mutathatnak. Epithel eredetű tumorsejtek azonosítása és kvantitálása jelenleg elsősorban az epithelialis adhézions molekula (EpCAM) sejtfelszíni, valamint a cytokeratin intracelluláris exprezióján, illetve a hemopoiotikus sejtekre jellemző CD45 hiányán alapul. Mesenchymalis sejtek azonosítására a sejtfelszíni vimentin lehet alkalmas, illetve egyre inkább teret nyer az adott tumortípusra specifikus markerek alkalmazása is. (Ferreira, 2016)

2.2.2. Csontvelői aspirátum

A csontvelő vizsgálata a vérképzés aktuális állapota mellett egy sor egyéb, benignus ill. malignus betegségről nyújthat nélkülözhetetlen információt. A különféle elváltozások az esetek többségében egységesen érintik az egész csontvelőt, így többnyire egyetlen mintavételi helyről származó anyag vizsgálata is elegendő. A mintavétel (aspiráció) felnőttek esetében leggyakrabban a csípőlapátok hátsó részéből történik. Jelentősen elhízott betegek esetében szóba jön a csípőlapátok elülső része (a combhajlathoz közel), illetve a szegycsont is. Csecsemők és kisgyermekesek esetében a mintavétel a sípcsontból is végezhető, közvetlenül a térd alatt. A csontvelő-biopszia legalkalmasabb mintavételi területe a csípőlapátok hátsó része. (Henry's, 531-532. oldal; Hyun, 1988)

A csontvelő sejtállománya összetett; a vérképző (ős)sejteken kívül érett plazmasejtek, T-sejt alcsoportok, dendritikus sejtek, NK-sejtek is megtalálhatók benne, stromalis állománya

pedig gazdagon erezett, stromalis őssejtekkel és szekretált citokinekkal. A vérképző és az immunrendszer malignus megbetegedései, a leukémiák és a lymphomák tönkreteszik az érett, funkcióképes vérsejtek képzését. A csontvelőbe ezen kívül számos szolid tumortípus is gyakran ad áttétet; az ún. disszeminált tumorsejtek (disseminated tumor cells, DTC) számára a csontvelői mikrokörnyezet jelentősen elősegíti a túlélést. A legújabb kutatási eredmények alapján ez azért lehetséges, mert a csontvelői áttétképződés előtt a tumorsejtekből származó extracelluláris vezikulák mintegy előkészítik a csontvelői mikrokörnyezetet az intakt tumorsejtek számára. A korábbi feltételezésekkel ellentétben ugyanis tumorsejtek már a primer tumor felfedezése előtt a keringésbe kerülhetnek, és megkezdhetik az áttétképzést; eddig a kutatók úgy gondolták, hogy ez csak a tumor kialakulásának késői szakaszában következik be. (Röcken, 2010; Dasgupta, 2016; Sai, 2018)

A disszeminált tumorsejtek a csontvelőben hosszú időn át képesek túlélni nyugvó, kemo- és sugárterápiára rezisztens állapotban. Immunfenotípusuk az epithelialis-mesenchymalis tranzíció állapotának felel meg leginkább, őssejtekre is jellemző markerekkel. A keringő tumorsejtekkel együtt több kutatási eredmény alapján is független prognosztikai tényezőknek bizonyultak, melyek befolyásolják a teljes és a progressziómentes túlélést. A napjainkban elérhető technológiák, így pl. az áramlási citometria segítségével a disszeminált tumorsejtek kimutathatók a csontvelőből, kimutatásuk a bekövetkező relapszust jelezheti előre, illetve terápiás célpontot is képezhetnek. (Hoffmann, 2015; Sai, 2018)

2.2.3. Cerebrospinális folyadék

Felnőttekben az agy-gerincvelői (cerebrospinális) folyadék (liquor cerebrospinalis, röviden: likvor) mennyisége mintegy 90-150 mL. Naponta nagyjából 500 mL likvor termelődik, a teljes térfogat tehát 5-7 óránként teljesen lecserélődik (Spector, 2015). A likvor többek között védi a központi idegrendszert az artériás és a vénás nyomás, valamint a vérplazma összetételében bekövetkezett hirtelen változásoktól (vér-agy gát). Egészséges egyén likvora makroszkopos megjelenésében a vízhez hasonló: szintelen, átlátszó, tiszta folyadék. A fehérvérsejtek száma felnőttekben mikroliterenként legfeljebb 5, újszülöttekben 30 lehet, mely a serdülőkorra csökken a felnőtt értékre. Vörösvértestek normál körülmények között a likvorban nincsenek jelen. Felnőttekben a jelen lévő kevés fehérvérsejt mintegy 70%-a lymphocyta, 30%-a monocyta. Gyermekekben a monocyták aránya magasabb, akár 80% is lehet (de Graaf, 2011, *Cytometry B*).

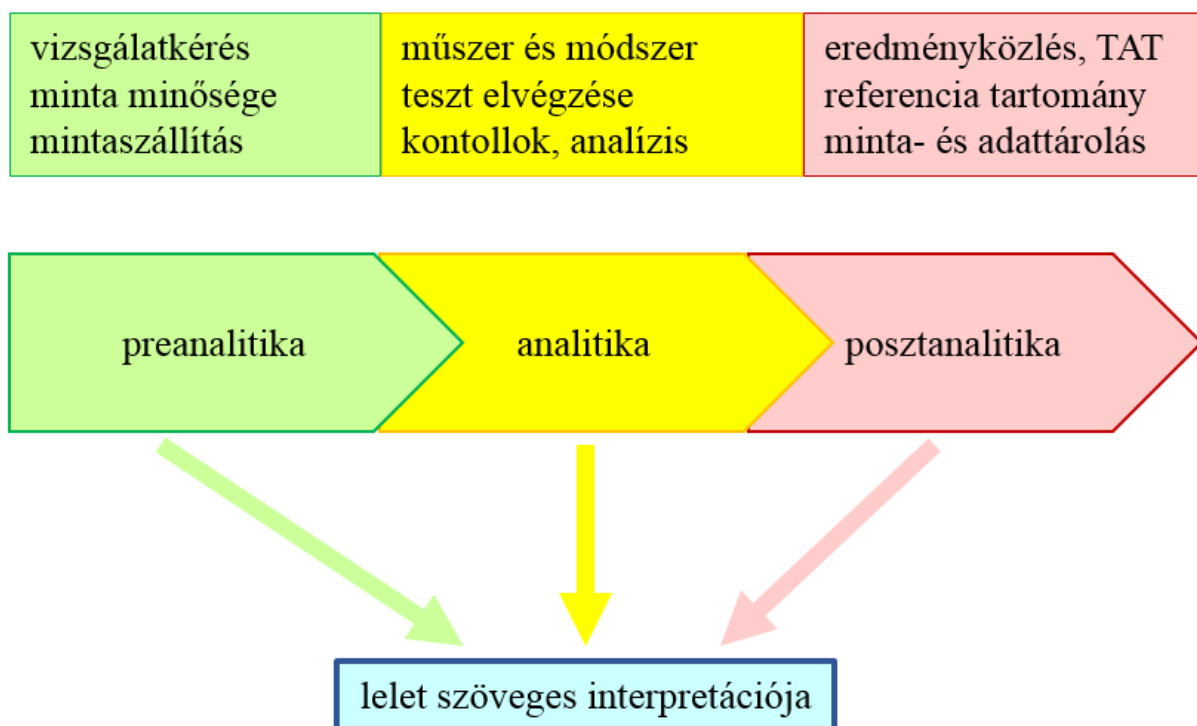
A likvorból történő mintavétel legbiztonságosabb helye a lumbalis gerincszakasz, de szükség esetén a tarkó alatt (cisternapunctio), vagy a nyakon oldalirányból is történhet a szúrás.

Az agykamrába helyezett kanül vagy shunt is használható mintavételre. Felnőtt egyéntől egyszerre legfeljebb 20 mL likvor vehető. A mintavétel helyét a laboratóriummal közölni kell, mivel a citológiai és a kémiai paraméterek ennek megfelelően változhatnak. (Henry's, 481. oldal)

A likvor citológiai vizsgálatát a mintavétel után a lehető legrövidebb időn belül el kell végezni, mert a sejtek károsodása már a mintavételt követő egy órán belül megkezdődik.

2.3. A laboratóriumi folyamatok és jellemzőik

A laboratóriumi vizsgálatok jelentősége igen nagy a diagnózis felállításakor és a betegek követésében. A klinikai döntések kétharmada a laboratóriumi eredmények alapján történik. A laboratóriumi folyamatok komplex rendszerét a preanalitikai, analitikai és posztanalitikai fázisok egymásba kapcsolódó integrációja adja (2. ábra). Az utóbbi években egyes szerzők a prepreanalitikai (megfelelő vizsgálat kérése a klinikus részéről) és a poszt-posztanalitikai (eredmények klinikusi értékelése) folyamatokat külön említik (Laposata, 2007).



2. ábra: A laboratóriumi folyamatok

A preanalitikai folyamatok zöld, az analitikai folyamatok sárga és a posztanalitikai folyamatok piros háttérszínnel vannak feltüntetve. A laboratóriumi folyamatok mindhárom fázisa illetve az egyes fázisokban fellépő lehetséges hibák mind hatással lehetnek a lelet szöveges interpretációjára.

Az ábra a (Henry's, 14. old), (Davis, 2013) és (Barnett, 2013) alapján saját szerkesztésű.

2.3.1. A preanalitikai fázis

A preanalitikai fázishoz tartozik minden olyan tevékenység, mely a teszt elvégzése előtt történik. A minta levétele előtti teendő a vizsgálatkérés, vagyis a megfelelő tesztek kiválasztása és a kérőlapon a beteggel kapcsolatos, az analízis szempontjából fontos információ közlése (gyógyszer bevitel ideje, kemoterápia, *de novo* vagy követéses vizsgálat). A mintavétel során a beteg korrekt azonosítása után figyelni kell arra, hogy az adott vizsgálatához megfelelő mennyiségű minta kerüljön a megfelelő mintavételi csőbe (pl. csontvelői aspirátum myeloma multiplex és perifériás vér paroxysmalis nocturnalis hemoglobinuria áramlási citometriai vizsgálata; likvor a speciális mintavételi csőbe kerüljön, de ha áramlási citometriai vizsgálatot kér az orvos, akkor fixálót kell tartalmaznia a mintavételi csőnek). A minták és kérőlapok illetve kéresek pontos jelölése elengedhetetlen. A levett minta minősége, vagyis alvadékos, hemolizált, lipémiás, icterusos volta is a preanalitikai fázisban jelen levő hibaforrások közé tartozik. A minta szállításának körülményei (humán szállítás vagy csőposta), annak hőmérséklete (szobahőn, jég között, fagyasztva), hossza jelentősen befolyásolja a kapott eredményt, illetve, hogy a vizsgálat egyáltalán kivitelezhető-e (*Simundic, 2008; Sciacovelli, 2017*). Különleges preanalitikai követelmény áramlási citometriai vizsgálat során, hogy bizonyos vizsgálatok csak adott időpontban meghatározott mintából végezhetőek (pl. gyermekkori akut limfoblasztos leukémia követéses vizsgálatra a csontvelői aspirátum a 15., a 33. vagy 78. napon levéve). Szintén az áramlási citometriai vizsgálatra érkező csontvelői vagy likvor minták esetében a perifériás vérrel történt kontamináció vagy a kevés élő sejtet tartalmazó minta preanalitikai hiba miatt korlátozottan vagy nem értékelhető (*Davis, 2013*).

2.3.2. Az analitikai fázis

Az analitikai fázisban történik a teszt kivitelezése és megszületik a vizsgálat eredménye. Ebben a fázisban igen eltérő az egyes laboratóriumok feladata. Míg a kémiai vagy hematológiai automaták óránként több ezer eredményt generálnak a megfelelő beállítás és gyári kontollok mérése után, addig a speciális laboratóriumok (pl. áramlási citometria, citogenetika, FISH) több órára vagy több napos procedúra során tudnak eredményt adni. Az analitikai fázishoz tartozik a külső és belső minőségi kontroll eredmények megfelelősége, az adott teszt teljesítménye: reprodukálhatóság (imprecision), pontosság (inaccuracy), szenzitivitás, specificitás. Az analitikai fázishoz tartozik az eredmények bevitele az informatikai rendszerbe, ami történhet automatikus vagy manuális módon (*Sciacovelli, 2017*). Az áramlási citometriai laboratóriumban az analitikai fázisban történik a minta jelölése a vizsgálat irányának megfelelően összeállított antitest

panelekkel. Itt fontos az antitestek klónjainak, a fluorokrómoknak, az antitestek hígításainak megválasztása, optimalizálása, valamint az egyéb reagensek, fixálók, permeabilizálók, lizálók minőségének biztosítása. Ugyanakkor az áramlási citométer helyes beállítása, a gyöngyökkel történő kalibráció, a kompenzáció, belső és külső kontroll alkalmazása biztosítja a műszer alkalmasságát a helyes mérési eredmény biztosítására (*Kalina, 2012*). Miután megtörténik a minta mérése, az áramlási citometriai eredmény úgy születik meg, hogy hozzáértő, képzett szakember analizálja a nyers adatokat. Az analízis alapja a kapuk felhelyezése a vizsgálandó populációk köré, ez történhet automata-kapuzással, értékelő szoftverrel vagy kézi kapuzással. Az eredmény lehet kvantitatív (pl. T, B, NK sejtek aránya és abszolút száma; blasztok %-a) vagy kvalitatív (blasztok immunfenotípusának leírása) (*Tanqri, 2013*). Az eredmény megjelenítése történhet hisztogram formájában vagy felhőképen, az értékelt sejtek %-os eloszlása vonatkozhat az összes mért sejtre vagy csak egy adott populációra, ezeket az eredménnyel együtt közölni kell. A szenzitivitás meghatározása különösen a hematológiai malignitások kezelése során a követéses vizsgálatoknál minden mérés során fontos, a leletben közlendő adat (limit of detection = detektálhatósági határ és limit of quantitation = kvantitálási határ) (*Theunissen, 2017*).

2.3.3. A posztanalitikai fázis

A posztanalitikai fázishoz az eredmény megszületése utáni folyamatok tartoznak. Így az eredményközlés, az eredmény összevetése a referencia tartománnyal és ez alapján annak értékelése, a kezelőorvos értesítése vagy adott esetben szöveges vélemény írása. A leletátfordulási idő (turnaround time) fontos minőségi jellemzője egy vizsgálatnak és a laboratóriumnak (*Antal-Szalmás, 2007*). A minta megőrzése további analízisre illetve a mért adat file-ok és az analizált file-ok megőrzése intézményenként a helyi szabályozás szerint előírt ideig szükséges. Az áramlási citometriai eredmények interpretációja speciális előképzettséget igényel, ahol a leletező orvos birtokában van az áramlási citométer, az antitest panelek és kontrollok technikai ismeretei mellett a hematológiai betegségek diagnosztikájához és követéséhez szükséges elméleti ismereteknek (*Barnett, 2013*).

2.3.4. A laboratóriumi folyamatok lehetséges hibái és indikátorai

A laboratóriumi folyamat során a hibák 46-68%-a a preanalitikai fázisban, 7-13% az analitikai fázisban és 18-47% a posztanalitikai fázisban történik (*Plebani, 2006*). A laboratóriumokban a minőségbiztosításnak és az egyre pontosabban mérő műszereknek köszönhetően az

analitikai folyamat hibái meglehetősen alacsony arányban játszanak szerepet, ezzel szemben az extra-analitikai folyamatok az összes hiba igen magas arányát adják úgy, hogy ezen folyamatok többségére a laboratóriumnak nincs hatása (*Plebani, 2009*). Ezt felismerve számos munkacsoport elemezte a pre- és posztanalitikai fázisban keletkező hibák hátterét (*Hawkins, 2012; Sciacovelli, 2016*) és indikátorokat dolgoztak ki a hibák felismerésére és regisztrálására. Az indikátorok nemzetközi harmonizációjára több munkacsoport tett javaslatot (*Barth, 2012; Sciacovelli, 2017; Plebani, 2017*). A jelenlegi konszenzus alapján a preanalitikai fázisban jegyeznek a legtöbb, 28 indikátort, az analitikai fázisban 6, míg a posztanalitikai fázisban 11 indikátort (*Sciacovelli, 2017; Plebani, 2017*). Az indikátorok regisztrálásával és a laboratóriumi informatikai rendszerben való rögzítésével a laboratóriumok monitorozni tudják a laboratóriumi folyamatok egyes fázisaiban keletkező hibák számát, arányát, így adott időszakra vonatkozóan javítani tudják saját teljesítményüket és klinikusi megítélésüket. Az utóbbi években a teljes laboratóriumi folyamat során fellépő valamennyi hibára potenciálisan „diagnosztikus” hibaként tekintenek (*Plebani, 2015*), ezzel azt sugallva, hogy a laboratóriumi folyamat bármely fázisában keletkező hiba befolyásolja az eredmény interpretációját és így téves diagnózishoz vezethet.

2.4. Preanalitikai megfontolások akut limfoblasztos leukémiában szenvedő gyermekek mintái kapcsán

Az akut limfoblasztos leukémia, a leggyakoribb gyermekkori rosszindulatú daganatos betegség, még napjainkban is vezető oka a 20 éves kor alatt, malignus megbetegedés miatt bekövetkezett haláleseteknek (*Hunger, 2015*), noha a betegség túlélése jelenleg már összehasonlíthatatlanul jobb, mint mikor Farbernek és mtsainak 1948-ban először sikerült remissziót indukálni ALL-es gyermekekben aminopterin alkalmazásával (*Farber, 1948*). Az akut limfoblasztos leukémia B- vagy T-sejtes lehet; az esetek 85%-ában prekursor B-sejtes leukémia (B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, BCP-ALL) alakul ki, 15%-ban pedig T-sejtes ALL. A jelenleg alkalmazott kezelés alapja továbbra is a kombinált kemoterápia, melynek kidolgozásában Riehmnek és mtsainak volt úttörő szerepe az 1970-es években (*Riehm, 1980*). A kemoterápia intenzitása és a további terápiás döntések meghozatala nagyban függ a betegség különféle prognosztikai tényezőitől, mint például a beteg klinikai állapota a diagnózis idején, a leukémiás sejtek genetikai tulajdonságai, a központi idegrendszer állapota és a korai terápiára adott válasz (*Hunger, 2015*). A helyes kockázatfelméréshez elengedhetetlen a megfelelő minőségű minták vizsgálata. Gyakori preanalitikai hiba, hogy vagy a csontvelő, vagy az agy-gerinc-

velői folyadék (likvor) perifériás vérrel szennyeződik. Akár morfológiai, akár áramlási citometriai vizsgálatok történnek a mintából, nélkülözhetetlen, hogy elegendő számú élő sejtet tartalmazzon (Schrappe, 2009). Az AIEOP BFM 2009 protokoll szerint a 8. napon a perifériás vér, illetve a 15. és 33. napon a csontvelő vizsgálata elengedhetetlen a későbbi terápia intenzitásának meghatározásához (Schrappe, 2009). A mintavétel során a lehető legkisebbre kell csökkenteni annak valószínűségét, hogy a csontvelői mintába perifériás vér kerüljön, mivel ellenkező esetben alábecsülhetjük a csontvelői blastarányt, és nem a megfelelő rizikócsoporthoz soroljuk a beteget. Az ALL-IC BFM 2009 szabályrendszere szerint, mely a csontvelőben minimális reziduális betegség (MRD) jelenlétének áramlási citometriai eljárás segítségével történő megállapítására vonatkozik, ha a 15. napi csontvelői mintában az erythroid előalakok aránya nem éri el a 2%-ot, nagy a valószínűsége, hogy a csontvelői minta jelentős mértékben szennyeződött perifériás vérrel. Ha az ilyen minta 10% feletti arányban tartalmaz reziduális kóros sejteket, a beteg az eredmény alapján a nagy kockázatú (Flow High Risk) csoportba sorolható. Amennyiben a perifériás vérrel kontaminált csontvelői mintában 10% alatti a blasztok aránya, az áramlási citometriai rizikócsoporthoz (0,1% - 10%: Flow Medium Risk és <0,1%: Flow Low Risk) történő besorolásuk nem tehető meg, a mintát MRD vizsgálatra alkalmatlannak kell minősíteni (Dworzak, 2009; Radu, 2020).

A központi idegrendszer érintettsége esetén intrathecalis kemoterápia beadására van szükség (de Graaf, 2011, *J Neurol*). Ha azonban az agy-gerincvelői folyadékból (likvor) vett minta perifériás vérrel szennyeződik, az esetlegesen kimutatott kóros sejtek eredete nem állapítható meg egyértelműen. További nehézség, különösen, ha a mintát pl. áramlási citometriai vizsgálat elvégzéséhez messzebbre kell szállítani, hogy a likvorból vett mintában a sejtek gyorsan elpusztulnak. A sejtpusztulás üteme és mértéke sejttípusonként eltérő, így hosszabb mintaszállítás esetén mire a vizsgálat megtörténik, a minta sejttözetétele, az egyes sejttípusok egymáshoz viszonyított aránya már jelentősen megváltozhatott, és a kóros sejtpopuláció esetleg már nem mutatható ki. Perifériás vérből és csontvelőből vett minták esetén rendszerint rendelkezésünkre áll elegendő számú élő sejt, likvorminták esetében azonban a sejtszám gyakran nagyon alacsony, ami tovább nehezíti az elemzést. További hátrány, hogy sem arról nincs konszenzus, mennyi a vizsgálat értékelhetőségéhez szükséges minimális sejtszám (az irodalomban 100 és 1000 közötti értékek lelhetők fel – Kleine, 1999; Urbanits, 2002), sem arról, hogy pontosan mik a perifériás vérrel történt szennyezettség igazolásának kritériumai (McIntosh, 1986; Lauer, 1989; Mahmoud, 1993).

Összességében tehát a kapott eredmények valóságát igen jelentős mértékben határozza meg a csontvelői és a likvorminta minősége, legyen szó akár diagnózis céljából, akár a

követés során vett mintáról, úgy gyermekkori ALL-ben, mint más leukémia- és limfóma-típusok esetén.

2.5. Analitikai megfontolások disszeminált tumorsejtek detektálására áramlási citometriával és immunhisztokémiával

A gyermekkori daganatok közül elsősorban a neuroblastoma, a rhabdomyosarcoma, a Ewing-sarcoma és a retinoblastoma kapcsán várható, hogy a betegség lefolyása során a tumor a csontvelőben is megjelenik (*Finkelstein, 1970; Krishnan, 2007*). A neuroblastoma a ganglionléc (*crista neuralis*) sejtjeinek rosszindulatú elfajulása, melyek a mellékvese velőállományában vagy a szimpatikus ganglionokban találhatók. Az 1986-ban kidolgozott és 1988-ban módosított nemzetközi neuroblastoma osztályozási rendszer (International Neuroblastoma Scoring System, INSS) az anatómiai előfordulás és a csontvelői infiltráció alapján kategorizálja a betegséget (*Brodeur, 1988; Park, 2010*). Park és mtsai a csontvelő érintettségének megítélésére immunhisztokémiai vizsgálatok végzését javasolták (CD56, chromogranin A, synaptophysin – *Park, 2010*). Felnőttekben leggyakrabban prosztata- emlő- és tüdőrák-áttétek jelennek meg a csontvelőben. (*Anner, 1977; Singh, 1977; Krishnan, 2007*) A primer szolid tumorból disszemináló tumorsejtek vizsgálatával megállapítható az áttétek és a relapszusok eredete (*Kang, 2013*). A malignus betegség stádiumbesorolása és a terápia tervezése során fontos a csontvelő esetleges tumoros érintettségének megállapítása, mely a csontvelő-aspirátum és csontvelő-biopsziás minta morfológiai vizsgálatával lehetséges. Kaur és mtsai (*Kaur, 2011*) szerint tumoros érintettség megítélésére a kétoldali, csípőlapátból vett minta elemzése az arany standard.

Az áramlási citometriát már az 1980-as évek óta alkalmazzák a malignus sejtek DNS-tartalmának mérésére (*Corver, 2002*). Napjainkban a többszínű áramlási citometria (multicolor flow cytometry, MFC) elsődleges alkalmazási területe a vérképzőrendszeri betegségek felismerése és kategorizálása (*Craig, 2008; van Dongen, 2012*), de a szolid tumoros betegségek diagnosztikájában és követésében is van szerepe. Ennek ellenére mindezig csak kevés olyan tanulmány látott napvilágot, mely kifejezetten a szolid tumorok áramlási citometria segítségével történő fenotipizálására fókuszál. Ferreira-Facio és mtsai (*Ferreira-Facio, 2013*) különféle gyermekkori rosszindulatú daganatok immunfenotípusát vizsgálták, és megállapították, hogy az áramlási citometria ezekben az esetekben egy gyors diagnosztikus és szűrővizsgálati eszköz. Leghasznosabb markerekként az alábbiakat írták le: CD45, CD56, CD81, CD99, CD271, EpCAM, GD2, nMYOD, továbbá a T- és B-sejtekre specifikus markerek. Egyes ritka esetekben, melyekben a primer tumort nem sikerül megtalálni, a csontvelő áramlási citometriai vizsgálata

elengedhetlenné válik a diagnózis megállapítására (Csáthy, 2011). A csontvelő immunhisztokémiai és áramlási citometriai vizsgálata során kapott eredményeket összehasonlító tanulmányból kevés áll rendelkezésre (Sah, 2003; Swerts, 2004).

