

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A csontvelői stroma aktivációja különböző
onkohematológiai kórképekben**

Dr. Bedekovics Judit

Témavezető: Dr. Méhes Gábor



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014.

Tartalomjegyzék

1	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
2	BEVEZETÉS.....	5
3	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
3.1	<i>A normál csontvelői stroma felépítése</i>	<i>8</i>
3.2	<i>A rostsaporulat kimutatása a csontvelőben.....</i>	<i>12</i>
3.3	<i>Rostsaporulat megítélése különböző csontvelőt érintő kórképekben</i>	<i>14</i>
3.4	<i>A vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor (PDGFR) funkciója és aktivációja</i>	<i>23</i>
3.5	<i>A vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor (PDGFR) szerepe fibrotikus kórképekben</i>	<i>29</i>
3.6	<i>A PDGFR expresszió vizsgálatának lehetséges előnyei myelofibrosisban..</i>	<i>31</i>
4	CÉLKITŰZÉSEK	32
5	METODIKÁK.....	33
5.1	<i>Betegcsoport.....</i>	<i>33</i>
5.2	<i>A crista biopsziás minták feldolgozása</i>	<i>35</i>
5.3	<i>Az MF grádus meghatározására használt eljárás.....</i>	<i>36</i>
5.4	<i>Immunhisztokémiai vizsgálatok.....</i>	<i>37</i>
5.5	<i>Képkötés a PDGFRβ expresszió mértékének objektív megítéléséhez</i>	<i>39</i>
5.6	<i>Statisztikai feldolgozás</i>	<i>40</i>
6	EREDMÉNYEK	41
6.1	<i>A PDGFR expressziós mintázat normál csontvelői mintákon.....</i>	<i>41</i>
6.2	<i>A PDGFR expresszió mintázata myelofibrosisban.....</i>	<i>43</i>
6.3	<i>A PDGFRβ score és az MF grádus közötti kapcsolat.....</i>	<i>45</i>
6.4	<i>A PDGFRβ expresszió myelofibrosis progresszióra gyakorolt prediktív értéke</i>	<i>47</i>
6.5	<i>PDGFRβ expresszió mértékének objektív meghatározása digitális képanalízis segítségével</i>	<i>54</i>
6.6	<i>A PDGFRβ expresszió mértékét tükröző numerikus paraméterek és az MF grádus kapcsolata</i>	<i>59</i>
7	MEGBESZÉLÉS.....	67
8	ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK	75
9	ÖSSZEFOGLALÁS	76
10	SUMMARY	77
10	IRODALOMJEGYZÉK.....	78
11	TÁRGYSZAVAK.....	87
12	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	88
13	TÁMOGATÁSOK	89

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Ang-1: angiopoietin-1

ARC: adventitialis reticularis sejt (adventitial reticular cell)

AUC: area under the curve

CAR: CXCL12 gazdag reticularis sejt (CXCL12 abundant reticular cell)

CML: krónikus myeloid leukemia

CXCR4: chemokin type receptor 4

CXCL12: chemokin c-x-c motif ligand 12 (SDF-1)

DAB: diaminobenzidin

ET: essentialis thrombocythemia

FGF: fibroblast growth factor

FN: fals negatív

FP: fals pozitív

HSC: hemopoeticus őssejt (hemopoetic stem cell)

IPSS: international prognostic scoring system

JAK: Janus kinase

MDS: myelodysplasiás szindróma

MF: myelofibrosis

MPN: myeloproliferativ neoplasia

OPN: osteopontin

PDGF: platelet derived growth factor

PDGFR: platelet derived growth factor receptor

PMF: primer myelofibrosis

PV: polycythemia vera

ROI: region of interest

SCF: stem cell factor

SDF-1: stromal-derived factor 1 alpha (CXCL12)

SMA: smooth muscle actin

TGF β : transforming growth factor beta

VCAM: vascular cell adhesion molecule

VEGF: vascular endothelial growth factor

VLA-4: very late antigen-4

VN: valódi negatív

VP: valódi pozitív

2 BEVEZETÉS

A csontvelőben található mesenchymalis sejtek aktív elemei a vérkézésnek, és dinamikusan reagálnak a csontvelőt érintő primer vagy másodlagos neoplasticus folyamatokra. A mesenchymalis sejtek expansziója és aktivációja sokszor myelofibrosissal jár¹. A myelofibrosis tehát a csontvelői stroma aktivációja különböző reaktív illetve malignus kórképekben, melynek során rostsaporulat jelenik meg². Habár a primer alapbetegség lehet monoklonalis, a rosttermelésért felelős mesenchymalis sejtek jelenlegi ismereteink szerint poliklonalis expansziót mutatnak. A rostsaporulat összetétele alapján beszélhetünk reticulín fibrosisról és kollagén fibrosisról. Az előbbi önállóan is előfordulhat, azonban kollagén fibrosis jellemzően reticulín szaporulat talaján jön létre, és izoláltan nem fordul elő¹. Külön megemlítendő az extracellularis mátrix szaporulat egy speciális formája a csontújdonszaporulat, mely jellemzően súlyos rostsaporulat mellett jelenik meg, ilyenkor az osteomyelofibrosis elnevezés használható¹.

Megfigyelések szerint a klinikai relevancia szempontjából is el kell különítenünk a reticulín illetve kollagén szaporulatot. A reticulín szaporulat elméletileg reverzibilis elváltozás azonban az, hogy a folyamat visszafejlődik vagy progressziót mutat elsősorban a rostsaporulatot előidéző alapbetegség jellegétől függ. A kollagén szaporulat illetve az osteoid képződés ugyanakkor irreverzibilis elváltozások, melyek a kiváltó alapbetegség szanálódása után is fennmaradnak^{1,3}.

A rostsaporulat lehet diffúz illetve fokális. A fokális rostsaporulat gyakran olyan folyamatokhoz társul, amelyek egyszeri, lokális károsodás kapcsán jönnek létre például osteomyelitis, irradiáció talaján kialakuló nekrosis. Ezek az eltérések a vérképző aktivitás egészét nem befolyásolják jelentősen. Diffúz rostsaporulat kialakulhat gyulladásos megbetegedésekben, mint szisztémás kötőszöveti megbetegedések, autoimmun myelofibrosis

vagy mycobacterium fertőzés. Szintén diffúz eltérés formájában jelennek meg egyes metabolikus eltérések, mint például az osteopetrosis, vagy az osteomalacia^{1,3}. A rutin diagnosztikában leggyakrabban malignus eltérés gyanúja miatt kerül sor csontvelői mintavételre, így a neoplasiákhoz társuló fibrosissal találkozunk a leggyakrabban. A malignus folyamatok lehetnek primer vérképző rendszeri kiindulású neoplasiák úgy, mint akut illetve krónikus myeloid leukemia, akut illetve krónikus lymphoid leukemia, myelodysplasiás szindróma, egyéb myeloproliferatív kórképek, plasmasejtes, histiocytás illetve hízósejtes folyamatok. Rostszaporulattal számolhatunk azonban akkor is, amikor a csontvelő másodlagosan infiltrált a neoplasticus sejtek által. Így létrejöhet fibrosis szolid tumorok illetve lymphomák csontvelői infiltrációja esetén is¹.

A rostszaporulat jelenléte sokszor eltérő megítélés alatt áll a különböző kórképekben. Egyes folyamatokban a rostszaporulat dominálja a képet, és prognosztikai szereppel rendelkezik. Primer myelofibrosisban a reticulín és kollagén fibrosis fontos eleme a kórképnek, és független prognosztikai faktora az általános túlélésnek⁴. Krónikus myeloid leukémiában a fibrosis jelenléte a diagnózis időpontjában szintén negatív prognosztikai szereppel bír, megjósolva az elégtelen terápiás választ⁵. Primer myelodysplasiás szindrómában szintén gyakori elváltozás a rostszaporulat, amely amennyiben kifejezett, egy önálló klinikopathológiai entitást jelöl (MDS-F), amely agresszív kórlefolyással jár⁶. Myelodysplasiás szindrómában a fibrosis jelenléte negatív prognosztikai faktora az általános túlélésnek. A csontvelőt érintő betegségek egy másik – nagyobb – csoportjában a mesenchymalis sejtek expansiója és a következményes myelofibrosis hatása a prognózisra nem világos^{4,7}. Egyes esetekben a kóros rostszaporulat segíthet elkülöníteni a neoplasticus és reaktív eltéréseket, úgy, mint például lymphoproliferatív kórképekben. Máskor a mesenchymalis sejtek aktivációja és a rosttermelés még ilyen diagnosztikus szereppel sem bír,

csupán a stroma sejtek és a neoplasticus sejtek kóros kölcsönhatására hívja fel a figyelmünket⁷.

A myelofibrosis diagnózisa a rutin munkában crista iliacából származó csontvelői biopsziás anyagon, reticulin citokémiai reakció alapján történik, melyhez egy négy-fokozatú, szemi-kvantitatív grádus rendszer használatos (MF0-3)³. Az ezüst-impregnáción alapuló festés kiválóan alkalmas a reticulin illetve a kollagén rostozat feltűntetésére, azonban nem ad információt a rosttermelő stroma sejtek számáról és aktivitásáról^{3,8}.

Számos fibrosissal járó kórképben igazolták, hogy a rost termeléséért felelős stroma sejtek proliferációja és maga a rost termelése különböző növekedési faktorok kontrollja alatt állnak⁹. Ezek közül kiemelendő a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF, platelet derived growth factor), valamint a transforming growth factor β (TGF- β). Ezen növekedési faktorok közül a PDGF a fibroblastok proliferációjában, míg a TGF- β a rosttermelés szabályozásában játszik szerepet⁹⁻¹¹.

A vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor (PDGFR) a transzmembrán tirozin-kináz receptorok családjába tartozik, és két altípusa különíthető el (PDGFR α és PDGFR β), melyek homo- vagy heterodimerek képzésére képesek¹²⁻¹⁴. Egyéb fibrotikus kórképekben történt vizsgálatok alapján a tirozin-kináz gátló szerek alkalmazása a fibroblast proliferáció gátlásán keresztül csökkenti a rostszaporulat mértékét^{11,15}.

A doktori munka célja volt a PDGFR expressziós profiljának meghatározása normál csontvelői állományban, valamint a PDGFR expresszió és a myelofibrosis (MF) grádus közötti kapcsolat vizsgálata. További cél volt a fokozott PDGFR expresszió prediktív értékének meghatározása MF progresszió szempontjából. A tanulmány utolsó lépésében egy, a stroma aktiváció mértékét és megoszlását objektíven jelző módszer kidolgozására került sor.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 *A normál csontvelői stroma felépítése*

A vérképző (vörös) csontvelői állomány felnőttkorban a koponyacsontokban, a csigolyákban, a bordákban, a sternumban és a medencecsontokban található. Az egyik legnagyobb szervünknek számító csontvelői állomány gazdag mesenchymalis komponensekben, melyek nem csupán mechanikus és nutricionális támogatást nyújtanak a vérképző elemek számára, hanem részt vesznek a hemopoiesis finom szabályozásában is¹⁶. A hemopoeticus őssejtek (HSC) reciprok kölcsönhatásban állnak a csontvelői stroma különböző komponenseivel. A csontvelői homeosztázis fenntartásáért felelős stromalis mikrokönyezet, vagy más néven niche, a növekedési faktorok, citokinek, extracelluláris mátrix, ionok olyan összetételét és gradiensét alakítja ki, amely szabályozza a hemopoeticus őssejtek osztódási aktivitását, differenciálódási készségét, mobilizációját. Egyes tanulmányok szerint a nyugvó őssejtek az osteoblastos (endostealis) nichben találhatóak, míg a proliferáló őssejtek a vascularis nichben foglalnak helyet (1. Ábra)¹⁷⁻²⁰.

3.1.1 Endostealis és vascularis niche

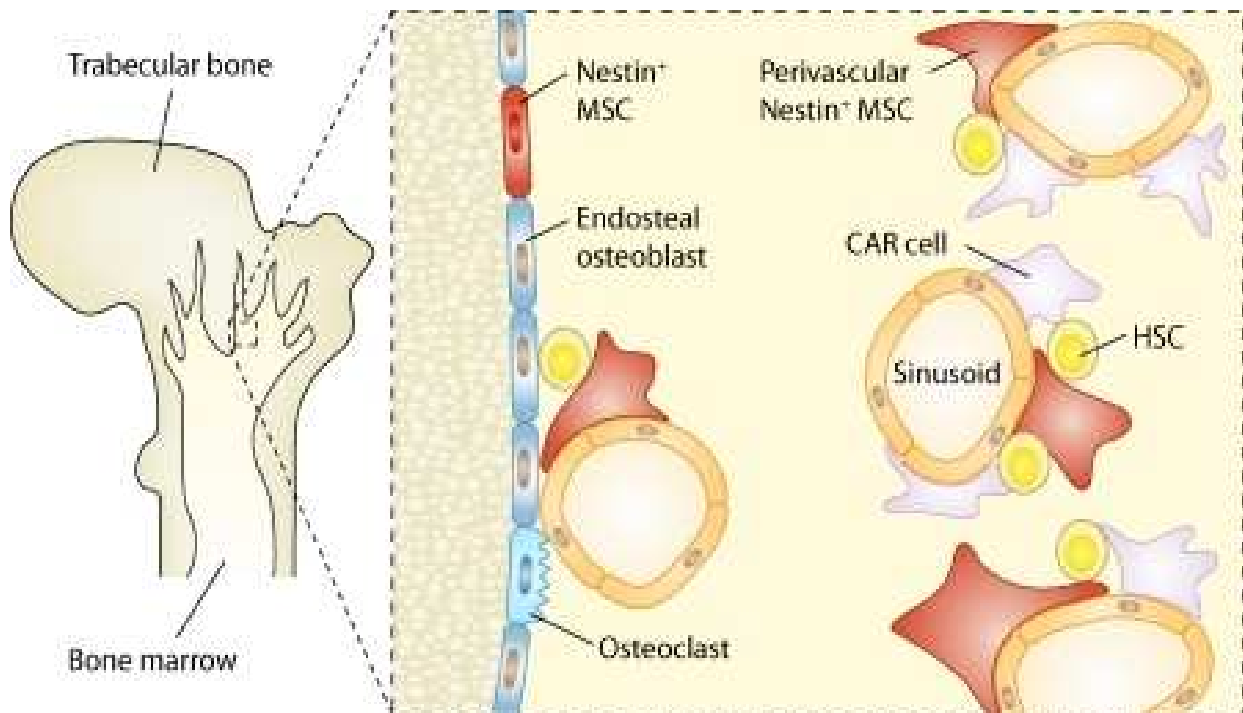
A csontvelőben kiterjedt medullaris sinus hálózat található, amely az endosteumnál lévő corticalis kapillárisoktól ered és a szisztémás vénás keringésben végződik¹⁶. A sinusok felépítésében endothel sejtek, illetve ún. adventitialis reticularis sejtek (ARC) vesznek részt, melyeket a basalis membrán választ el egymástól. A reticularis sejtek reticulín rostokat termelnek, amelyek a reticularis sejtek nyúlványával együtt az intersinusoidalis térbe nyúlnak,

emellett ezek a sejtek kis mennyiségben az intersinusoidalis térben önállóan is előfordulhatnak¹⁷⁻¹⁹. A reticularis sejtek egy része CXCL12 (stromal-derived factor 1 alpha; SDF-1 α) expressziót mutat, melyeket CAR (CXCL12 abundant reticular cells) sejteknek is neveznek. A CXCL12 receptorául szolgáló CXCR4 a hemopoeticus őssejtek felszínén azonosítható, és a CXCR4/CXCL12 tengely az őssejt homing egyik legfontosabb szabályozó eleme^{7,17-19}. Az említett sinushálózatot alkotó endothel sejtek is egyedi, specializált elemei a vasculaturának. A sinus hálózatot alkotó reticularis és endothel sejtek együttesen vesznek részt a mikrokörnyezet kialakításában. Ez az egység az ún. vascularis niche, amelyre magas oxigén és alacsony kalcium koncentráció jellemző. Itt megy végbe a HSC-k proliferációja és differenciációja¹⁷.

A csontvelői stroma másik fontos alkotóeleme a trabecularis csontgerendák bélését képző endostealis réteg. Az endosteum tartalmaz osteoblastokat, endostealis fibroblastokat, és helyenként osteoclastok is feltűnhetnek¹⁶. Az endostealis régióban látható őssejt pool topográfiai vizsgálatokkal igazolható. Az endostealis sejtek és a HSC-ek száma között pozitív korreláció figyelhető meg. Az endostealis sejtek által termelt legfontosabb faktorok az osteopontin (OPN), angiopoietin-1 (Ang-1), membrán kötött stem cell factor (SCF) melyek a HSC sejtek nyugvó állapotban tartásának irányában hatnak¹⁷⁻¹⁹. Fontos megjegyezni, hogy az endostealis rétegben is kimutathatók CXCL12 termelő sejtek, valamint kisebb mennyiségben az csontgerendák közelében is láthatók sinus és kapilláris átmetszetek¹⁹. Az endosteumban és közvetlen környezetében látható egység az ún. osteoblastos niche, amely kisebb oxigén és nagyobb kalcium koncentrációt mutat. Az itt lévő HSC sejtek nyugvó (G0) fázisban vannak¹⁷.

A két niche tehát részben eltérő felépítéssel rendelkezik, másrészt azonban a CXCL12 termelés mindkét lokalizációban kimutatható. Átfedést jelent még a vascularis és az osteoblastos mikrokörnyezet között a nestin expressziót mutató sejtek jelenléte, melyek szintén képesek CXCL12 termelésre. A nestin pozitív sejtek perivascularis lokalizációban

helyezkednek el, és funkcionális valamint morfológiai szempontból átfedést mutatnak a CAR sejtekkel. Úgy vélik, a nestin pozitív mesenchymalis sejtek a CAR sejtek primitívebb altípusát képviselik, a nestin expresszió a mesenchymalis őssejtekben megfigyelhető.



1. ábra. Hemopoieticus őssejt (HSC) niche lokalizációja a csontvelőben (Enhinger A. és mtsai, 2011)²⁾. A hemopoieticus őssejtek az osteoblastos és vascularis mikrokörnyezet (niche) szomszédságában mutathatók ki. Az osteoblastos niche-ben osteoblastok, osteoclastok, mesenchymalis őssejtek (MSC) és kis számban sinusok láthatók. A vascularis niche a csontgerendáktól távolabb helyezkedik el, és nagy mennyiségben tartalmaz CXCL12 termelő reticularis sejteket (CAR), itt is megfigyelhetők nestin pozitív mesenchymalis őssejtek.

Bár az osteoblastos és vascularis niche fogalma széles körben ismert, jelenleg nem teljesen elfogadott elmélet. Felmerül annak a lehetősége, hogy a két kompartment nem különül el élesen egymástól, illetve egyes kutatók szerint az osteoblastos mikrokörnyezetben is az ott jelen lévő erek játsszák a fő szerepet.

3.1.2 A zsírsejtek szerepe a csontvelő felépítésében

Említést kell tenni a zsírsejtekről, amelyek életkortól függően a vörös csontvelő állomány 30-70%-át képezik, valamint mennyiségük a legtöbb esetben fordított arányban áll a hemopoieticus állomány méretével^{3,16}. A zsírsejtek szintén aktív résztvevői a hematopoiesis finom szabályozó rendszerének, adiponectin és tumor nekrosis faktor termelésével negatív hatást gyakorolnak a HSC-poolra⁷.

3.1.3 A csontvelői mátrix

A csontvelői mesenchymalis sejtek gazdag extracellularis mátrixot termelnek, amely tartalmaz proteoglykánokat, glycosaminoglykánokat, fibronectint, tenascint, reticulint, kollagént, laminint, thrombospondint. Az extracellularis mátrixhoz számos citokin kötődhet, így az részt vesz egy citokin gradiens kialakításában, amely a különböző régiók eltérő sajátságait magyarázza. A rostok továbbá különböző adhéziós molekulákhoz kapcsolódva aktiválhatnak, vagy éppen gátolhatnak sejtfunkciókat^{1,16}.

