

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Dr. Szánthó Eszter Judit



DEBRECENI EGYETEM

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2021

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**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

**FOLYADÉKBIOPSIÁS BIOMARKEREK VIZSGÁLATA IMMUN-ALAPÚ
MÓDSZEREKKEL MALIGNUS KÓRKÉPEKBEN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Szánthó Eszter Judit okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Hematológia Program) keretében

Témavezető: Dr. Hevessy Zsuzsanna, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus
tagok: Dr. Fagyas Miklós, PhD
Dr. Barna Gábor, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet könyvtára (online)
2021. május 31. (hétfő) 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Kovács Ilona, PhD
Dr. Jáksó Pál, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus
tagok: Dr. Kovács Ilona, PhD
Dr. Jáksó Pál, PhD
Dr. Fagyas Miklós, PhD
Dr. Barna Gábor, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet könyvtára (online)
2021. május 31. (hétfő) 13:00 óra

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a koteles.julianna@med.unideb.hu e-mail címre 2021. május 31. (hétfőn) 10 óráig.

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. Immun-alapú módszerek definíciója, története

Az élő szervezetek működését molekulák közötti kölcsönhatások határozzák meg. Ezek egyik formája az antigén-antitest reakció.

Az antigén-antitest reakciók specificitása immunanalitikai eljárások kifejlesztését is lehetővé tette. A 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. A latex-szemcséket tartalmazó turbidimetria az automatizált klinikai kémiai laboratóriumokban széles körben használt eljárás különféle plazmafehérjék kimutatására.

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. Ilyen módon monoklonális antitesteket nyertek, melyek az adott antigén egy-egy epitópjára specifikusak.

1.1.1. Immunkémiai módszerek

Az *in vitro* ligand (kötés) típusú eljárásokkal különösen a kis molekulák mérése vált lehetővé. 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 automatizálhatóság. 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. 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. 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.

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: poliszitirén csőfal-, mikroplate üreg belső felülete, latex partikulák-, papírkorong-, üveggyöngy-, paramágneses részecskék felszíne, stb..

1.1.2. Az áramlási citometria elve és alkalmazása a klinikai gyakorlatban

Az áramlási citometria szuszpenzióban lévő sejtek vizsgálatára alkalmas analitikai módszer. A sejtfelszíni és citoplazmatikus markerek detektálása gyors és objektív vizsgálat, melynek alkalmazása ma már elengedhetetlen a leukémia-diagnosztikában. Lényege a sejtvonalakra és a sejt érési fázisára specifikus CD markerek (CD=cluster of differentiation) azonosítása a patológiás sejteken, fluoreszcens festékekkel jelölt monoklonális antitestekkel. Az akut leukémiák diagnosztikájában az elsődleges cél a blastok jellemzése sejtvonal és érettség szempontjából, ill. kóros marker-expressziók kimutatása a blastokon (pl. lymphoid és myeloid markerek együttes expressziója egy sejten). Ez a karakterizálás lehetővé teszi a leukémiás sejtek célzott keresését kezelést követően (minimális reziduális betegség, MRD). A kóros mintázat felismeréséhez elengedhetetlen, hogy a normál csontvelői sejtvonalak érését ismerjük, az azokra jellemző CD markerek intenzitásához hasonlítsuk a vizsgált mintában kapott eredményt.

1.2. 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 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.

Racila és munkatársai 1998-ban írták le a napjainkban is gyakran alkalmazott immunológiai alapú mágneses szeparálás módszerét a keringő tumorsejtek elkülönítésére. Mivel a keringő tumorsejtek a perifériás vérben igen kis mennyiségben vannak jelen, 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 sejtszuszpenzió 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, már csak azért sem, mert a betegség lefolyása során és a kezelés hatására is a tumorsejtek egyre heterogénebbé válnak.

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.

A folyadékbiopsziák esetében a legfőbb hátráltató tényező, hogy a valóban a tumorból származó sejteket, extracelluláris vezikulákat, nukleinsavakat elkülönítsük a benignus eredetűektől. Mindemellett ezekben a testfolyadékokban rendszerint igen kis mennyiségben vannak jelen; a rendelkezésre álló technológiai háttér ezért csak a közelmúlttól tette lehetővé alaposabb tanulmányozásukat.

