

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**ÚJ MÓDSZEREK AZ AKUT LEUKÉMIÁK
DIAGNOSZTIKÁJÁBAN ÉS PROGNOSZTIKAI MEGÍTÉLÉSÉBEN**

Dr. Karászi Éva

Témavezető:

Dr. Kappelmayer János

egyetemi docens

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS-ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
KLINIKAI BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS PATOLÓGIAI INTÉZET
Debrecen, 2002.

BEVEZETÉS

A malignus hematológiai betegségek gyógyulási esélyének javításában, a terápia sikerességének növelésében lényeges szerepet játszik a pontos diagnózis felállítása, a leukémia típusának korrekt meghatározása, mely a megfelelő kezelés megválasztásához is szükséges. A leukémiás sejtek komplex immunológiai és genetikai jellemzése nem csak diagnosztikus szempontból fontos, hanem lehetővé teszi a remisszió detektálását, a minimális reziduális betegség (MRD) kimutatását és a relapszusok korai felismerését is. Mindehhez a tumoros sejtek minél sokoldalúbb karakterizálása, ún. multiparametrikus analízise szükséges, melynek során egyszerre több adatot nyerhetünk a sejtek strukturális és funkcionális jellemzőiről. Ennek kapcsán a sejtvonal azonosítására alkalmas intracelluláris markerrek kimutatásának feltételeit vizsgáltuk, összehasonlítva a különböző antitest klónok és fluorofórok kombinációjával kapott eredményeket, valamint elemeztük az AML altípusok elkülönítésére használható új marker, a CD162 (P-szelektin glikoprotein ligand-1, PSGL-1) diagnosztikus jelentőségét.

A kezelés várható kimenetelének előrejelzését szolgálja a különböző prognosztikai faktorok detektálása már a betegség kezdetén, melyek ismerete a kemoterápiás kezelést is befolyásolhatja. A prognosztikai

tényezők közül a citosztatikum rezisztencia leggyakoribbnak tartott okát, a membrán transzporterek szerepét vizsgáltuk funkcionális teszt alkalmazásával. Ezen fehérjék számos molekulát távolítanak el a sejtől aktív pumpafunkcióval. Szubsztrátjaik közé tartozik a malignus hematológiai kórképek kezelésében alkalmazott citosztatikumok egy része is, miáltal a sejt egyidejűleg több citosztatikummal szemben is rezisztenssé válik (multi-drog rezisztencia jelenség - MDR).

A markervizsgálatok diagnosztikai jelentősége

A malignus hematológiai kórképek diagnosztikájában és az MRD immunológiai kimutatásában ma a direkt jelölt monoklonális antitestekkel végzett áramlási citometriai analízis jelenti a legobjektívebb és legtöbb információt hordozó vizsgálati módszert. Akut leukémiás minták esetén, a kóros sejtvonal ("lineage") legmegbízhatóbb meghatározására az intracitoplazmatikus antigének szolgálnak, melyek általában már a felszíni markerek megjelenése előtt kimutathatóak. A myeloid, a T és B lymphoid vonalak elkülönítésére leginkább a mieloperoxidáz (MPO), cyCD3 és cyCD79a használható. A permeabilizáló szer megválasztása mellett fontos a rendelkezésre álló antitest klónok ill. a különböző fluorofórok kombinációjának vizsgálata, mely alapján kiválasztható a sejtvonal azonosítását biztosító kellően szenzitív és specifikus eljárás.

Bár az áramlási citometriai vizsgálatokkal a malignitás az esetek többségében jól besorolható a jelenleg ismert markerek segítségével, lényeges kérdés olyan új markerek keresése, melyek az egyes altípusok elkülönítését biztonságosabbá teszik. A hármas vagy négyes jelölésű áramlási citometriai analízis alkalmazásán kívül, illetve ezzel egyidejűleg, egy másik diagnosztikai megközelítés olyan markerek alkalmazása, melyek különböző intenzitással jelennek meg normál illetve malignus sejteken. Az irodalomban már több marker esetén igazoltak kvantitatív eltéréseket normál és leukémiás sejtek közt. Az eltérő sejtfelszíni denzitást mutató fehérjék közt különösen fontosak azok, melyek a malignus sejtek funkciója pl. adhézió, aggregáció, transzendotheliális migráció szempontjából jelentőséggel bírnak mint pl. az integrinek vagy szelektin ligandok. Vizsgálataink során egy ebbe a csoportba tartozó fehérje, a P-szelektin glikoprotein ligand (PSGL-1, CD162) kvantitatív expresszióját és ennek diagnosztikus szerepét vizsgáltuk.