Korábbi vizsgálatok felmérték az egészséges egyénekből származó csontvelő biopsziás minták reticulín és kollagén rost tartalmát. A vizsgálatba bevont személyeknél kizárható volt olyan alapbetegség jelenléte, amely rostsaporulatot eredményez. Két ilyen tanulmány eredménye érhető el, melyek a kiértékelés során a Bauermeister skálát²¹ használták (1. táblázat). Az eredmények alapján elmondható, hogy az egészséges populáció 20-27%-ának látható a csontvelő biopsziás mintáiban igen finom rostozat (Bauermeister 2). Ez azt jelenti, hogy a mintában azonosítható elszórtan néhány egyedülálló reticulín rost, mely mellett elszórtan kisebb gócbokban reticulín rostokból álló finom hálózat is megjelenik. Ez az Európai

Konszenzus rendszerében MF-1 grádusnak felel meg (1. táblázat). A populáció mindössze 4-5%-ában lehetett ennél kifejezettebb rostsaporulatot azonosítani, azonban egyetlen esetben

Módosított Bauermeister gradálási rendszer (Bauermeister, 1971; Bain et al, 2001)	
0	Nincs kimutatható reticularis rostozat
1	Elszórta láthatók izolált rost fragmentumok vagy kisebb gócban finom rost hálózat
2	Finom rosthálózat látható diffúzan az egész mintában, nincs durva rostozat
3	Finom rosthálózat látható diffúzan az egész mintában, kisebb gócban durva kötegekkel, kollagén szaporulat nem mutatható ki (Trichrome festés negatív)
4	Diffúz, gyakran durva rostozat kötegekkel, kollagén szaporulat kimutatható (Trichrome festés pozitív)
Az Európai Konszenzus ajánlása (Thiele et al, 2005)	
0	Elszórt reticulín rostozat kereszteződések nélkül, ekvivalens a normál csontvelővel
1	Laza rosthálózat számos kereszteződéssel, különösen a perivascularis régiókban
2	Diffúz és denz rosthálózat számos kereszteződéssel, kisebb gócban rostkötegekkel és/vagy osteosclerosis jeleivel
3	Diffúz és denz rosthálózat számos kereszteződéssel, durva rostkötegekkel, kollagén szaporulattal, a folyamatot gyakran szignifikáns osteomyelofibrosis kíséri sem jelent meg kollagén szaporulat ¹ .

1. táblázat. A csontvelői rostsaporulat megítélésére használt leggyakoribb szemikvantitatív gradálási rendszerek.

3.2 A rostsaporulat kimutatása a csontvelőben

A rostsaporulat kimutatása minden esetben dekalcinált, fixált, paraffinba ágyazott biopsziás mintákból történik, melyek jellemzően a crista iliacából származnak. A csontvelői aspirátum nem alkalmas a rostsaporulat kimutatására, mivel a rostozat rögzül a környező nagyobb erekhez, csontgerendákhoz, így az aspirátumban csak kisebb mennyiségben jelenhet meg. Fibroticus csontvelő esetén az aspirátum egyéb betegség kimutatására is alkalmatlan lehet, amennyiben a kinyert minta hypocellularis vagy acellularis (punctio sicca)^{1,3}.

A myelofibrosis reprezentatív értékeléshez szükséges, ideális minta jellemzői az Európai Konszenzus alapján: A biopsziás minta minimum 1,5 cm hosszúságú, és legalább 10

intertrabecularis, reprezentatív látóteret tartalmaz. A reticulin mennyiségének megítélése csakis a vérképző állomány területén lehetséges. A csontvelő biopsziás minta gyakran tartalmaz periosteum részletet illetve egyéb lágyrészeket, melyek rostban gazdagok. Ezen részletek természetesen nem tartoznak a vérképző állományhoz³. A biopsziás minta mechanikus stressztől való védelme a pre-analitikai fázisban szintén fontos szempont, hiszen a külső behatás következtében összenyomódott állományban a kisebb ereket illetve zsírsejteket körülvevő, valamint az egyesével elhelyezkedő finom reticulin rostok közel kerülnek egymáshoz, és azt a benyomást kelthetik, hogy a mintában fokális rostsaporulat van jelen.

Ahhoz, hogy a klinikai tanulmányokban a fibrosis mértéke összehasonlítható legyen, régóta kialakult a törekvés egy egységes szemi-kvantitatív értékelési rendszer kidolgozására. Ezen score rendszerek alapja a rostsaporulat kimutatására szolgáló speciális festések kidolgozása volt. Az egyik ilyen – napjainkban is használt – festés a Gömöri-féle ezüst impregnáció, amely a rostokat övező glycoprotein mátrixot tünteti fel⁸. Ezen festéssel a reticulin rostozat fekete vékony szálcsák formájában tűnik fel, míg a kollagén rostok világosbarna illetve sárgásbarna kötegek formájában jelennek meg. A másik gyakran használt festési eljárás a trichrome festés, amely kék színben rajzolja ki a kollagén rostokat^{1,3}. Bizonyos esetekben a legmagasabb grádusú rostsaporulathoz csontújdonképződés is társulhat, ennek kimutatása HE festéssel is lehetséges, nem igényel speciális eljárást. Ilyenkor a csont trabeculákhoz kisebb csipkék, tövisek formájában osteoid kapcsolódik, amely színben eltér a már calcifikált csontállománytól¹. A csontvelőben az erek adventitialis rétegében, a zsírsejtek körül normál esetben is láthatunk reticulin rostokat, így ezek a festések minőségének megítélése során belső kontrollként szolgálnak. Kollagén rostokból álló kötegek illetve csontújdonképződés normál esetben nem figyelhetők meg^{1,3}.

Összesen tíz szemi-kvantitatív rendszer ismert, amelyek közül a legelterjedtebb a Bauermeister scale (1971)²¹, illetve az Európai Konszenzus rendszere (2005)³. Ezen rendszerek kidolgozása primer myelofibrosisban szenvedő betegek csontvelői biopsziás mintáinak vizsgálatával valósultak meg (1. táblázat).

3.3 Rostszaporulat megítélése különböző csontvelőt érintő kórképekben

Rostszaporulat számos kórképben megjelenhet, melyek közül a neoplasticus folyamatoknak van kiemelt jelentősége (2. táblázat). A különböző, a csontvelőt infiltráló

Diffúz rostszaporulattal járó kórképek	
Primer csontvelői neoplasiák	Nem neoplasticus szisztémás betegségek
Primer myelofibrosis (PMF)	
Szekunder myelofibrosis egyéb myeloproliferatív kórképekben PV, ET, CML	Primer autoimmun MF
Primer- és szekunder myelodysplasiás szindróma MDS-F	Egyéb kötőszöveti betegségek Osteopetrosis
Akut myeloid leukemiák	Primer és szekunder hyperparathyroidismus
Akut lymphoid leukemiák	D-vitamin defficiencia
Érett B- és T-sejtes neoplasiák	Primer hypertrophiás osteoarthropathia
Szisztémás mastocytosis	
Szisztémás histiocytosis	
A csontvelőt másodlagosan infiltráló betegségek	Toxikus hatás
Szolid tumormetasztázis	
Hodgkin- és non-Hodgkin-lymphoma	

primer- illetve secunder neoplasticus folyamatok más-más mértékben aktiválják a csontvelői stromát, és a stroma aktiváció eltérő klinikai relevanciával bír.

2. táblázat. Diffúz rostsaporulattal járó kórképek (Kuter DJ. és mtsai, 2007)¹.

3.3.1 Rostszaporulat myeloproliferatív neoplasiákban

A myeloproliferatív neoplasia hemopoeticus őssejteket érintő klonális elváltozás, amely egy vagy több sejtvonal szaporulatával jár. A 2008-as WHO klasszifikáció alapján a myeloproliferatív neoplasiák két fő csoportra oszthatók, ezek a Philadelphia- kromoszóma pozitív és negatív formák. Philadelphia-kromoszóma (BCR-ABL) pozitív eltérés a krónikus myeloid leukemia. A Philadelphia-kromoszóma negatív csoportba tartoznak az essentialis thrombocythemia, polycythemia vera, primer myelofibrosis²². A BCR/ABL negatív myeloproliferatív kórképek nagy átfedést mutatnak klinikailag, histopathológiailag illetve a JAK2 mutáció felismerése óta kijelenthetjük, hogy molekuláris szinten is^{4,22}. Ugyanakkor meg kell jegyezni azt, hogy a három jól ismert altípus eltérő gyakorisággal mutat transzformációt súlyos myelofibrosis illetve akut leukemia irányába⁴.

Polycythemia vera esetében a csontvelői vizsgálat során trilinearis hyperplasia látható a hypercellularis mintában (3. táblázat). A megakaryocyták száma emelkedett, méretük változatos, a myeloid és az erythroid vonal balra tolt^{4,22}. Az esetek 30%-ában fejlődik ki később súlyos myelofibrosis, amelyet post-PV fibrosistnak nevezünk, valamint az esetek 10%-a mutathat AML transzformációt⁴. A post-PV-ben látható előrehaladott fibrosis előtt, a cellularis fázisban is előfordulhat reticulín szaporulat, amely igen enyhe fokú (MF-1). Ha a cellularis fázisban már jelen volt ilyen rostsaporulat, nagyobb a későbbi fibroticus transzformáció esélye. A kezdetől fibrosist mutató eseteknél nagyobb továbbá a lép mérete, illetve érdekes módon alacsonyabbnak mutatkozik a thrombotikus események száma, mely két megfigyelés között összefüggést feltételeznek. A leukemiás transzformációban azonban nincs különbség a kezdetben enyhe fibrosist mutató és a rostsaporulat nélküli esetek között²³.

Polycythemia vera (PV) diagnóza /összes major és egy minor vagy első major és két minor kritérium/
major kritériumok:
hemoglobin >18,5g/dl férfiakban, >16,5g/dl nőkben; illetve egyéb bizonyíték megléte az emelkedett vörösvértest térfogatra
JAK2V617F mutáció vagy más funkcionálisan hasonló mutáció, pl. JAK2 exon 2 mutáció
minor kritériumok:
csontvelő biopsziás mintában korhoz képest hypercellularitás és trilinearis myeloproliferatio
a serum erythropoetin szint a normáltartomány alatt van
endogén erythroid kolónia formáció in vitro

3. táblázat. WHO 2008-as kritériumrendszere a polycythemia vera (PV) diagnózisához.

Az essentialis thrombocythemia és a primer myelofibrosis esetében is előfordulhat areaktív thrombocytosis²⁴. Essentialis thrombocythemiában a normocellularis vagy mérsékelten hypercellularis csontvelőben a megakaryocyták aránya emelkedett, azok laza csoportokat alkotnak. A sejtek általában a szokványosnál nagyobbak, érettek, ebben a kórképben jellemző az ún. staghorn-like megakaryocyta. A myeloid és erythroid vonal többnyire nem érintett (4. táblázat)^{4,22,24}. Az essentialis thrombocythemia jellemzően nem társul fibrosissal (ez az esetek kevesebb, mint 10%-ában mutatható csak ki), és a Philadelphia-negatív MPN csoporton belül a legkedvezőbb kórlefelgyáással rendelkezik⁴. A betegek átlagos túlélése nem tér el jelentősen a normál populációjától²⁵. Amennyiben essentialis thrombocythemiában kifejezett myelofibrosis jelenik meg a követés során, az eredeti diagnózis revíziója szükséges. Ebben az esetben a kezdeti eltérés a kialakult morfológiai képtől függően polycythemia vera vagy primer myelofibrosis korai formája lehetett. A jelenleg legszélesebb körben elfogadott prognózisbecslő illetve terápiás protokollok nem tartalmazzák a myelofibrosis megítélését ET-ben^{24,26}.

Essentialis thrombocythemia (ET) diagnóza
/mind a 4 kritériumnak teljesülnie kell/
thrombocyták szám tartósan $\geq 450 \times 10^9/L$
a csontvelő biopsziás mintában főként a megakaryocyták sejtvonalát érintő proliferáció, emelkedett számú, nagyméretű, érett megakaryocyták, nem jelentős neutrophil granulopoiesis és erythropoiesis
JAK2V617F vagy más klonális marker kimutatható
vagy
JAK2V617F hiányában a reaktív thrombocytosis kizárható

4. táblázat. WHO 2008-as kritériumrendszere az essentialis thrombocythemia (ET) diagnózisához.

Primer myelofibrosis (PMF) esetében a diagnózis egyik major kritériuma a rostszenesedés. Szinte mindig láthatunk megakaryocyták szenesedését, és a sejtek alakja változatos, megakaryocyták atypia is megjelenhet. Emellett hypercellularis állomány, balra tolt granulocyták vonal, esetleg erythroid depletio a főbb jellemzők. Minor kritériumok a splenomegalia, anemia, magas LDH szint illetve erythroblastosis (5. táblázat)^{4,22}. A PV-hez hasonlóan itt is elkülöníthető egy ún. pre-fibroticus stádium. Ennek a kezdeti fázisnak több elnevezése is ismert úgy, mint krónikus megakaryocyták-granulocyták myelosis, cellularis idiopathiás myelofibrosis, cellularis primer myelofibrosis. Később, a kórlefordulás során azonban súlyos reticulín szenesedés jelenik meg, mely kollagén fibrosissal valamint osteosclerosisral társulhat. Leukémiás transzformáció mintegy 8%-ban fordul elő⁴.

Az International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment ajánlása alapján a primer myelofibrosis prognózisbecslésében széles körben elfogadott klinikai score rendszer az International Prognostic Scoring System (IPSS) amely öt klinikai paramétert vizsgál, és ez alapján négy prognosztikai csoportot különít el²⁷. A klinikai vizsgálatok alapján ezen prognosztikai score rendszer jó összefüggést mutat az általános túléléssel. A vizsgálatokból kiderül, hogy a primer myelofibrosis egy prognosztikailag heterogén csoport, a betegek túlélése tág határok között változik. A fibrosissal a prognózisra gyakorolt hatását legrészletesebben ebben a kórlefordulásban vizsgálták. Ezen vizsgálatok szerint az Európai

Konszenzus grádusa független prognosztikai faktornak tekinthető az általános túlélés tekintetében^{27,28}. Ez alapján a myelofibrosis grádus rendszerének is van létjogosultsága az IPSS mellett, és a kettő együttes használata tűnik a legoptimálisabbnak. A primer myelofibrosis kezelésében megjelenő új lehetőségek, mint az allogén őssejt transzplantáció és a JAK-2 gátló kezelések teszik fontossá ebben a csoportban a prognózis pontos megítélését²⁹.

Primer myelofibrosis (PMF) diagnózisa /mindhárom major és két minor kritériumnak teljesülnie kell/
major kritériumok:
megakaryocita proliferatio és atypia, melyhez reticulin vagy kollagén fibrosis társul
vagy
jelentős reticulin-fibrosis hiányában a megakaryocytákat érintő elváltozást csontvelői hypercellularitás kíséri, melyet főleg a granulocyta proliferatio okoz és gyakran társul csökkent erythropoesissel (prefibroticus cellularis fázis)
PV, CML, MDS vagy más myeloid kórképek WHO kritériumainak nem felel meg
JAK2V617F vagy más klonális markerek (MPLW515K/L) kimutathatók
vagy
a fent említett klonális markerek hiányában szekunder fibrosisa nincs bizonyíték
minor kritériumok:
leuko-erythroblastosis
emelkedett serum laktát-dehidrogenáz szint
anemia
splenomegalia

5. táblázat. WHO 2008-as kritériumrendszere a primer myelofibrosis (PMF) diagnózisához.

A primer myelofibrosis illetve polycythemia vera esetében tehát súlyos fibrosis és akár osteomyelofibrosis is előfordulhat a betegség terminális állapotában. Az előrehaladott myelofibrosis (MF-2 ill. -3) klinikai jelei az anemia, splenomegalia, leuko-erythroblastosis, tear-drop vörösvérsejtek, melyek a myeloid metaplasia tüneteinek felelnek meg^{30,31}. Ilyenkor a csontvelőben elszórtan maradvány hemopoeticus gócok előfordulhatnak, amelyek hypocellularis, fibroticus zónákkal keverednek. Csontújdonképződés gyakran látható.

A primer myelofibrosis komplex pathomechanizmussal rendelkezik. Egyrészt a neoplasticus myeloid sejtek növekedési faktorokat termelnek (pl. PDGF, FGF, TGF β , VEGF), melyek a stroma sejteket aktiválják, ezek pedig szintén képesek növekedési faktorok termelésre. A folyamat során az adventitialis reticularis sejtek, valamint a mesenchymalis őssejt markerekkel azonosítható sejtek száma emelkedik^{2,32,33}. Primer myelofibrosisban deprimált továbbá a CXCL-12/CXCR4 tengely. Ennek kapcsán egyrészt a HSC sejtek CXCR4 expressziója csökkent, másrészt a funkcionális CXCL-12 mennyisége is alacsonyabb. Mindez együttesen a HSC sejtek homingjának csökkenéséhez vezethet, amely következtében azok a keringésbe juthatnak, ez pedig hozzájárulhat az extramedullaris vérképzéshez^{2,33}.

A myelofibrosis pathogenesisében fontos szerepet tulajdonítanak bizonyos növekedési faktoroknak, így a vérlemezke eredetű növekedési faktornak (platelet derived growth factor = PDGF) is, amely a tirozin-kináz receptor családba tartozó PDGF receptort aktiválja. A tirozin kináz gátló kezelések bevezetése óta a myelofibrosis megítélése krónikus myeloid leukemiában eltérő a többi myeloproliferatív neoplasiaéhoz képest. Az imatinib kezelés a BCR/ABL aktivitás gátlásán túl, blokkolja a PDGFR α és PDGFR β útvonalat, valamint a TGF β általi c-abl stimulációt is¹⁵. Ez egy fontos szempont, hiszen a myelofibrosis az imatinib kezelés előtt a CML gyakori szövődménye volt, mely összefüggést mutatott a CML stádiumával valamint a túléléssel. Az imatinib kezelés bevezetése kapcsán azonban ezeket az összefüggéseket újra kell elemezni, mely jelenleg is folyamatban van. Az azonban már ismert, hogy az imatinib kezelés a betegek jelentős hányadában csökkenti a csontvelőben a rosttartalom mértékét, és egyes esetekben a rosttartalom a normál szintre áll vissza^{5,34}. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy az imatinib kezelés nem jelent biztos védelmet a rostsaporulat megjelenése ellen.

Megállapítható, hogy a diagnózis időpontjában kimutatott rostsaporulat az imatinib kezelés érájában is hatással van a prognózisra. CML accelerált fázisa gyakrabban fordult elő a

diagnóziskor fibrotikus esetekben, illetve a fibrosis nélküli esetekben nagyobb gyakorisággal értek el major molekuláris és komplett citogenetikai választ. Tehát igaz, hogy egyes esetekben az imatinib visszafordítja a fibrosist, a kezdetben fennálló fibrosis negatív prognosztikai hatását nem törli el^{5,35}.

Megemlítendő ugyanakkor, hogy a myeloproliferatív neoplasiák pathogenesisében fontos szerepet tulajdonítanak bizonyos mutációk jelenlétének, melyek kimutatása része ezen kórképek diagnosztikájának. A 2008-a WHO klasszifikáció is említést tesz a JAK2 (V617F) illetve az MPL (W515) mutációkról, melyek a myeloproliferatív kórképek klonális elváltozásainak tekinthetők. A 2013-ban leírt CALR (calreticulin mutáció) szintén klonális eltérésnek bizonyult MPN-ben. A fentieken túl számos szubklonális eltérés is leírásra került (ASXL1, SRSF2, EZH2, IDH1 és IDH2), melyek szintén összefüggést mutatnak a betegség progressziójával és egyes klinikai paraméterekkel³⁶.

Az eddigi vizsgálatok alapján elmondható, hogy a CALR mutációt hordozó beteg kórlefolysa kedvezőbb, mint a JAK2 illetve MPL mutációt hordozó betegeké, valamint megállapítható, hogy a tripla-negatív alcsoport a legkedvezőtlenebb kimenetellel társul. Az eddigi eredmények alapján felmerül, hogy a három klonális mutáció meghatározása része lehetne a prognózis meghatározásának az IPSS-ben használt klinikai paraméterek mellett. Ezt a megközelítést kliniko-molekuláris prognózisbecslésnek nevezik³⁶.

A különböző mutációk meghatározásának azonban nem csak prognosztikai szerepe van, hanem azok terápiás célpontként is szolgálhatnak. Így például már a klinikumban is használatos JAK-2 inhibitorok, mint például a ruxolitinib - nemrégiben kerültek bevezetésre, indikációjuk a közepes illetve magas kockázatú myelofibrosis, illetve poszt-polycythemia vera és poszt-essentialis thrombocythemia myelofibrosis³⁷.

3.3.2 Rostszaporulat myelodysplasiás szindrómában

Myelodysplasiás szindrómákban a fibrosis gyakorisága 12-50% között mozog és előfordulhat enyhe (MF-1) illetve előrehaladott (MF2-3) rostszaporulat is³⁸. Bár enyhe rostszaporulat bármely WHO alcsoportban előfordulhat, az Európai Konszenzus ajánlása alapján a myelodysplasiás szindrómákon belül elkülöníthető az a klinikopathologiai alcsoport, amely legalább MF-2 grádusú fibrosissal társul. Az MDS-F (MDS fibrosissal) alcsoportot több sejtvonalat érintő dysplasia jellemzi, valamint gyakoribb dysmegakaryopoiesis, és a blasztszaporulat³⁸. Az általában agresszív lefolyású betegségben nagy a betegek transfúziós igénye.

Összességében megállapítható, hogy az előrehaladott fibrosis az IPSS-től független prognosztikai faktornak tekinthető az általános túlélésre vonatkoztatva MDS-ben^{6,39-41}. A fibrosis kedvezőtlen hatása valószínűleg nem a vérképző állomány csökkenésével magyarázható, hanem a fibrosis a csontvelői homeosztázis zavarát, a csontvelői mikrokörnyezet diszfunkcióját jelzi. Így a fibrosis nem a közvetlen magyarázata lehet a kedvezőtlen kórlefolyásnak, hanem egyfajta indikátora annak⁶. Jelenleg az MDS-ben használt két klinikai prognózisbecslő rendszer közül sem az IPSS, sem pedig a WHO klasszifikáción alapuló score rendszer sem tartalmazza a fibrosis megítélését³⁸.