1.3. 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. Az utóbbi években egyes szerzők a pre-preanalitikai (megfelelő vizsgálat kérése a klinikus részéről) és a poszt-posztanalitikai (eredmények klinikusi értékelése) folyamatokat külön említik.

1.3.1. 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 vizsgálatára; 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. 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.

1.3.2. Az analitikai fázis

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. 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). 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).

1.3.3. 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. 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.

1.3.4. 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. 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. Ezt felismerve számos munkacsoport elemezte a pre- és posztanalitikai fázisban keletkező hibák hátterét és indikátorokat dolgoztak ki a hibák felismerésére és regisztrálására. Az indikátorok nemzetközi harmonizációjára több munkacsoport tett javaslatot. A jelenlegi konszenzus alapján a preanalitikai fázisban jegyeznek a legtöbb, 28 indikátort, az analitikai fázisban 6, míg a posztanalitikai fázisban 11 indikátort. 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, ezzel azt sugallva, hogy a laboratóriumi folyamat bármely fázisában keletkező hiba befolyásolja az eredmény interpretációját és így téves diagnózishoz vezethet.

1.4. Preanalitikai megfontolások akut limfoblasztos leukémiában szenvedő gyermekek mintái kapcsán

Az akut limfoblasztos leukémia, a leggyakoribb gyermekkori rosszindulatú daganatos betegség, mely 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 a kombinált kemoterápia. A kemoterápia intenzitása és a további terápiás döntések meghozatala nagyban függ a betegség különféle prognosztikai tényezőitől. A helyes kockázatfelméréshez elengedhetetlen a megfelelő minőségű minták vizsgálata. Gyakori preanalitikai hiba, hogy vagy a csontvelő, vagy az agy-gerincvelői folyadék (likvor) perifériás vérrel szennyeződik. Akár morfológiai, akár áramlási citometriai vizsgálatok történnek a mintából, nélkülözhetetlen, hogy elegendő számú élő sejtet tartalmazzon. 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. 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 blastok 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.

A központi idegrendszer érintettsége esetén intrathecalis kemoterápia beadására van szükség. 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 sejtípusonként eltérő.

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 értékeltségéhez szükséges minimális sejtszám (az irodalomban 100 és 1000 közötti értékek lelhetők fel), sem arról, hogy pontosan mik a perifériás vérrel történt szennyezettség igazolásának kritériumai.

1.5. 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. A neuroblastoma a ganglionléc (*crista neuralis*) sejtjeinek rosszindulatú elfajulása, melyek a mellékvese velőállományában vagy a szimpatikus ganglionokban találhatóak. Az "International Neuroblastoma Staging System" (INSS) a szerint osztályozza a betegséget, hogy mely anatómiai lokalizációban található és beszűri-e a csontvelőt. Park és mtsai a csontvelő érintettségének megítélésére immunhisztokémiai vizsgálatok végzését javasolták (CD56, chromogranin A, synaptophysin). Felnőttekben leggyakrabban prosztata-, emlő- és tüdőrák-áttétek jelennek meg a csontvelőben. 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 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. Napjainkban a többszínű áramlási citometria (multicolor flow cytometry, MFC) elsődleges alkalmazási területe a vérképzőrendszeri betegségek felismerése és kategorizálása, de a szolid tumoros betegségek diagnosztikájában és követésében is van szerepe. Ennek ellenére mindezidáig csak kevés olyan tanulmány látott napvilágot, mely kifejezetten a szolid tumorok áramlási citometria segítségével történő fenotipizálására fókuszál. Ferreira-Facio és mtsai 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 elengedhetetlenné válik a diagnózis megállapítására. A csontvelő immunhisztokémiai és áramlási citometriai vizsgálata során kapott eredményeket összehasonlító tanulmányból kevés áll rendelkezésre.

1.6. 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. A betegség stádiumának megállapítására hazánkban elsődlegesen a Rai szerinti besorolási rendszer terjedt el. 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.

Az elmúlt évtizedekben a krónikus lymphocytás leukémia kapcsán számos, 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.) eltérően a timidin-kináz 1 (TK1, ATP-5'-foszofotranszferáz; EC.2.7.1.21) a nem specifikus tumormarkerek közé tartozik, mely a folyamatosan osztódó sejtekben van jelen. 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.

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. A TK1 továbbá CLL és non-Hodgkin-lymphoma esetében prognosztikai marker is.