Multi-drog rezisztencia mechanizmusok

A membrán fehérjék egy része esetén a fenti immunológiai kimutatás nem mindig célravezető, legfőképpen azért mert a fehérje jelenlétének sokkal fontosabb annak funkcionális aktivitása. Ez érvényes a prognosztikai szempontból fontos membrán transzporterekre is, melyek a citosztatikumokat még hatásuk kifejtése előtt eltávolítják a sejtéből, így nem

teszik lehetővé a kemoterápiás szer olyan intracelluláris koncentrációjának elérését, mely a malignus sejt elpusztításához szükséges. A fenti membrán fehérjék az ABC transzporterek (ABC=ATP binding cassette) nagy csoportjába tartoznak mint a P-glikoprotein (Pgp), az MRP család fehérjei (multidrug resistance related protein) és az újabban leírt BCRP (breast cancer related protein). Ezen ABC transzporterek prognosztikai szerepe, a terápiát kedvezőtlenül befolyásoló hatása akut myeloid leukémiás (AML) betegekben ma már bizonyítottnak tekinthető.

Multidrog rezisztencia tesztekben használható az mRNS kimutatása RT-PCR-el, magának a fehérjének monoklonális antitestekkel történő detektálása áramlási citométerrel vagy immuncitokémiai módszerekkel, és alkalmazhatunk funkcionális tesztek, melyek a klinikai szempontból fontos paramétert, a fehérje transzport aktivitását mérik fluoreszcens szubsztrátok segítségével.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A diagnosztikai (immunfenotípus) vizsgálatok terén:

- a. A sejtvonal-specifikus intracitoplazmatikus markerek közül azon permeabilizálási technika és klón kombinációk meghatározása, melyek a "lineage" legszenzitívebb, de még specifikus kimutatási lehetőségét biztosítják
- b. A felszíni markerek közül egy eddig leukémiák esetén nem alkalmazott marker, a P-szelektin glikoprotein ligand-1 (PSGL-1 vagy CD162) diagnosztikai felhasználhatóságának vizsgálata

2. A prognosztikai (multi-drog rezisztencia) vizsgálatok terén

- a. A kalcein teszt adaptálása és optimalizálása rutin diagnosztikai tesztként
- b. Az MDR aktivitást meghatározása adott sejtpopulációkon és az MDR aktivitás valamint Pgp antigén expresszió összefüggésének vizsgálata
- c. A kalcein teszt prognosztikai és prediktív értékének nagyszámú beteganyagon történő meghatározása

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtpermeabilizálási eljárások és jelölések

Kereskedelmi forgalomban is elérhető hat permeabilizálásra használt kit összehasonlítását végeztük el 21 normál és akut leukémiás minta analízisével két centrum Áramlási Citometriai Részlegén (DEOEC, KBMPI és Salamancai Egyetem). A vizsgálatokra minden esetben a diagnózis felállításakor, a kezelés megkezdése előtt került sor. A procedurát minden esetben a gyártó előírásainak megfelelően végeztük el, ennek során a Cytofix/Cytoperm (Pharmingen), Fix and Perm (Caltag Laboratories), Intraprep (Immunotech), Intrastain (DAKO), Permeacyte (Bio-E) és a Permeafix (Ortho) kiteket hasonlítottuk össze.

Emellett vizsgáltuk a három legfontosabb intracelluláris marker ellen termelt antitest klónok és különböző fluoreszcens konjugátumaik: fluoreszcein izotiocianát (FITC) és fikoeritrin (PE) kombinációját. Leukémiás minták esetén a malignus sejtek szelektív vizsgálata miatt felszíni CD45 jelölést végeztünk a permeabilizálás előtt, és a CD45 dim populáció sajátosságait vizsgáltuk. A mérések FACScan és FACScalibur áramlási citométereken történtek. Statisztikai analízis során a szignifikancia szintek meghatározásához a Wilcoxon és a Kruskal –Wallis tesztet használtuk.

PSGL-1 kvantitatív meghatározás

A PSGL-1 molekula a leukocyták endothelen keresztüli migrációjában, a endothel sejteken expresszáldó P és E-szelektinekhez való kötődésben játszik szerepet, valamint kötődik a leukocita L-szelektin-hez is. A PSGL-1 detektálására a jelöletlen klónt (PL-1) a kvantitatív meghatározáshoz, a PE konjugált KPL-1 antitestet (BD Pharmingen, CD162) pedig többes jelölésekhez használtuk.