3.3.3 Rostszaporulat akut leukemiákban

Az akut myeloid leukemiáknak két alcsoportja ismert, amely kifejezett rostszaporulattal járhat: az akut panmyelosis myelofibrosissal, illetve az akut megakaryoblastos leukemia. Mindkét betegség igen ritka, és jellemző rájuk a dysplasticus „dwarf” megakaryocyták jelenléte hypolobulált sejtmaggal. Egyes elképzelések szerint a kóros megakaryocyták citokin

termelésének hatására jelenik meg rostsaporulat a csontvelőben⁴². Rostszaporulat azonban egyéb leukemia típusokban is előfordulhat enyhébb formában, és az a mikrokörnyezet zavarára utal. Akut leukemiákban a neoplasticus sejtek a hemopoeticus progenitor sejtek számára fiziológiás mikrokörnyezetet modulálják, és használják fel progressziójuk során. Ennek alapján egyes újabb terápiás beavatkozások a CXCL12/CXCR4 tengelyt, integrineket és az angiogenezist célozzák⁷.

3.3.4 Rostszaporulat hajás sejtes leukemiában és egyéb lymphoproliferatív kórképekben

Bár számos lymphoproliferatív kórkép társul stroma reakcióval és így fibrosissal, a rostsaporulat szempontjából kiemelt jelentőséggel bír a hajás sejtes leukemia klasszikus formája. Ez a krónikus lymphoproliferatív kórkép, mono- vagy pancythopeniával illetve splenomegaliával jelentkezik és jellemző rá a szignifikáns rostsaporulat jelenléte, valamint a következményes punctio sicca⁴³. E miatt a jellegzetesség miatt a hajás sejtes leukemia neoplasticus sejtjei és a csontvelői mesenchymalis sejtek kapcsolata részletesen tanulmányozott. A CXCR4 illetve VLA-4 molekulák fontos szerepet játszanak a hemopoeticus őssejtek migrációjában, adhesiójában és retentiójában. A neoplasticus B-sejtek ezen kapukat használják arra, hogy elfoglalják azon fészkeket vagy mikrokörnyezeteket, amelyek normál körülmények között a hemopoeticus őssejtek védelmét és szabályozását szolgálják. Mindez úgy lehetséges, hogy a neoplasticus „őssejtek” is rendelkeznek ezen receptorokkal (CXCR4, VLA-4), melyek ligandjait a mesenchymalis sejtek termelik (CXCL-12 valamint VCAM-1 és fibronectin). Ezt a kapcsolatot részben felelőssé teszik a kóros sejtek terápia rezisztenciájáért is⁴⁴.

A hajás sejtes leukemia mellett egyéb lymphoproliferatív kórképekre is jellemző az, hogy csontvelői infiltrációt okoznak. Érdekes jelenség az, hogy egyes kórképek interstitialis, mások

nodularis míg ismét mások paratrabecularis megoszlást mutatnak. Ez a különböző neoplasticus sejtek szelektív homing mechanizmusával magyarázható. A homing után a neoplasticus sejtek kórosan befolyásolják a stromalis mikrokörnyezet összetételét, így létrehozva a neoplasticus niche-t. Ez általában az erek proliferációjával, az adhézións molekulák expressziós profiljának változásával jár. Egyes esetekben a folyamathoz fibroblast szaporulat és reticulín fibrosis is társul. A rostsaporulat a kivételes esetektől eltekintve – mint hajás sejtes leukémia – általában nem jelentős, azonban jelenléte segíthet a reaktív és neoplasticus lymphoid infiltrátum elkülönítésében^{7,45}.

3.3.5 Rostszaporulat szolid tumor metastasisban

Számos szolid tumor érintheti a csontvelőt, amelyet a csont metastasis előfutárának is tartanak¹. Előfordulhatnak disszeminált tumor sejtek egyesével vagy kisebb csoportokban a csontvelői mikrokörnyezetben, illetve megjelenhet klinikailag releváns metastasis is. A lymphoproliferatív neoplasiákhoz hasonló módon, a szolid daganatok tumor sejtjei a hemopoieticus őssejtek belépési pontjait és speciális szupportív környezetét használják ki a csontvelőbe való bejutáshoz és a további invázióhoz, amit parasitismusnak is nevezhetünk. A kóros citokin expressziós profil itt is egy neoplasticus niche kialakulásához vezet, amely azonban általában jelentősebb ér- és fibroblast proliferációval társul, amely jelentős reticulín fibrosist vonhat maga után⁴⁶.

3.4 *A vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor (PDGFR) funkciója és aktivációja*

A vérlemezke eredetű növekedési faktornak két fő alegysége ismert, a PDGF A és a PDGF B, melyek diszulfid-híddal összekapcsolt homo-és heterodimer alkotására képesek, és

a PDGF/VEGF család tagját képezik. Összességében elmondható, hogy két gén által kódolt három funkcionálisan aktív fehérjét különíthetünk el¹⁴. A növekedési faktort először thrombocyták α -granulumjaiból izolálták, azonban később ismeretessé vált, hogy számos sejtípus képes ezek szintézisére (6. táblázat).

Sejtípus	PDGF-A	PDGF-B
Fibroblast	+	+
Keratinocyta	+	+
Cytotrophoblast	+	+
Leydig-sejt	+	+
Glomerularis mesangialis sejt	+	+
Skeletalis myoblast	+	
Vascularis simaizomsejt	+	+
Astrocyták	+	
Neuronok	+	+
Schwann-sejtek	+	+
Oocyták, blastocysta sejtek	+	
Endometrialis/myometrialis sejtek	+	+
Epithelialis sejtek	+	+
Retina pigment epithel sejtek	+	+
Macrophagok	+	+
Thrombocyták/megakaryocyták	+	+

6. táblázat. Vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) A- és B- alegység termelésére képes sejtípusok (Heldin CH és mtsai., 1999)¹².

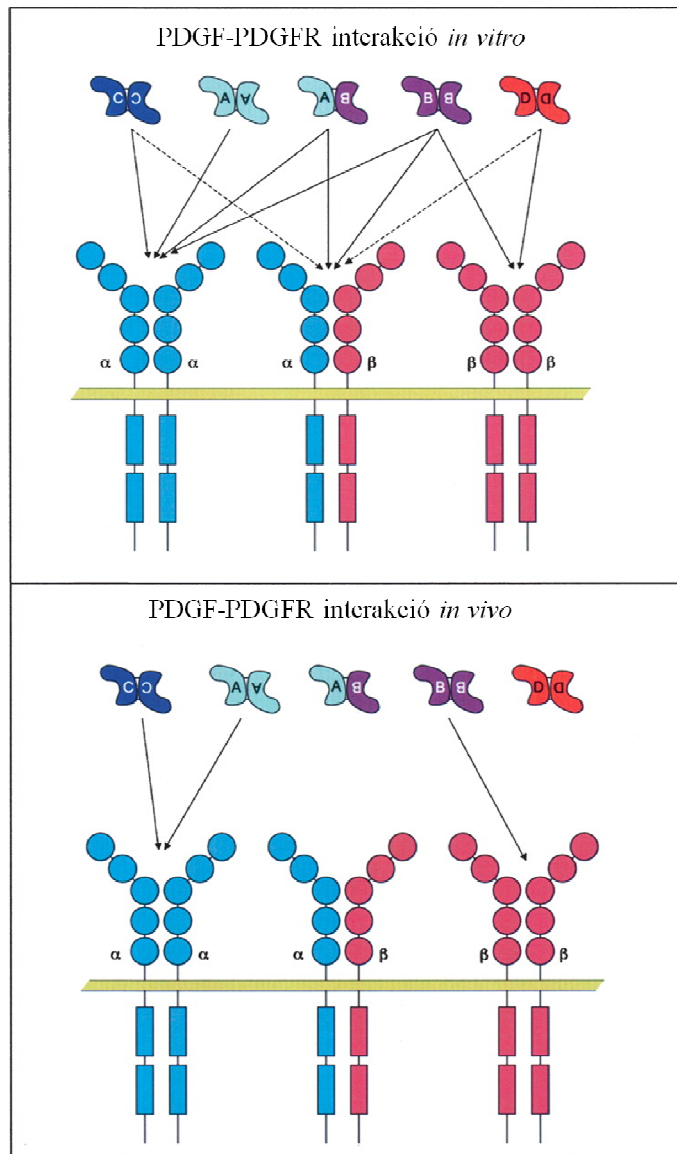
A legtöbb sejt mind a két fő alegység termelésére képes. Újabb kutatások alapján két további alegység is leírásra került, melyek a PDGF C és a PDGF D elnevezést kapták^{12,13}. A PDGF expresszió spatio-temporalis szabályozás alatt áll, szintje bizonyos fiziológias és patológias stimulusk hatására változik¹⁴. A növekedési faktor poszt-transzlációs módosítása során a C-terminális vég lehasítására kerül sor, amely a fehérje mátrix-komponensekhez való kötődésének affinitását csökkenti, így az távolabbi szövetrészekbe jutva fejtheti ki hatását. A mátrix és növekedési faktorok közötti kapcsolat egyenetlen térbeli elrendeződés, gradiens kialakítását teszi lehetővé, amely befolyásolja a növekedési faktor hatását^{12,14}. Bár normál

körülmények között a PDGF parakrin hatással rendelkezik, bizonyos tumoros folyamatokban ismert autokrin szabályozó körök kialakulása is¹⁴.

A vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor az enzimaktiváshoz kapcsolt receptorok, azon belül a tirozin kináz receptorok közé tartozik. A PDGFR-nek két altípusa ismert, melyek a PDGFR α és a PDGFR β , ezek szintén homo-és heterodimer kialakítására képesek. A dimerként funkcionáló PDGF fehérjék két receptor alegységet kötnek meg egy időben, melyek így hozzák létre a fentebb említett receptor dimereket¹²⁻¹⁴. *In vitro* a PDGFR α mind a PDGF A, mind pedig a PDGF B fehérjéket nagy affinitással köti meg, míg a PDGFR β receptor csak a PDGF B iránt mutat nagy affinitást. *In vivo* a PDGF A homodimer a PDGFR α , míg a PDGF B homodimer a PDGFR β receptorhoz kötődik, míg a PDGF AB illetve PDGFR $\alpha\beta$ heterodimer szerepe és affinitása nem tisztázott (2. ábra)¹⁴.

A különböző receptor dimerek átfedő jelátviteli útvonalak beindítására képesek, melyek közül kiemelt a mitogén szerep, az aktin reorganizáció, és a kemotaxis. Mind az α -mind a β homodimerek mitogén hatással rendelkeznek, illetve részt vesznek az aktin reorganizációban. A β -homodimerek aktivációja kemotaktikus hatással rendelkezik, azonban az α -homodimerek esetében ez sejttípus függő funkció. Fibroblastokon és a simaizom sejteken a kemotaxis gátlása figyelhető meg¹²⁻¹⁴.

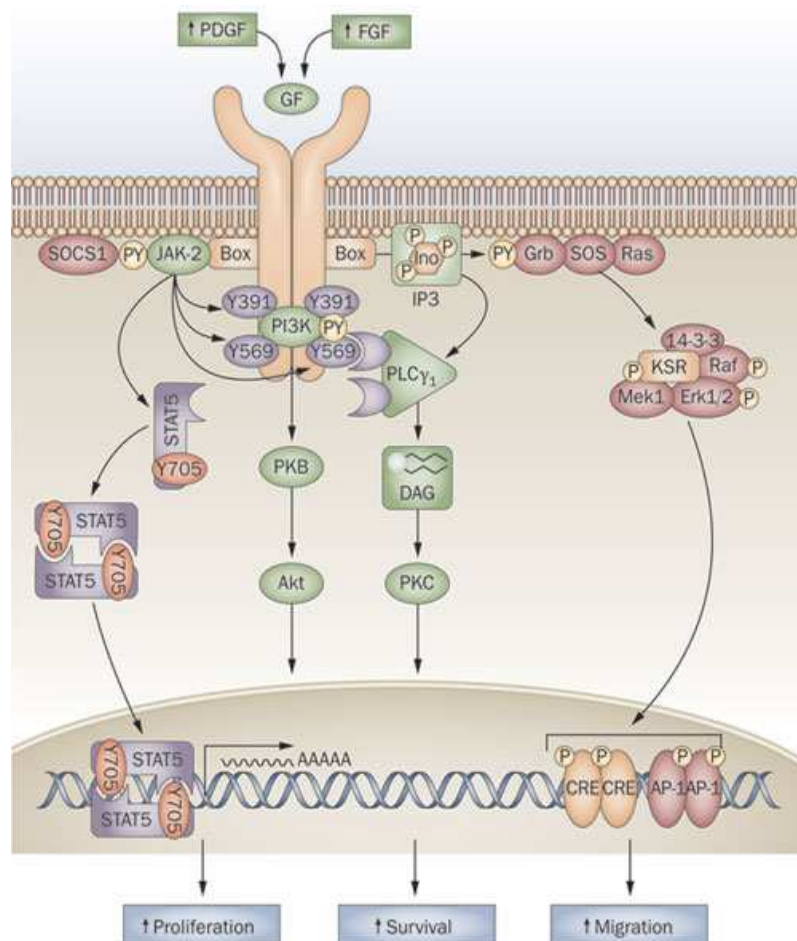
Mivel az α -és β homodimerek valamelyest eltérő funkcióval rendelkeznek, egy adott sejt PDGF ligandra adott válasza függ a sejt PDGFR expressziós profiljától¹⁴. Eddigi megfigyelések alapján elmondható, hogy a PDGFR különböző típusú mesenchymalis sejteken figyelhető meg. PDGFR α expressziót írtak le pulmonalis, dermalis, intestinalis lokalizációjú mesenchymalis progenitor sejteken és oligodendroglia progenitor sejteken, míg PDGFR β expresszió jellemzi a vascularis simaizom sejteket (vSMC), illetve a pericytákat¹². A szabályozási rendszerhez hozzátartozik az a megfigyelés is, miszerint egy adott sejttípus különböző interleukinek, citokinek hatására képesek megváltoztatni PDGFR profiljukat^{12,14}.



2. ábra. PDGF-PDGFR interakció *in vitro* és *in vivo* (Andrae J. és mtsai., 2008)¹⁴. Az ábra felső része a sejt kultúrákon igazolt ligand-receptor interakciót jelzi, a szaggatott vonal a gyenge kapcsolatot mutatja. Az alsó panel az emlősökben már *in vivo* is igazolt kapcsolatokat írja le.

A PDGFR tehát enzimaktivitáshoz kapcsolt receptorok családjába tartozik, melyek két fő doménből álló transzmembrán fehérjék. Ligandkötő részük a sejtmembrán külső felszínén helyezkedik el, míg citoplazmatikus aegységük enzimekkel alkot komplexet. A ligand kötődésére adott válasz általában lassan alakul ki, melynek az a magyarázata, hogy olyan intracelluláris jelátviteli útvonalak aktiválódnak, melyek a génexpressziós mintázat változását eredményezik.

A tirozin kináz receptor alegységek a ligand kötődését követően dimerizációt mutatnak, amelyet autofoszforiláció követ. Az autofoszforiláció során a foszforilált tirozin oldalláncok intracelluláris jelátviteli útvonalak kötőhelyeül szolgálnak. A PDGFR aktiváció ily módon képes aktiválni a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkádot, amely a c-jun, c-fos és c-myc aktiválásán keresztül sejtosztódásért felelős fehérjék átírását idézi elő. A PDGFR aktivációjának hatására szintén aktiválódik a foszfolipáz-c (PLC), amely jelátviteli útvonal végén a BAD fehérje inaktiválásán keresztül a bcl-2 antiapoptotikus faktor felszabadul a gátlás alól, amely a sejtek túlélését segíti elő. Megemlítendő továbbá a PI3K útvonal aktiválása, amely eredményeként aktin reorganizáció megy végbe (3. Ábra)^{12,13,47-49}.



3. ábra. Vérelemzke eredetű növekedési faktor receptor (PDGFR) aktivációjához köthető jelátviteli útvonalak (Schermuly R.T. és mtsai., 2011)⁴⁷. A PDGFR aktiváció hatására elindul a MAPK kaszkád, aktiválódik a PI3K és a PLC útvonal, melyek eredményeként proliferáció, apoptózis gátlás, aktin reorganizáció és így migráció jön létre.

A PDGFR-hoz köthető jelátviteli útvonal gátlására több módszert is kidolgoztak, melyek közül a legoptimálisabbnak a tirozin kináz aktivitás gátlása bizonyult. A tirozin-kináz gátlók a kináz domén ATP-kötőhelyéhez kapcsolódva fejtik ki hatásukat. Jelenleg az imatinib mezilát (imatinib, ST1571, Gleevec) a legelterjedtebb tirozin kináz gátló, amely egyaránt blokkolja a PDGFR α , a PDGFR β , a bcr-abl fúziós fehérje, a c-kit és az Flt3 aktivitását^{14,15}. Az imatinib a klinikumban is használatos Philadelphia-kromoszóma pozitív krónikus myeloid leukémia, gastrointestinalis stroma tumor esetében, valamint PDGFR gén transzlokációt hordozó kórképekben.

A PDGFR aktivációja az embriogenesisben és az organogenesisben is szerepet játszik. A PDGFR α szerepét leírták a gastrulatióban illetve a velőcső kialakulásában, valamint főként az oligodendroglia sejtek migrációjában. A PDGFR β -nak pedig főként a cardiovascularis rendszer fejlődésében van szerepe a pericyták migrációjának szabályozása révén. Az organogenesisben is megoszlik a két receptor típus szerepe. A PDGFR α az oligodendrogenesis mellett szerepet játszik a tüdő alveolus hálózatának, a bél boholyrendszerének fejlődésében, illetve a haj morfogenezisében. A PDGFR β szerepét pedig az angiogenesisben és a glomerulogenesisben hangsúlyozzák. Az angiogenesis során az endothelsejtek által termelt és az újonképződő erek lefűződéseiben nagy koncentrációban jelen lévő PDGF BB hatására a pericyták és egyéb érfal progenitor sejtek proliferálnak és migrálnak a megfelelő lokalizációba^{14,50}.

Bár a PDGF a VEGF családba tartozó növekedési faktor, és a VEGF szerepét már leírták a hematopoiesisben, a PDGF szerepe egyelőre nem tisztázott. A PDGF BB és PDGFR β knock-out egerek esetében megfigyelhető volt a hematopoiesis zavara, azonban ezen egerek őssejtjei letális irradiáción átesett egerekbe injektálva képesek voltak normál vérképző aktivitásra, amely arra utal, hogy a PDGFR β jelátviteli útvonal zavara

másodlagosan, a vascularis defektusok, illetve a PDGFR β expressziót mutató hemangioprekurzor sejtek zavarán keresztül képes befolyásolni a vérképzést¹⁴.

3.5 *A vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor (PDGFR) szerepe fibrotikus kórképekben*

Több olyan betegség is ismeretes, amely összefüggésbe hozható a PDGFR jelátviteli útvonallal. Olykor a PDGFR-t érintő genetikai defektus minden esetben azonosítható az adott kórképben, míg más esetekben ilyen genetikai eltérés nem azonosítható, azonban a jelátviteli útvonal és a kórkép közötti kapcsolat farmakológiai úton bizonyítható⁹.

A fibroticus kórképekről általánosságban elmondható, hogy fibroblastok proliferációja és extracellularis mátrix termelése jelenik meg. A PDGFR útvonal aktivációja leginkább az első lépésben játszik szerepet, míg a rost termelése a már felszaporodott fibroblastokon TGF- β hatására jön létre. Az így kifejlődő stroma sejt szaporulat és mátrix depositio hatására progresszív hegesedés jön létre, amely az adott szerv funkciójának károsodásához vezet. A fibroticus folyamatok esetében a PDGF termelése leginkább a gyulladással járó sejtekhez, macrophagokhoz köthető, amelyek egyúttal olyan citokineket is termelnek, amely a PDGFR fokozott expressziójához vezet^{9,47}.

Tüdőfibrosis esetében az alveolaris falban, az erek illetve a bronchusok falában lévő myofibroblastok proliferációját írták le. Ebben a kórképben az emelkedett PDGF szint mérhető a bronchoalveolaris lavage-ban, amely forrásaként a macrophagok jelölhetők meg. A gyulladással járó mediátorok hatására fokozódik PDGFR α expresszió, azonban a PDGFR β expresszió nem változik⁹. Állatmodellekben a tirozin kináz inhibitorok alkalmazása csökkentette a fibrosis mértékét, és növelte a túlélést^{51,52}. Az idiopathiás tüdőfibrosisban végzett nemzetközi tanulmány során a tirozin kináz gátlók alkalmazásával csökkent a FVC romlása és a progresszió mértéke⁵³.