2.6. Posztanalitikai megfontolások a timidin kináz enzim, mint tumormarker használatáról CLL-ben

A krónikus lymphocytás leukémia a fejlett országokban a leggyakrabban előforduló leukémia. Elsősorban idősebb személyeket érint, férfiakat valamivel nagyobb számban, mint nőket (Hallek, 2019). A betegség stádiumának megállapítására hazánkban elsődlegesen a Rai szerinti besorolási rendszer terjedt el (Rai, 1975). E szerint a betegségnek öt stádiuma van: Rai 0 stádiumban csak lymphocytosis van jelen, melyet rendszerint véletlenül fedeznek fel, a betegnek panasza, tünete még nincs. Rai 1 stádiumban a lymphocytosis mellé nyirokcsomó-megnagyobbodás (lymphadenomegalia) társul, Rai 2 stádiumban már a máj és/vagy a lép megnagyobbodása (hepato-splenomegalia) is. A Rai 3 stádium jellemzője, hogy a lymphocytosis mellett anaemia van jelen, lymphadenomegaliával és hepato-splenomegaliával, vagy anélkül. Rai 4 stádiumba akkor soroljuk a beteget, ha a lymphocytosis mellett thrombocytopenia alakul ki, akár jelen van ezek mellett anaemia és nyirokcsomó- ill. máj/lép-megnagyobbodás, akár nincs. A Rai stádiumok a betegség lefolyására, a várható túlélésre vonatkozó információt is hordoznak: Rai és mtsai megfigyelései alapján a 0. stádiumban az átlagos túlélés meghaladta a 150 hónapot, az 1. stádiumban 101 hónap, a 2. stádiumban 71 hónap, a 3. stádiumban 19 hónap, a 4. stádiumban szintén 19 hónap volt (Rai, 1975).

Az azóta eltelt időben számos egyéb tényező, elsősorban genetikai, kromoszomális eltérések prognosztikai szerepének felismerésére került sor. A genetikai tényezők mellett egyes, a vérben keringő biomarkerek is szolgáltathatnak a betegség várható kimenetelére vonatkozó információt, ezek közé tartozik a timidin-kináz enzim is. Néhány specifikus biomarkertől (AFP, HCG, PSA, stb. – Houstek, 1968; Vaitukaitis, 1974; Stenman, 1999) eltérően a timidin-kináz 1 (TK1, ATP-5'-foszfotranszferáz; EC.2.7.1.21) a nem specifikus tumormarkerek közé tartozik, mely a folyamatosan osztódó sejtekben van jelen (O'Neill, 2001). A timidin-kináz a DNS szintézis úgynevezett mentési útvonalának kulcsenzimje, a timidint timidin-monofoszfáttá alakítja. Az enzimnek két izoformája van: a TK1 a citoplazmában, a TK2 a mitokondriumokban található. A TK1 enzim aktivitása sejtciklus-függő; szintje a G1/S fázisban kezd emelkedni, és a G2/M fázisban éri el a csúcst (Reihard, 1951; Weissman, 1960; Berk, 1973; Sherley 1988; Kornberg, 1989).

A TK1 enzimet már számos sejt- és szövettípusból izolálták, és számos daganatos betegségben írtak le emelkedett TK1-aktivitást a szérumban, noha az enzim keringésbe jutásának mechanizmusa még nem egészen ismert (*Hallek, 1992; Thomas, 1995; Fockens, 2001; Fujiwaki, 2001*). A TK1 továbbá CLL és non-Hodgkin-lymphoma esetében prognosztikai marker is (*Gronowitz, 1983; Kallander, 1984; Hallek, 1999; Konoplev, 2010*). A korábbi években számos tanulmány igazolta a CD38 és a Zap70 expresszió prognosztikai szerepét CLL-ben (*Damle, 1999; Damle, 2002; Wiestner, 2003; D'Arena, 2007; Malavasi, 2011*). Azokban a betegekben, akikben az immunglobulin nehézlánc gén variábilis régiója (IGHV gén) nem mutálódott, és magasabb CD38- és Zap70-expresszióval rendelkeztek, a TK1 aktivitás is magasabb volt, és betegségük előrehaladottabb stádiumban volt (*Xu, 2009; Rivkina, 2011*). Konoplev és mtsai kimutatták, hogy a magasabb TK1-szint rövidebb túlélést és a diffúz nagy B-sejtes lymphoma (Richter-szindróma) kialakulásának nagyobb kockázatát jelzi (*Konoplev, 2010*).

Az enzim aktivitásának mérésére elsőként rendelkezésre álló módszer ¹²⁵I-dezoxi-uridint alkalmazó radio-immunesszé volt (*Gronowitz, 1980*); később sikerült kompetitív ELISA-t is kifejleszteni, mely már nem igényelte radioaktív izotóp alkalmazását (*Öhrvik 2004*). Wu és mtsai a TK1-koncentrációt (és nem az enzim aktivitását) mérő módszert fejlesztettek ki (*Wu, 2003*). Legújabban Faria és mtsai számoltak be folyadékkromatográfiás-tömegspektrometriás eljárásról (*Faria 2012*). Nisman és mtsai emlőrákban szenvedő betegek mintáit két, kereskedelmi forgalomban elérhető immunesszé segítségével vizsgálták, és noha leírtak eltéréseket a két teszt között, mindkettőt alkalmasnak ítélték a tumor várható kiújulásának előrejelzésére (*Nisman 2013*).

Hallek és mtsai CLL-es betegek vizsgálatával 7,1 U/L-ben állapították meg a TK1 cutoff értékét, amely elkülönítette a várhatóan rövidebb (magas TK1-szint) és hosszabb (alacsony TK1-szint) progressziómentes túlélési idővel rendelkező, a vizsgálat időpontjában Binet A stádiumban lévő betegeket (*Hallek 1999*). A francia-német CLL7 tanulmányban a nagy kockázatú Binet A stádiumú betegeket beazonosító egyik kockázati tényező a 10 U/L feletti TK1-aktivitás volt (*Furman, 2010; Bahlo, 2011*). Magnac és mtsai a TK1-szint és az IGHV mutációs státusz összefüggésének vizsgálatával azt figyelték meg, hogy a 15 U/L feletti TK1-aktivitással rendelkező betegekben a gén általában nem mutálódott (*Magnac, 2003*). 2012-ben Sagatys és Zhang egy részletes összefoglalót publikáltak a CLL prognosztikai markereiről, melyben egy egységes algoritmus kidolgozását javasolták a betegség várható kimenetelének minél pontosabb megítélésére (*Sagatys, 2012*). Molica és mtsai a MD Anderson Rákközpont (MD Anderson Cancer Center, MDACC) és a módosított német CLL pontrendszer összehasonlító elemzését végezték, és azt találták, hogy bármilyen újabb pontozórendszer kidolgozásához ezt a kettőt

kell alapul venni (*Bahlo, 2011; Wierda, 2011; Molica, 2013, Leuk Res*). Egy újabb írásában Molica egy nemzetközi, átfogó CLL prognosztikai index kidolgozását javasolta (*Molica, 2013, Leuk Lymph*).

3. Célkitűzések

A laboratóriumi diagnosztika speciális területein végzett munkánk során célunk az volt, hogy a különböző malignus megbetegedések esetében alkalmazott laboratóriumi vizsgálatok preanalitikai, analitikai és posztanalitikai evaluálásához hozzájáruljunk és megvizsgáljuk, hogy ezen folyamatok hogyan befolyásolják az eredmények interpretációját.

1. Preanalitikai fázis vizsgálata: a kezelés megválasztásának és módosításának alapja ALL során a meghatározott időpontokban vett perifériás vér, csontvelői aspirátum illetve likvor mintában kimutatható blasztok aránya. Ennek áramlási citometriával történő megítéléséhez elengedhetetlenül szükséges a megfelelő minőségű minta. Célunk az volt, hogy meghatározzuk az áramlási citometriai vizsgálatra érkező nem megfelelő minőségű minták arányát, ami megakadályozta, hogy értékelhető eredmény szülessen.
2. Analitikai fázis vizsgálata: disszeminált tumorsejtek detektálása folyadékbiopsziás eljárás során hagyományosan morfológiai/immunhisztokémiai módszerrel történik. Célul tűztük ki, hogy összevessük ezen hagyományos módszer és az áramlási citometriai módszer szenzitivitását, specificitását és diagnosztikai hatékonyságát a szolid tumor sejtek és a neuroblastoma sejtek detektálásában.
3. Posztanalitikai fázis vizsgálata: a timidin kináz enzimaktivitás eredmény helyes értékeléséhez célul tűztük ki életkor-specifikus referencia tartományok megalkotását nagyszámú egészséges egyén mintáját felhasználva. Mivel a CLL elsősorban az idősebb populációt érintő betegség, kíváncsiak voltunk arra, hogy naiv, gyógyszeres terápiát még nem kapott CLL betegek timidin kináz enzimaktivitás értékei hogyan függenek a betegség stádiumától, egyéb laboratóriumi paramétereiktől és található-e olyan cut-off érték, ami a korban és nemből illesztett egészséges populációtól elkülöníti őket.

4. Anyagok és módszerek

A munkánk során felhasznált antitestek, klónok és gyártóik valamint a műszerek és szoftverek az adott tanulmány részletes módszertanánál szerepelnek.

Az ott fel nem sorolt vegyszerek, mintavételi csövek és gyártóik:

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
Paraformaldehid	Sigma, St. Louis, MO

K₃-EDTA-val alvadásgátolt vérvételi cső:

3,0 mL, műanyag cső, referencia szám: 368857, Becton Dickinson and Company, BD Franklin Lakes, NJ, USA

Transfix stabilizátort tartalmazó cső cerebrospinális folyadékhoz:

3,0 mL, műanyag cső, referencia szám: TF-CSF-5-25, Caltag Medsystems, Buckingham, UK

4.1. Preanalitikai fázis: a nem megfelelő minőségű minták felderítésére irányuló tanulmány módszertana

4.1.1. ALL-ben szenvedő gyermekek csontvelői mintáinak vizsgálata

1 csoport: Retrospektív módon, akut limfoblasztos leukémiával 2011 és 2018 között diagnosztizált gyermekek adatait értékeltük. 15. napi csontvelői minta 104 betegről állt rendelkezésre (61 fiú, 43 leány). 23 beteg (20 fiú, 3 lány) T-sejtes ALL-ben (22%), 81 beteg (41 fiú, 40 leány) prekursor B-sejtes ALL-ben szenvedett. A teljes populáció átlagéletkora a mintavétel időpontjában 83 hónap volt (1 és 201 hónap között).

2 csoport: 33. napi csontvelői minta 90 betegről (50 fiú, 40 leány) állt rendelkezésre. 13 minta (14%) T-ALL-es betegektől (11 fiú, 2 lány), 77 minta (86%) prekursor B-sejtes ALL-es betegektől (39 fiú, 38 leány). Az átlagéletkor ebben a csoportban is 83 hónap volt (2 és 202 hónap között).

4.1.2. ALL-ben szenvedő gyermekek likvor mintáinak vizsgálata

A fenti időszakban 20 ALL-es gyermektől összesen 26 likvorminta áramlási citometriai vizsgálata történt. A betegek átlagéletkora 75 hónap volt (7 és 214 hónap között). Tizenkét beteg fiú (60%), nyolc beteg leány (40%) volt. Egy betegnek volt T-ALL-je (5%), a többieknek prekursor B-sejtes ALL-je (95%). Egynél több mintát öt betegtől küldtek, három minta érkezett a T-ALL-es betegtől, és további négy betegtől két-két minta.

4.1.3. Natív és stabilizátort tartalmazó mintavételi csőbe vett likvor minták összehasonlítása

Negyvenhét beteg (gyermekek és felnőttek vegyesen) összesen 51 likvormintáját értékeltük, összevetve az élő sejtek arányát natív és stabilizátort (TransFix®; Ref. No. TF-CSF-5-25, Caltag Medsystems, Buckingham, UK) tartalmazó mintákban. A betegek közül 19 nő/leány (40%), 28 férfi/fiú (60%) volt. Az átlagéletkor 43 év volt (10 hónap és 79 év között). Huszonkilenc stabilizált és huszonkét natív mintát vizsgáltunk.

4.1.4 Áramlási citometriai vizsgálatok

Az áramlási citometriai mérések nyolcszínű jelöléssel FACSCanto II áramlási citométeren történtek, az adatokat FACSDiva 8.0.2 szoftverrel értékeltük (mindkettő gyártója: Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA). A 2013 márciusa előtt érkezett prekursor B-sejtes ALL-es és a 2013 szeptembere előtt érkezett T-ALL-es gyermekek mintáit négszínű pannellel, minden további mintát nyolcszínű pannellel vizsgáltunk. A jelölés menete a korábban leírtaknak megfelelő volt (*Simon, 2012*). Az alkalmazott antitesteket, klónokat és gyártókat az **1. táblázat** foglalja össze. A likvormintákat is ezek alapján a panelek alapján jelöltük, azonban a legtöbb esetben a kevés mintamennyiség miatt a teljes panelt nem tudtuk alkalmazni. Az eredmények összehasonlíthatósága érdekében az áramlási citométert naponta kalibráltuk a gyártó által ajánlott Cytometer Setup and Tracking fluoreszcens mikrogönggyökkel (Cat No. 641319, Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA), az Autocomp szoftver segítségével.

A

	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	APC
1. cső	CD20 (L27) ¹	CD10 (SS2/36) ³	CD34 (8G12) ¹	CD19 (SJ25C1) ¹
2. cső	CD20+CD10 (L27+SS2/36) ^{1,3}	CD38 (HB7) ¹	CD45 (2D1) ¹	CD19 (SJ25C1) ¹
3. cső	CD58 (AICD58) ²	CD10 (SS2/36) ³	CD45 (2D1) ¹	CD19 (SJ25C1) ¹
4. cső	cyFXIII	CD10 (SS2/36) ³	CD45 (2D1) ¹	CD19 (SJ25C1) ¹
5. cső	syto16 ⁷	CD10 (SS2/36) ³	CD45 (2D1) ¹	CD19 (SJ25C1) ¹

B

	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	Pac.Blue	Pac.Orange
1. cső	CD58 (AICD58) ²	CD123 (SSDCLY107D2) ²	CD33 (D3HL60.251) ²	CD19 (J3-119) ²	CD10 (HI10a) ¹	CD81 (JS-81) ¹	syto40 ⁷	CD45 (HI30) ⁵
2. cső	syto16 ⁷	CD66c (KOR-SA3544) ²	CD34 (8G12) ¹	CD19 (J3-119) ²	CD10 (HI10a) ¹	CD38 (HB7) ¹	CD20 (2H7) ⁴	CD45 (HI30) ⁵
3. cső	cyFXIII	CD10 (SS2/36) ³	CD45 (2D1) ¹		CD19 (SJ25C1) ¹			

C

	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	APC
1. cső	syto16	CD7 (8H8.1) ²	CD45 (2D1) ¹	CD3 (SK7) ¹
2. cső	CD4 (SK3) ¹	CD8 (SK1) ¹	CD45 (2D1) ¹	CD3 (SK7) ¹
3. cső	CD99 (DN16) ⁶	CD7 (8H8.1) ²	CD5 (L17F12) ¹	CD3 (SK7) ¹
4. cső	nTdT (HT6) ³	CD7 (8H8.1) ²	CD3 (SK7) ¹	cyCD3 (SK7) ¹

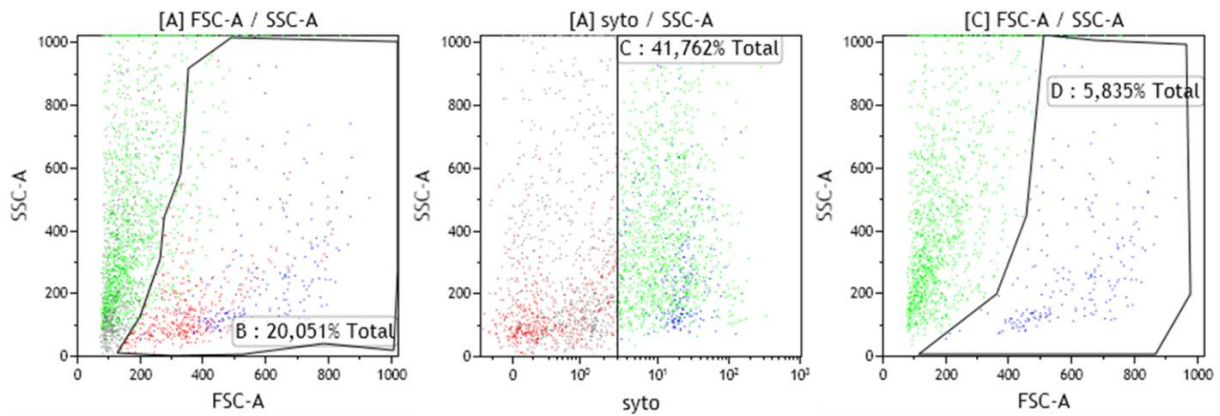
D

	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	Pac.Blue	Pac.Orange
1. cső	syto16 ⁷	CD99 (3B2-TA8) ⁵	CD3 (SK7) ¹	CD7 (8H8.1) ²	CD1a (HI149) ¹	CD8 (SK1) ¹	CD4 (RPA-T4) ¹	CD45 (HI30) ⁵
2. cső	nTdT (HT6) ³	CD99 (3B2-TA8) ⁵	CD5 (L17F12) ¹	CD7 (8H8.1) ²	cyCD3 (SK7) ¹	CD3 (SK7) ¹	syto40 ⁷	CD45 (HI30) ⁵

1. táblázat: Antitest-panelek és klónok a gyermekek 15. és 33. napi mintáinak vizsgálatához

A: Négyszínű BCP-ALL panel MRD detektálására; **B:** Nyolcszínű BCP-ALL panel MRD detektálására. 2017 szeptemberétől a CD123 átkerült a 2. csőbe (mint CD66c+CD123 az FL2 csatornán), az 1. csőben a helyére a CD73+CD304 került (klónok: ad2 ill. 12C2; mindkettőt a SONY Biotechnology (San José, CA, USA) gyártja); **C:** Négyszínű T-ALL panel; **D:** Nyolcszínű T-ALL panel. A fluorokrómokot lásd a *Rövidítések jegyzékében*. Gyártók: 1: Becton-Dickinson Pharmingen, San José, CA, USA; 2: Beckmann-Coulter, Brea, CA, USA; 3: Dako, Glostrup, DK; 4: BioLegend, San Diego, CA, USA; 5: ExBio, Prága, CZ; 6: AbDSerotec, Raleigh, NC, USA; 7: Molecular Probes, Eugene, OR, USA. A cyFXIII-A antitest házilag készült (Katona, 2001).

A csontvelői mintákban az élő sejtek arányát syto-festéssel határoztuk meg, ezt megelőzően minden mintából kizártuk a duplikátumokat. Azokat a csontvelői mintákat, melyekben az erythroid prekursorok aránya nem érte el a 2%-ot, az ALL-IC BFM 2009 szabályrendszere szerint perifériás vérrel szennyezettnek tekintettük (Dworzak, 2009; Radu, 2020). A likvormintákban vagy syto- és FSC/SSC szekvenciális kapuzással (**3. ábra**), vagy, syto-festés hiányában a fényszórási tulajdonságok alapján határoztuk meg az élő sejtek arányát. A 30%-nál kevesebb élő sejtet tartalmazó likvormintákat értékelésre alkalmatlannak minősítettük. Perifériás vérrel történt szennyezettséget abban az esetben állapítottunk meg, ha a likvormintában mikroliterenként 100-nál több vörösvértest fordult elő.



3. ábra: Likvorminta szekvenciális syto+FSC/SSC kapuzási stratégiája az élő sejtek törmeléktől történő elkülönítésére

A fényszórási tulajdonságokra és a syto-expresszióra külön-külön kapuzva az élő sejtek minősülő események aránya jelentősen különbözött. A legpontosabb eredményt a szekvenciális kapuzás segítségével tudtuk elérni.

4.2. Analitikai fázis: disszeminált tumorsejtek kimutatására irányuló tanulmány módszertana

Retrospektív analízis keretében összesen 72 mintát vizsgáltunk, ezek közül 63 csontvelő, 6 likvor, 2 bronchoalveolaris mosófolyadék és 1 perifériás vér volt, 50 különböző betegtől. Immunhisztokémiai vizsgálati eredmény 48 esetben állt rendelkezésre. A populációt két alcsoportra osztottuk: az első csoportba 34, különféle igazolt vagy gyanított szolid tumoros betegségben szenvedő beteg (16 gyermek, 18 felnőtt) 36 mintája került, míg a másik csoportba 16, igazoltan vagy gyanítottan neuroblastomás gyermek 36, diagnózis céljából vagy az utánkövetés során vett mintája szerepelt.

4.2.1. Szolid tumor gyanúval vagy igazolt betegséggel bíró csoport

A csoport 13 betegénél (3 gyermek, 10 felnőtt) nem igazolódott tumoros betegség, 21 főnél (13 gyermek, 8 felnőtt) azonban igen. A betegek klinikai adatait a 2. táblázat foglalja össze. Az igazoltan tumoros alcsoportban 13 beteg férfi/fiú (8 felnőtt, 5 gyermek), 8 leány (mind gyermek) volt. 2015 novemberében a csoport 25 betege (11 gyermek, 14 felnőtt) életben volt, 9 (5 gyermek, 4 felnőtt) már elhunyt. A gyermekek átlagéletkora 9 év (3 hónap és 15 év között), a felnőtteké 58 év (21 és 94 év között) volt.

Sorszám	Nem	Életkor (év)	Tumor típusa
1	férfi	4 hónap †	<u>histiocytosis</u>
2	nő	2,5 †	atípusos <u>teratoid/rhabdoid tumor</u>
3	nő	4	<u>érett teratoma</u>
4	nő	8 †	<u>choroid plexus carcinoma</u>
5	nő	12	<u>histiocytosis</u>
6	nő	13	<u>Wilms-tumor</u>
7	férfi	14	<u>pilocytás astrocytoma (Grade 1)</u>
8	férfi	14	<u>Ewing-sarcoma</u>
9	férfi	17 †	<u>synovialis sarcoma</u>
10	nő	17	primitív <u>neuroektodermális tumor</u>
11	férfi	17 †	<u>világossejtes veserák</u>
12	nő	18	<u>chondrosarcoma</u>
13	nő	19	<u>Wilms-tumor</u>
14	férfi	23	<u>Hodgkin-kór</u>
15	férfi	46 †	<u>follicularis lymphoma</u>
16	férfi	49	tüdőrák
17	férfi	57 †	gyomorrák
18	férfi	60 †	tüdőrák
19	férfi	60	<u>histiocytosis</u>
20	férfi	90	prosztatárák
21	férfi	94 †	prosztatárák

2. táblázat: A szolid tumoros betegek klinikai adatai

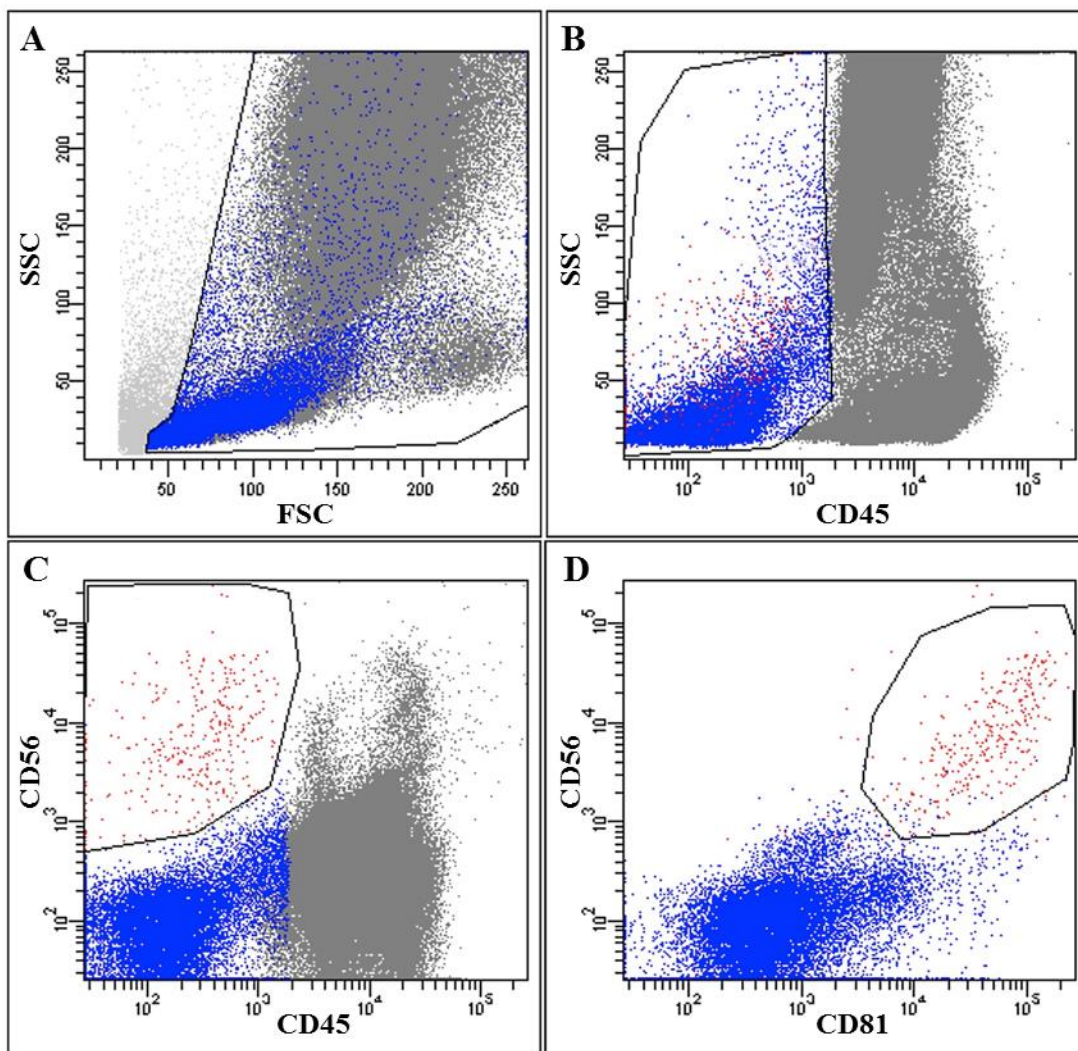
A legfiatalabb beteg 4 hónapos, a legidősebb 94 éves volt. † elhunyt.