A vizsgálatokat 25 egészséges és 20 akut myeloid leukémiás beteg mintáin végeztük el. A PSGL-1 expresszió kvantitatív meghatározásához a QIFI kitet (DAKO) alkalmaztuk. A PSGL-1 expressziót az FL-1 (FITC) csatornán mért MFI érték alapján kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg, az eredményeket antitest kötő képesség (antibody binding capacity, ABC) formájában adtuk meg. A blastok kiválasztása leukémiás mintákban a CD45 jelölés alapján történt, míg normál minták esetén a CD33/CD34 koexpressziót mutató blastok szelektív analízisét végeztük el. Statisztikai analízisekben a Mann-Whitney U tesztet használtuk.

Kalcein teszt

A módszer lényege, hogy a kalcein-acetoximetilészter, mint hidrofób molekula a sejtbe diffundál, majd Pgp vagy MRP1 jelenlétében onnan kipumpálódik. Az előbbi transzport proteinek hiányában intracelluláris

észterázok hasítása következtében kalcein keletkezik, mely fluoreszkáló molekula, és nem szubsztrátja a Pgp-nek. A tesztben a fehérje blokkolására ún. revertáló ágens, modulátor használható, mely ebben a tesztben Verapamil (Vp). Ez mind a Pgp mind az MRP1 aktivitását gátolja.

Az intracelluláris fluoreszcencia intenzitást a revertáló ágens jelenlétében (Vp+) és hiányában (Vp-) detektálva a Pgp/MRP1 aktivitás mértékére következtethetünk, ahol kvantitatív eredményt a fluoreszcencia intenzitások különbségéből kaphatunk a $[FI(Vp+) - FI(Vp-)]/FI(Vp+) \times 100$ képlet alapján. A kapott eredmény a multidrog rezisztencia aktivitás faktor (MAF), mely a Pgp és az MRP1 együttes aktivitását méri, és az eredmény jól korrelál a Pgp/MRP1 szubsztrát citosztatikumok kipumpálásának mértékével. A sejteket az inhibitor jelenlétében ill. hiányában történő inkubálás után kalcein-AM-el töltöttük fel, majd a reakció leállítását követően a sejtek életképességét jelző propidium-jodid festést alkalmaztunk. A mérést maximum 24 óra 4°C-on történő tárolás után végeztük el Becton Dickinson FACSCalibur ill. FACScan áramlási citométereken.

A kalcein teszt minták eltarthatósági vizsgálata

A teszt alkalmazásának fontos eleme a preanalitikai hibák csökkentése. Ennek különös jelentősége van funkcionális tesztek esetében, mert fontos, hogy nem fixált, élő sejtekkel dolgozzunk, és biztosítsuk a transzport

funkcióhoz szükséges ATP ellátást. Ezek érdekében megvizsgáltuk a minták optimális tárolhatóságát szobahőmérsékleten és 4°C-on, teljes csontvelő és Ficollon szeparált kalceinnel feltöltött sejtszuszpenzió esetében. A minta előkészítést ill. a mérést a fentiek szerint végeztük el a 0., 6., és 24. órában.

Kalcein teszt kombinálása felszíni marker jelöléssel

Kísérleteinkben a CD45 panleukocytá markert alkalmaztuk, mely az éretlen sejteken alacsony intenzitással expresszálódik, így a CD45 dim populáció szelektív analízisével a tumoros sejtek MAF értéke kalkulálható.

Pgp molekulaszám meghatározása

Kvantitatíve meghatároztuk a felszíni molekulaszámot beadékkal végzett kalibrálás segítségével (ABC: antibody binding capacity, QIFI Kit, DAKO) és az eredményeket összevetettük a MAF értékével. A méréseket sejtvonalakon és klinikai mintákon kiviteleztek, indirekt immunfluoreszcens teszt formájában. Minden mérésnél a fluoreszcens kalibrációs beadékok szimultán futtatása is megtörtént konstans FL-1 beállítás mellett, majd ezek alapján a sejtenkénti ABC kalkulálható volt, mely 1-1 arányú antigén-antitest kötődés esetén a felszíni molekulaszám meghatározására alkalmas.