Májfibrosis esetén a perisinusoidalis stellate sejtek proliferációja figyelhető meg, melyek PDGFR β expressziója csupán fibrosis esetén mutatható ki. Állatmodellekben a perisinusoidalis, periportalis térben emelkedett PDGF DD szint volt kimutatható, melynek forrásaként a Kuppfer sejteket tartják^{9,54,55}. Állatmodellen az imatinibe-mesylate csökkentette a fibrosis kialakulásának esélyét⁵⁶, azonban a szer hatása előrehaladott esetben kérdéses⁵⁷. Humán alkalmazásban összefoglaló tanulmány még nem készült.

Scleroderma esetében mind a PDGF, mind pedig a PDGFR fokozott expressziója kimutatható volt a bőrben. A PDGFR β pozitív rosttermelő sejtek scleroderma és hegképződés esetén is valószínűleg a perivascularis sejtekből erednek. A sclerodermában megfigyelhető fibroblastok fokozott PDGFR α expressziót is mutatnak és autokrin PDGF aktivációra is képesek. A fokozott PDGFR α expressziót a TGF- β hatásnak tulajdonítják^{9,58,59}. Scleroderma esetében PDGFR foszforilációt előidéző PDGFR-autoantitestek voltak azonosíthatók. Bár kisebb tanulmányok, és esetismertetések felvetették a tirozin kináz gátló kezelés szerepét⁶⁰, a scleroderma terápiájában, az első kiterjedt study nem erősítette meg ennek pozitív hatását előrehaladott esetekben⁶¹.

Nephrosclerosis számos kórkép talaján létrejöhet és lehet glomerularis illetve tubulointerstitialis eredetű. Glomerularis fibrosis esetében fokozott PDGFR β expresszió volt kimutatható. Állatmodellek esetében a PDGFR jelátviteli útvonal gátlása a mesangialis sejtek proliferációjához és a mátrix depositio csökkenéséhez vezet. Valamennyi PDGF ligand szintje emelkedett a glomerularis fibrosisban, azonban a növekedési faktor forrása jelenleg nem tisztázott⁹. Állatmodellekben a tirozin kináz inhibitorok kedvező hatással voltak a krónikus glomerularis betegségekre⁶², azonban humán vonatkozásban jelenleg nem érhető el tanulmány a témában.

Myelofibrosisban emelkedett szérum PDGF szint volt azonosítható, valamint emelkedett növekedési faktor mRNS szintet igazoltak^{9,32,63,64}. A csontvelő

immunhisztokémiai vizsgálatára, a rosttermelő sejtek azonosítására ugyanakkor ezidáig nem került sor. A tirozin kináz gátló kezelés alkalmazásáról fibrosissal társuló CML-es esetekből állnak rendelkezésre eredmények⁵.

3.6 A PDGFR expresszió vizsgálatának lehetséges előnyei myelofibrosisban

A stroma sejtek vizsgálata a rostsaporulat mértékének meghatározásával szemben több lehetséges előnyt rejt, melyek vizsgálatára eddig nem került sor. A PDGFR kimutatására szolgáló immunhisztokémiai eljárás standard jelölődést mutat, a kémiai reakción alapuló ezüst-impregnációval szemben. A normál csontvelői stroma PDGFR expressziójának vizsgálatával negatív és pozitív belső kontrollok határozhatók meg, melyek növelik a kiértékelés megbízhatóságát. A már megtermelt rostozattal ellentétben a rosttermelő stroma sejtek száma egy dinamikusabb, a környező faktorokra gyorsabb változást mutató paraméter lehet. A rostsaporulat pathogenesisének ismeretéből arra következtethetünk, hogy a stromasejtek proliferációja a myelofibrosis megjelenésének prediktív mutatója lehet azokban a kórképekben, amelyekben az irodalmi adatok alapján a rostsaporulat prognosztikai szereppel bír. Az immunhisztokémia módszerrel járó festődési sajátosságok lehetővé teszik a pozitív és negatív jelölődést mutató területek éles elkülönítését, amely digitális képanalízisen alapuló objektív vizsgálómódszerhez ad lehetőséget. A szubjektív sajátosságokkal is rendelkező, szemikvantitatív grádus rendszerrel szemben a digitális képanalízis használatával megadott numerikus paraméterek követéses esetek precíz összehasonlítására adnak lehetőséget, amely elsősorban az anti-fibrotikus terápiás eljárások hatásának mérésére lehetne alkalmas. A PDGFR expresszió kimutatása egyben terápiás célpont azonosítását is jelöli a tirozin-kináz gátló szerek érájában.

4 CÉLKITŰZÉSEK

A doktori munka célkitűzései az alábbiak voltak:

1. A PDGFR α és PDGFR β expressziójának meghatározása normál, humán csontvelői biopsziás mintákon.
2. A PDGFR expresszió vizsgálata különböző, myelofibrosissal társuló onkohematológiai kórképekben.
3. A PDGFR β expressziót mutató stroma sejtek és a rotszaporulat mértéke közötti kapcsolat kvantitatív vizsgálata, mely megvalósításához egy, a stroma sejtek számát tükröző, szemi-quantitatív score rendszer kidolgozására volt szükség.
4. A PDGFR β expresszió myelofibrosis progresszióra vonatkozó prediktív értékének meghatározása myeloproliferatív neoplasiákban, ahol a rotszaporulat megjelenésének az irodalmi adatok alapján prognosztikai szerepe van.
5. Digitális képanalízisen alapuló vizsgálómódszer kifejlesztése, amely lehetővé teszi a PDGFR β expressziót mutató, immunpozitív areák automatizált azonosítását, az immunnegatív areától való elkülönítését, és méretének elemzését.
6. A digitális képanalízis használatával meghatározott, PDGFR β pozitív sejtek számát és eloszlását tükröző objektív, numerikus paraméterek és a myelofibrosis grádusa közötti kapcsolat vizsgálata.

5 METODIKÁK

5.1 *Betegcsoport*

5.1.1 A PDGFR mintázat meghatározása és az MF grádussal mutatott kapcsolat vizsgálata

A PDGFR α és PDGFR β expresszió meghatározásához a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Belgyógyászati Intézet Hematológiai Tanszékén illetve a Gyermekgyógyászati Klinika Gyermekonkológiai és Hematológiai nem önálló Tanszéken kezelt betegek crista biopsziás mintáinak feldolgozására került sor. A PDGFR mintázat meghatározása és az MF grádussal történő kapcsolat vizsgálat 60 csontvelői mintán történtek retrospektív módon, az életkor 2-90 év között változott (35 nő és 25 férfi). A 60 mintából 47 pathológiás csoportba tartozott, ahol olyan alapbetegség volt azonosítható, amely az irodalmi áttekintés alapján potenciálisan csontvelői rostsaporulathoz vezet. A vizsgálatba bevontunk további 13 esetet, melyekben fibrosis, illetve a csontvelőt érintő primer vagy secunder neoplasticus folyamat kizárható volt. A kontroll csoportba elsősorban lymphomás betegektől, stádium meghatározás céljából vett minták tartoztak, és itt az MF grádus definíció szerint MF-0 volt. A pathológiás csoportban 13 esetben myelodysplasiás szindróma, 17 esetben myeloproliferatív neoplasia, míg további 17 esetben egyéb rostsaporulatot mutató folyamat volt azonosítható. A pathológiás alcsoportban az MF grádus bármely értéket felvehette (MF-0-3). Az MDS alcsoportban a 2008. évi WHO klasszifikáció alapján 9 eset mutatott több sejtvonalat érintő dysplasiát (RCMD), 2 eset refrakter anemiát (RA), míg 2 esetben blaszt szaporulattal kísért dysplasia volt megfigyelhető (RAEB). Az MPN alcsoportban a 2008. évi WHO klasszifikáció alapján 4 esetben essentialis thrombocytosis (ET), 6 esetben polycythemia vera (PV), 7 esetben primer myelofibrosis volt igazolható (PMF). Az MPN

alcsoporthoz a JAK-2 státusz alakulása a következő volt: JAK-2 V617F mutáció 13 esetben pozitív volt, 3 esetben negatív volt, 1 esetben nem állt rendelkezésre adat. Az egyéb alcsoporthoz 7 esetben akut myeloid leukemia (AML), 1 esetben hajjas sejtes leukemia (HCL), 1 esetben Langerhans sejtes histiocytosis (LCH) volt igazolható, míg további 8 esetben definitív neoplasticus folyamat nem volt azonosítható, azonban a vizsgálat során olyan reaktív folyamat volt jelen, mely mellett rostsaporulat volt megfigyelhető.

5.1.2 A PDGFR β expresszió myelofibrosis progresszióra gyakorolt prediktív értéke

A PDGFR β expresszió myelofibrosis progresszióra gyakorolt prediktív értékének meghatározásához a European Bone Marrow Working Group (EBMWG) bevonásával, összesen öt európai hematopathológiai centrum közreműködésével, 84 myeloproliferatív neoplasiában szenvedő beteg (42 nő és 42 férfi), 193 crista biopsziás mintájának retrospektív feldolgozására került sor. A vizsgálatban részt vettek az alábbi intézetek: Institute of Pathology, University Hospital Basel, Switzerland; Radboud University Nijmegen Medical Center, Hollandia; Charité - University Medicine Berlin, Németország; Bay Zoltán Intézet, Szeged, Magyarország; Pathológiai Intézet, Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Debrecen, Magyarország. A partnerek a következő információkat biztosították: életkor, nem, histopathológiai diagnózis, a mintavétel időpontja. Az egyes esetekből általában két minta állt rendelkezésre, azonban néhol három vagy több mintavétel is történt a követés során.

Az MPN alcsoporthoz belül az esetek a következő megoszlást mutatták a 2008. évi WHO klasszifikáció alapján: 55 PMF, 8 essentialis thrombocythaemia (ET), 5 polycythemia vera (PV), 3 krónikus myeloid leukemia (CML), 3 másképpen nem osztályozható (MPN-U), 4 myeloproliferatív megbetegedés/myelodysplasias szindróma átfedő elváltozása (MPN/MDS).

További hat esetben az MPN alapbetegséghez egyéb elváltozás, például lymphoproliferatív kórkép társult.

A tanulmány során 84 esetből 193 minta kiértékelésére került sor, az átlagos követési idő 34,43 hónap (2-151 hónap) volt. A PMF alcsoportba tartozó 55 esetből 126 minta állt rendelkezésre, itt az átlagos követési idő 30,17 hónap volt (2-143 hónap).

A Gömöri-féle ezüst impregnáció, a PDGFR β immunhisztokémiai festés, valamint a minták kiértékelése a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Pathologiai Intézetében történt.

5.1.3 PDGFR β expresszió objektív megítélése digitális képanalízis segítségével

A PDGFR β expresszió objektív megítélésére szolgáló algoritmus kifejlesztéséhez és teszteléséhez összesen 79 crista biopsziás minta retrospektív vizsgálatára került sor, melyek a Debreceni Egyetem Klinikai Központ, Belgyógyászati Intézet, Hematológiai Tanszékén kezelt betegektől származtak. A vizsgálat két részből állt. Az első részben az algoritmus kifejlesztéséhez 10 kontroll és 32 kóros minta kiértékelése történt meg, míg a vizsgálat második részében az algoritmus tesztelése során további 37 kóros minta vizsgálatára került sor. A vizsgálat első részében a pathológiás csoportban a 32 mintából 14 esetben MPN, míg 18 esetben MDS volt a diagnózis. A vizsgálat második részében mind a 37 eset az MPN alcsoportba tartozott, melyek között követéses esetek is jelen voltak.

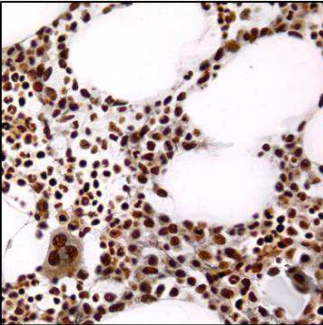
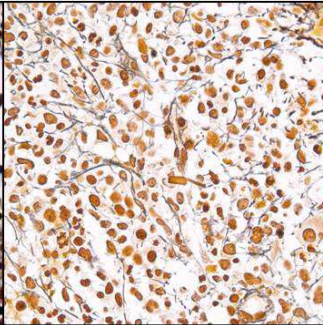
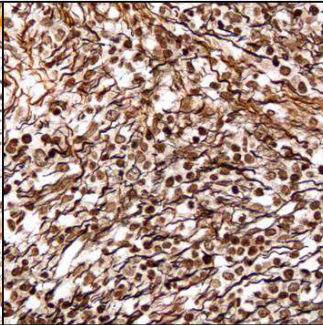
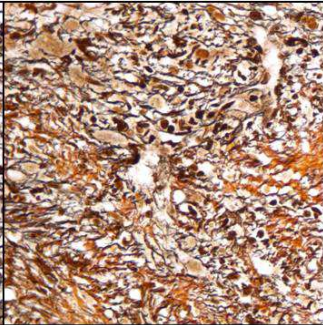
5.2 *A crista biopsziás minták feldolgozása*

A Debreceni Egyetem Klinikai Központban vételezett és a Pathologiai Intézetbe eljuttatott crista biopsziás minták feldolgozásának első lépése a fixálás, amely 3,6%-os pufferezt formaldehid oldatban történik 24 órán keresztül. A fixálást 48 órás dekalcinálás

követi, melyhez 0,1 g/ml EDTA-Tris oldat használatos. A dekalcinált mintákat paraffinba ágyazzák, melyet követően 4 µm-es metszetek készülnek.

5.3 Az MF grádus meghatározására használt eljárás

A disszertációban részletezett valamennyi vizsgálatban sor került rácrost festésre, és ez alapján az MF grádus meghatározására. A reticulín rostozat kimutatása Gömöri-ezüstözéssel történt (4. ábra), a myelofibrosis grádus meghatározásához az Európai Konszenzus (2005) irányelvei szolgáltak alapul. A széles körben elfogadott szemi-quantitatív rendszer négy fokozatot különít el (MF-0, -1, -2, -3) (Thiele és mtsai. 2005).

			
MF-0: Elszórt reticulín rostozat kereszteződések nélkül.	MF-1: Laza rosthálózat számos kereszteződéssel, különösen a perivascularis régiókban.	MF-2: Diffúz és denz rosthálózat számos kereszteződéssel, kisebb góccokban rostkötegekkel. Osteosclerosis kísérheti.	MF-3: Diffúz és denz rosthálózat számos kereszteződéssel, durva rostkötegekkel, kollagén szaporulattal. Osteosclerosis kísérheti.

4. ábra. A myelofibrosis (MF) mértékének megítéléséhez használt, reticulín festésen alapuló, négy-fokozatú grádus rendszer csontvelő biopsziás anyagokon.

5.3.1 Gömöri-féle ezüst impregnáció

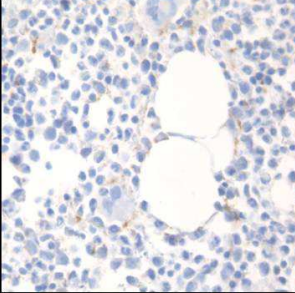
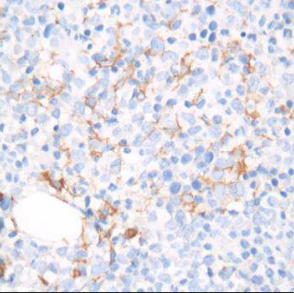
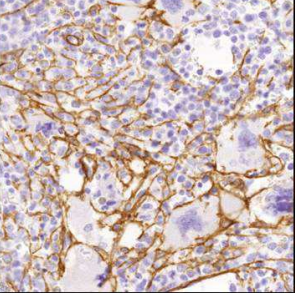
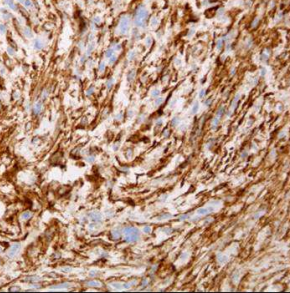
Az ezüst impregnáció, vagy más néven Gömöri-festés standard protokoll alapján készült. Az eljárás során a metszetek 0,5%-os kálium-permanganát (60458 Sigma-Aldrich)

oldatba kerülnek 5 percre, melyet 3 desztillált vizes öblítés követ. Ezután a metszeteket 1 percre 1%-os kálium-metabiszulfít (31268 Sigma-Aldrich) oldatba tesszük, melyet 3 csapvizes mosás és 4 desztillált vizes öblítés követ. Ezt követően a metszetek 2%-os vas-ammónium-szulfát (221260 Sigma-Aldrich) oldatba kerülnek 3 percre, amit ismét 3 desztillált vizes öblítés követ. Az impregnációhoz frissen készített 2% kálium-hidroxidot (P5958 Sigma-Aldrich) tartalmazó 10%-os ezüst-nitrát (21572.188 VWR AnalaR Normapur) használatos 1 percig, melyet 1 desztillált vizes öblítés és 5 perces csapvízben hígított 10%-os formalinfixálás (03300, Formaldehyd Molar Chemicals) követ. Mosás után a metszeteket 0,2%-os arany-klorid (520918, Sigma-Aldrich) oldatba helyezzük 30 másodpercre, melyet desztillált vizes mosás követ. Végül a metszetek 1%-os nátrium-tioszulfát (S7026 Sigma-Aldrich) oldatba kerülnek, melyet 2 kör desztillált vizes öblítés, dehidráció és a metszetek fedése követ.

5.4 *Immunhisztokémiai vizsgálatok*

A PDGFR β immunhisztokémiai festés alapján sor került a PDGFR β score meghatározására. Az általunk bevezetett szemi-kvantitatív score rendszer – az MF grádushoz hasonlóan – négy fokozatot különít el, mely részletes kritériumai az 5. ábrán olvashatók⁶⁵. Általánosságban megállapítható, hogy a PDGFR β pozitív stroma sejtek által alkotott hálózat komplexitásának és denzitásának emelkedésével arányosan nő az adott esetre vonatkozó PDGFR β score érték.

A PDGFR csontvelői expressziós mintázat meghatározása során a PDGFR β immunhisztokémiai vizsgálat mellett PDGFR α immunhisztokémiai vizsgálat, valamint nestin, CD34 illetve SMA (smooth muscle actin) jelöléseket is tartalmazó kettős immunhisztokémiai vizsgálatok is készültek.

			
<p>PDGFRβ-0: Pozitív sejtek nem/ elvétve láthatók, kereszteződések nincsenek jelen.</p>	<p>PDGFRβ -1: Izolált pozitív sejtek és/ vagy ezek vékony nyúlványai, helyenként kereszteződések előfordulhatnak.</p>	<p>PDGFRβ -2: Pozitív sejtek, illetve ezek nyúlványai diffúz, laza hálózatot alkotnak, a nyúlványok között számos kereszteződés látható.</p>	<p>PDGFRβ -3: Pozitív sejtek, illetve ezek nyúlványaik, diffúz, denz hálózatot alkotnak, a sejtek helyenként kötegekbe rendeződnek.</p>

5. ábra. A stroma aktiváció mértékének megítéléséhez használt, PDGFRβ immunhisztokémiai vizsgálaton alapuló, négy-fokozatú score rendszer csontvelő biopsziás anyagokon.

5.4.1 PDGFR és kettős immunhisztokémiai festések menete

Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a mintákat Dako EnVisionFLEX Peroxidáz-gátló reagensben (Dako, Glostrup, Denmark) 5 percig inkubáltuk nedves kamrában. Az antigén feltáráshoz pH 9.0-en a Leica RE-7119 (Leica, Wetzlar, Germany) antigén feltáró oldat használatával került sor, melyet desztillált vizes és pufferes (EnVision™ FLEX Wash Buffer, pH 7.6) mosás követett. A metszeteket ezután az anti-PDGFRβ (ab-32570, nyúlban termeltetett, monoklonális [Abcam, Cambridge, UK] vagy a 3169 [Cell Signaling, nyúlban termeltetett, monoklonális, Danvers, MA, USA]), illetve az anti-PDGFRα (ab-61219, nyúlban termeltetett, poliklonális, Abcam) primer antitestekkel inkubáltuk 1:100 hígítás (EnVision™ FLEX Antibody Diluent [Dako, Glostrup, Denmark]) mellett 1 órán át, nedves kamrában, szobahőmérsékleten. Az inkubációt puffer oldatos mosási lépés követte. Az antitest-antigén kötődés detektálása EnVision™ FLEX/HRP (Dako) használatával történt nedves kamrában,

ahol az inkubációs idő 30 perc volt. Ismételt mosást követően a metszetekre DAB oldat került 1-10 percig (EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen), melyet hematoxylin magfestés követett.

Az immunhisztokémiai festések intenzitásának és eloszlásának értékelése, valamint a dokumentációhoz felvételek készítése fénymikroszkóppal és a hozzá csatlakozó digitális kamerával történtek (Leica DM2500 mikroszkóp, DFC 420 camera and Leica Application Suite V3 software; Leica).

Két különböző anti-PDGFR β klón tesztelésére került sor (Y92 anti-PDGFR β , ab-32570 [Abcam] és 28E1 anti-PDGFR β , 3169 [Cell Signaling]). A két primer antitesttel az esetek többségében megegyező mintázat volt látható, azonban a későbbi vizsgálatokhoz – így a digitális képanalízis során - a 28E1 klónt használtuk a finomabb, tisztább morfológiai kép alapján.