4.2.2. Neuroblastoma gyanúval vagy igazolt betegséggel bíró csoport

A 16 neuroblastomás beteg közül 13 fiú, 3 leány volt, átlagéletkoruk a diagnózis időpontjában 27,4 hónap (2 és 83 hónap között). 2015 novemberében 6 beteg volt életben, 9 már elhunyt, 1 beteg sorsa nem ismert. Az elhunytak a diagnózis időpontjában már mind idősebbek voltak 12 hónapnál.

4.2.3. Áramlási citometriai vizsgálatok

A többszínű áramlási citometriai (multicolor flow cytometry = MFC) vizsgálatokban a perifériás vér és a csontvelői minták felszíni jelölése standard protokoll szerint történt: 50 µL perifériás vért/csontvelőt inkubáltunk különféle sejtfelszíni epitópokat felismerő, telítési koncentrációban jelen lévő, fluoreszcens festékkel direkt jelölt antitestekkel 15 percig sötétben, szobahőn; a mintában a sejtszámot foszfátpufferelt sóoldattal (PBS) $10 \times 10^9/L$ -re állítottuk be. A nem hemopoietikus tumorsejtes panelben az alábbi antitestek szerepeltek: CD7-FITC (4H9 klón), EpCAM-PE (EBA-1 klón), CD45-PerCP (2D1 klón; mindhárom antitest gyártója: Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA), és CD33-APC (D3HL60-251 klón; Immunotech - Beckman Coulter, Marseille, France), míg a neuroblastoma panelben 4 színű kombinációban a következők: CD81-FITC (JS-81 klón; Becton Dickinson Pharmingen, San Diego, CA, USA), CD117-PE (104D2 klón; Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA), CD45-PerCP (2D1 klón; Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA), és CD56-APC (N901 (NKH-1) klón; Immunotech - Beckman Coulter, Marseille, France). Ha Ewing-sarcoma vagy histiocytosis gyanúja merült fel, hozzátettük még az alábbiakat: CD99-FITC (TÜ12 klón; Becton Dickinson Pharmingen, San Diego, CA, USA) illetve CD1a-APC (HI149 klón; Becton Dickinson Pharmingen, San Diego, CA, USA). Néhány esetben az erythroid prekurzorok jobb azonosíthatósága érdekében a CD71-FITC (L01.1 klón; Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA) használatára is sor került. A vörösvértesteket FACS lizáló oldattal (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA) lizáltuk, majd a mintákat PBS-sel mostuk (300g, 5 perc) és 1% paraformaldehidet tartalmazó PBS-ben reszuszpendáltuk. Az így fixált mintákat 4°C-on tároltuk, legfeljebb 24 óráig. A mérések FACSCalibur vagy FACSCanto II (mindkét műszer gyártója: Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA) áramlási citométeren történtek, ugyanazokat a beállításokat használva minden vizsgált mintára. De novo minták esetében 100 000, utánkövetési (minimális reziduális betegség keresése) mintákból 300 000 sejt begyűjtése történt, a mérési adatokat list-mode adatfájlokban tároltuk. Az adatok elemzését FACSDiva szoftverrel (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA) végeztük. A neuroblastoma sejtek CD45 negatív, CD56 pozitív, CD81 pozitív és ritkán CD117 pozitív immunfenotípussal jellemezhetőek. Minimális reziduális betegség (MRD) keresése során az alábbi kapuzási stratégiát alkalmaztuk: első lépésben a fényszórási tulajdonságok (előre szórt fény/oldalra szórt fény) alapján elkülönítettük az élő sejteket a törmeléktől (**4A ábra**), majd a CD45 negatív régióból a CD56/CD81 pozitív sejtek voltak a reziduális neuroblastomasejtek (**4B-D ábra**).



4. ábra: A neuroblastoma-sejtek detektálására szolgáló kapuzási stratégia utánkövetési mintákban

A neuroblastoma-sejtek CD45 negatív, CD56 pozitív, CD81 pozitív és ritkán CD117 pozitív sejtek. Minimális reziduális betegség keresésére 300 000 eseményt gyűjtöttünk be, és szekvenciális kapuzást alkalmaztunk (A-D). Az első kapuban az élő sejtek (A), az élő sejtekből a CD45 negatív régió (B), a CD45 negatív régióból a CD56 pozitív események (C), majd ebből a CD81 pozitív események adják a neuroblastoma-sejtekre jellemző immunfenotípust (D). FSC: forward scattered light (előre szórt fény); SSC: side scattered light (oldalra szórt fény).

4.2.4. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatok során a csontvelőbiopsziás mintákat 4%-os foszfátpufferelt formaldehidben fixáltuk 24 órán keresztül, majd 1%-os EDTA-val dekalciáltuk 48 órán át. A szövetfeldolgozás és paraffinba ágyazás után 4 mikron vastagságú metszeteket készítettünk. Bond-Max készülék (Leica Microsystems, GmbH, Germany) és a hozzá tartozó Bond Polymer Refine Detection kit (DS9800; Germany) alkalmazásával a metszeteket

CD56 (NCL-L-CD56-1B6, egér monoklonális; Novocastra, Nussloch, Germany), CD99 (M3601, egér monoklonális; Dako, Glostrup, Denmark), chromogranin A (M0869, egér monoklonális; Dako, Glostrup, Denmark) és S-100 (Z0311, nyúl poliklonális; Dako, Glostrup, Denmark) jelölésekkel festettük. A metszeteket ezt követően fénymikroszkóppal (Leica DM2500 mikroszkóp, DFC 420 kamera és Leica Application Suite V3 szoftver; Leica, Wetzlar, Németország) vizsgáltuk.

A csontvelői aspirátumból készített keneteket formalinban utófixáltuk 10 percre, majd pufferes mosást (Ventana Reaction Buffer) követően nedves betöltéssel indítottuk VENTANA BenchMark ULTRA (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) immunfestő automatán. Az antigén feltárás ULTRA Cell Conditioning 1 Buffer-ben (pH 8,5), 95 °C-on 20 percre tartott. A chromogranin A ellenes antitest (a biopsziás minták esetében is használt M0869, egér monoklonális; Dako, Glostrup, Denmark) inkubálási ideje 30 perc, a detektálás UltraView Universal DAB Detection Kit-tel történt. Ezt követte a felülfestés haematoxillinban és kékítés szintén automatizált módon, majd víztelenítés, derítés után fedés.

4.2.5. Szenzitivitás, specificitás, diagnosztikai hatékonyság

Miután a mintákat besoroltuk a valódi pozitív (VP), valódi negatív (VN), álpozitív (ÁP) és álnegatív (ÁN) kategóriákba, kiszámítottuk az egyes módszerek szenzitivitását, specificitását és diagnosztikai hatékonyságát az alábbi képletek alapján:

$$\text{Szenzitivitás: } VP/(VP+ÁN) \times 100$$

$$\text{Specificitás: } VN/(VN+ÁP) \times 100$$

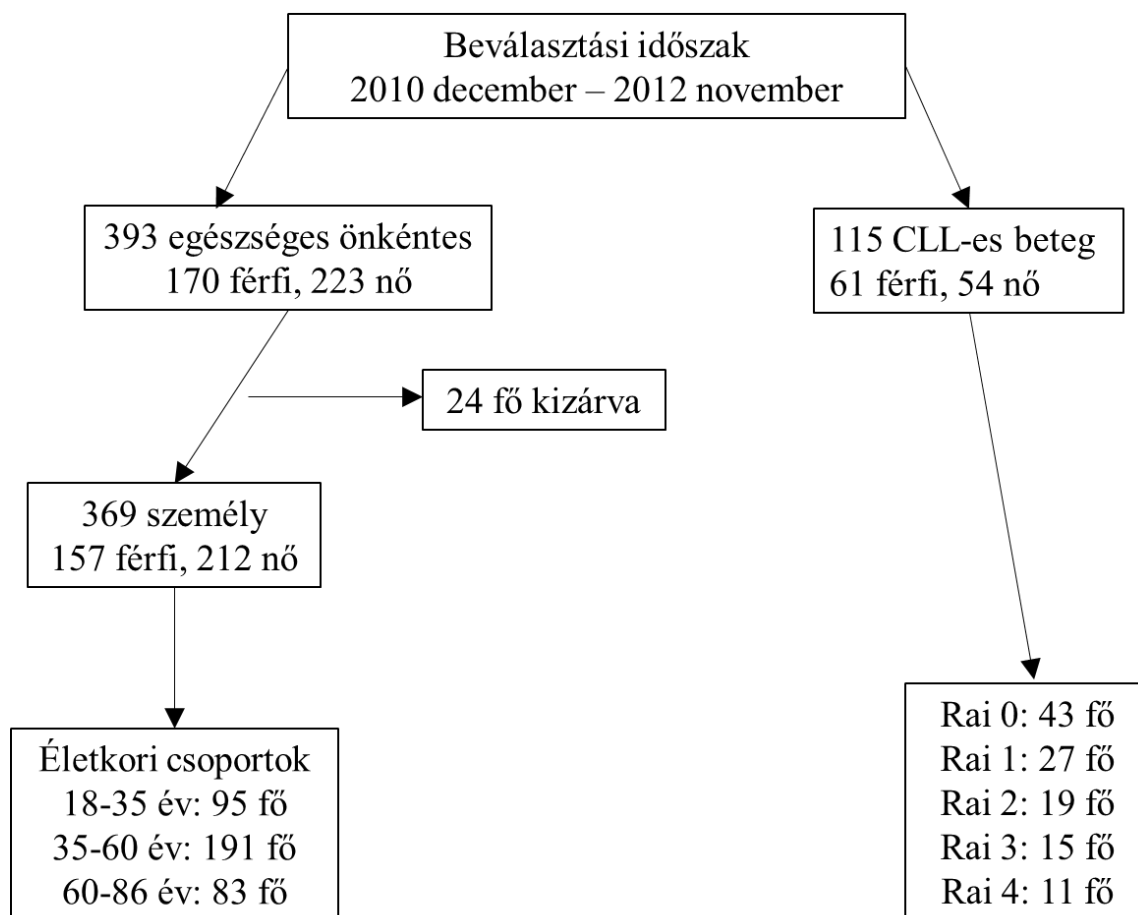
$$\text{Diagnosztikai hatékonyság: } (VP+VN)/(\text{Összes eset}) \times 100$$

4.3. Posztanalitikai fázis: a szérum timidin-kináz enzim életkor-specifikus referencia-tartományainak meghatározására, valamint CLL betegcsoporton történő validálására szolgáló tanulmány módszertana

4.3.1. Egészséges populáció a referencia tartományok meghatározásához

Háromszázhatvankilenc egészséges önkéntes szérummintáját vizsgáltuk. A vizsgálatba bevont személyek véradók és a Laboratóriumi Medicina Intézet dolgozói közül kerültek ki. Életkoruk 18 és 86 év között volt (medián: 45 év), nemi megoszlás szerint 157 férfi és 212 nő. Beválasztási kritériumként a vizsgált laboratóriumi paraméterek egyikükénél sem haladhatták meg a referencia-tartomány felső határának kétszeresét. A vizsgálatban nem vehetett részt olyan

személy, akinek tumoros, anyagsere- vagy krónikus gyulladáshoz vezető betegsége volt. A statisztikai elemzésből 24 egyén adatait kizártuk, mivel a kiválasztási kritériumok teljesülése nem volt egyértelműen megállapítható. Az életkor befolyásoló szerepének vizsgálatához a populációt három alcsoportra osztottuk: 18-35 év közöttiek (fiatalok), 35-60 év közöttiek (középkorúak) és 60 év feletti (idősek). (5. ábra)



5. ábra. A vizsgálatba bevont egészséges és CLL-es populáció jellemzői

4.3.2. CLL populáció a módszer validálásához

Keresztmetszeti, korban és nemből illesztett eset-kontroll tanulmány keretében a 2010 decembere és 2012 novembere között megjelent CLL-es betegeket vizsgáltuk (115 fő). Az átlagéletkor a beteg- és a kontrollcsoportban is 65,6 év volt (46 és 86 év között), a férfi:nő arány megközelítőleg 1:1 (61:54). A Rai stádiumbesorolás szerint 43 beteg volt Rai 0, 27 beteg Rai 1, 19 beteg Rai 2, 15 Rai 3 és 11 Rai 4 stádiumban (5. ábra). A betegcsoportban 29 beteg a fent megállapított középkorú, 86 az idős korcsoportba tartozott.

4.3.3. Laboratóriumi módszerek

4.3.3.1. Timidin kináz aktivitás mérése

A TK1-aktivitást indirekt, módosított, kétlépéses kompetitív kemilumineszcens immunoasszé segítségével mértük Liaison immunkémiai analizátoron (DiaSorin S.p.A., Saluggia, Olaszország). A kalibrációs görbét matematikailag a gyártó határozza meg (mestergörbe), mely tartalmazza a patológiás értékeket is. Minőségellenőrzés céljából a reagenskészletben két QC (quality control) minta található, egy magas és egy alacsony értékű. A mérési teljesítmény értékelésére a pontosságot és a precizitást az alacsony (QC1) és a magas (QC2) értékű kontrollminták mérésével határoztuk meg. A precizitást a variációs koefficienssel (CV) jellemeztük, a pontosságot mint százalékos eltérést a névértéktől. A sorozaton belüli pontosság és precizitás értékeléséhez a QC1 és QC2 mintákat egymás után kilencszer mértük le, a sorozatok közötti pontosság és precizitás értékeléséhez 18 különböző napon. Az eredményeket a várt és a mért értékek közötti lineáris regresszióként értékeltük. A mérés linearitását egy igen magas TK1-aktivitással rendelkező beteg mintájának sorozatos hígításával határoztuk meg.

4.3.3.2. CD38 és Zap-70 expresszió vizsgálata áramlási citometriai analízissel

A mintákból a fehérvérsejtszámot Advia 120 hematológiai automatával határoztuk meg (Siemens AG, Erlangen, Németország). Az abszolút B-sejtszámot a CD19+ sejtek százalékos aránya és a fehérvérsejtszám alapján számítottuk. Az áramlási citometriai mérések FACSCanto II áramlási citométeren történtek, a mérési eredményeket FACSDiva szoftver segítségével értékeltük (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA). Az alkalmazott antitestek: CD19-PE-Cy7 (J3-119 klón, Beckman-Coulter, Brea, CA, USA); CD38-APC (HB7 klón, Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA) és Zap70 (jelöletlen, 2F3.2 klón, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA). A beteget abban az esetben minősítettük CD38 és/vagy Zap70 pozitívnak, ha a CLL sejtek legalább 20%-a expresszálta ezeket a markereket.

4.3.3.3. FISH vizsgálat

Az interfázisú fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) vizsgálatok perifériás vérből származó sejtuszpenzióon történtek, standard protokoll szerint. A sejteket vagy 72 órás, 12-O-tetra-dekanoil-forbol-13-acetátot (TPA; Sigma-Aldrich, München, Németország) tartalmazó

médiumban történt tenyésztést követően, vagy nem tenyésztett perifériás vérből történt közvetlen feldolgozást követően vizsgáltuk. A FISH vizsgálatához használt próbák a következők voltak: LSI Rb1(13q14)/13q34; LSI p53; LSI ATM (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, USA). A sejteket 4,6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI) jelöltük. Minden próbát legalább 200 interfázisú sejten vizsgáltunk minden betegnél. A képeket Zeiss Axioplan2 fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss, Zaventem, Belgium) készítettük, és ISIS szoftver (MetaSystems, Altlußheim, Németország) segítségével elemeztük.

4.3.4. Statisztikai analízis

Az adatok eloszlásának ellenőrzésére a Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztuk. A legtöbb esetben az adatok nem normál eloszlást mutattak, így a statisztikai analízishez a Mann-Whitney U tesztet használtuk. A korrelációs analízishez a Spearman-rho értéket számítottuk ki. Statisztikailag szignifikánsnak a $<0,05$ p értékkel rendelkező különbségeket minősítettük. Valamennyi statisztikai elemzést, a ROC görbék (receiver operating characteristics) megrajzolását és a görbe alatti terület (area under the curve, AUC) kiszámítását is, SPSS 19.0 statisztikai szoftver segítségével végeztük (IBM Corps., Armonk, NY, USA).

5. Eredmények

5.1. Preanalitikai fázis: a nem megfelelő minőségű minták felderítésére irányuló tanulmány eredményei

5.1.1. ALL-ben szenvedő gyermekek csontvelői mintáinak eredményei

1 csoport

A száznégy 15. napi csontvelői mintából tizenhatnál (15%) igazoltunk perifériás vérrel történt szennyeződést (81 B-sejtes ALL-ből 12-nél, 23 T-sejtes ALL-ből 4-nél). A B-sejtes ALL-es minták esetében a kontaminált mintákban talált reziduális blasztarány minden esetben a Flow High Risk határérték (10%) alatt volt, így a minták áramlási citometriai kockázatbesorolásra nem voltak alkalmasak. A négy T-ALL-es kontaminált minta közül három esetben a reziduális blasztarány 10% felett volt, így ezeket a betegeket a perifériás vérrel történt szennyeződés ellenére is be lehetett sorolni a Flow High Risk csoportba. Összesen tizenhárom 15. napi csontvelői minta nem volt alkalmas kockázatbecslésre a vizsgált 104 közül (12,5%), perifériás vérrel történt kontamináció miatt.

2 csoport

A vizsgált kilencven 33. napi csontvelői mintából 13 (14%) bizonyult perifériás vérrel szennyezettnek (tizenegy B-sejtes ALL-es minta az összesen 77-ből, két T-sejtes ALL-es minta 13-ból). Mindegyik kontaminált mintában 10% alatt volt a reziduális blastok aránya, így az ALL-IC 2009 szabályrendszere szerint ezek mind elégtelen minőségűek voltak MRD eredmény kiadására.

5.1.2. ALL-ben szenvedő gyermekek likvor mintáinak eredményei

A 26 mintából 22 esetben állt rendelkezésre VVT-szám is. Ennek a csoportnak az eredményeit részletesen a **3. táblázat** mutatja be.

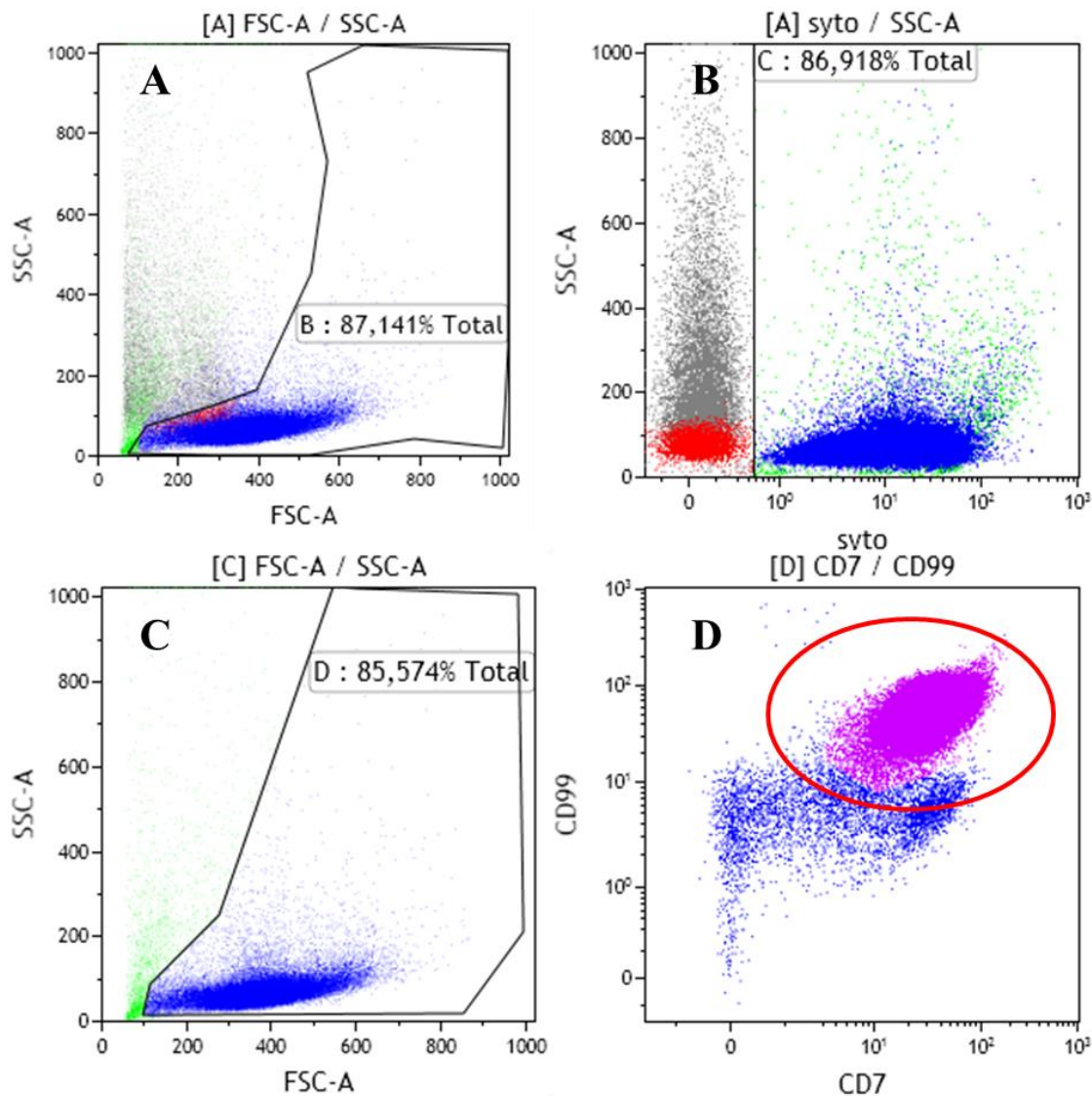
Minta sorszáma	Élő sejtek aránya <30%	PV kontamináció	Patológiás sejtek	Begyűjtött sejtek száma	FVS/ μ L	VVT/ μ L
1	+			1840	1	92
2	+			5612	2	1
3	+			10 000	2	11
4	+			2024	4	N/A
5	+			2029	5	1
6	+			3496	6	1
7	+	+		100 000	7	2560
8	+		+	2576	4	N/A
9	+		+	4094	5	5
10	+		+	9246	8	8
11	+	+	+	3887	9	1280
12	+	+	+	13 961	80	123
13	+	+	+	76 245	336	24 533
14	+	+	+	2576	40	8533
15		+	+	300 000	679	1133
16		+	+	300 000	12 800	107
17		+	+	130 893	679	683
18		+	+	3082	140	90 453
19		+		3703	23	160
20				100 000	623	N/A
21				17 710	179	N/A
22				5750	180	80
23				2208	44	67
24			+	137 356	720	5
25			+	2415	41	32
26			+	2737	11	61

3. táblázat: ALL-ben szenvedő gyermekek likvor mintáinak eredményei

A 24., 25. és 26. minta T-ALL-ben szenvedő betegből, a többi minta BCP-ALL-ben szenvedő betegekből származott. N/A: nincs adat.

Mikroliterenként 100 VVT jelenlétét tekintve a perifériás vérrel történt kontamináció határértékének, a 22 mintából 10 (45%) volt szennyezett. A tizenegy mintánál (1-11. minta) tapasztalt alacsony (mikroliterenként 10 alatti) fehérvérsejtszám ellenére az áramlási citométer ezekből is több ezer (1840 – 100 000) eseményt gyűjtött be, jóllehet valamennyi kis sejtszámú mintában az élő sejtek aránya 30% alatt volt. Négy ilyen alacsony sejtszámú mintában találtunk blasztokat (8-11. minta), ezek közül egy volt perifériás vérrel szennyezett (11. minta). Összesen a 26 mintából 14-ben találtunk malignus sejteket, ezek közül 8 (57%) volt perifériás vérrel szennyezett. A **6. ábrán** egy jól értékelhető, perifériás vérrel nem kontaminált minta felhőképei

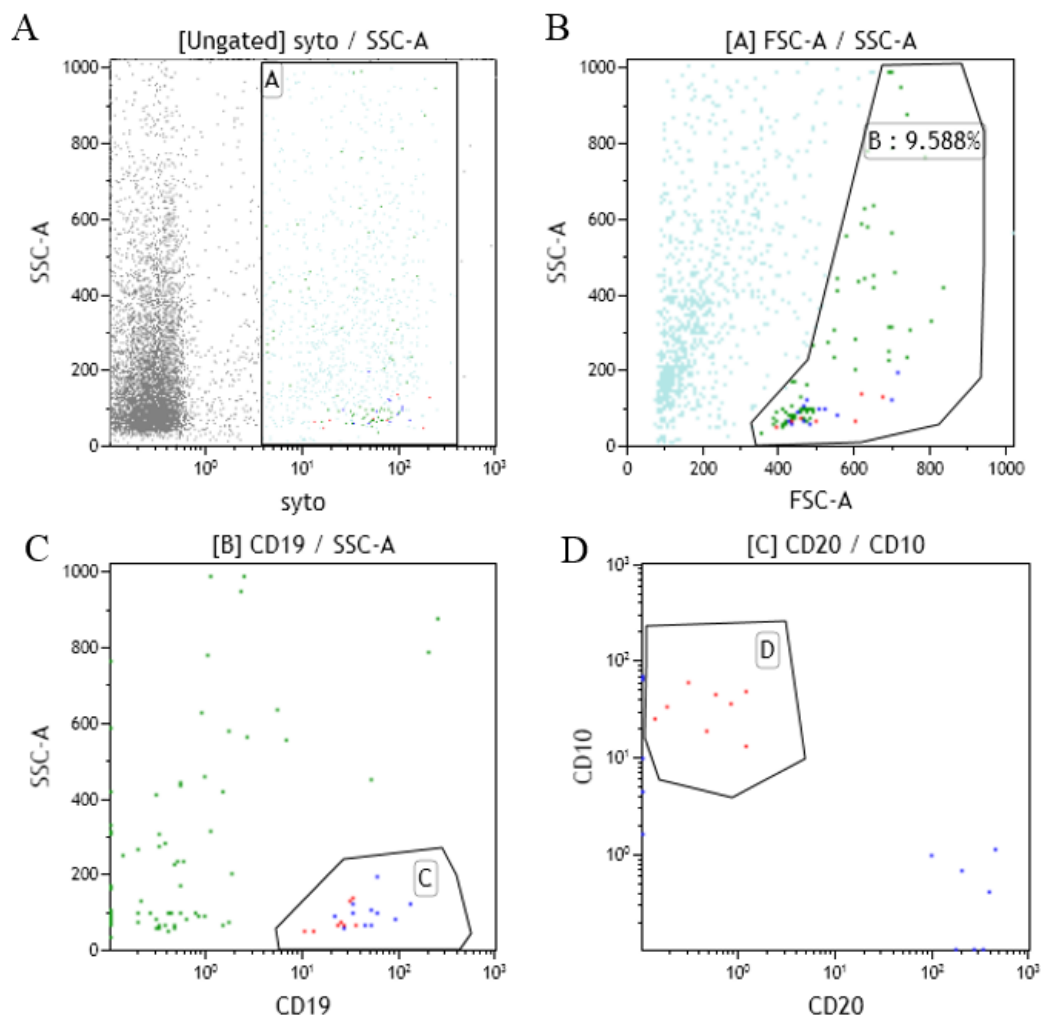
láthatók; a T-sejtes ALL-ben szenvedő beteg kóros sejtjei élénk CD99 és CD7 expresszióval rendelkeznek.