Betegek és a kemoterápiás kezelés

A DEOEC II. Belklinika és az Országos Hematológiai és Immunológiai Intézet beteganyagából 93 de novo leukémiás beteg mintájának analízisét

végeztük el. A diagnózis felállításában a morfológiai jegyek mellett minden esetben immunfenotípus vizsgálatok is történtek. A betegek remissziós indukciós kezelése 7+3 protokoll alapján történt, melyben Ara-C $200\text{mg}/\text{m}^2$ 7 napig, majd antraciklinek (adriamicin $45\text{mg}/\text{m}^2$ vagy daunoblasztin $60\text{mg}/\text{m}^2$ és idarubicin $12\text{mg}/\text{m}^2$) 3 napig történő adása szerepel. Ez M4/M5 leukémiák esetében kiegészült $100\text{mg}/\text{m}^2$ etopozid 4 napos hozzáadásával. A csontvelő értékelésére a 4. héten került sor. A szignifikancia szintek meghatározásához a Student félé t-tesztet használtuk, a különböző prognosztikai faktorok szerepének multiparametrikus elemzésére Cox félé regressziót alkalmaztunk, míg a Kaplan-Mayer görbe elemzéséhez a log rank tesztet végeztük el.

EREDMÉNYEK

Permeabilizálási technikák összehasonlító elemzése

1. Fényszórási tulajdonságok és az autofluoreszcencia változása

A permeabilizálás következtében gyakorlatilag minden permeabilizáló szer használata esetén változnak a sejtek fényszórási jellegzetességei, melyek a forward scatter (FSC) – side scatter (SSC) dot plot képeken a nem permeabilizált minta képéhez viszonyítva szembetűnőek. A sejtípusok adatait összegezve valamennyi permeabilizáló szer esetén szignifikáns különbséget kaptunk az FSC értékek növekedésében a nem permeabilizált mintához viszonyítva, mely a perifériás vér lymphocytái és a csontvelői lymphoid elemek esetén volt a legkifejezettebb. A sejtek autofluoreszcenciája (MFI érték – mean fluorescence intensity) a permeabilizálás következtében minden esetben növekedést mutatott mind az FL-1 (FITC), mind az FL-2 (PE) csatornákon.

2. Mieloperoxidáz

A három klón (MPO-7, CBL-MPO-1 és H-43-5) összehasonlításában eredményeink az MPO-7 szignifikánsan jobb szenzitivitását mutatták a másik két klónnal szemben az MFI értékek alapján. A FITC és PE konjugátumok összevetésében az utóbbiak magasabb MFI értéke, ezzel

nagyobb szenzitivitása igazolódott. Mérsékelt álpozitív reakciót csak a Cytofix/Cytoperm alkalmazásakor észleltünk mindhárom klón esetén.

3. cyCD79a

Három forgalmazótól származó HM57 klón (PE) vizsgálatával a Pharmingen antitestje minden permeabilizáló szer használata mellett szignifikánsan alacsonyabb MFI értéket mutatott, mint a DAKO és az Immunotech reagense. Álpozitív reakciót egyik klón esetén sem tapasztaltunk.

4. cyCD3

A S4.1 klón esetén jelentős álpozitivitást észleltünk myeloblastokon, ezért a további vizsgálatok a másik két antitesttel történtek, melyek közül az UCTH-1 mutatott magasabb MFI értékeket és a pozitív sejtek százalékos aránya is magasabb volt, mint a Hit3a antitest esetén.

5. Permeabilizáló oldatok

A különböző klónok MFI értékeinek összehasonlítása során nem találtunk szignifikáns különbséget a permeabilizáló ágensek között.

Kvantitatív PSGL-1 meghatározás normál és malignus sejteken.

1. PSGL-1 expresszió normál hemopoetikus sejteken

Perifériás vér sejtjein végzett vizsgálatok alapján a B sejtek CD162 jelölődése alacsony, míg a T sejtek és NK sejtek PSGL-1 expressziója lényegesen magasabb. A monocyták és neutrophilek intenzív CD162 expressziót mutattak. Normál csontvelő analízisekor megfigyelhető a CD162 expresszió növekedése a hemopoetikus sejtek érése során. A monocyta vonal sejtjein a granulocytákhoz képest szignifikánsan magasabb expresszió volt detektálható.