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. A francia-német CLL7 tanulmányban a nagy kockázatú Binet A stádiumú betegeket beazonosító egyik kockázati tényező a 10 U/L feletti TK1-aktivitás volt. Mag-nac és mtsai a TK1-szint és az IGHV mutációs státusz összefüggésének vizsgálatával azt figyelték meg, hogy a 15 U/L feletti TK1-aktivitással rendelkező betegeknél a gén általában nem mutálódott.

2. 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 paraméterektől és található-e olyan cut-off érték, ami a korban és nemből illesztett egészséges populációtól elkülöníti őket.

3. Anyagok és módszerek

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

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

3.1.1. 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 betegtől 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 betegtől (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).

3.1.2. 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.

3.1.3. 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.

3.1.4 Áramlási citometriai vizsgálatok

Az áramlási citometriai mérések FACSCanto II áramlási citométeren történtek, az adatokat FACSDiva 8.0.2 szoftverrel értékeltük. A 2013 márciusa előtt érkezett prekursor B-sejtes ALL-es és a 2013 szeptembere előtt érkezett T-ALL-es gyermekek mintáit négy színű pannellel,

minden további mintát nyolcszínű panellel vizsgáltunk. 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 mikroyöngyökkel, az Autocomp szoftver segítségével.

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. A likvormintákban vagy syto- és FSC/SSC szekvenciális kapuzással, 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.

3.2. 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.

3.2.1. 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. 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.

3.2.2. 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.

3.2.3. 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 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, EpCAM-PE, CD45-PerCP, és CD33-APC; a neuroblastoma panelben 4 színű kombinációban a következők: CD81-FITC, CD117-PE, CD45-PerCP, és CD56-APC. Ha Ewing-sarcoma vagy histiocytosis gyanúja merült fel, hozzátettük még az alábbiakat: CD99-FITC, illetve CD1a-APC. Néhány esetben az erythroid prekursorok jobb azonosíthatósága érdekében a CD71-FITC használatára is sor került. A vörösvértesteket FACS lizáló oldattal 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 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 végeztük. A neuroblastoma sejtek CD45 negatív, CD56 pozitív, CD81 pozitív és ritkán CD117 pozitív immunfenotípussal jellemezhetők. 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, majd a CD45 negatív régióból a CD56/CD81 pozitív sejtek voltak a reziduális neuroblastomasejtek.

3.2.4. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatok során a csontvelőbiopsziás mintákat 4%-os foszfátpufferelt formaldehidben fixáltuk 24 órán keresztül, majd 1%-os EDTA-val dekalcifikáltuk 48 órán át. A szövetfeldolgozás és paraffinba ágyazás után 4 mikron vastagságú metszeteket készítettünk. Bond-Max készülék és a hozzá tartozó Bond Polymer Refine Detection kit alkalmazásával a metszeteket CD56, CD99, chromogranin A és S-100 jelölésekkel festettük. A metszeteket ezt követően fénymikroszkóppal (Leica DM2500 mikroszkóp, DFC 420 kamera és Leica Application Suite V3 szoftver) vizsgáltuk.

3.2.5. 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: szenzitivitás $[100 \times TP / (TP + FN)]$, specificitás $[100 \times TN / (TN + FP)]$ és diagnosztikai hatékonyság $[(100 \times (TP + TN)) / (TP + TN + FP + FN)]$

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

3.3.1. 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, anyagcsere- vagy krónikus gyulladásos 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).

3.3.2. 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. A betegcsoportban 29 beteg a fent megállapított középkorú, 86 az idős korcsoportba tartozott.

3.3.3. Laboratóriumi módszerek

3.3.3.1. Timidin kináz aktivitás mérése

A TK1-aktivitást indirekt, módosított, kétlépéses kompetitív kemilumineszcens immunoasszé segítségével mértük Liaison immunkémiai analizátoron. 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.

3.3.3.2. 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. Az alkalmazott antitestek: CD19-PE-Cy7, CD38-APC és Zap70. A beteget abban az esetben minősítettük CD38 és/vagy Zap70 pozitívnak, ha a CLL sejtek legalább 20%-a expresszálta ezeket a markereket.

3.3.3.3. 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) tartalmazó médiumban történt tenyésztést követően, vagy nem tenyésztett perifériás vérből történt közvetlen feldolgozást követően vizsgáltuk. A FISH vizsgálathoz használt próbák a következők voltak: LSI Rb1(13q14)/13q34; LSI p53; LSI ATM. A sejteket 4,6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI) jelöltük. Minden próbát legalább 200 interfázisú sejten vizsgáltunk minden betegnél. A képeket Zeiss Axioplan2 fluoreszcens mikroszkóppal készítettük, és ISIS szoftver segítségével elemeztük.