6. ábra: T-ALL-ben szenvedő beteg jól értékelhető likvormintájának analízise

A szekvenciális kapuzás alapján az élő sejtek aránya az összes begyűjtött eseményre vetítve 85,6% volt (C), ebben az esetben ettől nem tért el jelentősen sem a csak a fényszórási tulajdonságok (A), sem a csak a syto-expresszió alapján (B) kapott arány. Az élő sejtek 96%-a élénk CD99/CD7 expresszióval rendelkező, patológiás T-lymphoblast volt (D, lila színnel).

A 26 likvormintából 14-ben (54%) az élő sejtek aránya nem érte el a 30%-ot. Ezek közül 7-ben volt kimutatható patológiás sejt (50%), melyek közül 4 mintában (8-11. minta) az alacsony élő sejtarány mellett is detektálhatók voltak malignus sejtek (7. ábra). Akkor tekintettük pozitívnak a likvormintát, ha a patológiás sejtre jellemző, hasonló tulajdonságokkal rendelkező 10 sejtet találtunk.



7. ábra: BCP-ALL-ben szenvedő beteg kis sejtszámú, nehezen értékelhető likvormintája

A likvorban a fehérvérsejtszám 9/ μ L, az élő sejtek aránya 30% alatt volt (A,B), de jól differenciálható volt a CD19+ B sejteken (C; késsel) belül a CD20-/CD10+ malignus sejtpopuláció (D; pirossal).

5.1.3. Natív és stabilizátort tartalmazó mintavételi csőbe vett likvor minták összehasonlításának eredményei

A 22 natív minta közül 9 (41%) esetében kaptunk 30% alatti élő sejtarányt, a stabilizátort tartalmazó 29 minta közül 5-nél (17%). A különbség a Fischer-féle egzakt teszt alapján szignifikáns ($p=0,05$). Perifériás vérrel történt kontamináció (mikroliterenként több mint 100 VVT jelenléte) a natív csoportban 36%-ban (22 mintából 8), a stabilizátort tartalmazó csoportban 14%-ban (29 mintából 4) fordult elő.

5.2. Analitikai fázis: disszeminált tumorsejtek kimutatására irányuló tanulmány eredményei

5.2.1. Szolid tumor gyanúval vagy igazolt betegséggel bíró csoport eredményei

Harmincnégy beteg összesen 36 (27 csontvelő, 6 likvor, 2 bronchoalveolaris mosófoliadék, 1 perifériás vér) mintáját vizsgáltuk áramlási citometriával, szolid tumor klinikai gyanúja vagy transzfúzió-dependens anémia miatt. Nyolc szolid tumoros esetben találtunk disszeminált tumorsejteket: CD45-/EpCAM+ karcinómasejteket négy, CD45-/CD99+ Ewing-sarcoma sejteket egy, CD45-/CD99+/CD117+ PNET (primitive neuroectodermal tumor) sejteket egy és CD45-/CD1a+, Langerhans-sejtes histiocytosisra jellemző sejteket két esetben mutatunk ki. A további 13, igazoltan szolid tumoros betegnél csontvelői infiltráció nem volt kimutatható. Tizennégy beteg esetében immunhisztokémiai vizsgálati eredmény nem állt rendelkezésre. Az áramlási citometriai (MFC) és az immunhisztokémiai (IHC) vizsgálati eredményeket összevetve húsz (91%) konkordáns (6 pozitív és 14 negatív) és 2 diszkordáns esetet találtunk ebben a betegcsoportban.

5.2.2. Neuroblastoma gyanúval vagy igazolt betegséggel bíró csoport eredményei

Harminchat csontvelői mintát vizsgáltunk áramlási citometriával neuroblastoma gyanúja miatt diagnosztikus, vagy igazolt betegség esetén utánkövetési céllal, 16 gyermektől. Huszonhat mintán történt immunhisztokémiai vizsgálat. Az eredmények 17 esetben konkordánsak (13 pozitív, 4 negatív), 9 esetben diszkordánsak voltak. A diszkordáns minták közül kettő volt MFC-/IHC+, mintkettő ugyanattól a betegől származott. A hét MFC+/IHC- diszkordáns minta hat különböző betegől származott; ezek a minták utánkövetési minták voltak, a tumorsejtek aránya 1% alatti volt.

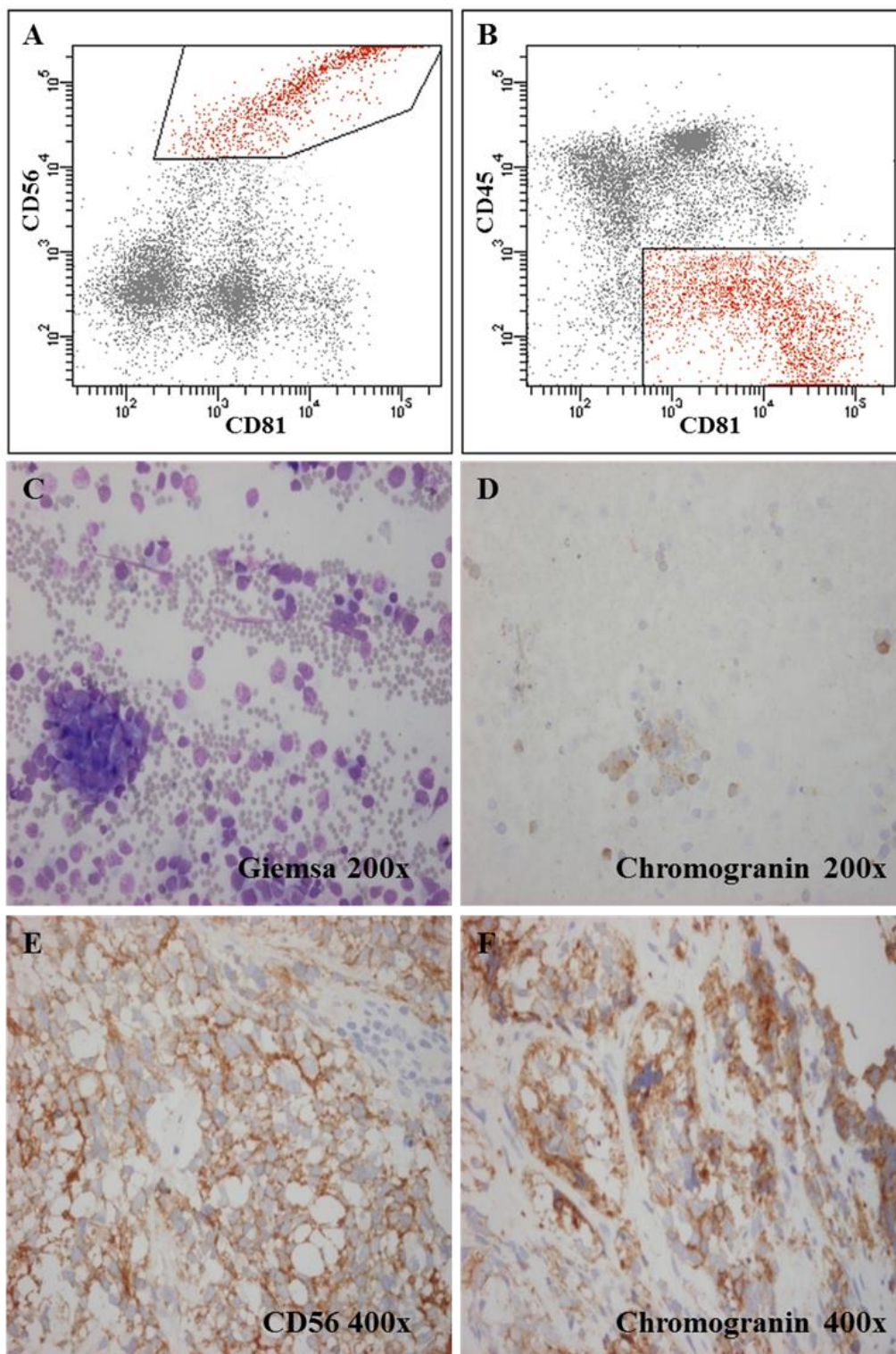
A neuroblastoma-csoportban 65%-os volt a konkordancia az áramlási citometria és az immunhisztokémia között (26 esetből 17). Összesítésben a konkordancia a két módszer között 77%-os volt (48 esetből 37). A konkordancia és a diszkordancia alapján különböző mintázatok találtunk.

5.2.3. Konkordáns és diszkordáns mintázatok

1. mintázat: MFC-pozitív/IHC-pozitív konkordáns eredmények

A szolid tumoros csoportban hat, a neuroblastoma-csoportban tizenhárom pozitív konkordáns mintát találtunk, noha a malignus sejtek aránya több esetben jelentősen eltért a kétféle

módszerrel. Egy *de novo* neuroblastomás minta felhőképei és fénymikroszkópos felvételei láthatók a **8. ábrán**. A csontvelői aspirátumot leukémia kizárására küldték áramlási citometriai vizsgálatra. Leukémia valóban nem igazolódott, de 30%-nyi CD45-/CD56+/CD81+ neuroblastoma-sejtet mutattunk ki. (**8A** és **8B** ábra). Giemsa- (**8C** ábra) és chromogranin-festéssel (**8D** ábra) szintén láthatók voltak a neuroblastoma-sejtek a csontvelői aspirátumból készült kenetben, míg a biopsziás minta CD56 (**8E** ábra) és chromogranin (**8F** ábra) jelöléssel 90%-os csontvelői neuroblastoma-infiltrációt igazolt.



8. ábra: Egy 1-es mintázattal (MFC+/IHC+) jellemezhető *de novo* neuroblastoma-eset

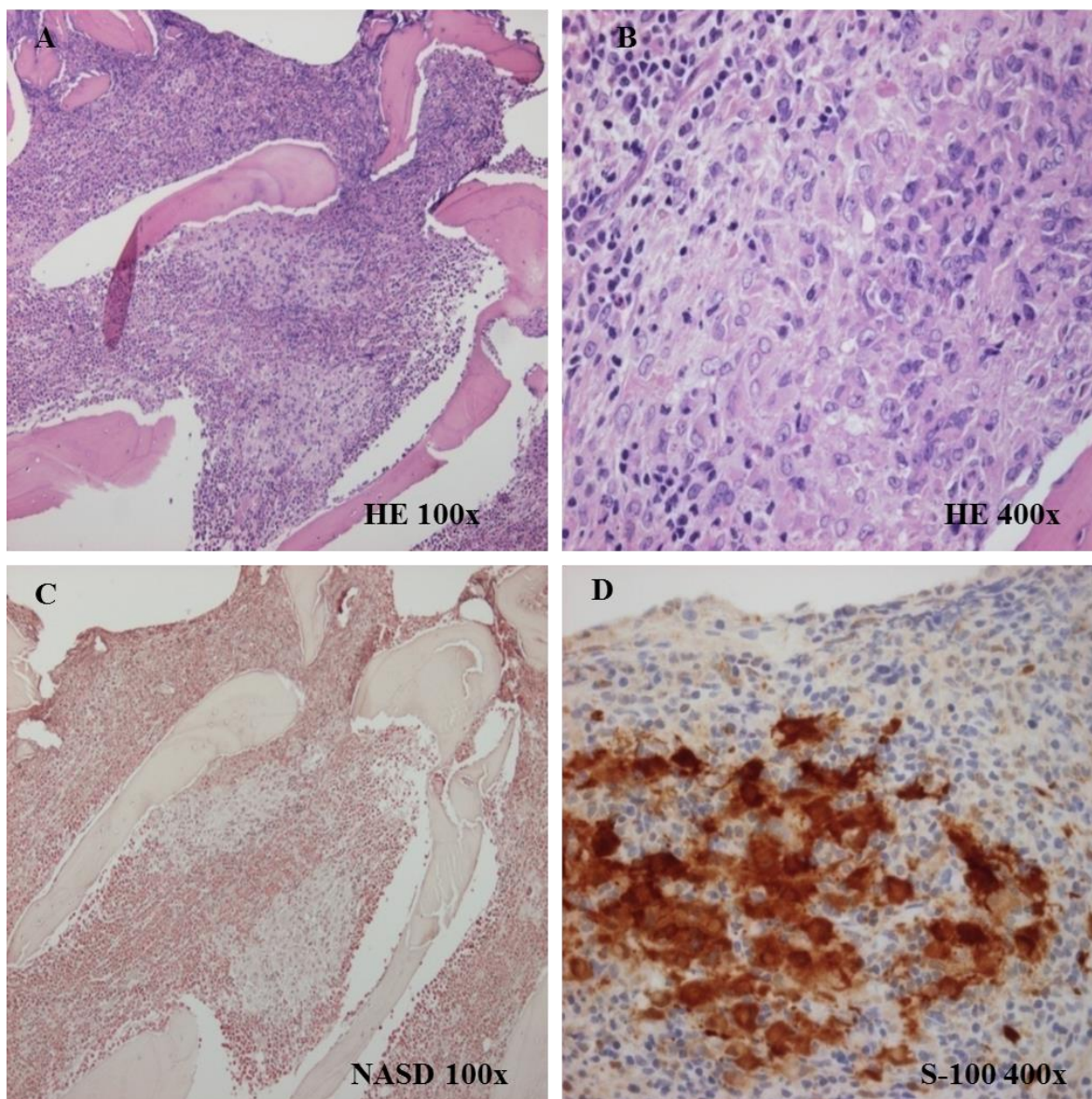
A csontvelő-aspirátum áramlási citometriai vizsgálatára akut leukémia kizárása céljából került sor. Az áramlási citometriai vizsgálat során 30% CD45-/CD56+/CD81+ neuroblastoma-sejtet találtunk (A, B). Giemsa (C) és chromogranin (D) festéssel az aspirátumban szintűgy kimutathatók voltak a neuroblastoma-sejtek, a csontvelő-biopsziás minta immunhisztokémiai vizsgálata (E, F) pedig a csontvelő 90%-os neuroblastomás infiltrációját igazolta.

2. mintázat: MFC-negatív/IHC-negatív konkordáns eredmények

A szolid tumoros csoportban tizennégy, a neuroblastoma-csoportban négy negatív konkordáns mintát találtunk. A szolid tumoros csoport mintái közül nyolc származott olyan betegtől, akiknek igazolt tumoros betegségük volt, csontvelői infiltráció nélkül.

3. mintázat: MFC-negatív/IHC-pozitív diszkordáns eredmények

Két-két MFC-negatív/IHC-pozitív diszkordáns eredményt találtunk a szolid tumoros és a neuroblastoma-csoportban is. Az egyik diszkordáns minta egy Langerhans-sejtes histiocytosisban szenvedő betegtől származott. A csontvelő-biopsziás minta fénymikroszkópos vizsgálata (**9. ábra**) 10%, peritrabecularisan elhelyezkedő patológiás histiocyta jelenlétét igazolta hematoxilin-eozin festéssel (**9A** és **9B** ábra), valamint naftol-AS-D-kloroacetát-észteráz (**9C** ábra) és S100- (**9D** ábra) festéssel.



9. ábra: Egy 3-as mintázattal (MFC-/IHC+) jellemezhető eset a szolid tumoros csoportból

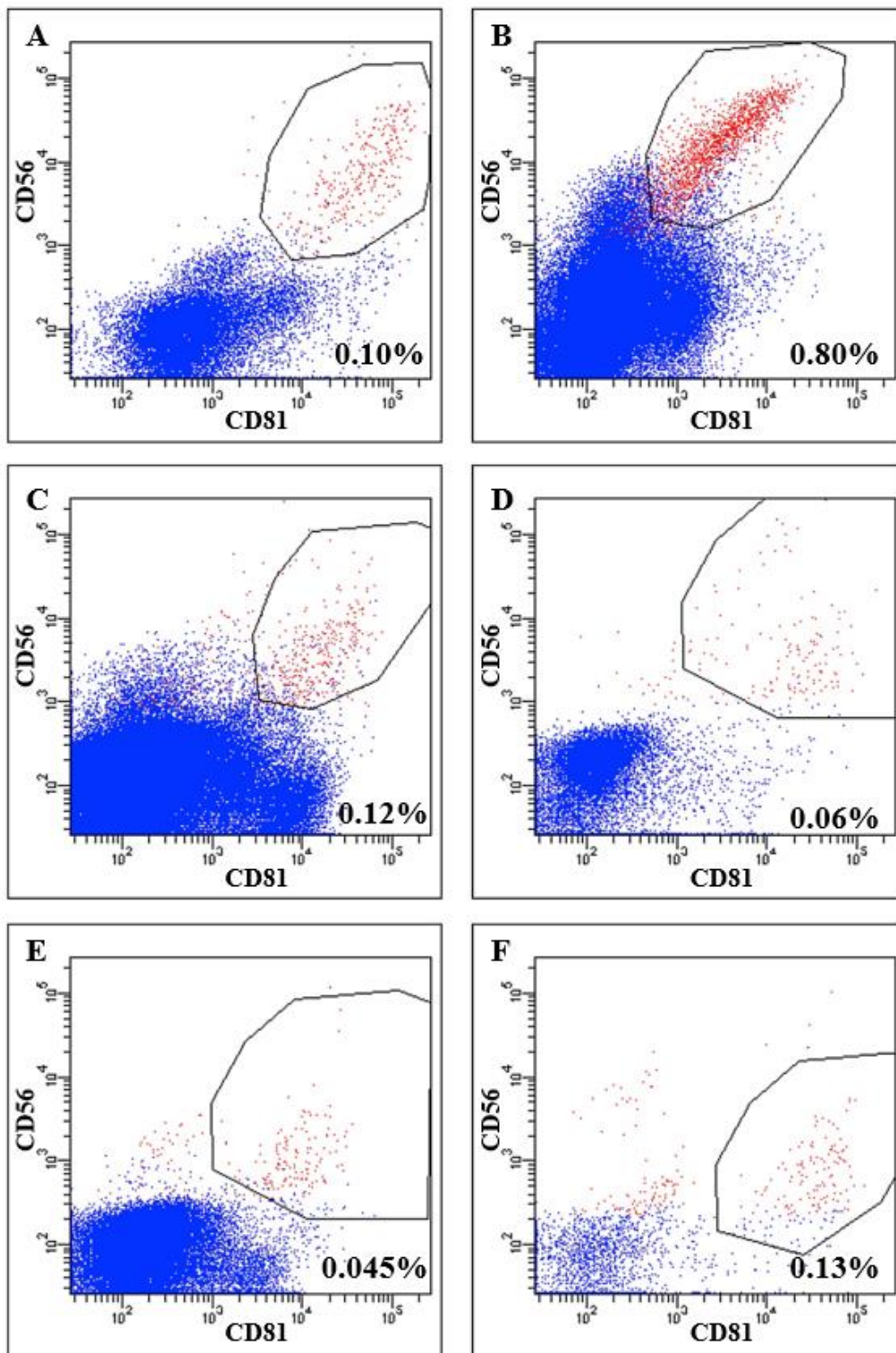
A csontvelő-aspirátumból áramlási citometriai vizsgálattal tumorsejteket nem sikerült kimutatni, azonban a csontvelő-biopszia során nyert minta szövettani vizsgálata mintegy 10%, peritrabecularisan elhelyezkedő kóros histiocyta jelenlétét igazolta, melyek morfológiája a Langerhans-sejtes histiocytosisra volt jellemző. A, B: hematoxin-eozin festés; C: naftol AS-D kloroacetát észteráz; D: S-100 immunhisztokémia.

A szolid tumoros csoport másik diszkordáns mintája egy Hodgkin-lymphomás betegről származott; az ő esetében a Reed-Sternberg sejteket áramlási citometriával nem tudtuk kimutatni. A neuroblastoma csoport két diszkordáns mintája MRD minta volt, két különböző időpontban véve ugyanattól a betegről. Immunhisztokémiai vizsgálattal mintegy 10%, rozettákat képező tumorsejtet sikerült kimutatni. Mivel az áramlási citometriai vizsgálat csontvelői aspirátumból történik, azt feltételeztük, hogy ebbe a mintatípusba nem kerültek bele a tumorsejtek.

Az aspirátumból készült kenetek Giemsa- és chromogranin-festésével sem volt igazolható a tumor jelenléte, mely igazolta a feltételezésünket.

4. mintázat: MFC-pozitív/IHC-negatív diszkordáns eredmények

A neuroblastoma csoportban hét diszkordáns mintát találtunk, melyek hat különböző betegről származtak. Ezekben az esetekben áramlási citometriával igen alacsony, 1% alatti arányban kimutattunk tumorsejteket, de ez a mennyiség már túlságosan kevésnek bizonyult ahhoz, hogy immunhisztokémiai vizsgálattal is kimutatható legyen. A **10. ábrán** hat ilyen eset felhőképeit mutatjuk be.

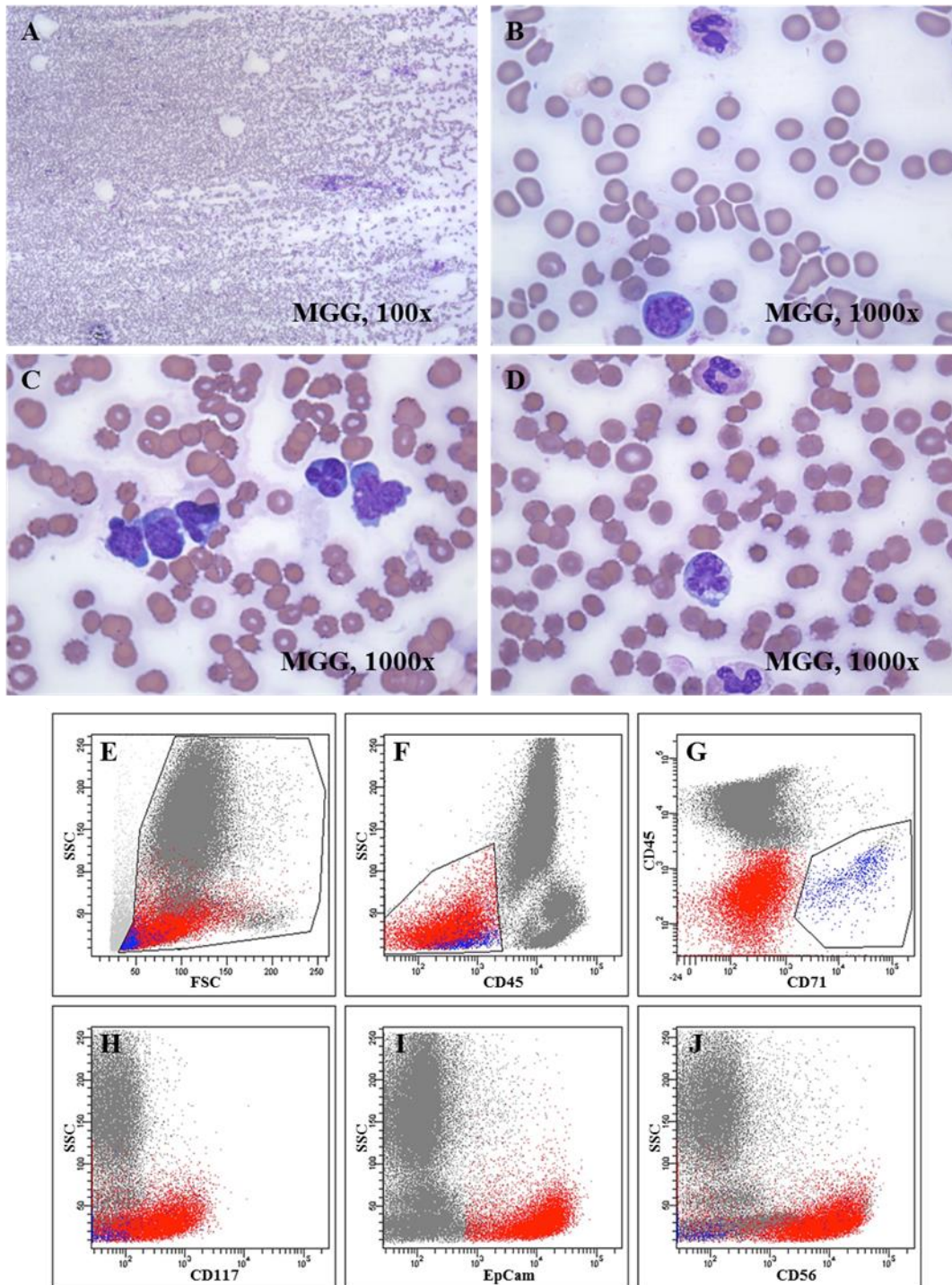


10. ábra: A 4-es mintázattal (MFC+/IHC-) jellemezhető neuroblastoma-esetek

Valamennyi ilyen eset minimális reziduális betegség keresésére érkezett. A morfológiai vizsgálat negatív, a MRD detektálási protokoll szerint végzett áramlási citometriai vizsgálat (A-F) pozitív eredményt adott, 0,06% és 0,8% közötti arányban kimutatva neuroblastoma-sejteket a csontvelő-aspirátumban. Az ábrákon csak a CD45 negatív, élő sejtek vannak megjelenítve. Piros színnel a reziduális neuroblastoma-sejteket, kézzel az erythroid prekurzorokat jelöltük. A D és az F ábrán szereplő minta rendkívül sejtiszegény csontvelőből származott.