Kettős immunhisztokémiai festéseket az En Vision FLEX/HRP rendszerrel végeztük szekvenciálisan. Miután az első primer antitest kötődését az EnVision™ FLEX/HRP oldattal megállítottuk, a második elsődleges antitestet is hozzáadtuk a mintához. A kettős immunhisztokémiai vizsgálatok az alábbi primer antitestek kombinációival készültek: Anti-PDGFR α , anti-PDGFR β , anti-SMA (M0851, egérben termeltetett, monoklonális, Dako), anti-CD34 (NCL-L-END, egérben termeltetett, monoklonális, Novocastra, Newcastle, UK) és anti-nestin (ab-22035-100; Abcam). A DAB chromogén mellett a második színreakcióhoz VIP chromogén (Vector VIP Peroxidáz (HRP) szubsztrát) volt használatos. A kettős immunhisztokémiai vizsgálatok során metil-zöld magfestést alkalmaztunk.

5.5 *Képkészítés a PDGFR β expresszió mértékének objektív megítéléséhez*

A PDGFR β IHC festett metszetek digitalizálására a Panoramic metszet szkener (3DHitech, Budapest, Magyarország) használatával került sor, melyhez egy multicolor digitális kamera tartozik (Stingray F146C IRF Medical, Allied Vision Technologies,

Stadtroda, Germany). A digitalizált metszeteket 768x768 képpont nagyságú csempékre osztottuk, melyeket a további elemzéshez használtunk. A PDGFR β expresszió mértékének objektív megítélését szolgáló algoritmus kifejlesztéséhez 42 digitalizált crista biopsziás mintából összesen 1437 digitális kép részletet, azaz csempét nyertünk. Az egy esetre jutó átlagos csempeszám 40,59 volt (6-147), mely érték leginkább a minta méretétől, illetve kisebb részben annak összetételétől függött⁶⁶.

5.6 Statisztikai feldolgozás

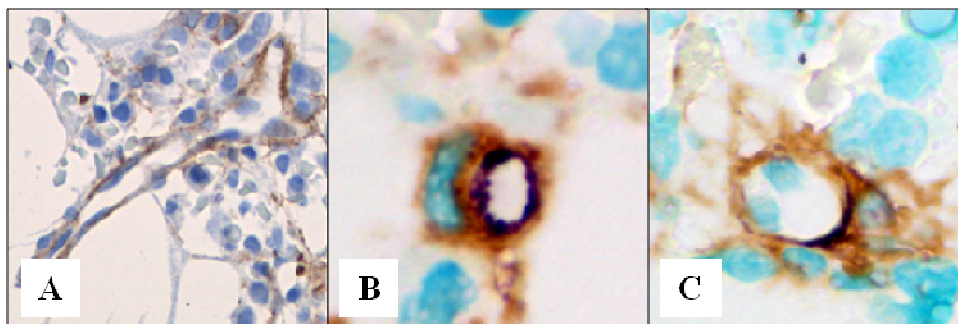
A statisztikai feldolgozás és a diagramok elkészítése a GraphPad Prism 5.03 és a Microsoft Excel 2007 szoftver használatával történtek. A szemi-kvantitatív értékelésből származó diszkontinuous eredményeket tartalmazó vizsgálatok esetén nem-paraméteres statisztikai próbákat használtunk. Spearman korrelációs és Wilcoxon párosított próbákat végeztünk. A myelofibrosis progressziójának vizsgálata a különböző alcsoportokban Log-rank analízissel történt. A numerikus paraméterek és az MF grádus viszonyának vizsgálatában a fentiekén túl ROC analízist is használtunk. Az eredményeket szignifikánsnak tartottuk, amennyiben a p érték <0,05 volt.

6 EREDMÉNYEK

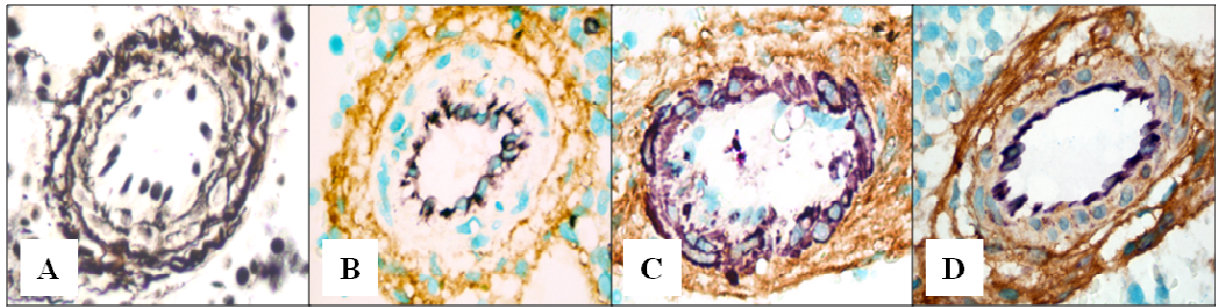
6.1 A PDGFR expressziós mintázat normál csontvelői mintákon

A PDGFR α és β receptorok expressziós mintázatának meghatározása olyan crista biopsziás mintákon történtek, melyeket lymphomával diagnosztizált, de még nem kezelt betegektől származtak stádium meghatározás céljából, és a rutin feldolgozás során reticulín szaporulat nem volt azonosítható (MF-0). A két tirozin kináz receptor eltérő mintázatot mutatott (7. táblázat).

A stroma sejteken belül PDGFR α expresszió volt megfigyelhető az endothel sejteken illetve a csont trabeculákat övező endostealis sejtrétegen. Az endothel sejtek ugyanakkor negatívnak bizonyultak PDGFR β IHC vizsgálattal, míg az endostealis rétegben kimutatható volt a fehérje expressziója, tehát itt mind a két receptor altípus jelen volt. PDGFR β expresszió volt megfigyelhető továbbá perisinusoidalisan valamint pericapillarisan, azaz a pericytáknak megfelelően (6. ábra), illetve PDGFR β pozitívnek bizonyultak az erek adventitialis rétegét képező sejtek. Megemlítendő, hogy a nagyobb erek azon rétege mutatott PDGFR expressziót, ahol rácsrost festéssel reticulín rostozat is azonosítható (7. ábra). A zsírsejteken immunhisztokémiai módszerekkel nem lehetett PDGFR expressziót azonosítani.



6. ábra. PDGFR β expresszió a csontvelő pericapillaris sejtjeiben (IHC, x400). PDGFR β expresszió látható egy capillaris falában (A), a PDGFR β pozitívsejtek körbe veszik a CD34 pozitív endothelt (lila színreakció) (B), és SMA ko-expressziót mutatnak (lila színreakció) (C).



7. ábra. PDGFR α és PDGFR β expresszió az erek falában (reticulin festés és IHC, x400). Reticulin festéssel finom rostozat azonosítható egy ér adventitialis rétegében (A). Ugyanebben a rétegben PDGFR β expresszió figyelhető meg barna színreakcióval (B, C, D). Az endothel CD34 pozitív (lila színreakció), és nem mutat PDGFR β expressziót (B). Az ér muscularis rétege SMA pozitív (lila színreakció), és nem mutat PDGFR β expressziót (C). Az intimán PDGFR α expresszió (lila színreakció) azonosítható (D).

Kettős immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk a PDGFR lokalizáció, illetve a kettős pozitívítások megerősítésére. A kettős immunhisztokémiai vizsgálatokkal megerősíthető volt az endostealis réteg PDGFR α/β ko-expressziója. A nagyobb erek esetében a PDGFR β pozitív adventitialis réteg negatív volt PDGFR α , SMA, CD34 reakciókkal (7. ábra). Ugyanakkor a perisinusoidalis/pericapillaris pericyta sejtek a PDGFR β expresszió mellett SMA pozitívítást is mutattak, míg a PDGFR α és a CD34 reakciókkal az általuk övezett endothel réteg mutatott pozitívítást (6. ábra).

Az endostealis és perivascularis stroma sejteken túl az interstitialis állományban nem vagy minimális mennyiségben lehetett PDGFR β pozitív reticularis sejteket azonosítani a rostszaporulat nélküli mintákban.

A mesenchymalis progenitor sejteket jelző nestin reakcióval elszórtan lehetett pozitívítást azonosítani. Az endothel sejtek részleges nestin expressziót mutattak, illetve elszórtan egy-egy reticularis és pericapillaris sejt is pozitív volt. Az endothel sejtek részéről PDGFR α /nestin, míg a reticularis sejtek részéről PDGFR β /nestin ko-expresszió feltételezhető azzal a megjegyzéssel, hogy a PDGFR pozitív sejtek csak kis része mutat nestin expressziót is. A crista biopsziás mintákon végzett kettős festésekkel a ko-expresszió nem volt megerősíthető.

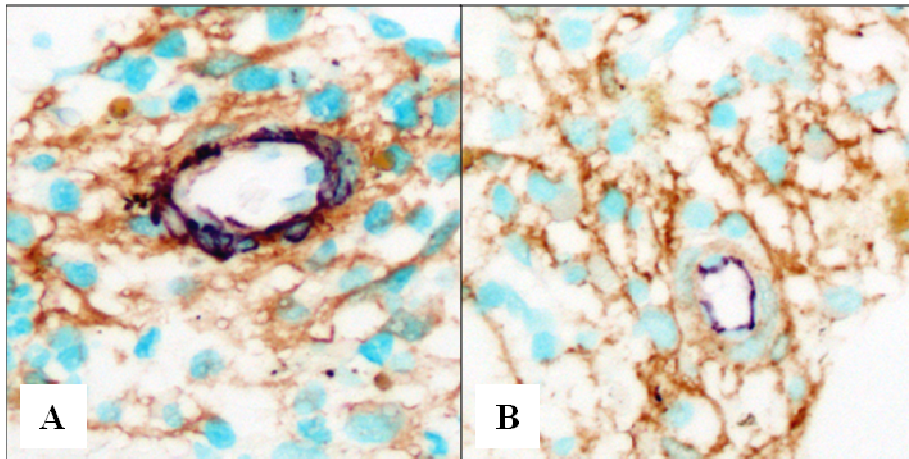
Sejttípus	PDGFR β	PDGFR α	SMA	CD34
Interstitialis fibroblast	+	-/+	-	-
Ér adventitiális fibroblast	+	-	-	-
Perisinusoidális pericyta	+	-	+	-
Pericapilláris pericyta	+	-	+	-
Endothel	-	+	-	+
Endosteális sejt	+	+	-	-
Adipocyta	-	-	-	-

7. táblázat. PDGFR α , PDGFR β , SMA, CD34 expresszió a csontvelői mesenchymalis sejteken immunhisztokémiai vizsgálat, és fénymikroszkópos értékelés alapján.

+ valamennyi esetben expresszió volt megfigyelhető, - expresszió egyetlen esetben sem volt megfigyelhető, +/- részleges pozitivitás volt megfigyelhető

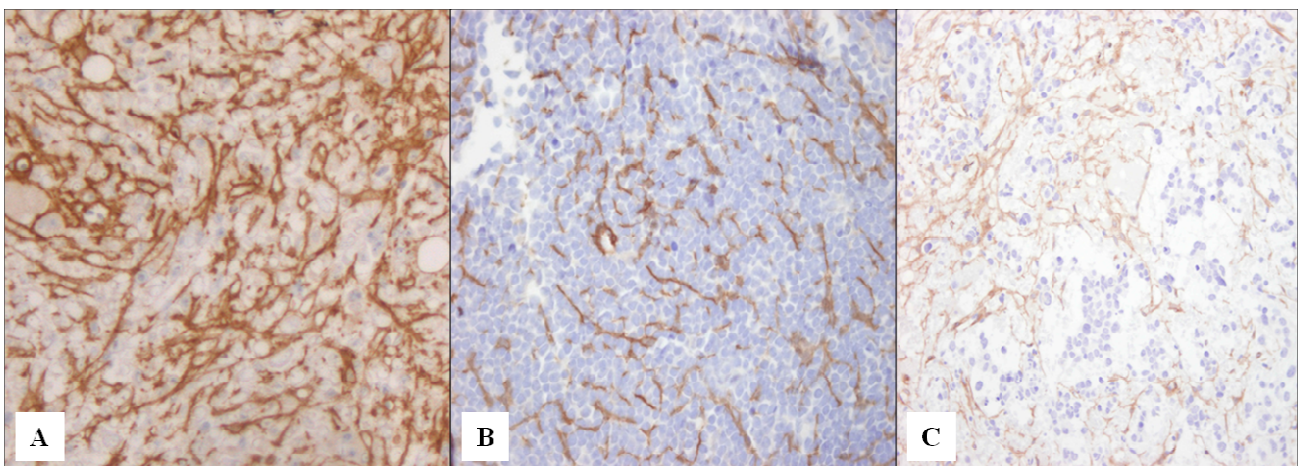
6.2 A PDGFR expresszió mintázata myelofibrosisban

Rostszaporulatot mutató crista biopsziás mintákban a PDGFR β expresszió fokozódása volt megfigyelhető, azonban a PDGFR α expresszió változása ezt nem követte. Kettős immunhisztokémiai vizsgálatok alapján a PDGFR β expressziót mutató stromalis sejtek részéről myofibroblast átalakulás nem volt megerősíthető, mivel SMA expressziót ezen sejtek nem mutattak (8. ábra, A). Mivel a pericyták PDGFR β pozitívak, felmerült annak a lehetősége, hogy a PDGFR β expressziót mutató sejtek számának emelkedése myelofibrosisban érszaporulathoz köthető, azonban CD34 és PDGFR β kettős immunhisztokémiai vizsgálatokkal szignifikáns érszaporulat nem volt igazolható az általunk vizsgált fibrotikus mintákban (8. ábra, B). Ezt a megfigyelést az SMA expresszió hiánya is támogatta. A rostsaporulatot mutató mintákban a proliferációt mutató PDGFR β pozitív sejtek nestin negatívak voltak.



8. ábra. A fibrotikus csontvelőben megfigyelhető PDGFR β expresszió az aktivált fibroblastokra korlátozódik (IHC, x400). Egy ér látható, melynek muscularis rétege SMA pozitív (lila színreakció), azonban az eret körülvevő PDGFR β pozitív fibroblastok (barna színreakció) SMA negatívak (A). Egy másik ér endothel sejtsjei CD34 expressziót mutatnak (lila színreakció), azonban az eret övező PDGFR β pozitív fibroblast proliferációt mutató (barna színreakció) állományban nem figyelhető meg kísér szaporulat (B).

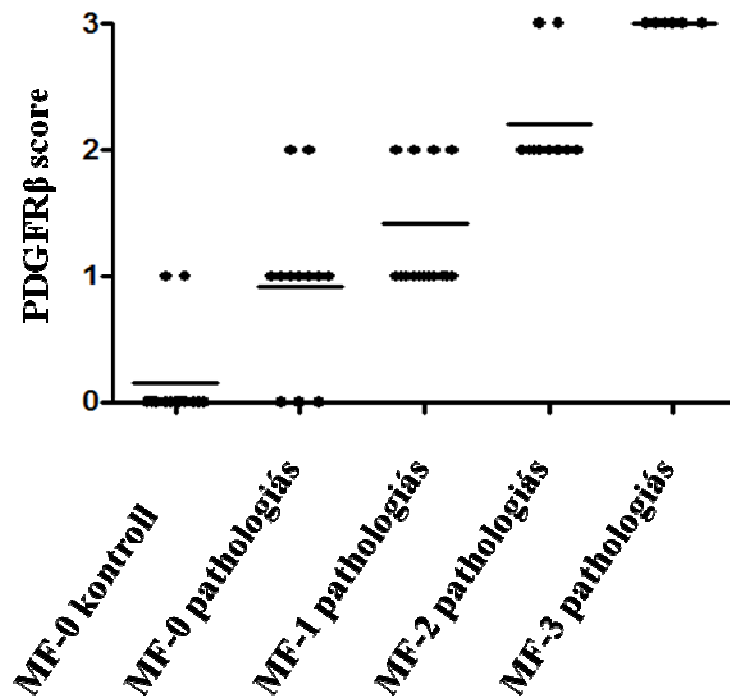
Fokozott PDGFR β expresszió, a myelofibrosishoz hasonlóan, számos kórképben megjelent. Tanulmányaink során leginkább myeloproliferatív neoplasiákra, illetve myelodysplasiás szindrómára fókuszáltunk, azonban stroma aktiváció volt megfigyelhető egyéb lymphoid és myeloid neoplasiákban, szolid tumor metasztázisban is (9. ábra).



9. ábra. Fokozott PDGFR β expresszió különböző neoplasticus kórképekben, (IHC, x200).
A: primer myelofibrosis. B: akut lymphoblastos leukemia. C: neuroblastoma.

6.3 A PDGFR β score és az MF grádus közötti kapcsolat

A PDGFR β expressziót mutató sejtek mennyiségének pontosabb megítélése, és a sejt aktiváció valamint a myelofibrosis grádus közötti összefüggés meghatározása céljából egy szemi-kvantitatív score rendszert dolgoztunk ki, mely az MF grádushoz hasonlóan négy fokozattal rendelkezik (PDGFR β 0-3). A PDGFR β score és az MF grádus között erős korreláció volt megfigyelhető (Spearman $r=0,83$) 60 eset vizsgálata alapján (10. ábra).



10. ábra. A myelofibrosis (MF) grádus és a PDGFR β score közötti korreláció (n=60).

A nem fibrotikus kontroll csoportban nem volt szignifikáns különbség a két érték között (MF grádus átlaga 0,0 (SD=0,0) vs. PDGFR β score átlaga 0,15 (SD=0,38); $p=0,35$; $n=13$). Az MF grádus a kontroll csoportban definíció szerint MF-0 volt, a PDGFR β score ebben a csoportban PDGFR β -0 vagy PDGFR β -1 volt. A kontroll csoportban ennél nagyobb stroma sejt proliferáció nem volt megfigyelhető (11.ábra, A). A pathológiás eseteket tartalmazó csoportban ($n=47$) 26 esetben megegyezett az MF grádus és a PDGFR β score,

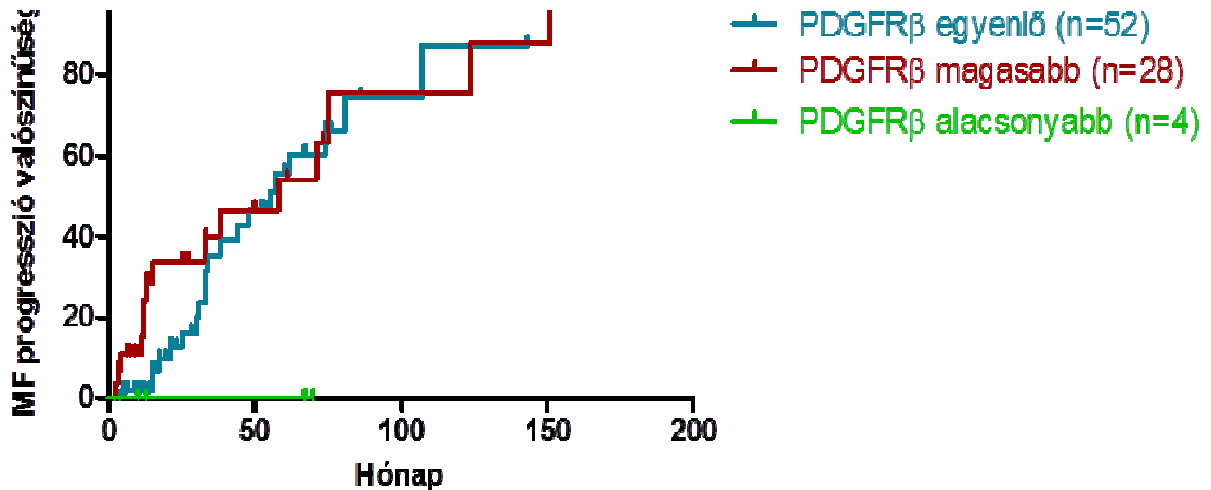
összefüggés volt megfigyelhető, Spearman $r=0,86$; $p<0,0001$. A korreláció akkor is fennállt, amikor a diagnózis időpontjában (Spearman $r=0,84$; $p<0,0001$), és a követés során (Spearman $r=0,82$; $p<0,0001$) vett mintákat külön-külön vizsgáltuk.

6.4.2 A fokozott PDGFR β expresszió és az MF progresszió kapcsolata az összes esetben

A diagnózis időpontjában a 84 esetből 14 volt pre-fibroticus MF-0 grádust mutatva, míg 30 eset MF-1, 21 eset MF-2 és 19 eset MF-3 grádust mutatott. A PDGFR β expresszió tekintetében 4 eset volt PDGFR β -0, míg 31 PDGFR β -1, 24 PDGFR β -2 és 25 PDGFR β -3 alcsoportba került besorolásra. A PDGFR β score a 84 esetből 29 esetben volt magasabb, mint az MF grádus, egyenlő volt azzal 51 esetben, és végül alacsonyabbnak bizonyult az MF grádusnál 4 esetben. A követési idő során a myelofibrosis tekintetében 34 eset mutatott progressziót, azaz az MF grádus emelkedett a kiindulási értékhez képest. 10 esetben regresszió, redukció volt megfigyelhető, azaz az MF grádus a kiindulási képest csökkent. Végül 40 esetben az MF grádus tekintetében nem volt megfigyelhető változás. A regressziót mutató mintáknál 4 esetben a beteg gyógyszeres kezelésben részesült, 3 esetben csontvelő transzplantáció történt, míg 3 esetben nem állt rendelkezésre információ a kezelésről.