3.3.4. 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.

4. Eredmények

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

4.1.1. ALL-ben szenvedő gyermekek csontvelői mintáinak eredményei

1. csoport

A száznegy 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.

4.1.2. ALL-ben szenvedő gyermekek likvor mintáinak eredményei

A 26 mintából 22 esetben állt rendelkezésre VVT-szám is. Mikroliterenként 100 VVT jelenlétét tekintve a perifériás vérrel történt kontamináció határértékének, a 22 mintából 10 (45%) volt szennyezett. A tizenegy mintánál 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, ezek közül egy volt perifériás vérrel szennyezett. Összesen a 26 mintából 14-ben találtunk malignus sejteket, ezek közül 8 (57%) volt perifériás vérrel szennyezett.

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 az alacsony élő sejtarány mellett is detektálhatók voltak malignus sejtek. Akkor tekintettük pozitívnak a likvormintát, ha a patológiás sejtre jellemző, hasonló tulajdonságokkal rendelkező 10 sejtet találtunk.

4.1.3. 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.

4.2. Analitikai fázis: disszeminált tumorsejtek kimutatására irányuló tanulmány eredményei

4.2.1. Szolid tumor gyanúval vagy igazolt betegséggel bíró csoport eredményei

Harmincnégy beteg összesen 36 (27 csontvelő, 6 likvor, 2 bronchoalveolaris mosó folyadék, 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 csontvelői 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.

4.2.2. 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 betegtől származott. A hét MFC+/IHC- diszkordáns minta hat különböző betegtől 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.

4.2.3. 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. Az egyik ilyen csontvelői aspirátumot leukémia kizárására küldték áramlási citometriai vizsgálatra. Leukémia valóban nem igazolódott, de 30%-nyi CD45-/CD56+/CD81+ neuroblastoma-sejtet mutattunk ki. Giemsa- és chromogranin-festéssel szintén láthatók voltak a neuroblastoma-sejtek a csontvelői aspirátumból készült kenetben, míg a biopsziás minta CD56 és chromogranin jelöléssel 90%-os csontvelői neuroblastoma-infiltrációt igazolt.

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 10%, peritrabecularisan elhelyezkedő patológiás histiocyta jelenlétét igazolta hematoxilin-eozin festéssel, valamint naftol-AS-D-kloroacetát-észteráz és S100 festéssel.

A szolid tumoros csoport másik diszkordáns mintája egy Hodgkin-lymphomás betegtől 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 betegtől. 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.

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. Az egyik tumorosan infiltrált csontvelő egy idős, súlyos thrombocytopeniában szenvedő betegről származott, akinél a thrombocytopenia miatt sem csontvelő- sem tumorbiopsziára, így immunhisztokémiai vizsgálatra sem kerülhetett sor. A csontvelői aspirátumból készített, May-Grünwald-Giemsa szerint festett kenetben kis nagyítással összecsapzódott sejtek voltak láthatók, nagyobb nagyítással többlebenyű, rögös kromatinszerkezetű maggal, 1-2 magvacskával, bazofil, vakuolizált citoplazmával rendelkező malignus sejteket lehetett megkülönböztetni. Áramlási citometriaival vizsgálattal 17% CD45 negatív sejtet találtunk, 1% erythroid prekuzort és 16% EpCAM+/CD56+/CD117+ tumorsejtet, melyek valószínűleg a képalkotó 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.

4.2.4. Szenszitivitás, specificitás, diagnosztikai hatékonyság

Megvizsgáltuk a két módszer szenszitivitását, specificitását és diagnosztikai hatékonyságát tumorsejtek kimutatására csontvelőben és más testfolyadékokban. 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.

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

4.3.1. 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.

4.3.2. 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. 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.

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, ezt a három stádiumot közösen kezeltük, mint előrehaladottabb betegséget.

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 szérumban mért 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 ($p = 0,002$).

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.

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. 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%).

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.

A CD38-/Zap70- betegeket az egyik vagy mindkét prognosztikai faktorra pozitív betegtől 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.

5. Megbeszélés

5.1. 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. Jóllehet a munkacsoport számos tanulmány keretében adott ajánlást, ezek a közlemények kevéssé 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.