5. mintázat: MFC-pozitív/IHC nem áll rendelkezésre

Immunhisztokémiai vizsgálati eredmény összesen 24 esetben nem állt rendelkezésre: 14 esetben a szolid tumoros csoportból, és 10 esetben a neuroblastoma csoportból. Utóbbi csoportban ebből a tíz esetből áramlási citometriával vizsgálva kilenc pozitív, egy negatív volt. A szolid tumoros csoportban tíz eset volt negatív áramlási citometriával, ezek között négy olyan beteg volt, akiknél szolid tumor egyértelműen igazolódott, de csontvelői érintettség nem volt. A tizennégyből négy esetben kaptunk pozitív eredményt, ezek közül egy fals pozitívnek bizonyult. A **11. ábrán** egy tüdő tumoros beteg tumorsejtek által infiltrált csontvelői mintájának képei láthatók. Az idős betegnek súlyos thrombocytopeniája volt, így sem csontvelő- sem tumorbiopsziára, így immunhisztokémiai vizsgálatra sem kerülhetett sor. A csontvelői aspirátumból készített, May-Grünwald-Giemsa szerint festett kenetben (**11A-D** ábra) kis nagyítással összecsapódott sejtek voltak láthatók (**11A** ábra), nagyobb nagyítással többlebenszerű, rögzös kromatinszerkezetű maggal, 1-2 magvacskával, bazofil, vakuolizált citoplazmával rendelkező malignus sejteket lehetett megkülönböztetni (**11B-11D** ábra). Áramlási citometria vizsgálatával 17% CD45 negatív sejtet találtunk, 1% erythroid prekurzort és 16% EpCAM+/CD56+/CD117+ tumorsejtet (**11E-J** ábra), melyek valószínűleg a képkötő vizsgálatokkal igazolt tüdődaganatból származtak. A kóros sejteken látott CD56 expresszió a kissejtes tüdőrák gyakori jellemzője, míg a CD117 expresszió megjelenése ugyanebben a kórképben rossz prognosztikai faktor (*Naeem, 2002; Travis 2012*).



11. ábra: 5-ös mintázat: MFC-pozítív/IHC nem történt

Valószínűleg tüdőrákból származó betegből származó csontvelői aspirátum morfológiai és áramlási citometriai vizsgálatának eredménye. Súlyos thrombocytopenia miatt csontvelő-biopszia és szövettani vizsgálat nem történt. A csontvelő-aspirátumból May-Grünwald-Giemsa szerint festett kenetekben (A-D) kis nagyítással sejtaggregátumokat láttunk (A), nagyobb nagyítással a malignus sejtek többszörös maggal, durva rögös szerkezetű magkromatinnal, magonként 1-2 magvacskával és basophil, vakuolizált citoplazmával rendelkeztek (B-D). Áramlási citometriai vizsgálattal a sejtek 17%-a a CD45 negatív régióban volt, 1% erythroid prekurzor és 16% EpCAM+/CD56+/CD117+ tumorsejt volt detektálható, melyek feltehetőleg a képalkotó vizsgálatokkal kimutatott tüdőtumorból származtak.

5.2.4. Szenzitivitás, specificitás, diagnosztikai hatékonyság

Megvizsgáltuk a két módszer szenzitivitását, specificitását és diagnosztikai hatékonyságát tumorsejtek kimutatására csontvelőben és más testfolyadékokban. Az eredményeket a **4. táblázat** foglalja össze. Neuroblastoma-sejtek kimutatására az áramlási citometria érzékenyebbnek bizonyult az immunhisztokémiánál, különösen, ha MRD kereséséről volt szó (90% vs. 65%), de más szolid tumorok esetében ez éppen fordítva volt (100% vs. 82%). Az áramlási citometria és az immunhisztokémia is teljes mértékben specifikus a neuroblastoma kimutatására, egyéb szolid tumorok esetében az áramlási citometria specificitása 96% volt. A neuroblastomából disszeminálódott tumorsejtek csontvelői detektálásában az áramlási citometria hatékonyabb volt az immunhisztokémiánál (100% vs. 86%); ez a különbség még inkább kifejezetté vált az utánkövetési mintáknál, melyekben MRD-t kellett keresni (92% vs. 68%). A szolid tumoros csoportban az immunhisztokémia hatékonysága 100%, az áramlási citometriáé 91% volt.

Érzékenység

	Neuroblastoma <i>de novo</i>	Neuroblastoma MRD	Egyéb szolid tumorok
MFC	100%	90%	82%
IHC	80%	65%	100%

Specificitás

	Neuroblastoma <i>de novo</i>	Neuroblastoma MRD	Egyéb szolid tumorok
MFC	100%	100%	96%
IHC	100%	100%	100%

Hatékonyság

	Neuroblastoma <i>de novo</i>	Neuroblastoma MRD	Egyéb szolid tumorok
MFC	100%	92%	91%
IHC	86%	68%	100%

4. táblázat: Az áramlási citometria és az immunhisztokémia érzékenysége, specificitása és hatékonysága disszeminált tumorsejtek detektálásában

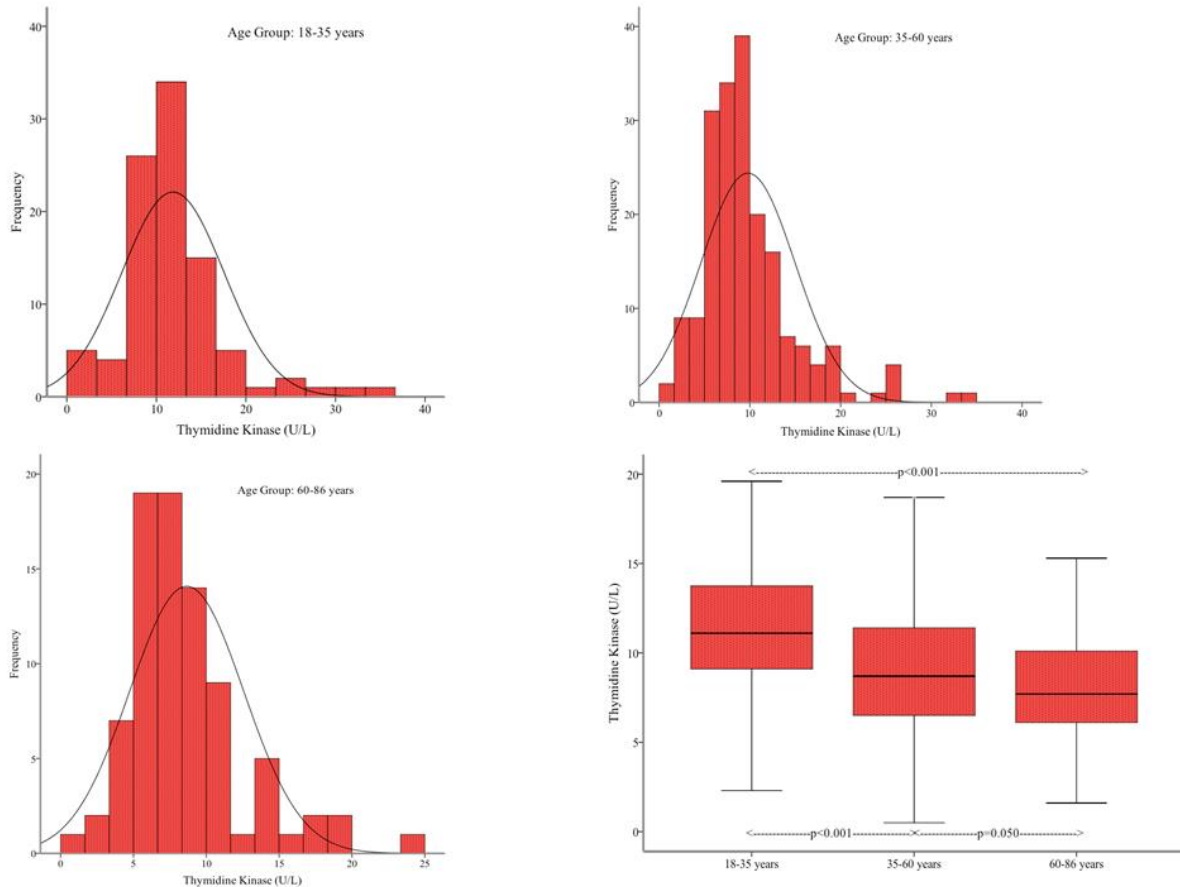
5.3. Posztanalitikai fázis: a szérumban timidin-kináz enzim életkor-specifikus referencia-tartományainak meghatározására, valamint CLL betegcsoporton történő validálására szolgáló tanulmány eredményei

5.3.1. A szérumban timidin-kináz aktivitás mérés analitikai teljesítménye

A reprodukálhatósági és pontossági vizsgálatok igen jó eredményeket adtak. A QC1 minta gyártó által megadott névleges TK1 aktivitása 14,8 U/L volt. A sorozaton belüli mérések középértéke $15,0 \pm 1,58$ U/L, a reprodukálhatóság CV-je a QC1 mintára 10,54%, a pontosság 101%. A sorozatok közötti mérések során a QC1 minta középértéke $14,8 \pm 2,23$ U/L volt, a reprodukálhatóság variációs koefficiense 15,03%, a pontosság 100%. A QC2 minta TK1-aktivitásának névértéke 53,7 U/L volt. A sorozaton belüli mérések során a középérték $62,4 \pm 6,34$ U/L, a CV 10,16%, a pontosság 116%. A sorozatok közötti mérések középértéke $49,15 \pm 6,27$ U/L, a CV 12,76%, a pontosság 92%. A teszt 0,5 U/L és 100 U/L között volt lineáris.

5.3.2. Életkor-specifikus referencia tartományok kialakítása egészséges populációban

Az egészséges önkéntesek csoportjában a TK1-aktivitás férfiakban és nőkben nem különbözött szignifikánsan, így csak életkori alcsoportokat határoztunk meg. A **12. ábra A-C** részén három életkori csoport enzimaktivitásait foglaltuk össze. Szignifikáns különbség volt a fiatal (n=95) és idős (n=83) korosztály ($11,85 \pm 5,7$ U/L vs. $8,65 \pm 3,9$ U/L; $p < 0,001$), valamint a fiatal és a középkorú (n=191) korosztály ($11,85 \pm 5,7$ U/L vs. $9,79 \pm 5,2$ U/L; $p < 0,001$) között, a középkorú és az idős korosztály között pedig a statisztikai szignifikancia határán ($9,79 \pm 5,2$ U/L vs. $8,65 \pm 3,9$ U/L; $p = 0,050$). Összességében a legalacsonyabb mért TK1-érték 0,5 U/L, a legmagasabb 35,6 U/L volt. A 97,5 percentilis érték a fiatal korosztályban 29,8 U/L, a középkorúak körében 25,4 U/L, míg az időseknél 19 U/L volt (**12D ábra**).



12. ábra: A szérumban mért timidin-kináz aktivitás eloszlása az egyes életkori csoportokban

A: 18-35 év; B: 35-60 év; C: 60-86 év; D: az egyes életkori csoportok között szignifikáns különbség van

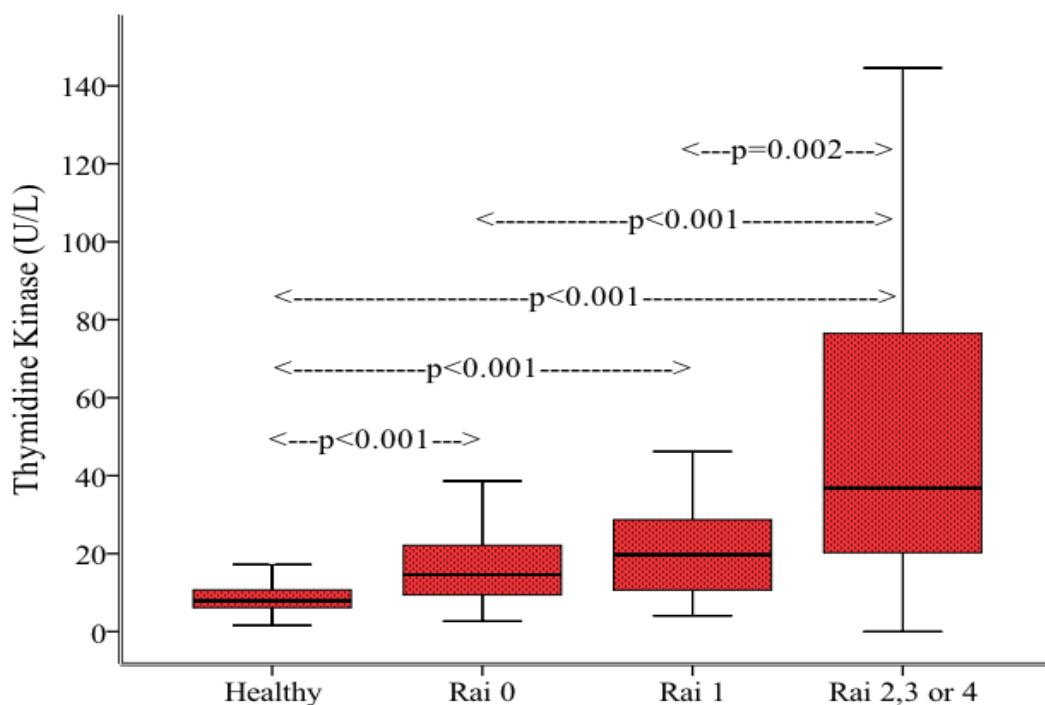
A kontrollcsoport és a CLL-es betegek szérumban mért TK1-aktivitása a betegség Rai stádiumától függetlenül szignifikánsan eltért. Mivel a Rai 2, 3 és 4 stádiumokban csak kevés beteg volt (**5. táblázat**), ezt a három stádiumot közösen kezeltük, mint előrehaladottabb betegséget.

	CLL-es betegek (115 fő)
Életkor években (átlag, tartomány)	65,6 (46-86)
Férfiak	61 (53%)
Nők	54 (47%)
Rai 0	43 (37%)
Rai 1	27 (23%)
Rai 2	19 (17%)
Rai 3	15 (13%)
Rai 4	11 (10%)
CD38-/Zap70-	52 (45%)
CD38-/Zap70+	17 (15%)
CD38+/Zap70-	15 (13%)
CD38+/Zap70+	31 (27%)
Fehérvérsejtszám (átlag, tartomány)	50,6 G/L (12,4 – 447 G/L)
Abszolút B-sejtszám (átlag, tartomány)	39,9 G/L (5,2 – 392 G/L)

5. táblázat: A CLL-es betegek jellemzői

A Rai stádium-beosztás klinikai adat, a CD38, Zap70 expresszió és az abszolút B sejtszám meghatározása áramlási citometriával, a fehérvérsejtszám megadása hematológiai automatával történt.

Az egészséges kontrollcsoportban (n=115) a TK1-aktivitás középértéke $9,18 \pm 5,0$ U/L volt, ez szignifikánsan alacsonyabb volt, mint akár a Rai 0 (n= 43; középérték: $18,58 \pm 15,6$ U/L; $p<0.001$), akár a Rai 1 (n= 27; középérték: $28,16 \pm 32,9$ U/L; $p<0.001$), akár a Rai 2-3-4 (n= 45; középérték: $72,88 \pm 101,1$ U/L; $p<0.001$) stádiumú CLL-es betegek szérum TK1-értékei. Szintén szignifikáns különbséget kaptunk a Rai 0 és a Rai 2-3-4 stádiumok ($p<0,001$), valamint a Rai 1 és Rai 2-3-4 stádiumok között ($p=0,002$) (**13. ábra**).



13. ábra: Rai 0, Rai 1 és Rai 2-3-4 stádiumban lévő CLL-es betegek szérumban lévő timidin-kináz aktivitásának összehasonlítása az egészséges kontrollcsoporttal

Szignifikáns különbség adódott valamennyi vizsgált csoport között a TK enzim aktivitásában.

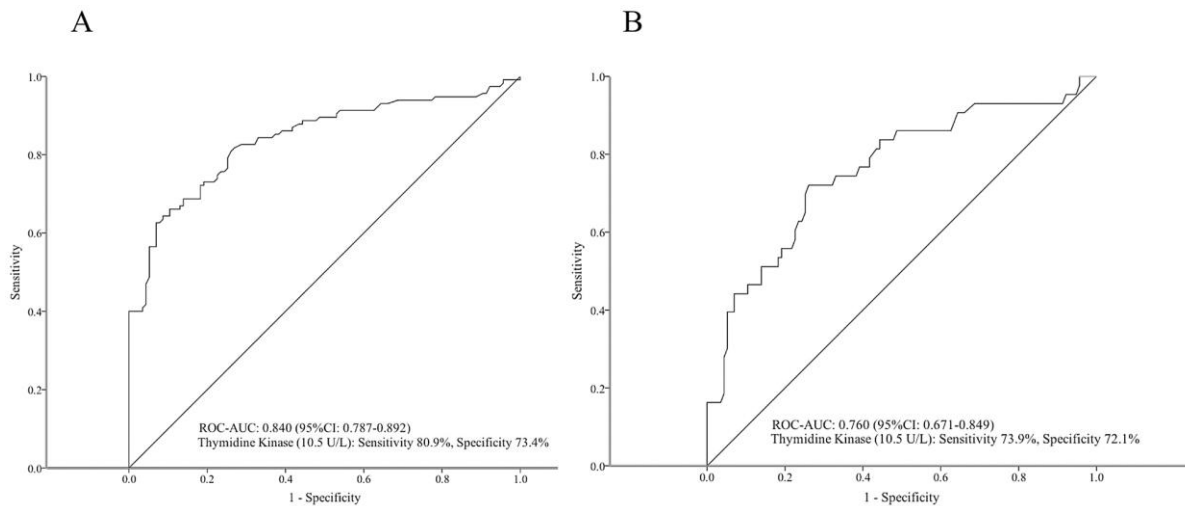
A CLL-es betegek átlagéletkora 65,6 év volt (46 és 86 év között). Ugyanazon Rai stádiumon belül az életkor nem okozott szignifikáns különbséget a középkorú (n=29) és az idős (n=86) CLL-es betegek TK1-értékei között (**6. táblázat**).

Rai stádium	Életkor		p érték
	46-60 év	60,1-86 év	
	Timidin-kináz aktivitás, átlag±szórás (U/L)		
Rai 0 (43 fő)	15,5±8,9 (15 fő)	20,2±18,2 (28 fő)	0,558
Rai 1 (27 fő)	59,7±67,7 (5 fő)	21,0±13,3 (22 fő)	0,524
Rai 2-3-4 (45 fő)	89,0±151,6 (9 fő)	68,8±86,7 (36 fő)	0,645

6. táblázat: Különböző Rai stádiumokban lévő középkorú és idős betegek timidin-kináz aktivitásainak összehasonlítása

A ROC görbe alatti terület 0,84 volt (95%-os konfidencia-intervallum: 0,787 – 0,892), a CLL-es betegeket az egészségesektől elkülönítő (cutoff) timidin-kináz aktivitás értéke 10,5

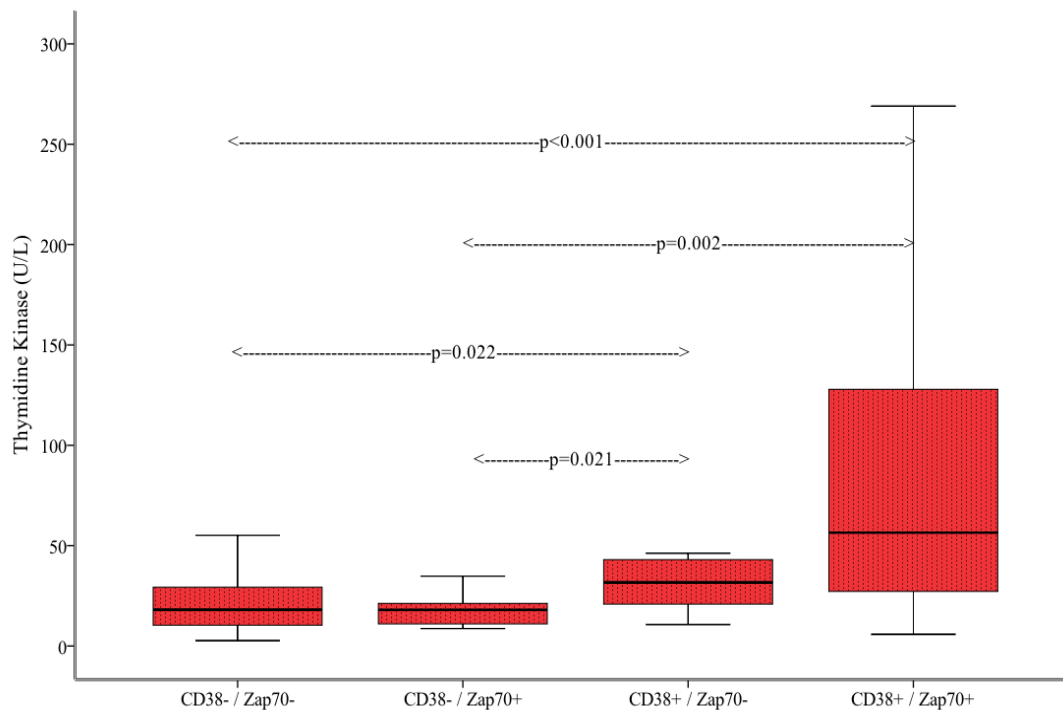
U/L 80,9%-os szenzitivitás és 73,4%-os specificitás mellett (**14A ábra**). Ugyanezen cutoff érték mellett a ROC görbe alatti terület 0,76 (95%-os konfidencia-intervallum: 0,671 – 0,849) volt a Rai 0 stádiumú CLL betegek és az egészséges populáció elkülönítésére (szenzitivitás: 73,9%, specificitás: 72,1%; **14B ábra**).



14. ábra: ROC (receiver operating characteristics) görbék

A: a CLL-es betegek összessége; B: a Rai 0 stádiumban lévő CLL-es betegek (AUC: area under the curve, görbe alatti terület).

A CLL-es betegek TK1-értékeit más ismert prognosztikai faktorokkal (CD38 és a Zap70 expresszió) is összehasonlítottuk. A TK1-aktivitás középértéke a CD38-/Zap70- csoportban (n=52) szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a CD38+/Zap70+ csoportban (n=31; $22,3 \pm 7,8$ U/L vs. $109 \pm 130,3$ U/L; $p < 0,001$). Szintén szignifikáns különbséget kaptunk a CD38-/Zap70+ csoport (n=17) és a CD38+/Zap70+ csoport között ($26,25 \pm 33$ U/L vs. $109 \pm 130,3$ U/L; $p = 0,002$); a CD38+/Zap70- (n=15) és a CD38-/Zap70- csoport között ($40,87 \pm 38$ U/L vs. $22,3 \pm 17,8$ U/L; $p = 0,022$); valamint a CD38-/Zap70+ csoport és a CD38+/Zap70- csoport ($26,25 \pm 33$ U/L vs. $40,87 \pm 38$ U/L; $p = 0,021$) között (**15. ábra**).



15. ábra. A CD38 és a Zap70 expresszió alapján különféle prognosztikai csoportokba sorolt CLL-es betegekben észlelt timidin-kináz aktivitás

A CD38-/Zap70- betegeket az egyik vagy mindkét prognosztikai faktorra pozitív betegektől elkülönítő TK1-aktivitás cutoff értéke ROC analízis alapján 30 U/L volt (ROC-AUC: 0,710, 95% CI: 0,601–0,819, specificitás: 76,6%, szenzitivitás: 54,3%).

A 115 CLL-es betegből 95 esetben állt rendelkezésre FISH eredmény. A 76 fős, 12-es triszómiával, 13-as kromoszóma deléciójával [del(13q)] vagy normál kariotípussal rendelkező betegcsoportot összehasonlítva a 17-es [del(17p13)] vagy a 11-es kromoszóma [del(11q)] deléciójával rendelkező betegekkel (n=19) a TK1-aktivitásokban nem volt szignifikáns különbség ($38,7 \pm 65,7$ U/L vs. $55,5 \pm 96,5$ U/L, $p=0,347$), és ez azt követően sem változott, miután a 12-es triszómiával rendelkező betegeket kivettük a statisztikai elemzésből ($33,0 \pm 44,5$ vs. $55,5 \pm 96,5$, $p=0,211$). A TK1-aktivitás és a fehérvérsejtszám (Spearman-féle rho: 0,367, $p<0,001$) valamint az abszolút B-sejtszám (Spearman-féle rho: 0,369, $p<0,001$) között korrelációt találtunk.