A következő lépésben az MF grádus tekintetében az eseteket két csoportra osztottuk. A progresszív csoportba kerültek azok az esetek, ahol az MF grádus emelkedett a kiindulási értékhez képest ($n=34$), a nem-progresszív csoportba pedig azok az esetek kerültek, amelyek nem mutattak változást, vagy regressziót mutattak ($n=50$). A 13. ábra ennek megfelelően a progresszió valószínűségét szemlélteti azokban az esetekben ahol a PDGFR β expresszió magasabb volt az MF grádushoz viszonyítva ($n=28$), ahol egyenlő volt azzal ($n=52$) valamint ahol alacsonyabb volt annál ($n=4$). Log-rank analízis elvégzésével a különböző alcsoportok között nem volt szignifikáns eltérés az MF progresszió tekintetében ($p=0,3028$). Azoknál az

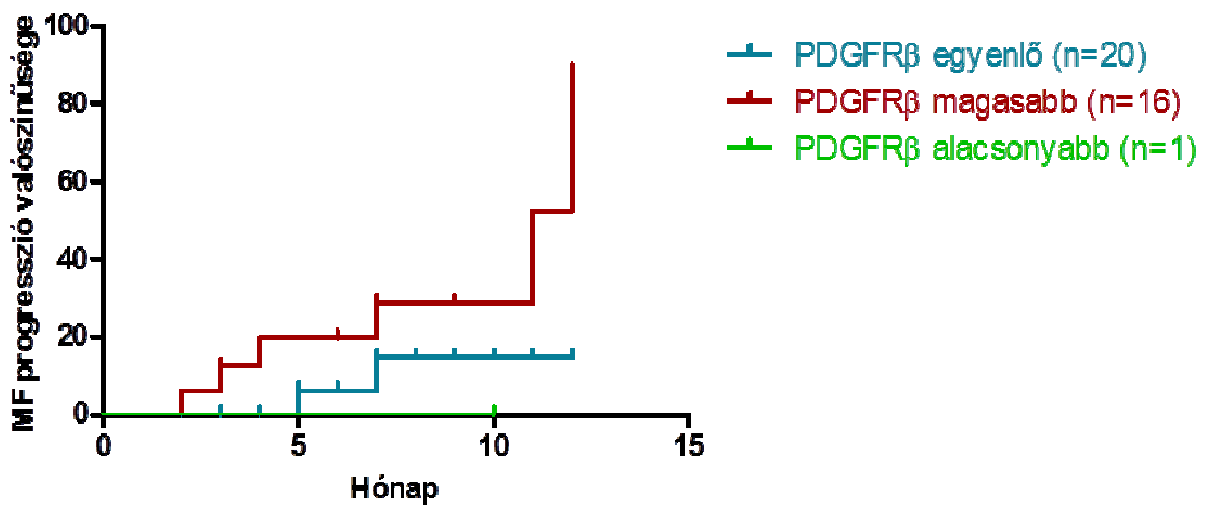
eseteknél, ahol az MF grádus a diagnózis időpontjában a legsúlyosabb mértéket mutatta (MF-3, n=19), további progresszió nem volt várható. Így a statisztikai elemzést ezek kizárását követően megismételtük, amely hasonló eredményt mutatott (p=0,4547).



13. ábra. A myelofibrosis (MF) progresszió valószínűsége különböző PDGFRβ státusz mellett (n=84). Az MF grádussal egyenlő, valamint az annál magasabb illetve alacsonyabb PDGFRβ score-ral járó esetek nem mutatnak különbséget az MF progresszió valószínűségének tekintetében Log-rank analízis során (p=0,3028).

A vizsgálat során az átlagos követési idő 34,43 hónap (2-151 hónap) volt. Feltételezhető azonban az, hogy a rosttermelő sejtek aktivációja és a rostsaporulat megjelenése gyorsan követik egymást, ezért a fenti vizsgálatokat azokban az esetekben is elvégeztük, melyek rövid (≤ 12 hónap) követési idővel rendelkeztek (n=37). A 14. ábra a progresszió valószínűségét szemlélteti azokban az esetekben ahol a PDGFRβ expresszió magasabb volt az MF grádushoz viszonyítva (n=16), ahol egyenlő volt azzal (n=20) valamint ahol alacsonyabb volt annál (n=1). Log-rank analízis elvégzésével a különböző alcsoportok között nem volt szignifikáns eltérés az MF progresszió tekintetében (p=0,2084). Az MF-3 grádussal rendelkező esetek kizárása után készült elemzés hasonló eredményt mutatott (p=0,7398).

Feltételezhető, hogy a PDGFR β expresszió megjelenése a pre-fibroticus esetekben előre jelzi a fibrosis megjelenését, viszont ez a prediktív szerep előrehaladott folyamatokban eltűnik. A vizsgált csoportban 14 olyan eset szerepelt, ahol a diagnózis időpontjában nem volt jelen rostsaporulat (MF-0). Azonban a Log-rank analízis ezen alcsoportban sem mutatott különbséget az MF progresszió valószínűségében a különböző PDGFR β expressziót mutató esetekben, $p=0,1982$.



14. ábra. A myelofibrosis (MF) progresszió valószínűsége különböző PDGFR β státusz mellett ≤ 12 hónapos követési időt feltételezve (n=37). Az MF grádussal egyenlő, valamint az annál magasabb illetve alacsonyabb PDGFR β score-ral járó esetek nem mutatnak különbséget az MF progresszió valószínűségének tekintetében.

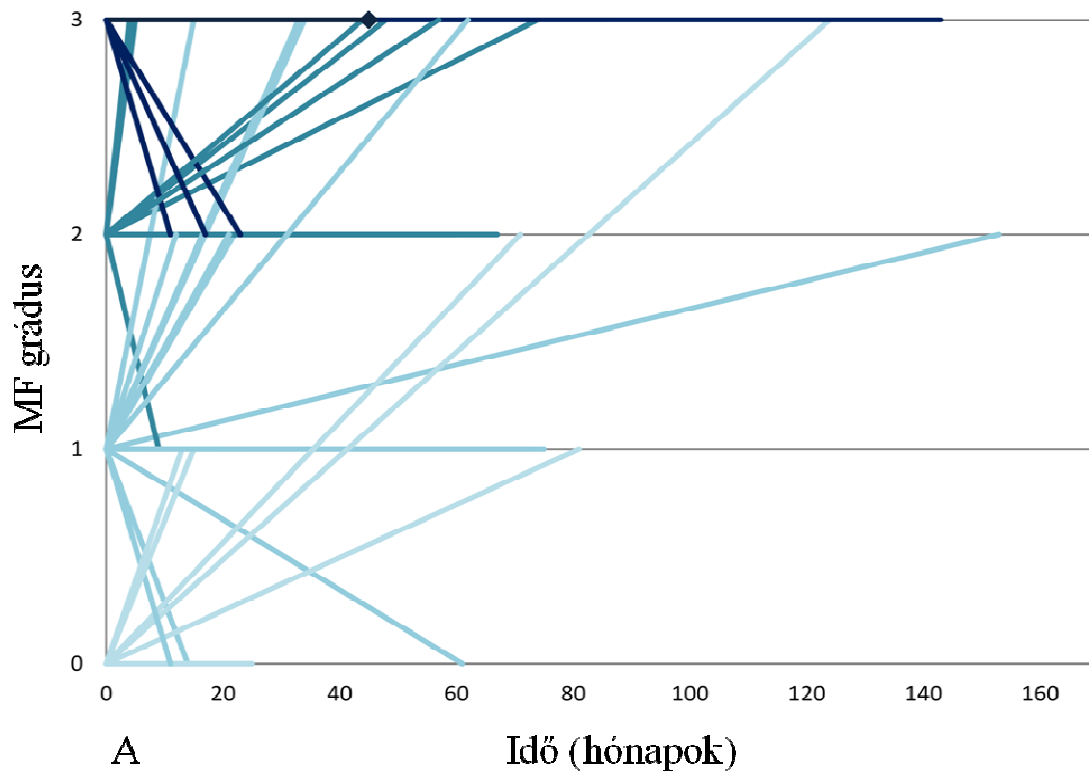
Az összes esetre vonatkoztatva MF-0 és MF-2 grádus között (n=65) az MF grádusnál magasabb PDGFR β expresszió mindössze 43%-os szenzitivitással és 46%-os specificitással jelezte előre a myelofibrosis progresszió megjelenését. Rövid követési időt vizsgálva (≤ 12 hónap) ugyanezen MF grádusokban (n=26) a szenzitivitás 82% volt, míg a specificitás 53%-nak bizonyult. A fentebbi vizsgálat során az MF-3 esetek kizárására a korábban részletezett okokból került sor. A pre-fibrotikus eseteket vizsgálva (n=14) a szenzitivitás elérte a 90%-ot, míg a specificitás 75% volt (8. táblázat).

	Összes eset (MF0-2)	1 év alatti követési idő	Pre-fibrotikus esetek
esetszám	65	26	14
valódi pozitív	15	9	9
valódi negatív	17	8	3
álpozitív	13	7	1
álnegatív	20	2	1
szenzitivitás	43% (15/35)	82% (9/11)	90% (9/10)
specifitás	57% (17/30)	53% (8/15)	75% (3/4)

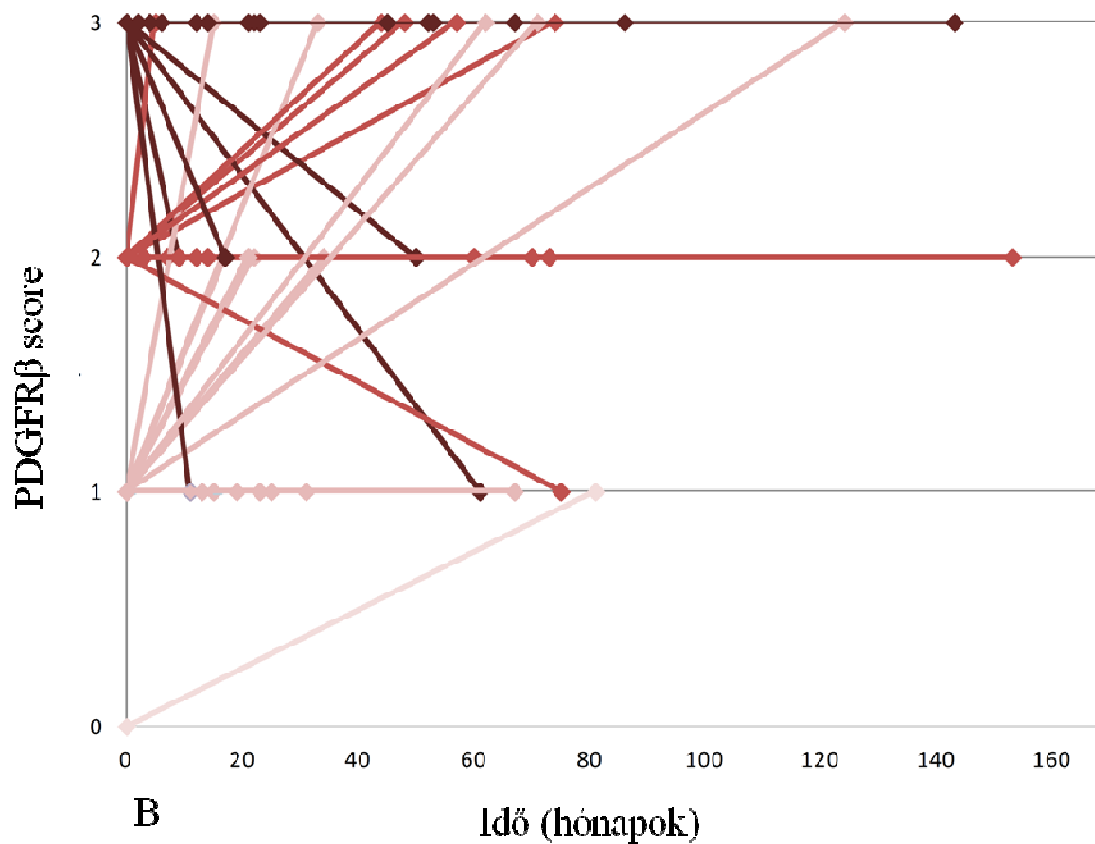
8. táblázat. A myelofibrosis (MF) grádust meghaladó PDGFR β expresszió szenzitivitása, specifitása a myelofibrosis progresszió tekintetében. Myelofibrosis progressziót mutat egy eset, amennyiben az MF grádus a kiindulási értékhez viszonyítva emelkedett. A legsúlyosabb rotszaporulattal rendelkező esetek (MF-3) további progresszióra nem képesek, így azok nem szerepelnek a vizsgálatban.

6.4.3 A fokozott PDGFR β expresszió és az MF progresszió kapcsolata a PMF alcsoportban

Mivel az 55 esetből álló PMF alcsoport bizonyult a legnagyobb betegcsoportnak a vizsgálatokat ezen beteganyagra fókuszálva megismételtük. A diagnózis időpontjában az MF grádus 6 esetben volt MF-0, 20 esetben volt MF-1, 11 esetben volt MF-2 és 18 esetben volt MF-3. A későbbi statisztikai feldolgozás során a fentebb részletezett okokból az MF-3 grádust mutató esetek kizárásra kerültek. A PDGFR β score 1 esetben volt PDGFR β -0, 18 esetben volt PDGFR β -1, 15 esetben volt PDGFR β -2, és 21 esetben volt PDGFR β -3. A betegek követése során az 55 esetből 24 esetben az MF grádus nem mutatott változást, 24 esetben progresszió volt megfigyelhető, míg 7 esetben regressziót láttunk (15. ábra). A stroma sejtek számát tükröző immunhisztokémiai vizsgálat szintjén 33 esetben nem volt változás, 16 esetben progresszió és 6 esetben regresszió volt megfigyelhető (16. ábra).

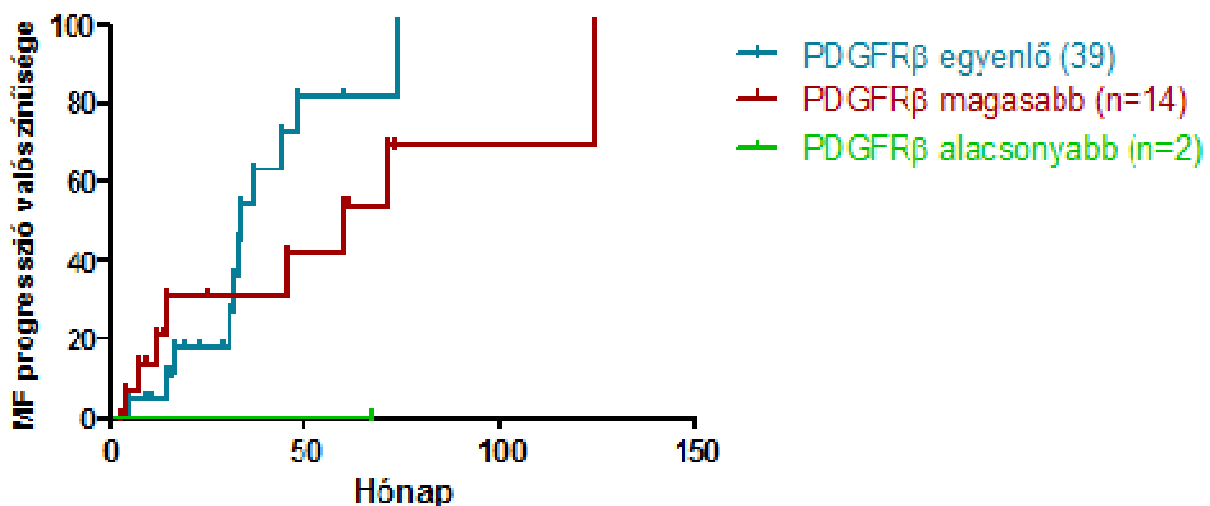


15. ábra. Az MF grádus alakulása az idő függvényében primer myelofibrosisban (n=55).



16. ábra. A PDGFRβ score alakulása az idő függvényében primer myelofibrosisban (n=55).

A PDGFR β score 14 esetben volt magasabb, mint az MF grádus, 39 esetben volt egyenlő azzal, és mindössze két esetben volt alacsonyabb. A 17. ábra a progresszió valószínűségét szemlélteti azokban az esetekben ahol a PDGFR β expresszió magasabb volt az MF grádushoz viszonyítva (n=14), ahol egyenlő volt azzal (n=39) valamint ahol alacsonyabb volt annál (n=2). Log-rank analízis elvégzésével a különböző alcsoportok között nem volt szignifikáns eltérés az MF progresszió tekintetében (p=0,3905). A rövid követési idővel rendelkező eseteket vizsgálva a magasabb (n=7), valamint egyenlő (n=13) PDGFR β expressziót mutató alcsoportok között nem volt szignifikáns különbség az MF progresszió tekintetében (p=0,7002).



17. ábra. A myelofibrosis (MF) progresszió valószínűsége különböző PDGFR β státusz mellett primer myelofibrosis alcsoportban (n=55). Az MF grádussal egyenlő, valamint az annál magasabb illetve alacsonyabb PDGFR β score-ral járó esetek nem mutatnak különbséget az MF progresszió valószínűségének tekintetében Log-rank analízis során (p=0,3905).

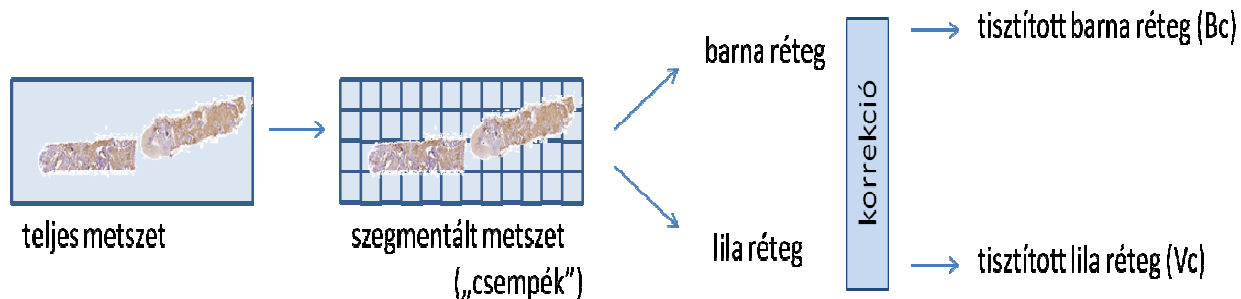
A PMF alcsoportban az MF grádusnál magasabb PDGFR β score az MF progressziót 40%-os szenzitivitással és 53%-os specificitással jelezte az MF-3 grádust mutató esetek kizárását követően. A rövid követési idővel rendelkező eseteket vizsgálva (<12 hónap) a szenzitivitás 83% volt, azonban a specificitás továbbra is alacsony maradt, 44% volt (9. táblázat).

	PMF esetek	PMF esetek, 1 év alatti követési idő
esetszám	37	15
valódi pozitív	8	5
valódi negatív	9	4
álpozitív	8	5
álnegatív	12	1
szenzitivitás	40% (8/20)	83% (5/6)
specifitás	53% (9/17)	44% (4/9)

9. táblázat. A myelofibrosis (MF) grádust meghaladó PDGFR β expresszió szenzitivitása, specifitása a myelofibrosis progresszió tekintetében primer myelofibrosisban (PMF). Progressziót mutat egy eset, amennyiben az MF grádus a kiindulási értékhez viszonyítva emelkedik.

6.5 PDGFR β expresszió mértékének objektív meghatározása digitális képanalízis segítségével

A PDGFR β immunhisztokémiai eljárással festett metszetek digitalizálását követően – a képfeldolgozás során – két réteg elkülönítésére került sor (18. ábra). Az ún. barna réteg az immunpozitív areákat foglalja magában, míg valamennyi immunnegatív, de hematoxylin festődést mutató terület a lila rétegbe kerül. Az egyes rétegek elkülönítése az úgynevezett hue érték és a szaturáció alapján történt. A barna réteghez tartozó pixelek hue értéke hue 60 és hue 340 közé esik. A Ramesh módszer segítségével meghatározható volt az a szaturáció, amely elkülönítette az antigén-antitest kötődést jelző specifikus sötét barna színreakciót a festődés háttereként jelentkező aspecifikus halvány barna jelölődéstől. Ezt a lépést háttér-korrekciónak neveztük. A háttér korrekciót követően nyert letisztított barna réteg különböző méretű és alakú barna objektumokból áll, amely tulajdonképpen megfelel a PDGFR β pozitív rosttermelő sejtek által alkotott sejtcsoportoknak. A letisztított barna rétegből nyert barna objektumok összességét barna komponensnek neveztük (Bc)⁶⁶.