2. PSGL-1 expresszió kvantitatív meghatározása

A fenti eredmények számszerű vizsgálatát is elvégeztük a különbségek egzakt meghatározása céljából. Ezek alapján az alábbi eredmények adódtak:

- a. A leukémiás myeloblastok PSGL-1 expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az érett sejté.
- b. A monocyta vonalon belül az expresszió széles határok között változott, de nem találtunk szignifikáns különbséget a monoblast/promonocyta és az érett monocyta populáció értékei között.
- c. A számszerű adatok azt tükrözik, hogy a monoblastok CD162 expressziója szignifikánsan magasabb, mint a myeloblastoké, és a két populáció értékei nem mutatnak átfedést, ami lehetővé teszi a két prekurzor sejt elkülönítését. Ezek alapján a blastokban detektált alacsony PSGL-1 expresszió AML M1 ill. M2 mellett szól. AML M4 esetében a két populáció

együttes jelenléte miatt egy PSGL-1 dim és egy PSGL-1 bright sejtcsoport különíthető el.

d. Normál myeloblastok jelölődése nem különbözött lényegesen a malignus blastok expressziójától.

e. Perifériás vérben és csontvelőben szimultán végzett mérések eredménye azt mutatta, hogy a periférián található blastokon a PSGL-1 kópiaszám nem különbözik szignifikánsan a csontvelői blastokétól.

A kalcein teszt metodikai vonatkozásai: preanalitikai hibák csökkentése, optimalizálás, kombinált jelölések

1. A kalcein teszt reprodukálhatóságának vizsgálata

Különböző sejtvonalak és klinikai minták a MAF értékek széles tartományában tették lehetővé a reprodukálhatóság vizsgálatát. Az igen magas MAF értéket mutató rezisztens sejtvonalon (KBV-1) kaptuk a legkisebb szórást, de elfogadható a variációs koefficiens (CV) értéke a betegekből ill. egészséges egyénekből származó minták esetén is (a CV értéke 0,3%, 11% ill. 13% volt sejtvonalon, leukémiás és normál mintában)

2. Minták eltarthatóságának vizsgálata

Szeperálás előtti, teljes csontvelői vagy perifériás vérminta tárolása során a sejtek energia készletének, ATP raktárának csökkenése miatt a MAF értékek

csökkenését látjuk. Bár ebben az esetben a PI pozitivitás nem mutat szignifikáns emelkedést, az ATP depléciónak miatt a 24 óráig tárolt mintában a magasabb FI(Vp-) érték a transzport funkciók csökkenését jelzi. Mindez a ténylegesnél alacsonyabb MAF értéket eredményez. Kísérleteink alapján a mintavétel után a perifériás vér ill. csontvelő feldolgozása 6 órán belül meg kell, hogy történjen. A Ficollon szeparált és kalceinnel feltöltött sejtek szuszpenziója 4°C-on 24 órán át tárolható, annak MAF értéke nem változik, mert ez a hőmérséklet a pumpafunkciót blokkolja.

3. Kalcein teszt kombinálása felszíni marker jelöléssel

A teszt alkalmazása során lényeges, hogy szelektíven a leukémiás sejtek rezisztenciáját mérjük és lehetőleg kizárjuk a vizsgálatból a normál csontvelői sejteket. Kettős jelölések alkalmazásával a CD45 dim blast populációra kapuzva ezen tumoros sejtek MAF értékét számolhatjuk, ezáltal a normál csontvelői sejtek zavaró hatását kiküszöbölhetjük. A kalcein és a felszíni marker fluoreszcenciájának biztonságos elkülönítésére megfelelő kompenzáció után az FL-3 detektor mérési tartományában (>650 nm) jelet adó CD45PerCP vagy CD45Cy5 használható.

4. Pgp molekulaszám meghatározása monoklonális antitesttel

Több tanulmány elemzi a funkcionális teszttel kapott eredmények és az antitestekkel történő jelölés korrelációját. Sok esetben igen eltérő