6. Megbeszélés

6.1. Preanalitikai fázis vizsgálata: a nem megfelelő minőségű minták azonosítása és ezek hatása az eredmények interpretációjára akut limfoblasztos leukémiás gyermekekben

A European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM; Klinikai Kémia és Laboratóriumi Medicina Európai Szövetség) 2012-ben külön munkacsoportot hozott létre a laboratóriumi folyamatok preanalitikai szakaszában történő tevékenységek és hibák felderítésére, a hibák (indikátorok) leírásának, kódolásának és regisztrációjának harmonizációjára (Lippi, 2019; von Meyer, 2020). Jóllehet a munkacsoport számos tanulmány keretében adott ajánlást a vénás mintavétel (Simundic, 2015), a beteg előkészítése (Simundic, 2014), a minta és a beteg identifikálása (van Dongen-Lases, 2016), a mintavételi csövek sorrendjének (Cornes, 2017) és a hemolízis kezelésének (Lippi, 2018) vonatkozásában, ezek a közlemények kevésbé foglalkoznak a speciális vizsgálatra érkező, ritkábban vett mintatípusok (pl. csontvelőből, likvorból végzett áramlási citometria) preanalitikájával. Ugyanakkor az ezen laboratóriumokba érkező minták esetében a rutin kémiai és hematológiai vizsgálatokra érkező mintákhoz képest sokkal több lehetséges preanalitikai hibával kell számolnunk: nem megfelelő a minta az adott vizsgálatra, alvadékos vagy kevés minta, rossz antikoaguláns, perifériás vér kontamináció (csontvelő, likvor, ascites esetén), hosszú, nem megfelelő körülmények közötti szállítás, alacsony élő sejtarány (Davis, 2013).

A leukémiák és limfómák diagnosztikájában és utánkövetésében, a gyermekkori akut limfoid leukémiákat is ideértve, a csontvelő és a likvor vizsgálata döntő fontosságú. A valós eredmények érdekében a vizsgált mintának megfelelő minőségűnek kell lennie. A csontvelői minták esetében gyakori a perifériás vérrel történő kontamináció (hemodilúció). His és mtsai (His, 2014) akut leukémiás betegek vizsgálatával a hemodilúció arányát 36%-nak találták.

Az ALL IC BFM 2009 Flow MRD működési szabályzata szerint az olyan 15. napi csontvelői minta, amely 2%-nál kevesebb erythroid prekuzort tartalmaz, nem alkalmas áramlási citometriai kockázatbesorolásra (Dworzak, 2009; Radu, 2020), csak abban az esetben, ha a reziduális blastok aránya meghaladja a 10%-ot, ez esetben a beteg a 15. napi csontvelői minta eredménye alapján a Flow High Risk csoportba besorolható. Amennyiben az ilyen mintában a blastok aránya 10% alatt van, a mintát kockázatbesorolásra alkalmatlannak kell minősíteni. A hemodilúció igazolására számos egyéb módszert is leírtak (Abrahamsen, 1995; Aldawood, 2015; Delgado, 2017; Pont, 2018). A mi eredményeink alapján a 15. napi csontvelői minták 12,5%-a volt kockázatbesorolásra alkalmatlan. Ez hátráltathatta a legmegfelelőbb terápiás protokoll kiválasztását. A 33. napi csontvelői minták hasonló arányban, 14%-ban voltak perifériás

vérrel szennyezettek. Ennek elkerülése érdekében a legfőbb lépés, hogy a csontvelő-aspiráció a biopszia előtt történjen, és ne aspiráljanak többet 1-2 mL csontvelőnél (Cloos, 2018).

Mivel a hematológiai malignus betegségek gyakran érintik a központi idegrendszert is, rendszeresen szükség van a likvor vizsgálatára. A diagnosztika alapját a konvencionális citomorfológiai vizsgálat képezi, noha egyes adatok szerint így az esetek akár 60%-ában is álnegatív eredményt kaphatunk (Hovestadt, 1990; Almeida, 2007). Az áramlási citometriának azonban nagy az érzékenysége és a specificitása, és az amerikai National Comprehensive Cancer Network ajánlásában a citomorfológiai vizsgálatokkal együttesen szerepel (Brem, 2005). Vizsgálatainkkal mi is igazoltuk az áramlási citometria elengedhetetlen fontosságát, különösen azokban az esetekben, amikor a likvorban igen alacsony volt a magvas sejtek száma (mikroliterenként 10 alatt), de malignus sejtek így is kimutathatók voltak, és a minta nem volt perifériás vérrel szennyezett. Kraan és mtsai (Kraan, 2008) azt javasolták, hogy legalább 25 kóros sejtből álló populáció esetén minősítsük pozitívnak a mintát, 10 és 25 sejt között gyanúsnak, és 10 alatt negatívnak. Mi a tanulmányunkban a patológiás sejtre jellemző, hasonló tulajdonságokkal rendelkező 10 sejt esetén tekintettük a likvort pozitívnak. A likvorban a sejtek a mintavételt követően gyorsan pusztulásnak indulnak, legnagyobb arányban a granulocyták és a monocyták vesznek el (de Graaf, 2011, *Cytometry B*). Több kutatócsoport is próbálkozott különféle, sejtenyészteshez használt médiumok hozzáadásával, hogy a gyors sejtpusztulást megakadályozzák, eredményeik biztatóak voltak (Veerman, 1985; de Graaf, 2011, *J Neurol*).

Egyéb tartósítási lehetőségeket is megvizsgáltak, mint például a minta azonnali lehűtését, a centrifugálási lépések minimalizálását, a felülúszó leszívását a leöntés helyett (Chow, 1984; Dux, 1994; Kraan, 2008). Stabilizáló szerek, mint például a TransFix[®], szintén alkalmazhatók, sőt, a British Committee for Standards in Hematology kifejezetten ezt ajánlja likvorhoz (Johansson, 2014). A stabilizátort tartalmazó likvor esetében akár 72 órával a mintavétel után is lehetséges az áramlási citometriai analízis (Quijano, 2009; Johansson, 2014). Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a TransFix[®]-et és EDTA-t tartalmazó mintatároló csövekben a sejtesvesztés minimális, és a szérumot is tartalmazó médiumos vagy kezeletlen csövekben tárolt mintákkal összehasonlítva nagyobb határfokkal lehetett a leptomeningealis lokalizációjú hematológiai malignitásokat kimutatni az ilyen csövekben tárolt mintákból, mert a sejtek fény- és antigén-expressziói jól megőrződnek (de Jongste, 2014; Johansson, 2015).

Saját eredményünk azt mutatta, hogy a TransFix[®]-et tartalmazó minták esetében szignifikánsan több esetben találtunk 30% feletti élő sejtarányt, mint a natív minták esetében. Azonban patológiás sejtpopuláció olyan esetekben is azonosítható lehet, amikor az élő sejtek aránya

ennél alacsonyabb, amint az a mi vizsgálatunkban is előfordult hét mintánál, így igen nehéz az élő sejtekre vonatkozó minimum arányt megállapítani a minta értékelhetetlennek minősítésére.

Petzold és mtsai vizsgálatukban megállapították, hogy a standard lumbálpunkciók akár 20%-a is traumatikus lehet, noha nincs konszenzus arról, hogy pontosan mit is nevezünk traumatikus punkciónak (Petzold, 2006). Egyes szerzők akkor definiálják traumatikusnak a lumbálpunkciót, ha mikroliterenként legalább 100 VVT van jelen (Eskey, 2001), mások a határértéket mikroliterenként 400 VVT-nél állapítják meg (Shah, 2002; Wood, 2005). Azonban Gajjar és mtsai már mikroliterenként 10 VVT jelenléte esetén is traumatikusnak minősítették a mintavételt. Megfigyelték, hogy ALL-es gyermekekben a likvorminta perifériás vérrel történt szennyeződése negatív hatással volt a terápia kimenetelére (Gajjar, 2000).

Kraan és mtsai szerint a perifériás vérrel szennyezett likvormintából kimutatott kóros sejteknek csak akkor van diagnosztikus értéke, ha a likvorral egy időben vett perifériás vérminőségben a malignus sejtek nem detektálhatók (Kraan, 2008). Te Loo és mtsai ellenzik a likvorminta vételét az akut leukémiák azon időszakában, amikor sok malignus sejt kering a perifériás vérben, mivel egy traumatikus punkció során nem csak álpozitív eredményt kaphatunk, hanem iatrogén módon tumorsejteket juttathatunk a központi idegrendszerbe (Dutch Childhood Oncology Group 2006). Az általunk vizsgált gyermek populációban a likvorminták 45%-a, míg a vegyes életkorú csoportban stabilizátor nélkül a minták 36%-a volt perifériás vérrel kontaminált, ezek az arányok összhangban vannak az irodalomban leírtakkal (Petzold, 2006; Greenberg, 2008; Pappano, 2010).

Vizsgálataink korlátja azok retrospektív természete; prospektív tanulmány keretében lehetőségünk lett volna valamennyi, a minta minőségének értékelése szempontjából fontos paraméter vizsgálatára (Lippi, 2015). A natív és stabilizátort tartalmazó likvormintákban az értékelhető minták arányát nagyobb populáción is szükséges lenne vizsgálni.

Összességében a minták gyenge minősége hátráltathatja az akut limfoblasztos leukémiában szenvedő gyermekek megfelelő kockázati csoportba sorolását, és így a további terápiás stratégia megválasztását. Likvormintákban alacsony (<30%) élő sejtarány esetén is kimutathatunk malignus sejtpopulációt, így nehéz egyértelmű határértéket megállapítani az élő sejtarányra vonatkozóan.

Javasoljuk, hogy a csontvelői mintavételeknél a minta hemodilúciójának megelőzése érdekében a csontvelő aspiráció a biopszia előtt történjen, és legfeljebb 1-2 mL csontvelő aspirálására kerüljön sor. Likvor minta esetében stabilizátort tartalmazó mintavételi cső alkalmazását javasoljuk.

6.2. Analitikai fázis vizsgálata: disszeminált tumorsejtek kimutatása áramlási citometriával és immunhisztokémiával

Az analitikai fázis vizsgálata során két immun-alapú módszert, a gold-standard immunhisztokémiát és az áramlási citometriát vetettük össze disszeminált tumorsejtek detektálásában konkordancia, szenzitivitás, specificitás, diagnosztikai hatékonyság vonatkozásában.

A daganat-áttétek keletkezésének általánosan elfogadott elmélete szerint a primer tumorról malignus sejtek válnak le, bejutnak a szisztémás keringésbe (keringő tumorsejtek), majd megtelepednek más szervekben és szövetekben (disszeminált tumorsejtek), ahol szaporodásnak indulva létrehozzák a primer tumor áttétjét. A keringő és disszeminált tumorsejtek kimutatásának prognosztikai jelentősége lehet (Braun, 2005, *J Clin Oncol*). Braun és mtsai (Braun, 2005, *N Eng J Med*) kimutatták, hogy ha a csontvelőben emlőrákból származó mikrometasztázisok vannak jelen, az jelentősen rontja a betegség prognózisát. A keringő és disszeminált tumorsejtek kimutatása ugyanakkor igen nehéz feladat, mivel olyan érzékenységgű módszerre van szükség, ami képes egyetlen malignus sejtet azonosítani 10^6 vagy 10^7 magvas sejt között a csontvelőben vagy a perifériás vérben. Ross és Slodkowska (Ross, 2009) emlőrák kapcsán különféle, keringő és disszeminált tumorsejtek kimutatására alkalmas módszereket hasonlítottak össze, és megállapították, hogy ezek még mind fejlesztésre szorulnak ahhoz, hogy prognosztikai szerepüket valóban értékelni lehessen. Az utóbbi években azonban újabb és újabb módszereket fejlesztenek ki a keringő tumorsejtek detektálására, mint például az EPISPOT (Alix-Panabieres, 2015) vagy a CellSearch CTC (Andree, 2016) esszé.

A szolid tumorok diagnosztikájában az áramlási citometria mindezidáig nem került előtérbe. A nem hemopoiotikus tumorokra jellemző markerek vizsgálatával azonban a módszer hathatós segítség lehet a tumoros betegek kivizsgálása során, főleg azokban az esetekben, amikor csontvelő- vagy tumorbiopsziás minta nem áll rendelkezésre. Chang és mtsai (Chang, 2003) javasolták, hogy a disszeminált tumorsejtek detektálására az áramlási citometriai laboratóriumok használják a CD99, myogenin és CD56 markereket is az EpCAM mellett. Az EpCAM egy transzmembrán glikoprotein, mely az epithel eredetű sejtek felszínén fejeződik ki. Részt vesz a jelátviteli, migrációs, proliferációs és differenciálódási folyamatokban. Számos tumorsejt is expresszálja. Tüdőrákban gyakran az EpCAM túlzott expressziója figyelhető meg, ezekben az esetekben a fehérje onkogénként viselkedik (Pak, 2012). Új eszköz lehet tehát a szolid tumorok és a belőlük származó disszeminált sejtek kimutatásában az áramlási citometria, mivel az epithel eredetű tumorok jellegzetes, CD45-/CD71-/EpCAM+ jelölődési mintázatát nem nehéz felismerni.

Csak kevés tanulmány látott napvilágot, melyben tumorosan infiltrált csontvelői minták immunhisztokémiai és áramlási citometriás vizsgálati eredményeit hasonlították össze. Molino és mtsai (*Molino, 1991*) 1991-ben, egyetlen tumor-specifikus monoklonális antitest használatával úgy találták, hogy az immunhisztokémia sokkal jobb módszer emlőtumor-sejtek csontvelői jelenlétének kimutatására, mint az áramlási citometria. Sah és mtsai (*Sah, 2003*) krónikus B-sejtes lymphoproliferatív betegségek kapcsán hasonlították össze a betegek csontvelőből készült áramlási citometriai és morfológiai eredményeit, azt kapva, hogy a csontvelőbiopsziás minta morfológiai és a csontvelői aspirátum áramlási citometriai vizsgálata egymást kiegészítő eredményeket adnak, és csak igen kevés diszkrepanciát találtak, ezeket is olyan mintákon, melyekben MRD keresése történt. Graf és mtsai (*Graf, 2005*) elsősorban hematológiai malignitások kapcsán hasonlították össze 141 csontvelői minta áramlási citometriai és immunhisztokémiai vizsgálati eredményeit. A két módszer között 80,5%-os konkordanciát találtak, ami igen közel áll az általunk az összes vizsgált esetre számított 77%-hoz.

Tanulmányunkban a konkordáns és diszkordáns eredmények alapján öt mintázati csoportba soroltuk az eseteket. A szolid tumoros csoportban 22 mintát vizsgáltunk áramlási citometriával és immunhisztokémiával is, az esetek 91%-ában a két módszerrel kapott eredmények egybehangzóak voltak. Az áramlási citometriának ugyanakkor megvannak a korlátai is, mi is találtunk áramlási citometriával negatív, immunhisztokémiával pozitív mintákat. Ezek egyike egy Hodgkin-lymphomás betegről származott. Az áramlási citometriáról ismert, hogy Hodgkin-lymphomában nem elég nagy az érzékenysége a kóros sejtek kimutatásában, még nyirokcsomósejtszuspenziók esetén sem (*Colorado, 2010*). A másik diszkordáns mintánk egy Langerhans-sejtes histiocytosisban szenvedő betegé volt, akinél a tumorsejtek a csontvelőben paratrabecularisan helyezkedtek el, így valószínűleg nem kerültek bele az áramlási citometriai laboratórium által feldolgozott aspirációs mintába a detektáláshoz elegendő számban.

A neuroblastoma csoportban 26 mintát vizsgáltunk párhuzamosan a két módszerrel, ezek 65%-ában kaptunk egybehangzó eredményt. A két MFC-/IHC+ esetben a tumorsejtek a csontvelői stromaiba voltak ágyazva, vagyis valószínűleg nem kerültek bele az aspirációs mintába az áramlási citometriai vizsgálattal is kimutatható mennyiségben. A két esetben 5% illetve 36% erythroid prekursor volt jelen, ami kizárta a jelentősebb, perifériás vérrel történt kontaminációt. A hisztopatológiai vizsgálattal szemben az áramlási citometriának számos előnye van, kiváltképp, ha a (reziduális) malignus sejtek aránya alacsony. Az immunhisztokémiai vizsgálattal már nem kimutatható kevés tumorsejt jelenlétét áramlási citometriai vizsgálattal lehet igazolni, ahogyan esetünkben is 7 MFC+/IHC- mintánk volt a neuroblastoma csoportban. Swerts és mtsai (*Swerts, 2004*) reziduális neuroblastoma-sejtek kimutatása kapcsán szoros korrelációt

írtak le az áramlási citometria és az immunhisztokémia között ($\chi^2=6,4$; $p=0,011$). Shen és mtsai malignitás gyanújával kivizsgált gyermekek serosus testüregi folyadékainak elemzésével megállapították, hogy az áramlási citometria 88%-os érzékenységgel és 98%-os specificitással mutatta ki a tumorsejteket (Shen, 2012). Munkánkban az áramlási citometria érzékenysége 82% volt a szolid tumoros csoportban és 93% a neuroblastoma-csoportban, a specificitás 100% volt.

Azoknál a neuroblastomás betegeknél, akiknél autológ transzplantációra kerül sor, kulcsfontosságú, hogy a csontvelőből vagy a perifériás vérből származó autograftban a szubmikroszkópos mikrometasztázisokat is ki tudjuk mutatni. Tsang és mtsai (Tsang, 2003) szerint az áramlási citometria reverz transzkripció polimeráz láncreakcióval (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) együttesen hatékony eszköz a neuroblastoma mikrometasztázisok kimutatására és az autograftok tisztaságának igazolására. Eredményeink szerint is neuroblastoma esetén a csontvelői reziduális kóros sejtek megtalálásában az áramlási citometria érzékenyebb és hatékonyabb volt a klasszikus immunhisztokémiánál. Egyéb szolid tumorok esetén azonban az immunhisztokémia bizonyult hatékonyabbnak (100% versus 91%). Ennek hátterében több tényező is állhat: a tumorsejtek adherens természete, az áramlási citometriai vizsgálathoz szükséges mintaelőkészítési folyamat, melynek során a sérülékeny tumorsejtek elpusztulhatnak, és az egyes tumortípusokra specifikus, áramlási citometriában alkalmazható direkt jelölt antitestek hiánya. Azonban tumor-specifikus markerek 8-10 színű jelölés keretében történő alkalmazásával, mintánként 500 000 – 1 millió sejt begyűjtésével az áramlási citometria érzékenysége növelhető.

Összességében elmondhatjuk, hogy a csontvelőből végzett áramlási citometriai és immunhisztokémiai vizsgálat egymást kiegészítő módszerek a disszeminált tumorsejtek kimutatásában. Az áramlási citometriai vizsgálat különösen olyan esetekben nyújthat jelentős diagnosztikai segítséget, melyekben tumorbiopsziás minta nem áll rendelkezésre. Neuroblastoma esetén csontvelői MRD kimutatására az áramlási citometria alkalmasabb.

Javasoljuk, hogy a csontvelői aspirátumból végzett áramlási citometriai vizsgálat és a csontvelőbiopsziás minta immunhisztokémiai vizsgálata lehetőség szerint párhuzamosan történjen, úgy a *de novo*, mint a minimális reziduális betegség keresésére vett mintákból.

6.3. Posztanalitikai fázis vizsgálata: a timidin kináz enzim életkor-specifikus referencia tartományainak meghatározása valamint CLL betegcsoporton történő validálása

Az International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC; Nemzetközi Klinikai Kémiai és Laboratóriumi Medicina Szövetség) külön munkacsoportot ho-

zott létre „Laboratóriumi hibák és beteg-biztonság” néven 2008-ban. Ez a munkacsoport különösen az extra-analitikai fázis (pre-és posztanalitika) folyamataival és az itt keletkező hibákkal valamint ezek hatásával foglalkozik (Plebani, 2017; Sciacovelli, 2017). A posztanalitikai fázis folyamatai közé tartozik az eredmény értékelése, összevetése az adott analit referenciatartományával (Krleza, 2019).

A Clinical and Laboratory Standards Institute 2008-as irányelvei alapján szükség lehet arra, hogy egy klinikai laboratórium egy kisebb tanulmány keretében megvizsgálja, hogy a gyártó által rendelkezésükre bocsátott teszthez megadott referenciatartomány alkalmazható-e az általuk vizsgált (beteg)populáción (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008). Kevéssel azt követően, hogy intézetünkben elkezdtük a TK1-méréseket a gyártó által megadott referenciatartomány (2 – 7,5 U/L) alkalmazásával, kiderült, hogy az általunk vizsgált populációra ez a referenciatartomány nem alkalmazható, mivel számos esetben kaptunk a felső határnál magasabb értékeket egészséges egyéneknél is. Az eredmények értékelése emiatt sok esetben nem volt egyértelmű, és felesleges aggodalmakhoz vezetett. Az egészséges egyéneknél megfigyelt magasabb értékek és az egyes életkori csoportok között feltűnő különbségek alapján végül saját TK1-referenciatartományok kialakítása mellett döntöttünk. Annak ellenére, hogy a TK1-aktivitás mérését széles körben alkalmazzák malignus betegségekben kockázatbecslésre és rutin szűrővizsgálatként is (Zhou, 2013), nem találtunk arra vonatkozó adatot, hogy életkor-specifikus TK1-referenciatartományokat megállapítottak volna.

A 97,5 percentilis értékek megállapításához minden életkori csoportban rendelkezésre állt elegendő számú egészséges egyén. A 97,5 percentilis értékek alapján új referencia-határértékeket állapítottunk meg: a fiatal (18-35 éves) populációban <30 U/L, a középkorúak (36-60 évesek) esetében <25 U/L, míg az időseknél (60 év felett) <19 U/L. A CLL vonatkozásában ezek az életkor-specifikus referenciatartományok kulcsfontosságúak, mivel a betegségben érintettek többsége idősebb életkorú. A Rai 0 stádiumú CLL-es betegeket az egészséges egyénektől elkülönítő TK1-aktivitás határértékét 10,5 U/L-nek állapítottuk meg. Ez az eredmény jól korrelál azzal, amit Letestu és mtsai publikáltak, akik a 10 U/L TK1-aktivitást írták le, mint a progressziómentes túlélés független rizikófaktorát (hazard ratio: 2,98; $p < 0,0001$ – Letestu, 2010).

Mivel a TK1 egy általános sejtproliferációs marker, szintje számos nem malignus betegségben (fertőzés, gyulladás, autoimmun betegségek, jóindulatú szöveti sejtszaporulatok) is enyhén emelkedett lehet (Chen, 2008). Hagberg és mtsai igazolták, hogy a szérumban TK1-aktivitásának emelkedését okozza a súlyos B12-vitaminhiány is, mivel az osztódó sejtek instabillá

válnak (*Hagberg, 1984*). Chen és mtsai kimutatták, hogy a szérumban TK1-koncentrációjának mérése egészségügyi szűrővizsgálatként is alkalmazható. Az emelkedett TK1-koncentrációval rendelkező egyéneknél ugyanis a későbbiekben nagyobb valószínűséggel alakult ki malignus betegség (*Chen, 2011*). Ugyanez a tanulmány írta le azt is, hogy az olajfűró munkások körében magasabb volt az emelkedett TK1-koncentrációval rendelkezők aránya, mint a városi lakosságban, tehát ha a TK1-mérést egészségügyi szűrővizsgálatként kívánjuk alkalmazni, számos nem malignus betegséget és a vizsgált személy környezeti tényezőit is figyelembe kell vennünk.

A Német CLL Tanulmányi Csoport (German CLL Study Group, GCLLSG) 2014-ben közölte egy összetett prognosztikai index rendszer alkalmazását CLL-ben, melynek részét képezi a timidin-kináz aktivitás meghatározása is. Tanulmányukban Pflug és mtsai arra a következtetésre jutottak, hogy a TK1-aktivitás kihagyásával a prognosztikai hatékonyság jelentősen csökkent (*Pflug, 2014*). 2015-ben Molica és mtsai a német prognosztikai rendszert az MD Anderson Cancer Center klinikai adatokon alapuló rendszerével hasonlították össze, és a német rendszert találták hatékonyabbnak. Eredményeinkre hivatkozva kiemelték a TK1-aktivitás vonatkozásában az életkor-specifikus referencia-tartományok alkalmazásának fontosságát, különös tekintettel arra, hogy a CLL rendszerint idősebb egyéneket érint (*Molica, 2015*).

Ismert, hogy a CD38+ CLL prognózisa rosszabb (*Dürig, 2002*). Hus és mtsai igazolták, hogy a CD38 és Zap70 expresszió együttes vizsgálata mindkét marker prognosztikai erejét növeli. Kimutatták, hogy a CD38+/Zap70+ betegek eseménymentes túlélési ideje rövidebb volt, mint a CD38-/Zap70- betegeké (*Hus, 2006*). Tanulmányunkban a CD38+/Zap70+ betegek TK1-aktivitását szignifikánsan magasabbnak találtuk a CD38-/Zap70- betegekénél, és nem találtunk szignifikáns különbséget a CD38-/Zap70- és a CD38-/Zap70+ betegek között. A CD38+ betegekben talált magasabb TK1-aktivitást az intenzívebb sejtproliferáció magyarázhatja, mivel a CD38 és a TK1 is proliferációs marker (*Funaro, 1997; Molica, 2013, Leuk Res*).

A CLL az esetek mintegy 5%-ában agresszív lymphomába, rendszerint diffúz nagy B-sejtes lymphomába transzformálódhat (Richter-szindróma). Agbay és mtsai 2016-ban azt találták, hogy a magasabb TK1-aktivitással rendelkező Richter-szindrómás betegek halálozási aránya nagyobb volt, utalva eredményeinkre, melyek szerint a CLL-es betegek szérumban mért magasabb TK1-aktivitás rendszerint előrehaladottabb Rai stádiummal, CD38 és Zap70 pozitívitással társult (*Agbay, 2016*).

A korábban publikált eredményekhez hasonlóan a 13-as és 17-es kromoszóma deléciója (del(13q) és del(17p13)), a 12-es kromoszóma triszómiája és a 11-es kromoszóma deléciója (del(11q22)) az általunk vizsgált betegcsoportban sem befolyásolta a mért TK1-értékeket (*Konoplev, 2010*).

A TK1-aktivitás jól korrelált a fehérvérsejtszámmal és az abszolút B-sejtszámmal, hasonlóan a Hallek és mtsai által korábban leírtakhoz (*Hallek, 1999*).