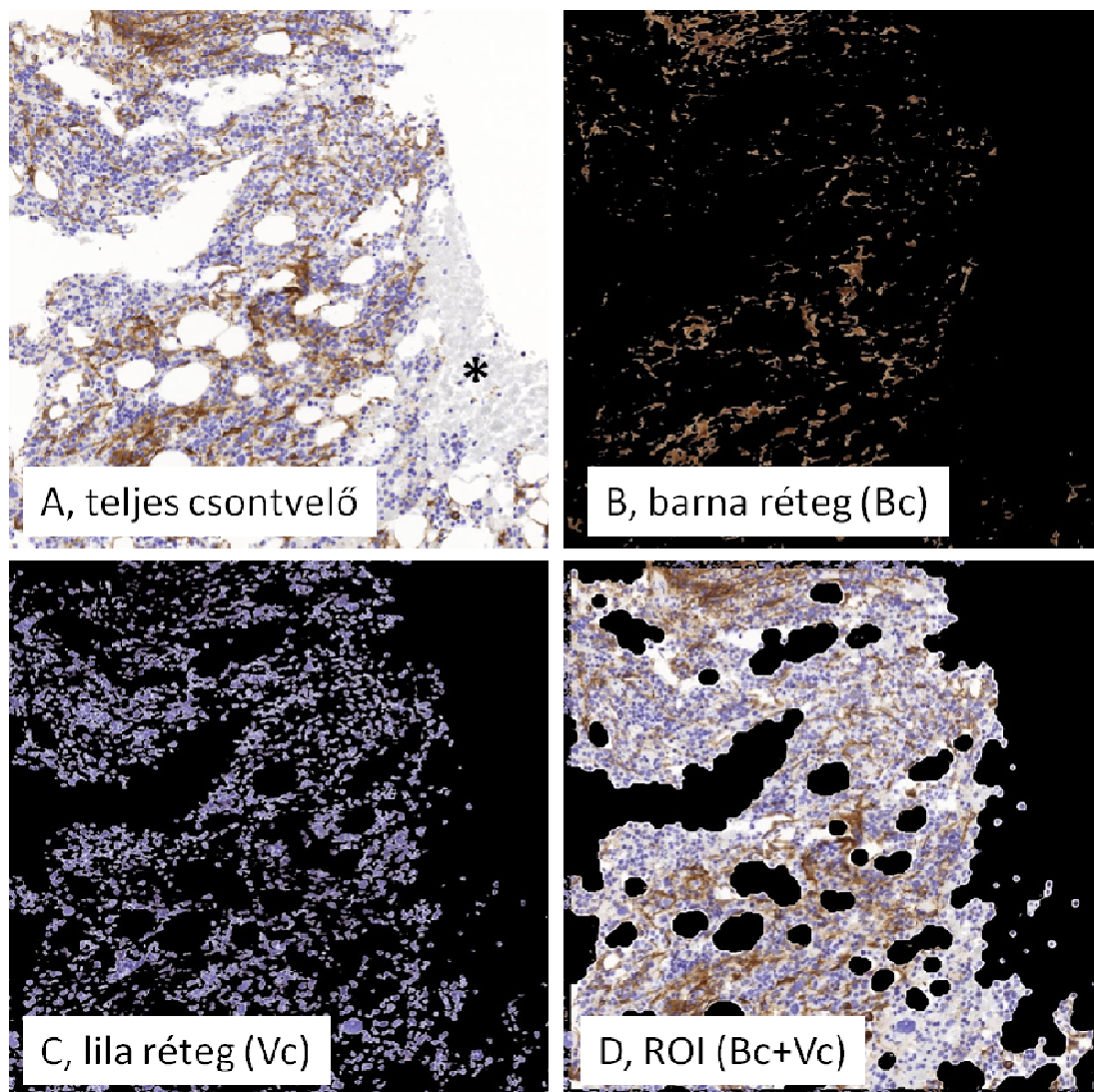


18. ábra. A crista biopsziás minták digitális feldolgozásának egyszerűsített algoritmus. A metszetek szegmentációját követően a meghatározott méretű metszetrészesletek, ún. csempék feldolgozására kerül sor. Az analízis során az egyes képpontok hue értéke és a szaturációja alapján két réteg különíthető el, melyek azonban még aspecifikus háttérfestődést és irreleváns elemeket is tartalmaznak. A korrekciót követően a tisztított immunpozitív, barna réteg (Brown component, Bc) és a tisztított immunnegatív, lila réteg (Violet component, Vc) áll rendelkezésre a további számításokhoz.

Az immunnegatív, vagyis a lila réteghez tartozó pixelek hue értéke 160 és 320 közé esett, ahol a szaturáció nagyobb volt, mint 20. A lila réteg, akárcsak a barna réteg nem tartalmazza a zsírsejteket, hiszen ezek a digitalizált metszetben üres, fehér foltokként jelennek meg. A lila rétegben ugyanakkor az immunnegatív vérképző állomány mellett még megfigyelhetőek egyéb csontvelői komponensek úgy, mint csont trabeculák, véralvadék, izomszövet, kötőszövetes állomány. Ezeket a vérképző állományhoz nem tartozó immunnegatív komponenseket automatizált eljárással el lehet különíteni a metszet hasznos részeitől. Ezt teszi lehetővé, hogy ezen szövetekben a sötétebb színű sejtmagok száma és eloszlása, a világosabb színű citoplazma vagy sejtközötti állomány (csont) mérete elkülöníti őket a relatíve sok sejtmagot és kisebb citoplazmát tartalmazó vérképző állománytól. A lila réteg, korrekcióját követően, így csak az intertrabecularis, vérképző állományhoz tartozó immunnegatív területeket tartalmazza. Ezt a letisztított lila réteget lila komponensnek neveztük (Vc).

Az intertrabecularis vérképző állomány tehát a korrekciók elvégzése után az immunnegatív (Vc) és az immunpozitív (Bc) komponenseket tartalmazta, melyek összegét hasznos területnek neveztük el (ROI: region of interest). A 19. ábra egy csempe feldolgozását mutatja be egy olyan crista biopsziás mintából, amelyben kifejezett stroma aktiváció volt

megfigyelhető. A PDGFR β pozitivitást tükrözi a korrigált barna réteg (19. ábra, B), valamint az immunnegatív vérképző állományt reprezentálja a tisztított lila komponens (19. ábra, C). A tisztított lila réteg már nem tartalmazza a 20. ábra A részén csillaggal jelölt véralvadékokat. A barna réteg és a lila réteg együttesen teszik ki a hasznos területet (ROI), amely megfelel az intertrabecularis vérképző állománynak (19. ábra, D).



19. ábra. Digitális metszet részlet (csempe) egy kifejezett stroma aktivációt mutató, PDGFR β immunhisztokémiai reakcióval jelölt crista biopsziás mintából. PDGFR β immunhisztokémiai reakcióval jelölt crista biopsziás minta (A). Az immunpozitív areát magában foglaló barna komponens, Bc (B). Az immunnegatív areát magában foglaló lila komponens, Vc (C). A barna komponens és a lila komponens összegéből álló hasznos terület (region of interest: ROI).

A ROI definiálása tehát automatizált úton történik manuális beavatkozás nélkül. Ezen automatizált folyamat validálása során 419 csempén végeztünk tesztet, melyek közül 300 csempét randomizált módon választottunk ki, míg további 119 csempét a rajta lévő objektumok alapján problémásnak ítéltünk, így kerültek beválasztásra. A 419 csempén a ROI definiálása mind automatizált, mind manuális úton megtörtént, amely teszt során az automatizált eljárás specificitása 97% volt.

A PDGFR β festődéshez köthető immunpozitivitás jellemzése céljából a leírt módon definiált hasznos területből (ROI) és barna komponensből (Bc) az alábbi paraméterek kerültek leírásra (10. táblázat). A barna objektumok száma (number of objects): az intertrabecularis barna (immunpozitív) objektumok számának összege, amely megfelel a PDGFR β pozitív sejtek és sejtcsoportok számának. Az összesített terület (SumArea): a barna objektumok területeinek összege (pixelek száma), mely megegyezik a barna componenssel. Az összesített kerület (SumPerimeter): a barna objektumok kerületeinek összege. Az összesített vázhossz (SumSkeleton): a barna objektumok vázhosszainak összege. A vázhossz egy alakzatba illeszthető valamennyi az alakzat körvonalaihoz belülről illeszkedő legnagyobb kör középpontjainak összege. Az alakzatba illeszthető kör akkor a legnagyobb, ha nem fedhető le teljesen egy másik az alakzatba illeszkedő körrel⁶⁷. További paraméter a súlyozott kerület (wPerimeter): ahol a súlyozás az objektum vázához tartozó kereszteződések és végpontok számával történik. Ez alapján minél komplexebb egy hálózat, annak nagyobb a súlyozott kerület, habár az összesített kerület nem változik vagy csökken az egymással egyre nagyobb felületen érintkező objektumok miatt⁶⁸.

Az összesített értékek mellett kiemeltük a legnagyobb értékeket, meghatározva ezzel azokat a csempéket vagy metszeteket, ahol az immunpozitív sejtek a legnagyobb összefüggő hálózatokat, azaz a legnagyobb objektumokat alkották. Minden csempén, illetve az egyes metszeteken is meghatároztuk a Top50 paramétereket úgy, mint Top50Area, Top50Perimeter,

Top50Skeleton. Ahhoz, hogy a barna objektumok méretének és komplexitásának értékelésekor a minta cellularitását is figyelembe vegyük, a paramétereket normalizáltuk a hasznos területtel (/ROI).

Összességében 13 paramétert definiáltunk, melyek a következők voltak: SumArea, SumPerimeter, SumSkeleton, Number of objects, SumArea/ROI, SumPerimeter/ROI, SumSkeleton/ROI, Number of objects/ROI, Top50Area, Top50Perimeter, Top50Skeleton, Number of objects/Bc, wPerimeter/ROI.

Név	Definíció
ROI	A csontvelői parenchyma összterülete, zsír- és acsontszövet kivételével.
SumArea	A PDGFR β pozitív, barna objektumok összterülete,
NUM	A PDGFR β pozitív, barna objektumok száma.
MaxPerimeter	A legnagyobb PDGFR β pozitív, barna objektum kerülete.
SumPerimeter	A PDGFR β pozitív, barna objektumok kerületeinek összege.
wPerimeter	A kerület súlyozás a kereszteződések és a végpontok számával.
SumSkeleton	A PDGFR β pozitív, barna objektumok vázainak összege.
Top50Area	A metszeten belül az 50 legnagyobb barna objektum területének összege.
Top50Perimeter	A metszeten belül az 50 legnagyobb barna objektum kerületének összege.
Top50Skeleton	A metszeten belül az 50 legnagyobb barna objektum vázának összege.
/ROI	Minden paramétert a hasznos területtel normalizálva is vizsgáltunk.

10. táblázat. A PDGFR β immunpozitivitás mértékének leírására szolgáló, digitális képanalízis során nyert paraméterek definíciói.

A statisztikai feldolgozást követően a kieső értékek eltávolítására is sor került, mely után megismételtük a statisztikai feldolgozást. Az 1437 csempe 2,5%-a tartalmazott egy vagy több kieső értéket. A kieső értékek leginkább olyan csempéken fordultak elő, ahol kis számban voltak jelen elszórta PDGFR β pozitív sejtek a mintában, azonban a metszési síkba került egy nagyobb ér átmetszete, amely adventitialis rétege kiugróan nagyméretű barna objektum formájában jelent meg. A statisztikai feldolgozás nem mutatott különbséget a kieső

értékek eltávolítása után. Bár a kieső értékek eltávolítás nem befolyásolta az eredményeket, ez a lépés

mégis javasolt enyhe stroma aktivációt mutató esetek összehasonlítása kapcsán.

6.6 *A PDGFR β expresszió mértékét tükröző numerikus paraméterek és az MF grádus kapcsolata*

6.6.1 A PDGFR β expresszió azonosításának validálása

A digitalizált metszetekből készült, egységes mérettel rendelkező csempéken a PDGFR β expresszió a barna komponensnek (Bc), az immunnegatív vérképző állomány a lila komponensnek (Vc), míg a teljes vérképző állomány a hasznos területnek (ROI=Bc+Vc) felelnek meg. Ezen komponensen definiálásával összesen 13 paraméter meghatározására került sor, melyeket az MF grádussal és a PDGFR β score-ral való összefüggésükben vizsgáltuk 42 crista biopsziás mintán. A 13 paraméterből nyolc erős korrelációt mutatott mind az MF grádussal (>0,75), mind pedig a PDGFR β score-ral (>0,75). A továbbiakban ezen nyolc paraméter részletes vizsgálatára került sor (11. táblázat).

A módszer kidolgozásához használt 42 crista biopsziás mintán túl az elfogadott beállításokkal méréseinket és számításainkat 37 további crista biopsziás mintán ismételtük meg validálás céljából. A kiválasztott nyolc paraméter továbbra is szignifikáns korrelációt mutatott mind az MF grádussal (Spearman r: 0,72-0,81), mind pedig a PDGFR β score-ral (Spearman r: 0,70-0,85).

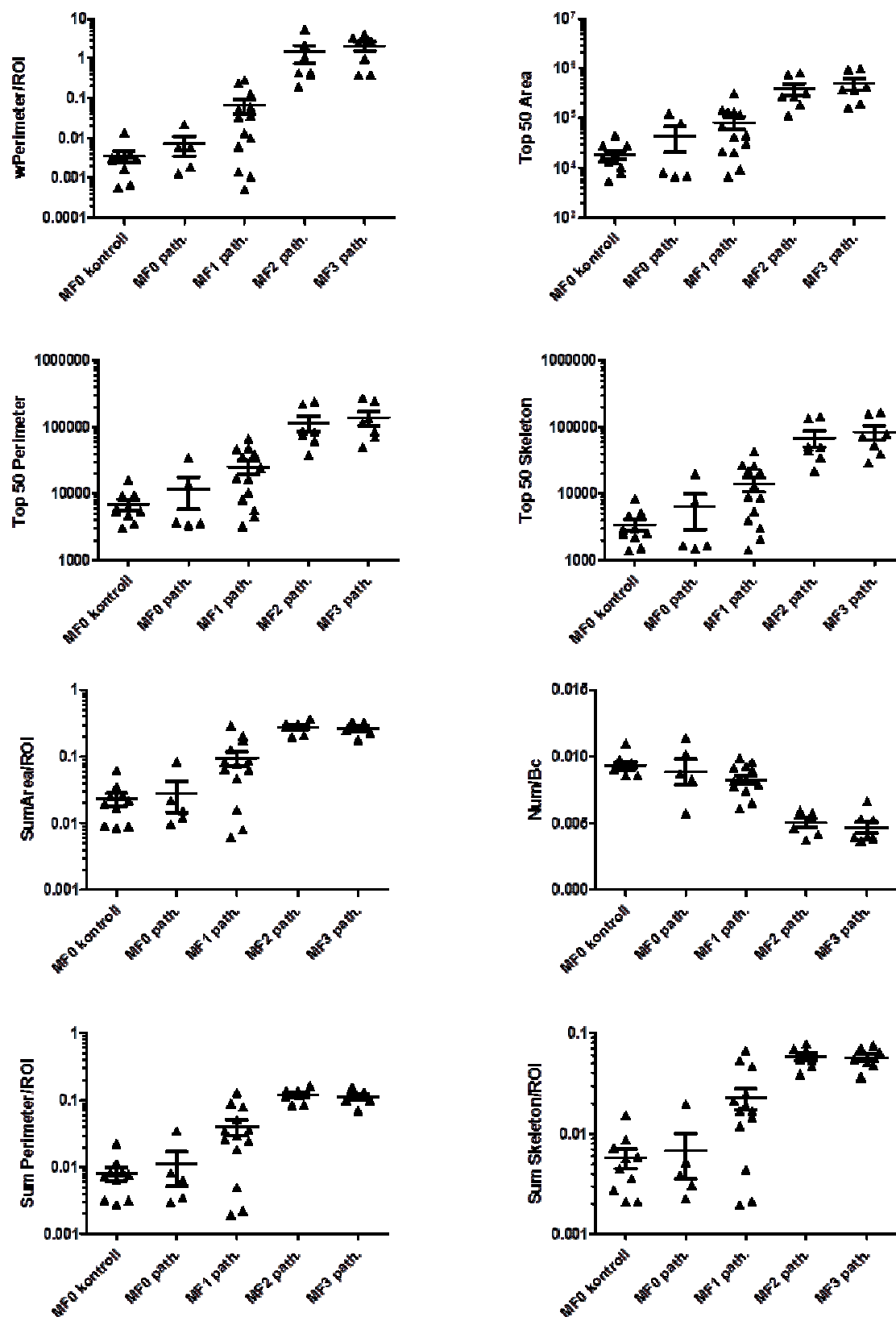
Paraméter	Korreláció, MF grádus		Korreláció, PDGFR β score	
	Spearman-R	P-érték	Spearman-R	P-érték
PDGFR β score	0,8578	< 0,0001	-	-
MF grádus	-	-	0,8578	< 0,0001
SumAreaROI	0,7956	< 0,0001	0,8669	< 0,0001
Num /Bc	-0,7893	< 0,0001	-0,7594	< 0,0001
Sum Perimeter/ROI	0,7886	< 0,0001	0,8702	< 0,0001
wPerimeter/ROI	0,8233	< 0,0001	0,8473	< 0,0001
Sum Skeleton/ROI	0,7878	< 0,0001	0,865	< 0,0001
Top 50 Area	0,8093	< 0,0001	0,7626	< 0,0001
Top 50 Perimeter	0,8237	< 0,0001	0,7898	< 0,0001
Top 50 Skeleton	0,8279	< 0,0001	0,7860	< 0,0001

11. táblázat. A PDGFR β expresszió mértékétük röző,

teljes metszetre vonatkozó numerikus paraméterek korrelációja a mikroszkópiával meghatározott, szemi-kvantitatív grádus értékekkel (n=42).

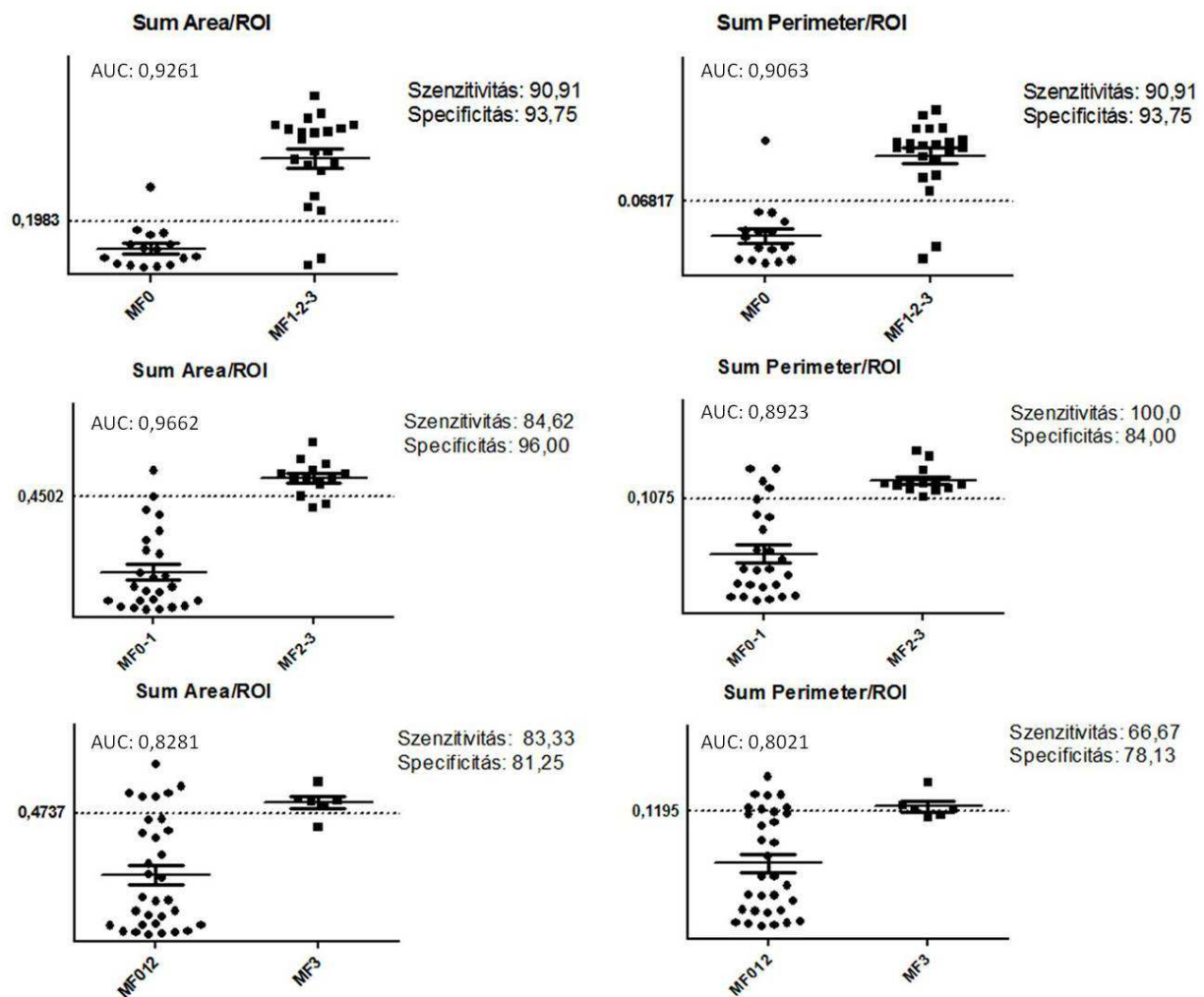
6.6.2 A digitális képfeldolgozáson alapuló, PDGFR β expresszióhoz kapcsolódó paraméterek és az MF grádus kapcsolata

Az MF grádussal való kapcsolat megítéléshez számított paraméterek a teljes metszetre vonatkoznak. A különböző MF grádussal járó esetekben a paraméterek jelentős különbséget mutattak. Az MF-0 grádussal rendelkező esetekben nem volt szignifikáns különbség egyetlen paraméter tekintetében sem az MF-0 kontroll és az MF-0 pathológiás esetek között. Ugyanakkor MF-0 és MF-3 között fokozatos emelkedés volt látható az értékekben a Num/Bc kivételével, amely csökkenést mutatott. Az MF-0 és MF-1 esetek között mind a nyolc kiválasztott paraméter szignifikáns különbséget mutatott (a p-érték 0,012 és 0,047 között változott).