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 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. A hemodilúció igazolására számos egyéb módszert is leírtak. 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.

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. Az áramlási citometriának azonban nagy az érzékenysége és a specificitása, és az amerikai National Comprehensive Cancer Network ajánlásában a citomorfológiai

vizsgálatokkal együttesen szerepel. 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. A likvorban a sejtek a mintavételt követően gyorsan pusztulásnak indulnak, legnagyobb arányban a granulocyták és a monocyták vesznek el. Több kutatócsoport is próbálkozott különféle, sejtenyésztéshez használt médiumok hozzáadásával, hogy a gyors sejtpusztulást megakadályozzák, eredményeik biztatóak voltak.

Egyéb tartósítási lehetőségeket is megvizsgáltak, mint például a minta azonnali lehűtését, a centrifugálási lépések minimalizálását, a felülúszó leszívását a leöntés helyett. Stabilizáló szerek, mint például a TransFix[®], szintén alkalmazhatók, sőt, a British Committee for Standards in Hematology kifejezetten ezt ajánlja likvorhoz. A stabilizátort tartalmazó likvor esetében akár 72 órával a mintavétel után is lehetséges az áramlási citometriai analízis. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a TransFix[®]-et és EDTA-t tartalmazó mintatároló csövekben a sejtvesztés minimális, és a szérumot is tartalmazó médiumos vagy kezeletlen csövekben tárolt mintákkal összehasonlítva nagyobb hatásfokkal lehetett a leptomeningealis lokalizációjú hematológiai malignitásokat kimutatni az ilyen csövekben tárolt mintákból, mert a sejtek fényszórási tulajdonságai és antigén-expressziói jól megőrződnek.

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 értékelhetetlen 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. 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.

Vizsgálataink korlátja azok retrospektív természete; prospektív tanulmány keretében lehetőségünk lett volna valamennyi, a minta minőségének értékelése szempontjából fontos paraméter vizsgálatára. 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.

5.2. 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.

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 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. 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 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 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 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 egybehangzók 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 nyirokcsomó-sejtszuspenziók esetén sem. 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 stromába 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 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 testüregei folyadékainak elemzésével megállapították, hogy az áramlási citometria 88%-os érzékenységgel és 98%-os specificitással mutatta ki a tumorsejteket. Munkánkban az áramlási citometria érzékenysége 82% volt a szolid tumoros csoportban és 93% a neuroblastoma-csoportban, a specificitás 100% volt.

Eredményeink alapján neuroblastoma esetén a csontvelői reziduális kóros sejtek megtalálásában az áramlási citometria érzékenyebb és hatékonyabb volt a klasszikus immunhisztolo-

kémiaiánál. Egyéb szolid tumorok esetén azonban az immunhisztokémia bizonyult hatékonyabbnak (100% versus 91%). Ennek háttérében több tényező is állhat: a tumorsejtek adherens természetű, 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.

5.3. 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 hozott 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. A posztanalitikai fázis folyamatai közé tartozik az eredmény értékelése, összevetése az adott analit referencia tartományával.

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 referencia-tartomány alkalmazható-e az általuk vizsgált (beteg)populáción. Kevéssel azt követően, hogy intézetünkben elkezdtük a TK1-méréseket a gyártó által megadott referencia-tartomány (2 – 7,5 U/L) alkalmazásával, kiderült, hogy az általunk vizsgált populációra ez a referencia-tartomány 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, nem találtunk arra vonatkozó adatot, hogy életkor-specifikus TK1-referenciatartományokat megállapítottak volna.

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 referencia-tartományok 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: $2,98$; $p < 0,0001$).

Ismert, hogy a CD38+ CLL prognózisa rosszabb. 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. Tanulmányunkban a CD38+/Zap70+ betegek TK1-aktivitását szignifikánsan magasabbnak találtuk a CD38-/Zap70- betegekéénél, 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.

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

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 egyénekben, ami szükségessé teszi életkor-specifikus referencia-tartományok használatát. Ezen kívül segíthet elkülöníteni a Rai 0 stádiumban lévő CLL-es betegeket az egészségesektől.

6. 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 értékeltségére 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 összehangban 10,5 U/L-nek találtuk.

7. 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.

8. 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., Sędek, Ł., 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 Re-transplanted 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 kardiálisvaszkuláris 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.