Minden laboratórium számára ajánlott, hogy saját referencia-tartományokat határozzon meg, ugyanis már kis etnikai vagy életstílusbeli különbségek is okozhatnak jelentős eltéréseket, az életkor és a nem befolyásoló szerepe mellett. Mindezek a különbségek igen megnehezítik általánosan alkalmazható referencia-tartományok kialakítását, annak ellenére is, ha a mérési módszer visszakövethető a referenciamódszerhez (*Panteghini, 2012; Henny, 2013*). Mivel egy laboratórium számára igen költséges feladat a referencia-tartományok megállapítása, egy lehetséges megoldás az, ha az összes, ugyanazzal a módszerrel mérő laboratóriumot bevonjuk egy homogén populáció vizsgálatába (*Henny, 2013*). Siest és mtsai arra hívták fel a figyelmet, hogy az egészségest a patológiástól elkülönítő határvonalak nem élesek, és a referencia-tartományokat és határértékeket úgy kell megállapítani, hogy azok a leginkább elő tudják segíteni a klinikai döntéshozatalt (*Siest, 2013*).

A CLL-es betegpopuláción végzett vizsgálatunk keresztmetszeti jellegénél fogva nem tette lehetővé a TK1-aktivitás prognosztikai markerként történő használhatóságának értékelését; ehhez egy prospektív tanulmányra lett volna szükség. Bár a CLL-es betegpopulációnk 115 főből állt, az egyes Rai stádiumokban és a CD38 és Zap70 expresszió megléte vagy hiánya alapján definiált alcsoportokban igen eltérő számú beteg volt, ami a statisztikai eredményeket torzíthatta. Az általunk megállapított életkor-specifikus referencia-tartományokat is szükségesnek látjuk más egészséges populációk vizsgálatával validálni.

Munkánk során megállapítottuk, hogy a szérumban mért TK1-aktivitás az életkor előrehaladtával jelentősen csökken az egészséges egyéneknél, ami szükségessé teszi életkor-specifikus referencia-tartományok használatát. Ezen kívül segíthet elkülöníteni a Rai 0 stádiumban lévő CLL-es betegeket az egészségesektől.

Javasoljuk, hogy a laboratóriumok egy kisebb létszámú, egészséges populáció vizsgálatával ellenőrizték, hogy a vizsgált analitra a gyártó által megadott referencia tartomány alkalmazható-e az általuk vizsgált populáción; amennyiben nem, javasolt saját referencia tartomány meghatározása.

7. Összefoglalás

A laboratóriumi folyamatok komplex rendszerét a preanalitikai, analitikai és posztanalitikai fázisok egymásba kapcsolódó integrációja adja. Míg az automatizált laboratóriumi eljárásokról számos tanulmány látott napvilágot az egyes fázisok elemzésére és a lehetséges hibák felderítésére, addig a speciális vizsgálatok vonatkozásában kevés vizsgálati eredmény született. Célunk az volt, hogy a különböző malignus megbetegedések esetében folyadék-biopsziás mintavétel után alkalmazott speciális, immun-alapú laboratóriumi vizsgálatok preanalitikai, analitikai és posztanalitikai evaluálásához hozzájáruljunk és megvizsgáljuk, hogy ezen folyamatok hogyan befolyásolják az eredmények interpretációját.

A preanalitikai folyamatok vizsgálata során azt találtuk, hogy gyermekkori ALL-ben szenvedő betegek 15. napi csontvelői mintáinak 12,5%-a, míg 33. napi csontvelői mintáinak 14%-a volt perifériás vérrel kontaminált és így nem volt alkalmas az áramlási citometriai rizikóbecslésre. ALL-es gyermekek likvor mintáiban az esetek 45%-ában találtunk perifériás vér kontaminációt és 54%-ában volt az élő sejtek aránya 30% alatti. Ugyanakkor ezen kis élő sejtarányú minták felében ki tudtunk mutatni patológiás sejteket, ami arra utal, hogy nem lehet egyértelmű cut-off értéket meghatározni az élő sejtarány tekintetében a minta értékelhetőségére vonatkozóan. Stabilizátort tartalmazó mintavételi cső alkalmazásával szignifikánsan csökkent a 30% alatti élő sejtarányt tartalmazó likvor minták aránya (41% vs 17%).

Az analitikai folyamatok vizsgálatakor disszeminált tumorsejtek kimutatására szolid tumorer esetében az immunhisztokémia és áramlási citometria egyezését 91%-nak találtuk, neuroblasztóma esetén 65%-nak. A *de novo* neuroblasztóma sejtek detektálásában az áramlási citometria diagnosztikai hatékonysága jobbnak adódott, mint az immunhisztokémiai módszeré (100% vs 86%), ez a különbség még kifejezettebb volt minimális reziduális betegség keresése során (92% vs 68%), különösen a hypoplasiás csontvelői környezetben. A szolid tumorer esetében a disszeminált tumorsejtek detektálására az immunhisztokémia diagnosztikai hatékonyságát találtuk jobbnak az áramlási citometriánál (100% vs 91%).

A posztanalitikai folyamatok közül a timidin-kináz enzimre vonatkozó életkor-specifikus referencia-tartományok meghatározását végeztük el. A fiatal (18-35 éves) populációban <30 U/L, a középkorúak (36-60 évesek) esetében <25 U/L, míg az időseknél (60 év felett) <19 U/L referencia-határértékeket állapítottunk meg. CLL-es betegeinkben az előrehaladottabb Rai stádium egyértelműen magasabb szérum timidin-kináz szintekkel járt együtt. Korrelációt találtunk a fehérvérsejtszám, valamint az abszolút B-sejtszám és a timidin-kináz szintje között. A

CLL-es betegeket az egészségesektől elkülönítő timidin-kináz értéket ROC analízissel a szakirodalomban fellelhető adatokkal összhangban 10,5 U/L-nek találtuk.

8. Summary

Laboratory testing is a complex process, including preanalytical, analytical and postanalytical phase. While several studies dealt with the description of these phases and evaluation of possible errors in automated laboratory systems, very few papers were published in the field of more sophisticated, specialized techniques. We aimed to evaluate the preanalytical, analytical and postanalytical phase of some immune-based laboratory methods which were carried out from liquid biopsy specimens.

Investigation of the preanalytical phase revealed that 12.5% of day 15 and 14% of day 33 bone marrow samples of children suffering from ALL were contaminated by peripheral blood, thus were inadequate for flow cytometry risk assessment. With the examination of the CSF samples of these children we found 45% of them to be contaminated with peripheral blood. Viable cell ratio was below 30% in 54% of the samples, making it difficult to correctly evaluate these specimens. However, 50% of these samples were positive for pathological cells, therefore a clear cutoff of viable cell ratio can not be exactly established for rejecting the CSF sample as inadequate in the context of lymphoblastic infiltration in childhood ALL. When using stabilizer, the number of the samples having <30% viable cells were significantly lower than in native samples (17% vs. 41%).

Investigation of the analytical phase revealed that immunohistochemistry and flow cytometry showed 91% concordance in detecting disseminated cells from various types of solid tumors, while in the case of neuroblastoma the concordance was 65%. Flow cytometry was superior in detecting neuroblastoma cells in *de novo* cases (100% vs. 86%) and even more efficient in detecting minimal residual disease (92% vs. 68%), especially in hypoplastic bone marrow. In the case of various types of solid tumors we found immunohistochemistry to be more effective than flow cytometry (100% vs. 91%) in tumor cell detection.

Investigation of the postanalytical phase was focused on defining age-specific reference ranges for serum thymidine kinase activity. Reference limits were found as follows: <30 U/L for young (aged 18-35 years), <25 U/L for middle-aged (36-60 years), and <19 U/L for elderly (>60 years) adults. In CLL patients more advanced Rai stage was associated with higher levels of serum thymidine kinase activity. There was correlation between white blood cell count and absolute B cell count and thymidine kinase activity. In line with published literature receiver operator characteristics analysis found a cutoff value of 10.5 U/L of serum thymidine kinase activity that distinguished CLL patients from healthy individuals.

9. A disszertáció új eredményei, megállapításai, klinikai jelentősége

1. Preanalitikai fázisra vonatkozó megállapítások:

a) Gyermekkori ALL-ben szenvedő betegek 15. napi csontvelői mintáinak 12,5%-a, míg 33. napi csontvelői mintáinak 14%-a volt perifériás vérrel kontaminált és így nem volt alkalmas az áramlási citometriai rizikóbecslésre.

b) ALL-es gyermekek likvor mintáiban az esetek 45%-ában találtunk perifériás vér kontaminációt és 54%-ában volt az élő sejtek aránya 30% alatti, ami miatt a minta korlátozottan volt értékelhető. Ugyanakkor ezen alacsony élő sejtet tartalmazó minták 28%-ában ki tudtunk mutatni patológiás sejtet, ami arra utal, hogy nem határozhatunk meg cut-off értéket az élő sejtek arányára vonatkozóan ha a likvor limfoblasztos infiltrációját vizsgáljuk ALL-ben.

c) Stabilizátort tartalmazó mintavételi cső alkalmazásával szignifikánsan csökkent a 30% alatti élő sejtarányt tartalmazó likvor minták aránya (41% vs 17%; $p=0,05$).

2. Analitikai fázisra vonatkozó megállapítások:

a) Disszeminált tumorsejtek kimutatására szolid tumorok esetében az immunhisztokémia és áramlási citometria egyezése 91%, neuroblasztóma esetén 65%.

b) A de novo neuroblasztóma sejtek detektálásában az áramlási citometria diagnosztikai hatékonysága jobb mint az immunhisztokémiai módszeré (100% vs 86%), ez a különbség még kifejezettebb minimális reziduális betegség detektálása során (92% vs 68%), különösen a hypoplasiás csontvelői környezetben.

c) A szolid tumorok esetében a disszeminált tumorsejtek detektálására az immunhisztokémia diagnosztikai hatékonysága jobb mint az áramlási citometriai módszeré (100% vs 91%).

3. Posztanalitikai fázisra vonatkozó megállapítások:

a) A timidin kináz enzim aktivitása a nemek között nem mutat eltérést, ugyanakkor az életkor előrehaladtával szignifikánsan csökken, ezért szükséges életkor-specifikus referencia tartományok meghatározása.

b) Egészséges populációban meghatároztuk a timidin kináz aktivitás életkor-specifikus referencia tartományait az alábbiak szerint: 18-35 év között: <30 U/L; 36-60 év között: <25 U/L; 60 év felett: <19 U/L

c) Meghatároztuk azt a timidin kináz enzimaktivitás értéket (10,5 U/L), mely elkülöníti a Rai 0 stádiumú CLL betegeket az egészséges egyénektől.

10. Irodalomjegyzék

- Abrahamsen, J. F., Lund-Johansen, F., Laerum, O. D., Schem, B. C., Sletvold, O., & Smaaland, R. (1995). Flow cytometric assessment of peripheral blood contamination and proliferative activity of human bone marrow cell populations. *Cytom Part A*, 19(1):77-85.
- Agbay, R. L. M. C., Jain, N., Loghavi, S., Medeiros, L. J., & Khoury, J. D. (2016). Histologic transformation of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Am J Hematol*, 91: 1036-43.
- Aldawood, A. M., Kinkade, Z., Rosado, F. G., Esan, O. A., Gibson, L. F., & Vos, J. A. (2015). A Novel Method to Assess Bone Marrow Purity is Useful in Determining Blast Percentage by Flow Cytometry in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplasia. *Ann Hematol Oncol*, 2(5):id1038.
- Alix-Panabieres, C., & Pantel, K. (2015). Liquid biopsy in cancer patients: advances in capturing viable CTCs for functional studies using the EPISPOT assay. *Expert Rev Mol Diagn*, 15:1411-1417.
- Almeida, S. M., Nakanishi, E., Conto, A. J., Souza, L. P., Antonelli Filho, D., & Roda, C. D. (2007). Cerebrospinal fluid cytological and biochemical characteristics in the presence of CNS neoplasia. *Arq Neuropsiquiatr*, 65(3B):802-809.
- Andree, K. C., van Dalum, G., & Terstappen, L. W. (2016). Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. *Mol Oncol*, 10(3):395-407.
- Anner, R. M., & Drewinko, B. (1977). Frequency and significance of bone marrow involvement by metastatic solid tumors. *Cancer*, 39:1337-1344.
- Antal-Szalmás, P., Ivády, G., Molnár, A., Hevessy, Z., Kissné Sziráki, V., Oláh, A., et al. (2007). "Turnaround time": a laboratóriumi eredménykiadás hatékonyságának új paramétere. *Orv Hetil*, 148(28):1317-1327.
- Ashworth, T. R. (1869). A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med*, 14:146-149.
- Bahlo, J., Pflug, N., Elter, T., Bauer, K., Eichhorst, B., Bergmann, M., et al. (2011). Proposal of a prognostic score for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia based on an overall survival analysis of three German CLL study group Phase III trials. *Blood*, 118(Suppl. 1), abstr. 2831.
- Barnett, D., Louazo, R., Gambell, P., De, J., Oldaker, T., Hanson, C. A., & on behalf of ICSH/ICCS Working Group. (2013). Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - Part IV - Postanalytic Considerations. *Cytom Part B-Clin Cy*, 84B:309-314.
- Barth, J. H. (2012). Clinical quality indicators in laboratory medicine. *Ann Clin Biochem*, 49:9-16.
- Berk, A. J., & Clayton, D. A. (1973). A genetically distinct thymidine kinase in mammalian mitochondria. Exclusive labeling of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem*, 248:2722-2729.
- Braun, S., & Naume, B. (2005). Circulating and disseminated tumor cells. *J Clin Oncol*, 23:1623-1626.
- Braun, S., Vogl, F. D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M. P., Coombes, R. C., et al. (2005). A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Eng J Med*, 353(8):793-802.
- Brem, S. S., Bierman, P. J., Black, P., Blumenthal, D. T., Brem, H., Chamberlain, M. C., & National Comprehensive Cancer Network. (2005). Central nervous system cancers: clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*, 3(5):644-690.
- Brodeur, G. M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N. L., Castel, V., Castleberry, R. P., et al. (1993). Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment. *J Clin Oncol*, 11:1466-1477.
- Brodeur, G. M., Seeger, R. C., Barrett, A., Berthold, F., Castleberry, R. P., D'Angio, G., et al. (1988). International criteria for diagnosis, staging and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 6:1874-1881.
- Chang, A., Benda, P. M., Wood, B. L., & Kussick, S. J. (2003). Lineage-specific identification of nonhematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Am J Clin Pathol*, 119(5):643-655.

- Chen, Z. H., Huang, S. Q., Wang, Y., Yang, A. Z., Wen, J., Xu, X. H., et al. (2011). Serological thymidine kinase 1 is a biomarker for early detection of tumours: a health screening study on 35 365 people, using a sensitive, chemiluminescent dot blot assay. *Sensors*, 11:11064-11080.
- Chen, Z. H., Zhou, H., Li, S., He, E., Hu, J., Zhou, J., & Skog, S. (2008). Serological thymidine kinase 1 (STK1) indicates an elevated risk for the development of malignant tumors. *Anticancer Res*, 28:3897-3907.
- Chow, G., & Schmidley, J. W. (1984). Lysis of erythrocytes and leukocytes in traumatic lumbar punctures. *Arch Neurol*, 41:1084-1085.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). *Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline, 3rd ed. CLSI document C28-A3*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cloos, J., Harris, J. R., Janssen, J. J., Kelder, A., Huang, F., Sijm, G., et al. (2018). Comprehensive Protocol to Sample and Process Bone Marrow for Measuring Measurable Residual Disease and Leukemic Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia. *J Vis Exp*, 133:e56386.
- Colorado, M., Cuadrado, M. A., Insunza, A., Mazonza, F., Acinas, O., & Iriando, A. (2010). Simultaneous cytomorphologic and multiparametric flow cytometric analysis on lymph node samples is faster than and as valid as histopathologic study to diagnose most non-Hodgkin lymphomas. *Am J Clin Pathol*, 133(1):83-91.
- Cornes, M., van Dongen-Lases, E., Grankvist, K., Ibarz, M., Kristensen, G., Lippi, G., et al. (2017). Order of blood draw. *Clin Chem Lab Med*, 55(1):27-31.
- Corver, W. E., & Cornelisse, C. J. (2002). Flow cytometry of human solid tumours: clinical and research applications. *Curr Diagn Pathol*, 8:249-267.
- Craig, F. E., & Foon, K. A. (2008). Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*, 111:3941-3967.
- Csáthy, L., Kappelmayer, J., Szegedi, I., Kiss, C., & Hevessy, Z. (2011). Classical and atypical neuroblastoma—Case reports. *Cytometry B Clin Cytom*, 80B:134-136.
- Damle, R. N., Ghiotto, F., Valetto, A., Albesiano, E., Fais, F., Yan, X. J., et al. (2002). B-cell chronic lymphocytic leukemia express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood*, 99:4087-4093.
- Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S., et al. (1999). Ig V mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94:1840-1847.
- D'Arena, G., Tarnani, M., Rumi, C., Vaisitti, T., Aydin, S., de Filippi, R., et al. (2007). Prognostic significance of combined analysis of Zap70 and CD38 in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*, 82:787-791.
- Dasgupta, A., Lim, A. R., & Ghajar, C. M. (2016). Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis? *Mol Oncol*, 11:40-61.
- Davis, B. H., Dasgupta, A., Kussick, S., Han, J. Y., Estrellado, A., & on behalf of ICSH/ICCS Working Group. (2013). Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - Part II - Preanalytical issues. *Cytom B Clin Cy*, 84B:286-290.
- de Graaf, M. T., de Jongste, A. H., Kraan, J., Boonstra, J. G., Sillevius Smitt, P. A., & Gratama, J. W. (2011). Flow cytometric characterization of cerebrospinal fluid cells. *Cytometry B Clin Cytom*, 80B:271-281.
- de Graaf, M. T., van den Broek, P. D., Kraan, J., Luitwieler, R. L., van den Bent, M. J., Boonstra, J. G., et al. (2011). Addition of serum-containing medium to cerebrospinal fluid prevents cellular loss over time. *J Neurol*, 258(8):1507-1512.
- de Haas, V., Ismaila, N., Advani, A., Arber, D. A., Dabney, R. S., Patel-Donnelly, D., et al. (2018). Initial diagnostic work-up of acute leukemia: ASCO clinical practice guideline endorsement of the College of American Pathologists and American Society of Hematology guideline. *J Clin Oncol*, 37:239-253.

- de Jongste, A. H., Kraan, J., van der Broek, P. D., Brooimans, R. A., Bromberg, J. E., van Montfort, K. A., et al. (2014). Use of TransFix™ cerebrospinal fluid storage tubes prevents cellular loss and enhances flow cytometric detection of malignant hematological cells after 18 hours of storage. *Cytometry B Clin Cytom*, 86(4): 272-279.
- Delgado, J. A., Guillén-Grima, F., Moreno, C., Panizo, C., Pérez-Robles, C., Mata, J. J., et al. (2017). A simple flow-cytometry method to evaluate peripheral blood contamination of bone marrow aspirates. *J Immunol Methods*, 442:54-58.
- Dutch Childhood Oncology Group, te Loo, D. M., Kamps, W. A., van der Does-van der Berg, A., van Wering, E. R., & de Graaf, S. S. (2006). Prognostic significance of blasts in the cerebrospinal fluid without pleiocytosis or a traumatic lumbar puncture in children with acute lymphoblastic leukemia: experience of the Dutch Childhood Oncology Group. *J Clin Oncol*, 24:2332-2336.
- Dux, R., Kindler-Röhrborn, A., Annas, M., Faustmann, P., Lennartz, K., & Zimmermann, C. W. (1994). A standardized protocol for flow cytometric analysis of cells isolated from cerebrospinal fluid. *J Neurol Sci*, 121:74-78.
- Dürig, J., Naschar, M., Schmücker, U., Renzig-Köhler, K., & Hölter, T. (2002). CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 16:30-35.
- Dworzak, M. N., Buldini, B., Gaipa, G., Ratei, R., Hrusak, O., Luria, D., et al. (2018). AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytom B Clin Cy*, 94(1):82-93.
- Dworzak, M. (2009). *ALL IC BFM Flow MRD SOP*. Forrás: http://www.bialaczka.org/wp-content/uploads/2016/10/ALLIC_BFM_2009.pdf
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8:874-879.
- Eskey, C. J., & Ogilvy, C. S. (2001). Fluoroscopy-guided lumbar puncture: decreased frequency of traumatic tap and implications for the assessment of CT-negative acute subarachnoid hemorrhage. *Am J Neuroradiol*, 22:571-576.
- Farber, S., Diamond, L. K., Mercer, R. D., Sylvester, R. F., & Wolff, J. A. (1948). Temporary remissions in acute leukaemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin). *N Eng J Med*, 238:787-793.
- Faria, M., Halquist, M. S., Kindt, E., Li, W., Karnes, H. T., & O'Brien, P. J. (2012). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of thymidine kinase activity in human serum by monitoring the conversion of 3'-deoxy-3'-fluorothymidine to 3'-deoxy-3'-fluorothymidine monophosphate. *J of Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 907:13-20.
- Ferreira, M. M., C., R. V., & Jeffrey, S. S. (2016). Circulating tumor cell technologies. *Molecular Oncology*, 10:374-394.
- Ferreira-Facio, C. S., Milito, C., Botafogo, V., Fontana, M., Thiago, L. S., Oliveira, E., et al. (2013). Contribution of multiparameter flow cytometry immunophenotyping to the diagnostic screening and classification of pediatric cancer. *PLoS One*, 8(3):e55534.
- Finkelstein, J. Z., Ekert H, Issacs, H., & Higgins, G. (1970). Bone marrow metastases in children with solid tumors. *Am J Dis Child*, 119:49-52.
- Fockens, J. A., Romain, S., Look, M. P., Martin, P. M., & Klijn, J. G. (2001). Thymidine kinase and thymidilate synthase in advanced breast cancer: response to tamoxifen and chemotherapy. *Cancer Res*, 61:1421-1425.
- Fujiwaki, R., Hata, K., Moriyama, M., Iwanari, O., Katabuchi, H., Okamura, H., & Miyazaki, K. (2001). Clinical value of thymidine kinase in patients with cervical carcinoma. *Oncology*, 61:47-51.
- Funaro, A., Morra M, Calosso, L., Zini, M. G., Ausiello, C. M., & Malavasi, F. (1997). Role of the human CD38 molecule in B cell activation and proliferation. *Tissue Antigens*, 49:7-15.

- Furman, R. R. (2010). Prognostic markers and stratification of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 1:77-81.
- Gajjar, A., Harrison, P. L., Sandlund, J. T., Rivera, G. K., Ribeiro, R. C., Rubnitz, J. E., et al. (2000). Traumatic lumbar puncture at diagnosis adversely affects outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 96(10):3381-3384.
- Graf, B. L., Korte, W., Schmid, L., Schmid, U., & Cogliatti, S. B. (2005). Impact of aspirate smears and trephine biopsies in routine bone marrow diagnostics: a comparative study of 141 cases. *Swiss Med Wkly*, 135(9-10):151-159.
- Greenberg, R. G., Smith, P. B., Cotten, C. M., Moody, M. A., Clark, R. H., & Benjamin Jr, D. K. (2008). Traumatic lumbar punctures in neonates: test performance of the cerebrospinal fluid white blood cell count. *Pediatr Infect Dis*, 27(12):1047-1051.
- Gronowitz, J. S., & Källander, C. F. (1980). Optimized assay for thymidine kinase and its application to the detection of antibodies against herpes simplex virus type 1 and 2-induced thymidine kinase. *Infect Immun*, 29:425-434.
- Gronowitz, J. S., Hagberg, H., Källander, C. F., & Simonsson, B. (1983). The use of serum deoxythymidine kinase as a prognostic marker, and in the monitoring of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer*, 47:487-495.
- Gruber, M., & Durham, H. E. (1896). Eine neue Methode zur raschen Erkennung des Cholera vibrio und des Typhusbacillus. *Münchener Medicinische Wochenschrift*, 43:285-286.
- Hagberg, H., Gronowitz, S., Killander, A., & Källander, C. F. (1984). Serum thymidine kinase in vitamin B12 deficiency. *Scand J Hematol*, 32:41-45.
- Hallek, M., Wanders, L., Strohmeyer, S., & Emmerich, B. (1992). Thymidine kinase: a tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range for potential clinical applications. *Ann Hematol*, 65:1-5.
- Hallek, M., Langenmayer, I., Nerl, C., Knauf, W., Dietzfelbinger, H., Adorf, D., et al. (1999). Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 93:1732-1737.
- Hallek, M., (2019). Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*, 94(11):1266-1287.
- Hawkins, R. (2012). Managing the pre- and post-analytical phases of the total testing process. *Ann Lab Med*, 32(1):5-16.
- Henny, J. (2013). Multicenter reference intervals studies: a promising perspective for the future? *Clin Chem Lab Med*, 51:1335-1338.
- His, A., Nguyen, T. D., Frater, J., Hassan, A., & Kreisel, F. (2014). Hemodilute Bone Marrow Aspirates Adversely Affect Timely Diagnosis, Subclassification, and Follow-Up of Acute Leukemia. *Am J Clin Pathol*, 142(suppl):A095.
- Hoffmann, O., Schröer-Zündorf, I. A., Kasimir-Bauer, S., Oberhoff, C., Kimmig, R., & Heubner, M. (2015). Evaluation of the prognostic significance of disseminated tumor cells in the bone marrow of primary, non-metastatic breast cancer patients after a 7-year follow-up. *Arch Gynecol Obstet*, 292(5):1117-1125.
- Houstek, J., Masopust, J., Kithier, K., & Rádl, J. (1968). Hepatocellular carcinoma in association with a specific fetal alpha-1-globulin, fetoprotein. *J Pediatr*, 72:186-193.
- Hovestadt, A., Henzen-Logmans, S. C., & Vecht, C. J. (1990). Immunohistochemical analysis of the cerebrospinal fluid for carcinomatous and lymphomatous leptomeningitis. *Br J Cancer*, 62:653-654.
- Hunger, S., & Mullighan, G. C. (2015). Acute lymphoblastic leukemia in children. *N Eng J Med*, 373:1541-1552.