eredmények adódnak, melyeket magyarázata lehet, hogy a funkcionális tesztekkel több transzport fehérje aktivitását mérjük, míg a monoklonális antitest csak egy proteinről ad felvilágosítást (efflux+/Pgp- esetek), vagy a fehérje jelen van ugyan, de nem működik, vagy az antitest keresztreakciót mutat más sejtfelszíni proteinekkel, melyeknek a drog rezisztenciában nincs szerepük (efflux-/Pgp+ esetek). Az indirekt immunfluoreszcenciás méréseket és a kalcein teszttel kapott eredményeket összevetve azt találtuk, hogy a KBV-1 rezisztens sejtvonalon a 98-as MAF érték mellett az ehhez tartozó felszíni molekula szám 500 000 volt sejtenként. A közepes rezisztenciát mutató KB8-5 sejtvonalon a MAF értéke csak 20%-al csökkent, míg a receptorszám több mint 90%-al (36 000/sejt). Vagyis a MAF érték még meglehetősen magas, de a fehérjeszám már szignifikánsan csökken. Beteg minták esetén, ahol a MAF érték 0 és 60 között van (leginkább 40 alatt), a fehérje sejtenkénti kópiaszáma igen alacsony, és ennek meghatározása nem differenciál biztonsággal az MDR pozitív és MDR negatív esetek között. Mindez azt jelzi, hogy a funkcionális teszt szenzitívebb indikátora multi-drog rezisztencia fennállásának, mint Pgp antigén expresszió vizsgálata ill. utal egyéb pumpa funkciók (pl. MRP1) lehetséges szerepére.

A teszt eredmények és a betegség klinikai kimenetelének korrelációja

1. MAF értékek összehasonlítása AML és ALL betegcsoportok esetén.

Mindkét centrumban az irodalmi adatoknak megfelelő eredményt kaptunk: AML-ek esetén gyakoribb a de novo fennálló rezisztencia, mint ALL-ben. A különbségek a lymphoid és myeloid leukémiás csoportok között szignifikánsnak adódtak.

2. A MAF érték összefüggése a terápiára adott válasszal: a teszt prediktív értéke

Anyagunkban egy olyan cut-off érték meghatározására törekedtünk, mely megbízhatóan elkülöníti az MDR pozitív és MDR negatív eseteket. Ennek érdekében a betegeket responder (R) és non-responder (NR) csoportba soroltuk. Meghatároztuk a MAF értékek átlagát és szórását a responder (R) és non-responder (NR) csoportban mindkét centrumban, majd a $MAF_R + SEM$ és a $MAF_{NR} - SEM$ (SEM: standard error of mean) értékek átlagaként kalkuláltuk a cut-off értéket, mely 20-nak adódott a budapesti centrumban és 25-nek a DEOEC beteganyagában. Ezen cut-off értékek alá ill. felé eső MAF értékek alapján az MDR pozitív és MDR negatív esetek elkülöníthetőek. Az így létrejött MDR+ és MDR- csoportokban meghatároztuk a responderek és non-responderek arányát. Az MDR negatív csoportban a betegek 72%-a jól reagált a kezelésre, vagyis a teszt negatív

prediktív értéke 72%, ezzel a biztonsággal jelzi a negatív eredmény a terápia hatékonyságát. Az MDR pozitív csoportban a betegek 69 %-ban nem lehetett komplett remissziót elérni, vagyis ennyi volt a non-responderek aránya. A kalcein teszt pozitivitása tehát 69%-os biztonsággal jelzi a terápia hatástalanságát (pozitív prediktív érték).

3. A teszt eredmények és a hosszútávú túlélés összefüggése

Ebbe a vizsgálatba azon betegek kerültek be, akiknek a követési ideje 8 hónapnál hosszabb volt. Kaplan-Mayer görbe alapján vizsgáltuk az MDR aktivitás és a betegség hosszabb távú kimenetelének összefüggését. Bár az MDR pozitív és MDR negatív csoportok túlélése közötti különbség nem érte el a statisztikai szignifikancia határát ($p=0,07$), a görbe alapján mindenképpen figyelemre méltó és klinikai relevanciával rendelkező eltérés volt a két csoport túlélése között: az MDR negatív betegeknél az 50%-os túlélés ideje háromszorosa (18 hónap) az MDR pozitív betegek 50%-os túlélésének.

MEGBESZÉLÉS

A malignus hematológiai betegségek pontos diagnosztikájában döntő jelentőségű a sejtvonal azonosítása ill. a leukémiás sejtek típusának és differenciáltságának meghatározása, mely az egyes altípusok elkülönítését, így a leukémiák/lymphomák klasszifikációját lehetővé teszi.