- Hus, I., Podhorecka, M., Bojarska-Junak, A., Roliński, J., Schmitt, M., Sieklucka, M., et al. (2006). The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol*, 17:683-690.
- Hyun, B. H., Gulati, G. H., & Ashton, J. K. (1988). Bone Marrow Examination: Techniques and Interpretation. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 2(4):513-523.
- Johansson, U., Bloxham, D., Couzens, S., Jesson, J., Morilla, R., Erber, W., et al. (2014). Guidelines on the use of multicolour flow cytometry in the diagnosis of haematological neoplasms. British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol*, 165(4):455-488.
- Johansson, U., Crawford, M., Hughes, M., Day, K., Harrison, D., & Almond, T. (2015). *Infiltration of CNS by acute leukemia. Analysis of fresh and TransFix stabilised CSF*. Forrás: https://www.cytomark.co.uk/downloads/Infiltration_of_CNS_by_acute_leukemia_ESCCA_Oct_2015.pdf
- Kalina, T., Flores-Montero, J., van der Velden, V. H., Martin-Ayuso, M., Böttcher, S., Ritgen, M., et al. (2012). EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*, 26(9):1986-2010.
- Källander, C. F., Simonsson, B., Hagberg, H., & Gronowitz, J. S. (1984). Serum deoxythymidine kinase gives prognostic information in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 54:2450-2455.
- Kamentsky, L. A., Melamed, M. R., & Derman, H. (1965). Spectrophotometer: New Instrument for Ultrarapid Cell Analysis. *Science*, 150:630-631.
- Kang, Y., & Pantel, K. (2013). Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell*, 23:573-581.
- Katona, É., Ajzner, É., Tóth, K., Kárpáti, L., & Muszbek, L. (2001). Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J Immunol Methods*, 258(1-2):127-135.
- Kaur, G., Basu, S., Kaur, P., & Sood, T. (2011). Metastatic Bone Marrow Tumors: Study of Nine Cases and Review of the Literature. *J Blood Disord Transfus*, 2:110.
- Kleine, T. O., Albrecht, J., & Zöfel, P. (1999). Flow cytometry of cerebrospinal fluid (CSF) Lymphocytes: alterations of blood/CSF ratios of lymphocyte subsets in inflammation disorders of human central nervous system (CNS) . *Clin Chem Lab Med*, 37:231-241.
- Kohler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495-497.
- Konoplev, S. N., Fritsche, H. A., O'Brien, S., Wierda, W. G., Keating, M. J., Gornet, T. G., et al. (2010). High serum thymidine kinase 1 level predicts poorer survival in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol*, 134:472-477.
- Kornberg, A., Lehman, I. R., Bessman, M. J., & Simms, E. S. (1989). Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Biochim Biophys Acta*, 1000:57-58.
- Kraan, J., Gratama, J. W., Haioun, C., Orfao, A., Plonquet, A., Porwit, A., et al. (2008). Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid. *Curr Protoc Cytom*, Chapter 6:Unit 6.25.
- Krishnan, C., George, T. I., & Arber, D. A. (2007). Bone marrow metastases: a survey of nonhematologic metastases with immunohistochemical study of metastatic carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 15:1-7.
- Krleza, J. L., Honovic, L., Tanaskovic, J. V., Podolar, S., Rimac, V., & Jokic, A. (2019). Post-analytical laboratory work: national recommendations from the Working Group for Post-analytics on behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Biochem Med (Zagreb)*, 29(2):020502.
- Laposata, M., & Dighe, A. (2007). "Pre-pre" and "post-post" analytical error: high-incidence patient safety hazards involving the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med*, 45:712-719.

- Lauer, S. J., Kirchner, P. A., & Camitta, B. M. (1989). Identification of leukemic cells in the cerebrospinal fluid from children with acute lymphoblastic leukemia: advances and dilemmas. *Am J Pediatr Hematol/Oncol*, 11:64.
- Lequin, R. M. (2005). Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 51(12):2415-2418.
- Letestu, R., Lévy, V., Eclache, V., Baran-Marszak, F., Vaur, D., Naguib, D., et al. (2010). Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood*, 116:4588-4590.
- Lippi, G., Banfi, G., Church, S., Cornes, M., de Carli, G., Grankvist, K., et al. (2015). Preanalytical quality improvement. In pursuit of harmony, on behalf of European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working group for Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clin Chem Lab Med*, 53(3): 357.370.
- Lippi, G., Betsou, F., Cadamuro, J., Cornes, M., Fleischhacker, M., Fruekilde, P., et al. (2019). Preanalytical challenges - time for solutions. *Clin Chem Lab Med*, 57(7):974-981.
- Lippi, G., Cadamuro, J., von Meyer, A., & Simundic, A. M. (2018). Practical recommendations for managing hemolyzed samples in clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med*, 56(5):718-727.
- Magnac, C., Porcher, R., Davi, F., Nataf, J., Payelle-Brogard, B., Tang, R. P., et al. (2003). Predictive value of serum thymidine kinase for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia*, 17:133-137.
- Mahmoud, H. H., Rivera, G. K., Hancock, M. L., Krance, R. A., Kun, L. E., Behm, F. G., et al. (1993). Low leukocyte counts with blast cells in cerebrospinal fluid of children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *N Eng J Med*, 329(5):314-319.
- Malavasi, F., Deaglio, S., Rajendra, D., Cutrona, G., Ferrarini, M., & Chiorazzi, N. (2011). CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood*, 118:3470-3478.
- McIntosh, S., & Ritchey, A. K. (1986). Diagnostic problems in cerebrospinal fluid of children with lymphoid malignancies. *Am J Pediatr Hematol/Oncol*, 8(1):28-31.
- McPherson, R. A., & Pincus, M. R. (2011). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods 22nd ed.* Philadelphia, PA: Elsevier Saunders.
- Miles, L. E., & Hales, C. N. (1968). Labelled Antibodies and Immunological Assay Systems. *Nature*, 219:186-189.
- Moldavan, A. (1934). Photo-electric Technique for the Counting of Microscopical Cells. *Science*, 80:188-189.
- Molica, S. (2013). Is it perhaps time for a comprehensive international prognostic index in chronic lymphocytic leukemia? *Leuk Lymphoma*, DOI: 10.3109/10428194.2013.825908.
- Molica, S., Giannarelli, D., Gentile, M., Cutrona, G., di Renzo, N., di Raimondo, F., et al. (2013). The utility of two prognostic models for predicting time to first treatment in early chronic lymphocytic leukemia patients: results of a comparative analysis. *Leuk Res*, 37:943-947.
- Molica, S., Giannarelli, D., Mirabelli, R., Levato, L., Russo, A., Linardi, M., et al. (2015). Unavailability of thymidine kinase does not preclude the use of German comprehensive prognostic index: results of an external validation analysis in early chronic lymphocytic leukemia and comparison with MD Anderson Cancer Center model. *Eur J Haematol*, 96:72-77.
- Molino, A., Colombatti, M., Bonetti, F., Zardini, M., Pasini, F., Perini, A., et al. (1991). A comparative analysis of three different techniques for the detection of breast cancer cells in bone marrow. *Cancer*, 67:1033-1036.
- Naeem, M., Dahiya, M., Clark, J. I., Creech, S. D., & Alkan, S. (2002). Analysis of c-kit protein expression in small-cell lung carcinoma and its implication for prognosis. *Hum Pathol*, 33:1182-1187.

- Nisman, B., Allweis, T., Kadouri, L., Mali, B., Hamburger, T., Baras, M., et al. (2013). Comparison of diagnostic and prognostic performance of two assays measuring thymidine kinase 1 activity in serum of breast cancer patients. *Clin Chem Lab Med*, 51:439-447.
- O'Neil, K. L., Buckwalter, M. R., & Murray, B. K. (2001). Thymidine kinase: diagnostic and prognostic potential. *Expert Rev Mol Diagn*, 1:428-433.
- Öhrvik, A., Lindh, M., Einarsson, R., Grassi, J., & Eriksson, S. (2004). Sensitive nonradiometric method for determining thymidine kinase 1 activity. *Clin Chem*, 50:1597-1606.
- Pak, M. G., Shin, D. H., Lee, C. H., & Lee, M. K. (2012). Significance of EpCAM and TROP2 expression in non-small cell lung cancer. *World J Surg Oncol*, 10:53.
- Panteghini, M., & Ceriotti, F. (2012). Obtaining reference intervals traceable to reference measurement systems: is it possible, who is responsible, what is the strategy? *Clin Chem Lab Med*, 50:813-817.
- Pappano, D. (2010). "Traumatic tap" proportion in pediatric lumbar puncture. *Pediatr Emerg Care*, 26(7):487-489.
- Park, S. J., Park, C. J., Kim, S., Jang, S., Chi, H. S., Kim, M. J., et al. (2010). Detection of bone marrow metastases of neuroblastoma with immunohistochemical staining of CD56, chromogranin A and synaptophysin. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 18:348-352.
- Petzold, A., Sharpe, L. T., & Keir, G. (2006). Spectrophotometry for cerebrospinal fluid pigment analysis. *Neurocrit Care*, 4(2):153-162.
- Pflug, N., Bahlo, J., Shanafelt, T. D., Eichhorst, B. F., Bergmann, M. A., Elter, T., et al. (2014). Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 124(1):49-62.
- Plebani, M. (2006). Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med*, 44(6):750-759.
- Plebani, M. (2009). Exploring the iceberg of errors in laboratory medicine. *Clin Chim Acta*, 404(1):16-23.
- Plebani, M. (2015). Diagnostic errors and laboratory medicine. *eJIFCC*, 26(1):7-14.
- Plebani, M., Sciacovelli, L., & Aita, A. (2017). Quality indicators for the total testing process. *Clin Lab Med*, 37:187-205.
- Pont, J., Souvignet, A., Campos, L., Plesa, A., Bulabois, B., Pernollet, M., et al. (2018). Accurate quantification of fourteen normal bone marrow cell subsets in infants to the elderly by flow cytometry. *Cytom B Clin Cy*, 94B:783-792.
- Quijano, S., López, A., Manuel Sancho, J., Panizo, C., Debén, G., Castilla, C., et al. (2009). Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry. *J Clin Oncol*, 27(9):1462-1469.
- Racila, E., Euhus, D., Weiss, A. J., Rao, C., McConnell, J., Terstappen, L. W., & Uhr, J. W. (1998). Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:4589-4594.
- Radu, L. E., Colita, A., Pasca, S., Tomuleasa, C., Popa, C., Serban, C., et al. (2020). Day 15 and day 33 minimal residual disease assessment for acute lymphoblastic leukemia patients treated according to the BFM ALL IC 2009 protocol. Single-center experience of 133 cases. *Front Oncol*, 10:923.
- Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N., & Pasternack, B. S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46(2):219-234.
- Reichard, P., & Estborn, B. (1951). Utilization of deoxyribosides in the synthesis of polynucleotides. *J Biol Chem*, 188:839-846.
- Riehm, H., Gadner, H., Henze, G., Langermann, H. J., & Odenwald, E. (1980). The Berlin Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment Study 1970-1976. *Pediatr Hemat Oncol*, 2(4):299-306.

- Rivkina, A., Vitols, G., Murovska, M., & Lejniece, S. (2011). Identifying the stage of new CLL patients using TK, ZAP-70, CD38 levels. *Exp Oncol*, 33:99-103.
- Ross, J. S., & Slodkowska, E. A. (2009). Circulating and disseminated tumor cells in the management of breast cancer. *Am J Clin Pathol*, 132:237-245.
- Röcken, M. (2010). Early tumor dissemination, but late metastasis: insights into tumor dormancy. *J Clin Invest*, 120(6):1800-1803.
- Sagatys, E. M., & Zhang, L. (2012). Clinical and laboratory prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Control*, 19:18-25.
- Sah, S. P., Matutes, E., Wotherspoon, A. C., Morilla, R., & Catovsky, D. (2003). A comparison of flow cytometry, bone marrow biopsy, and bone marrow aspirates in the detection of lymphoid infiltration in B cell disorders. *J Clin Pathol*, 56:129-132.
- Sai, B. Q., & Xiang, J. J. (2018). Disseminated tumour cells in bone marrow are the source of cancer relapse after therapy. *J Cell Mol Med*, 22:5776-5786.
- Schrapppe, M., Möricke, A., & Modlich, S. (2009). *AIEOP BFM 2009 Protocol*. Forrás: https://www.kinderkrebsinfo.de/health_professionals/clinical_trials/closed_trials/aieop_bfm_all_2009/index_eng.html
- Sciacovelli, L., Aita, A., Padoan, A., Pelloso, M., Antonelli, G., Piva, E., et al. (2016). Performance criteria and quality indicators for the post-analytical phase. *Clin Chem Lab Med*, 54(7):1169-1176.
- Sciacovelli, L., Lippi, G., Sumarac, Z., West, J., del Pino Castro, I. G., Vieira, K. F., et al. (2017). Quality indicators in laboratory medicine the status of the progress of IFCC Working Group "Laboratory Errors and Patient Safety" project. *Clin Chem Lab Med*, 55(3):348-357.
- Shah, K. H., & Edlow, J. A. (2002). Distinguishing traumatic lumbar puncture from true subarachnoid hemorrhage. *J Emerg Med*, 23:67-74.
- Shen, H., Tang, Y., Xu, X., Wang, L., Wang, Q., Xu, W., et al. (2012). Rapid detection of neoplastic cells in serous cavity effusions in children with flow cytometry immunophenotyping. *Leuk Lymphoma*, 53(8):1509-1514.
- Sherley, J. L., & Kelly, T. J. (1988). Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *J Biol Chem*, 263:8350-8358.
- Siest, G., Henny, J., Gräsbeck, R., Wilding, P., Petitclerk, C., Queraltó, J. M., & Hyltoft Petersen, P. (2013). The theory of reference values: an unfinished symphony. *Clin Chem Lab Med*, 51:47-64.
- Simon, Á., Bagoly, Z., Hevessy, Z., Csáthy, L., Katona, É., Vereb, G., et al. (2012). Expression of coagulation factor XIII subunit A in acute promyelocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*, 82B(4):209-216.
- Simundic, A. M., & Topic, E. (2008). Quality indicators. *Biochem Medica*, 18(3):311-319.
- Simundic, A. M., Church, S., Cornes, M. P., Grankvist, K., Lippi, G., Nybo, M., et al. (2015). Compliance of blood sampling procedures with the CLSI H3-A6 guidelines. *Clin Chem Lab Med*, 53(9):1321-1331.
- Simundic, A. M., Cornes, M., Grankvist, K., Lippi, G., & Nybo, M. (2014). Standardization of collection requirements for fasting samples: For the Working Group on Preanalytical Phase (WG-PA) of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). *Clin Chim Acta*, 432:33-37.
- Singh, G., Krause, J. R., & Breitfeld, V. (1977). Bone marrow examination for metastatic tumor. *Cancer*, 40:2317-2321.
- Spector, R., Snodgrass, R., & Johanson, C. E. (2015). A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: focus on adult humans. *Exp Neurol*, 273:57-68.
- Stenman, U. H., Leinonen, J., Zhang, W. M., & Finne, P. (1999). Prostate-specific antigen. *Semin Cancer Biol*, 9:83-93.

- Stewart, C. C., & Nicholson, J. K. (2000). *Immunophenotyping*. New York: Wiley Publication.
- Strotman, L. N., Millner, L. M., & Valdes Jr., R. (2016). Liquid Biopsies in Oncology and the Current Regulatory. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 20(5):429-436.
- Swerts, K., de Moerloose, B., Dhooge, C., Brichard, B., Benoit, Y., Laureys, G., & Philippé, J. (2004). Detection of residual neuroblastoma cells in bone marrow: comparison of flow cytometry with immunocytochemistry. *Cytometry B Clin Cytom*, 61:9-19.
- Tanqri, S., Vall, H., Kaplan, D., Hoffman, B., Purvis, N., Porwit, A., et al. (2013). Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - Part III - Analytical issues. *Cytom B Clin Cy*, 84B:291-308.
- Theunissen, P., Mejstrikova, E., Sedek, L., van der Sluijs-Gelling, A. J., Gaipa, G., Bartels, M., et al. (2017). Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 129(3):347-357.
- Thomas, W. M., Robertson, J. F., McKenna, P. G., O'Neill, K. L., Robinson, M. H., & Hardcastle, J. D. (1995). Serum thymidin kinase in colorectal neoplasia. *Eur J Surg Oncol*, 21:632-634.
- Travis, W. D. (2012). Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Mod Pathol*, 25:18-30.
- Tsang, K. S., Li, C. K., Tsoi, W. C., Leung, Y., Singh, M. M., Chik, K. W., et al. (2003). Detection of micrometastasis of neuroblastoma to bone marrow and tumor dissemination to hematopoietic autografts using flow cytometry and reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer*, 97(11):2887-2897.
- Urbanits, S., Griesmacher, A., Hopfinger, G., Stockhammer, G., Karimi, A., Müller, M. M., et al. (2002). FACS analysis-a new and accurate tool in the diagnosis of lymphoma in the cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta*, 317:101-107.
- Vaitukaitis, J. L. (1974). Human chorionic gonadotropin as a tumor marker. *Ann Clin Lab Sci*, 4(4):276-280.
- van Dongen, J. J., Lhermitte, L., Böttcher, S., Almeida, J., van der Velden, V. H., Flores-Montero, J., et al. (2012). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, 26:1908-1975.
- van Dongen-Lases, E. C., Cornes, M. P., Grankvist, K., Ibarz, M., Kristensen, G. B., Lippi, G., et al. (2016). Patient identification and tube labelling - a call for harmonisation. *Clin Chem Lab Med*, 54(7):1141-1145.
- Veerman, A. J., Huismans, L., & van Zantwijk, I. (1985). Storage of cerebrospinal fluid samples at room temperature. *Acta Cytol*, 29:188-189.
- von Meyer, A., Lippi, G., Simundic, A. M., & Cadamuro, J. (2020). Exact time of venous blood sample collection - an unresolved issue, on behalf of the European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clin Chem Lab Med*, ePub ahead of print.
- Weissman, S. M., Smellie, R. M., & Paul, J. (1960). Studies on the biosynthesis of deoxyribonucleic acid by extracts of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 45:101-110.
- Wierda, W. G., O'Brien, S., Wang, X., Faderl, S., Ferrajoli, A., Do, K. A., et al. (2011). Multivariate model for time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 29:4088-4095.
- Wiestner, A., Rosenwald, A., Barry, T. S., Wright, G., Davis, R. E., Henrickson, S. E., et al. (2003). ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*, 101:4944-4951.
- Wood, M. J., Dimeski, G., & Nowitzke, A. M. (2005). CSF spectrophotometry in the diagnosis and exclusion of spontaneous subarachnoid haemorrhage. *J Clin Neurosci*, 12:142-146.
- Wu, A. H. (2006). A selected history and future of immunoassay development and applications. *Clinica Chimica Acta*, 369:119-124.

- Wu, C., Yang, R., Zhou, J., Bao, S., Zou, L., Zhang, P., et al. (2003). Production and characterisation of a novel chicken IgY antibody raised against C-terminal peptide from human thymidine kinase 1. *J Immunol Methods*, 277:157-169.
- Xu, W., Cao, X., Miao, K. R., Qiao, C., Wu, Y. J., Liu, Q., et al. (2009). Serum thymidine kinase 1 concentration in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia and its correlation with other prognostic factors. *Int J Hematol*, 90:205-211.
- Yalow, R. S., & Berson, S. A. (1959). Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods. *Nature*, 184:1648-1649.
- Yalow, R. S., & Berson, S. A. (1960). Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest*, 39:1157-1175.
- Zhou, J., He, E., & Skog, S. (2013). The proliferation marker thymidine kinase 1 in clinical use. *Mol Clin Onc*, 1:18-28.

11. 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/278/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szánthó Eszter
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szánthó, E.**, Kárai, B., Ivády, G., Baráth, S., Széles, M., Kappelmayer, J., Hevessy, Z.: Evaluation of sample quality as preanalytical error in flow cytometry analysis in childhood acute lymphoblastic leukemia.
EJIFCC. 30 (4), 385-395, 2019.
2. **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: 1.863
3. **Szánthó, E.**, Bhattoa, H. P., Csobán, M., Antal-Szalmás, P., Ujfalusi, A., Kappelmayer, J., Hevessy, Z.: Serum Thymidine Kinase Activity: analytical Performance, Age-Related Reference Ranges and Validation in Chronic Lymphocytic Leukemia.
PLoS One. 9 (3), e91647, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0091647>
IF: 3.234





További közlemények

4. Kárai, B., Gyurina, K., Ujfalusi, A., Sédok, L., Barna, G., Jáksó, P., Svec, P., **Szánthó, E.**, Nagy, A. C., Müller, J., Simon, R., Wojczek, Á., Szegedi, I., Tiszlavicz, L. G., Kowalczyk, J. R., Kolenova, A., Kovács, G. T., Szczepański, T., Dworzak, M., Schumich, A., Attarbaschi, A., Nebral, K., Haas, O. A., Kappelmayer, J., Hevessy, Z., Kiss, C.: Expression Patterns of Coagulation Factor XIII Subunit A on Leukemic Lymphoblasts Correlate with Clinical Outcome and Genetic Subtypes in Childhood B-cell Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia.
Cancers (Basel). 12 (8), 1-17, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12082264>
IF: 6.126 (2019)
5. Nemes, B. Á., Barta, A., Ivády, G., Kárai, B., **Szánthó, E.**, Hevessy, Z., P. Szabó, R., Szilvási, A., Sipka, S., Baráth, S.: T Cell Subset Profile and Appearance of Donor-specific Antibodies in Primary and Retransplanted Kidney Recipients.
Transplant. Proc. 51 (4), 1215-1225, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2019.04.002>
IF: 0.784
6. 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: 2.433
7. Oláh, A., Szalkó, T., **Szánthó, E.**, Varga, É., Mátyus, J., Varga, J.: High sensitive Troponin T has an incremental value in estimation of cardiovascular risk in chronic kidney disease.
Int. J. Nephrol. Ther. 3 (1), 001-006, 2017.
8. Kárai, B., Jakó, J., **Szánthó, E.**, Kappelmayer, J., Hevessy, Z.: A myelodysplasiás szindróma diagnosztikája, a prognózis megítélése.
Hematol. Transzfuziol. 46 (2), 93-102, 2013.
9. Kárai, B., **Szánthó, E.**, Kappelmayer, J., Hevessy, Z.: Flow cytometry in the diagnosis of myelodysplastic syndromes.
E-JIFCC. 23 (4), [1-8], 2012.
10. Kappelmayer, J., **Szánthó, E.**, Oláh, A.: Kardiális Troponin T: infarktus diagnosztikai teszt vagy kardiálvaszkuláris rizikómarker?
Metabolizmus. 10 (Suppl.A), 65-68, 2012.





11. Lőrincz, I., **Szánthó, E.**, Simkó, J., Szabó, Z., Barta, K., Fűzi, M., Szigeti, G.: A fokozott arrhythmiarizikó új markere: a mikrovolt T-hullám-alternáns patomechanizmusa és vizsgálati módszerei.
Orv. Hetil. 151 (30), 1215-1224, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2010.28926>
12. Lőrincz, I., Szabó, Z., Simkó, J., **Szánthó, E.**, Barta, K., Fűzi, M., Szigeti, G.: A pitvarfibrilláció és a vegetatív idegrendszer.
Orv. Hetil. 149 (43), 2019-2028, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2008.28466>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,44

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,097**

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

Debrecen, 2020.10.01.



12. Tárgyszavak/Keywords

timidin kináz/thymidine kinase

disszeminált tumorsejtek/disseminated tumor cells

áramlási citometria/flow cytometry

preanalitikai faktorok/preanalytical factors

13. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Hevessy Zsuzsannának, és Prof. Dr. Kappelmayer Jánosnak, a Laboratóriumi Medicina Intézet vezetőjének, hogy a laboratóriumi hematológiai diagnosztika iránt felkeltve érdeklődésemet lehetővé tették e munka létrejöttét. Köszönöm a munkámhoz nyújtott nélkülözhetetlen segítségüket és támogatásukat.

Köszönöm a Laboratóriumi Medicina Intézet munkatársainak, elsősorban Dr. Kárai Bettinának, Dr. Harjit Pal Bhattoanak, Dr. Ujfalusi Anikónak, Dr. Baráth Sándornak, Dr. Antal-Szalmás Péternek és Dr. Ivády Gergelynek a munkám során nyújtott minden együttműködést és segítő támogatást.

Köszönet illeti az Áramlási Citometriai Laboratórium, a Hematológiai Részleg, valamint az Integrált Részleg minden jelenlegi és volt munkatársát. Külön köszönöm Kissné Sziráki Valéria, Szárazné Széles Marianna és Csobán Mária sok-sok segítségét.

Köszönöm a Patológiai Intézet munkatársainak, mindenekelőtt Dr. Bedekovics Juditnak az immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzését és a metszetekről készült képeket.

Köszönöm a klinikum oldaláról elsősorban Prof. Dr. Kiss Csongornak, Dr. Szegedi Istvánnak, Dr. Petrás Miklósnak és Dr. Ujj Györgynek a munkám elvégzéséhez nélkülözhetetlen együttműködést.

Köszönöm a jelenlegi munkahelyemen, a Dél-Pesti Centrumkórház Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet FACS Laboratóriumában dolgozó kolléganőknek és Tasnády Szabolcsnak, hogy támogattak az értekezésem elkészítésében.

Végezetül köszönöm családomnak, szüleimnek, testvéremnek, hogy szeretetükkel és biztatásukkal mindvégig támogattak.

14. Függelék

A függelék az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények különlenyomatait tartalmazza.