A “lineage” azonosításának legmegbízhatóbb módja az intracelluláris markerek alkalmazása, melyek közül leginkább a MPO, cyCD79a és cyCD3 használatos a myeloid, B és T lymphoid vonalak identifikálására. A detektálás szenzitivitásának és specificitásának vizsgálatára hat kereskedelmi forgalomban elérhető permeabilizáló kitnek ill. különböző monoklonális antitest klónoknak és ezek fluoreszcens konjugátumainak kombinációit hasonlítottuk össze. Bár valamennyi kit esetén lényeges változást észleltünk az FSS-SSC szignálokban a permeabilizálás után, ez az esetek zömében a sejtpopulációk elkülönítését nem zavarta. Eredményeink alapján a myeloid, B és T lymphoid vonalak az MPO, cyCD79a és cyCD3 intracitoplazmatikus markerekkel biztonsággal azonosíthatók, ha a fenti permeabilizáló kitek (Fix and Perm, Intrastain, Intraprep, Permeafix) és lehetőleg egy PE-el konjugált szenzitív klón (MPO-7, HM57, UCTH-1) kombinációit választjuk.

Az acut leukémiák típusainak elkülönítése, főként AML esetén nem mindig egyszerű. Vannak ismert markerek, melyek az esetek zömében segítséget nyújtanak a granulocyta, monocyta és megakaryocyta vonalak differenciálásában, ezek mellett azonban nagy jelentősége lehet további markerek azonosításának, melyek vagy sejtvonal specifikusak, vagy expressziójuk mértéke különbözik ez egyes sejtvonalakon. A kvantitatív áramlási citometria eszközével általunk vizsgált CD162 (PSGL-1) molekula ilyen markernek bizonyult, mely eltérő expressziót mutat a granulocyta és a monocyta vonal sejteiben, ezáltal a két sejtvonal elkülönítésére alkalmas. A PSGL-1 molekula expresszióját AML-ben és normál myeloid sejteken már korábban is vizsgálták, nem születtek azonban kvantitatív adatok az expresszió mértékéről. Vizsgálataink során meghatároztuk a sejtfelszíni PSGL-1 molekula számot egészséges és leukémiás egyének csontvelői és perifériás sejteiben. Szignifikáns különbség adódott a leukémiás betegekből származó myeloblastok és monoblastok CD162 jelölődése között, a két populáció értékei nem mutattak átfedést, mely a granulocyta és a monocyta vonal egyik elkülönítési lehetőségét jelenti. Mivel a monocyta CD14 marker az AML M4/M5 esetek kb. felében mutat pozitívítást ill. esetenként más szubtypusokban (M2) is detektálható, nem differenciál biztonsággal M4/M5

ill. M1/M2 leukémiák között. A jelenleg használt immunfenotípus vizsgálatokat a CD162 marker kvantitatív meghatározásával kiegészítve a fenti szubtypusok elkülöníthetők.

A korrekt diagnózis felállítása mellett a klinikai onkológiában jelentős igény van a malignus sejtek citosztatikum rezisztenciájának, mint prognosztikai faktornak a detektálására is, hiszen ennek ismerete meghatározhatja a választott kemoterápiás kezelést vagy indikálhatja modulátorok, revertáló ágensek hozzáadását a kemoterápiához. Vizsgálatainkban egy kvantitatív funkcionális tesztet, a kalcein tesztet alkalmaztuk beteg mintákon a multi-drog rezisztencia kimutatására két centrumban végzett tanulmány formájában. A teszt előnye, hogy a kalcein-AM mind a Pgp-nek, mind az MRP1-nek szubsztrátja, így verapamil használva inhibitorként, - mely szintén mindkét fehérje aktivitását blokkolja - a két protein által együttesen létrehozott transzport aktivitást detektálhatjuk. Az eredmények szelektivitásának növelésére célszerű felszíni marker jelölés alkalmazása, mely lehetővé teszi a leukémiás sejtek MDR aktivitásának mérését és a normál sejtek kizárását a vizsgálatból. Irodalmi adatok alapján a malignus sejtek azonosítására leginkább CD34 jelölés használható, de vizsgálhatjuk a CD45 dim populáció MDR aktivitását is. Az MDR detektálása esetén konszenzus protokoll ajánlása alapján helyes két különböző módszer

használata, pl. funkcionális teszt és monoklonális antitest együttes alkalmazása. Nagyobb klinikai beteganyagban ilyen jellegű összehasonlítást nem végeztünk, de néhány mintában meghatároztuk a sejtfelszíni receptorszámot és vizsgáltuk ennek a MAF értékkel mutatott korrelációját. Ezek alapján a MAF érték és a felszíni molekulaszám összefüggése nem lineáris, így az immunológiai meghatározás önmagában nem differenciálható módon az MDR pozitív és MDR negatív esetek között, a funkcionális teszt az MDR aktivitás szenzitívebb indikátorának tekinthető. A klinikai mintákon kapott eredményeink alapján a 93 de novo akut leukémiás beteg vizsgálatával megállapítottuk, hogy a kalcein teszt negativitása 72%-os prediktív értékkel előre jelzi a terápia hatékonyságát és jobb a túlélés ebben a csoportban, míg az MDR pozitívítás detektálásakor az esetek 69%-ban kedvezőtlen terápiás válaszra és rövidebb túlélésre számíthatunk. Eredményeink alapján a kalcein teszt standardizált formája a rutin áramlási citometriai diagnosztikában jól alkalmazható, megbízható, gyorsan kivitelezhető teszt, mely kvantitatív eredményt ad az MDR aktivitásról, és betegmintákon való alkalmazása igazolta a teszt eredmények korrelációját a betegség klinikai kimenetelével.

Vizsgálataink olyan metodikai kérdésekre terjedtek ki, melyek a leukémia diagnosztika pontosítását, könnyebbé tételét és a prognózis

megítélését célozták. Eredményeink alapján állást foglaltunk (i) a sejtvonal azonosításában fontos intracelluláris markerek antitest klónjainak és a permeabilizáló szereknek a optimális kombinációjáról (ii) a PSGL-1 expresszió jelentőségéről, mely a kvantitatív áramlási citometria módszerével alkalmas az AML szubtypusok elkülönítésére (iii) a multidrog rezisztencia detektálására használt funkcionális teszt, a kalcein teszt optimalizálásának feltételeiről és a teszt klinikai eredményeiről. Ezen módszerek a már alkalmazott metodikákkal együtt hozzájárulnak a leukémiás sejtek sajátosságainak komplex megítéléséhez és ezzel a terápia hatékonyságának növeléséhez.

A téziseket megalapozó munkák jegyzéke:

- I. **Karászi É**, Jakab K, Homolya L, Szakács G, Telek B, Kiss A, Rejtő L, Nahajevszky S, Sarkadi B, Kappelmayer J.: Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 112: 308-314 IF: 3,068
- II. Kappelmayer J, **Karászi É**, Telek B, Jakab K.: "Pros and cons" on how to measure multidrug resistance in leukemias *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 711-717 IF: 1,252
- III. Kappelmayer J, Kiss A, **Karászi É**, Veszprémi A, Jakó J, Kiss Cs.: Identification of P-selectin Glycoprotein Ligand-1 as a useful marker in acute myeloid leukemias. *Br J Haematol* 2001; 115: 903-909 IF: 3,068
- IV. Kappelmayer J, Gratama JW, **Karászi É**, Menendez P, Ciudad J, Rivas R, Orfao A.: Flow cytometric detection of intracellular myeloperoxidase, CD3 and CD79a. Interaction between monoclonal antibody clones, fluorochrome and sample preparation. *J Immunol Methods* 2000; 242: 53-65 IF: 1,995

A tézisekben fel nem használt egyéb tudományos munkák jegyzéke:

1. Szondy Zs, Reichert U, Bernardon JM, Michel S, Tóth R, **Karászi É**, Fésüs L.: Inhibition of activation-induced apoptosis of thymocytes by all-*trans* and 9-*cis* retinoic acids is mediated via retinoic acid receptor alpha *Biochem J* 1998; 331: 767-774 IF: 4,280
2. Jakab Zs, Balogh E, **Karászi É**, Kappelmayer J, Kiss Cs, Oláh É.: Variant translocation of 11q23 in infant acute lymphoblastic leukamia (ALL): do outcomes differ from t(4;11)? *Med Ped Oncol* 2002; 39:63-65 IF: 1,301
3. **Karászi É**, Kiss Cs, Jakab Zs, Szegedi I, Hevessy Zs, Kappelmayer J.: Gyermekkori akut leukémiák vizsgálata sejtfelszíni markerek és ploiditás alapján *Gyermekgyógyászat*, 1998; 4: 319-329
4. Mezei G, **Karászi É**, Telek B, Ujj Gy, Rejtő L, Kiss A, Rác K, Udvardy M, Rák K.: A chronicus lymphoid leukémia biológiája *Magyar Belorvosi Archívum* 2000; 53: 103-107
5. Telek B, Rejtő L, Mezei G, **Karászi É**, Kappelmayer J, Balázs M, Kiss A, Ujj Gy, Rák K, Udvardy M.: Molekuláris biológiai vizsgálatok krónikus lymphoid leukémiában *Orvosi Hetilap* 2001; 142: 833-839