20. ábra. A PDGFR β expresszió mértékét tükröz, digitális képfeldolgozáson alapuló, teljes metszetre vonatkozó paraméterek különböző MF grádussal járó esetekben (n=42).

Az MF-0 és MF-2 valamint az MF-0 és MF-3 alcsoportok között szintén szignifikáns különbség volt azonosítható, valamennyi paraméter esetében a p-érték <0,0001 volt. Szintén mind a nyolc paraméter szignifikáns különbséget jelzett az enyhe (MF-1) és közepes fokú (MF-2) fibrosis között (Top50Skeleton P=0,0012; Top50Perimeter P=0,0011; Top50Area P=0,0015; SumSkeleton/ROI P=0,0006; SumPerimeter/ROI P=0,0001; wPerimeter/ROI P=0,0149; SumArea/ROI P<0,0001; Num/Bc P<0,0001). A közepes (MF-2) és a súlyos (MF-3) fokú rotszaporulat között ugyanakkor egyik paraméter esetében sem volt látható szignifikáns különbség, a p-érték 0,2914 és 0,9957 között mozgott (20. ábra).



21. ábra. A PDGFR β pozitív sejtek mennyiségét és eloszlását tükröző, SumArea/ROI és SumPerimeter/ROI paraméterek megbízhatósága a különböző MF grádussal járó esetek elkülönítésében. MF: myelofibrosis, ROI: region of interest, AUC: area under curve.

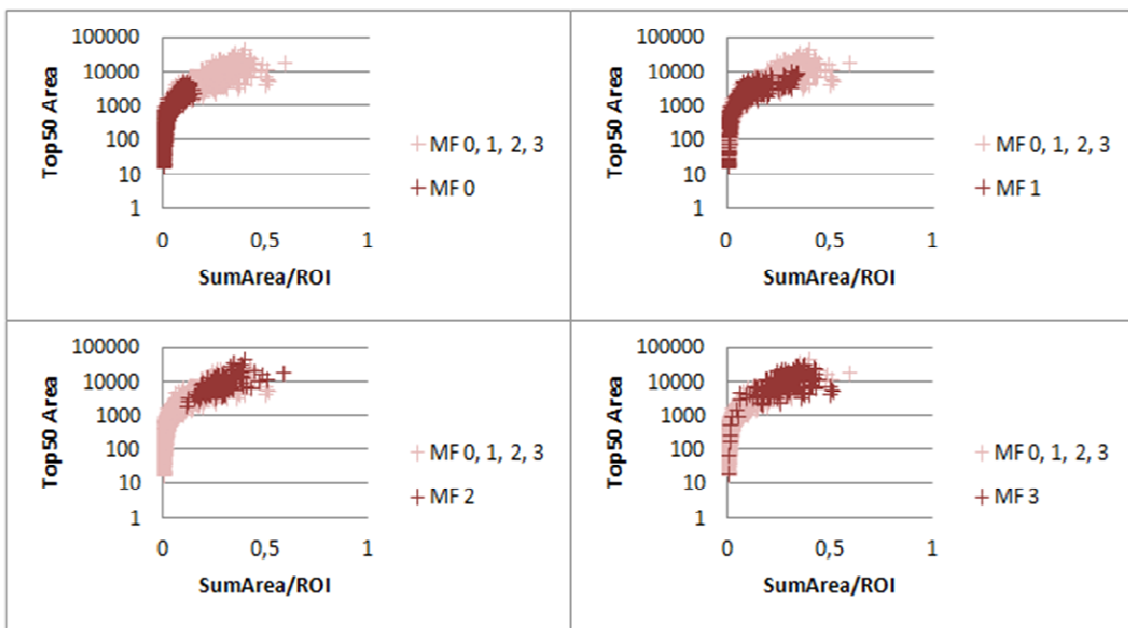
6.6.3 A digitális képanalízis használata követéses esetek vizsgálatában

A numerikus paraméterek alkalmazásával magas specificitással és szenzitivitással különíthetők el a fibrosis nélküli (MF-0) és a fibrosissal rendelkező esetek (MF 1-3) ROC-analízis során. A pozitív sejtek mennyiségét tükröző SumArea/ROI esetén az AUC (area under curve) 0,9261 volt, míg az immunpozitív sejtek által alkotott hálózat komplexitását tükröző SumPerimeter/ROI esetében ez az érték 0,9063-nak adódott. Az eltérés nélküli, illetve enyhe rostsaporulatot mutató eseteket a numerikus paraméterek szintén nagy biztonsággal különítik el a közepes- és súlyos fibrosissal járó esetektől. A SumArea/ROI esetén az AUC érték 0,9662, míg a SumPerimeter/ROI esetén 0,8923 volt. A módszer megbízhatósága jelentősen csökken az MF-3 grádussal járó esetek elkülönítése esetén. A SumArea/ROI-hoz tartozó AUC 0,8281, míg a SumPerimeter/ROI esetén ez az érték 0,8021 volt (21. ábra).

A mikroszkóppal meghatározott MF grádus egy szemi-kvantitatív érték, amely az egész crista biopsziás minta áttekintését követően egyetlen diszkontinuous számértékben fejezi ki az elváltozás mértékét. A mikroszkópos értékelés során a mintában látott legjellemzőbb terület alapján történik ezen érték meghatározása, azonban a mintán belül igen nagy heterogenitás figyelhető meg. A rostsaporulat általában kifejezettebb a megakaryocita clusterek és erek környezetében. A rostsaporulat azaz az MF grádus mellett a stroma sejt szaporulat, azaz a PDGFR β score is hasonló heterogenitást mutat. Ez a heterogenitás jól érzékelhető a PDGFR β immunhisztokémiai vizsgálat digitális képanalízise során. Ezt mutatja a 22. ábra, melyen a 42 crista biopsziás mintából származó 1437 csempe értékeit ábrázoljuk egyetlen diagramon, kiemelve az egyes MF grádusokhoz tartozó eseteket (MF0-3).

Az itt bemutatott paraméterek a SumArea/ROI és a Top50Area, melyek közül mindkettő a csempében detektálható barna objektumok területére vonatkozik. Hasonló

eloszlás volna látható a kerületre, illetve a vázhozra vonatkozó paraméterek ábrázolása esetén. Látható, hogy az egyes csempékhez tartozó számított értékek folyamatos emelkedést mutatnak. Megfigyelhető, hogy az egyes MF grádussal ellátott crista biopsziás mintákhoz tartozó csempék átfedő értékeket mutatnak. Így például a mikroszkópos értékelés során MF-0 al csoportba sorolt esetekhez tartozó csempék közül is vannak olyanok, melyekben jelentősebb

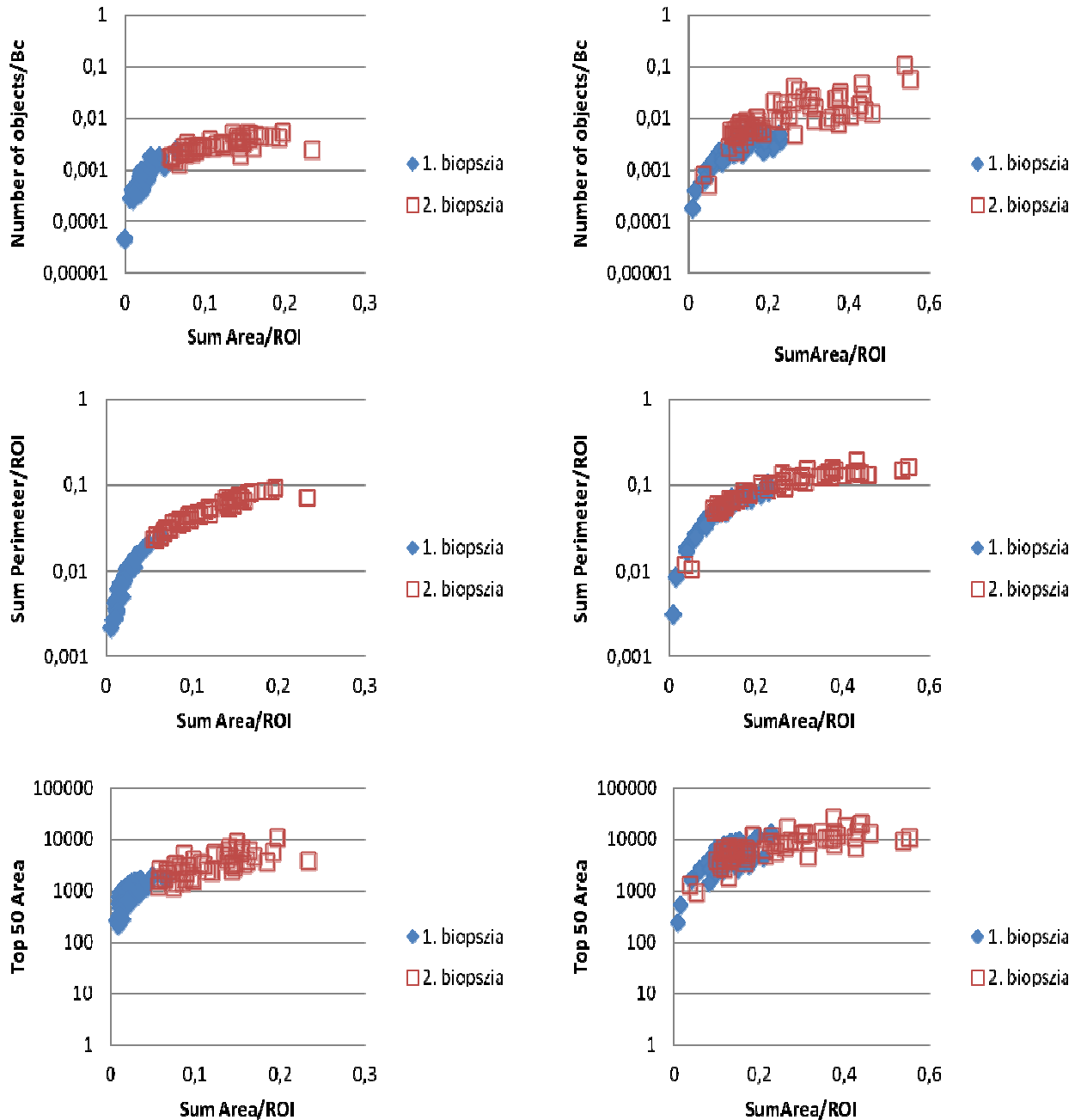


PDGFR β pozitívitas azonosítható, és a súlyos fibrosissal járó esetekben (MF-3) is láthatók olyan csempék, melyekben kevésbé kifejezett a stroma aktivációt jelző érték.

22. ábra. A PDGFR β expressziót mutató sejtcsoportok területét tükröző, digitális képfeldolgozáson alapuló, egyes csempékre vonatkozó paraméterek eloszlása kiemelve a különböző MF grádussal járó eseteket (n=42). A 42 esethez összesen 1437 képrészlet, azaz csempe tartozik. MF: myelofibrosis, ROI: region of interest.

A mikroszkópos értékelés során nem lehetséges ezen heterogenitás érzékeltetése, így a szemikvantitatív grádus rendszer a követéses vizsgálatok elemzése során korlátokkal rendelkezik. A követéses esetek objektív tanulmányozására négy paraméter került kiválasztásra (SumArea/ROI; Number of objects/Bc; Top50 Area; SumPerimeter/ROI). A 23. ábra szemlélteti követéses crista biopsziás minták digitális képanalízisen alapuló összehasonlító elemzését. Az első esetben (baloldal) PMF volt megállapítható, és a diagnózis

időpontjában a rotszaporulatot jelző MF grádus 0 volt, míg a stroma sejtjes komponensének aktivációját jelző PDGFR β score 1 volt. A 12 hónappal később elvégzett követéses crista

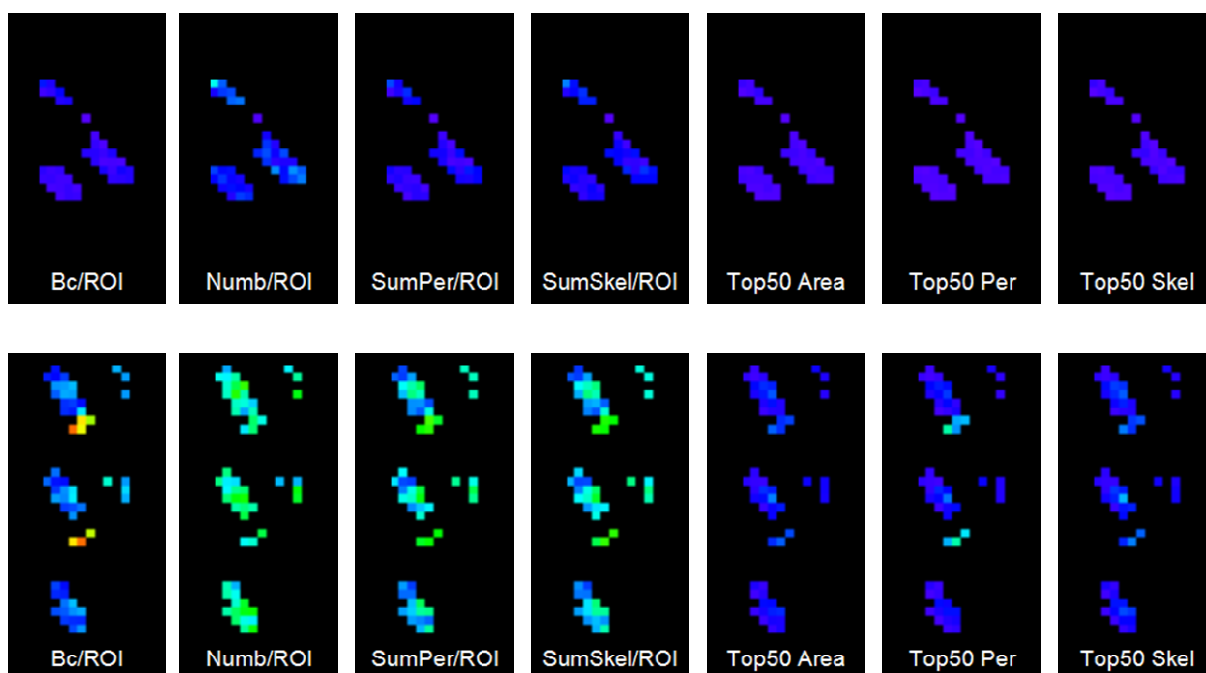


biopsziás mintában az MF grádus már 2 volt, míg a PDGFR β score is emelkedett, és szintén elérte a kettes score-t. A két minta között a fentebb felsorolt paraméterek mindegyikében szignifikáns különbség mutatkozott, a p-érték valamennyi esetben <0,0001 volt (23. ábra, bal oldal).

23. ábra. A PDGFR β expresszió mértékét tükröző, egyes metszet részletekre vonatkozó paraméterek változása két követéssel mintában. A bal oldali esetben a PDGFR β score 1-ről 2-re emelkedett, valamennyi paraméter szignifikáns különbséget jelzett a két minta között. A két minta minimális átfedést mutat. A jobb oldali esetben a PDGFR β score 2-ről 3-ra emelkedett, bár a két minta között átfedés látható, valamennyi paraméter szignifikáns különbséget mutatott.

A második szemléltetett esetben szintén PMF diagnózis született, ahol az MF grádus és a PDGFR β score is 2 volt. A négy évvel később vett crista biopsziás mintában mind a két érték emelkedett, és elérte a hármast. Korábban látható volt, hogy több eset összehasonlítása esetén a digitális képfeldolgozás során számított paraméterekben nem volt különbség a közepes (MF-2) és súlyos (MF-3) fibrosist mutató esetek között, valamint az is látható, hogy jelen esetben is nagy átfedést mutatnak a heterogén megjelenésű minták. Az összes csempén kiszámított értéket feldolgozó statisztikai elemzés ugyanakkor szignifikáns különbséget jelez a két minta között, a p-érték $<0,0001$ volt (23. Ábra).

A PDGFR β expressziót tükröző paraméterek bélyegképeken ábrázolhatók, ahol egy-egy képkocka egy-egy metszet részletnek, azaz csempének felel meg. A bélyegképeken az egyes paraméterekhez tartozó értékeket egy színskála alapján ábrázoljuk. A 24. ábra a fentebb részletezett esetet mutatja be (23. ábra, bal oldal), ahol a PDGFR β expresszió PDGFR β -1 score-ról PDGFR β score 2-re emelkedett.



24. ábra. A PDGFR β expresszió mértékét tükröző, digitális képfeldolgozáson alapuló, egyes metszet részletekre vonatkozó paraméterek ábrázolása bélyegkép formájában egy követéses mintában. A 24. ábra első felében bemutatott eset 1. (felső sor) és 2. (alsó sor) biopsziás mintái láthatók bélyegkép formájában. A bélyegképek a crista biopsziás minták heterogenitására hívják fel a figyelmet.

7 MEGBESZÉLÉS

Myelofibrosis során stroma aktiváció figyelhető meg a csontvelőben, amely reticulin és kollagén rostszaporulathoz vezet, melyhez néhány esetben csontújdonsképződés, azaz osteosclerosis is társulhat. A reticulin szaporulatot reverzibilis, míg a kollagén szaporulatot irreverzibilis elváltozásnak tartják. A kifejezett rostszaporulat során a normál vérképzés háttérbe szorul, a periférián cytopenia alakul ki. Myelofibrosis, azaz rostszaporulat számos betegségben létrejöhet, melyek legnagyobb része onkohematológiai kórkép^{1,3,7}. Bár számos esetben kimutatható a rostozat mennyiségének emelkedése, a klinikai vizsgálatok alapján a kórlefolyás szempontjából a myeloproliferatív neoplasiákban, illetve myelodysplasiás szindrómában van jelentősége.

Primer myelofibrosisban klinikai vizsgálatok bizonyították a rostszaporulat negatív prognosztikai hatását^{27,28}, a jelenlegi is folyó klinikai tanulmányokban már szerepel a rostszaporulat mértékének szemi-quantitatív meghatározása a diagnózis időpontjában, illetve a kezelés eredményességének tesztelésekor. Primer myelofibrosis esetében anti-fibrotikus terápiaként jelenleg az őssejt átültetés használatos, illetve újabb terápia lehetőségét jelent a JAK-2 gátló kezelés használata, melynek indikációja a közepes illetve magas kockázatú primer myelofibrosis, illetve poszt-polycythemia vera és poszt-essentialis thrombocythemia myelofibrosis^{29,69,70}.

Myelodysplasiás szindrómában szintén bizonyították a súlyos rostszaporulat negatív prognosztikai szerepét, azonban a rostszaporulat mértékének szemi-quantitatív meghatározása jelenleg nem része a prognózisbecslő protokolloknak. Az MDS-F, a fibrosissal társuló MDS jelenleg nem része a 2008-as WHO klasszifikációnak sem⁴⁰.

A rostszaporulat kórlefolyásra gyakorolt szerepének vizsgálatához, illetve az anti-fibrotikus kezelések eredményességének teszteléséhez szükség volt a rostszaporulat kimutatásának egységesítésére. A myelofibrosis kimutatására használt „gold standard” eljárás jelenleg a reticulin festés, vagy más néven Gömöri-féle ezüst impregnáció, amely mind a reticulin, mind pedig a kollagén szaporulat feltüntetésére alkalmas. A rostozat mennyiségi meghatározása pedig egy szemi-kvantitatív grádus rendszer segítségével történik, melyet 2005-ben egy európai konszenzus konferencián fogadtak el. A grádus rendszer négy fokozattal rendelkezik, amely 0 és 3 között terjed. Egészséges egyénekben leginkább MF-0 jellemző, azonban olykor MF-1 is előfordulhat³.

A reticulin festés, és a MF-grádus jól jelzik a csontvelőben található rostozat mennyiségét, azonban nem adnak információt a stroma aktiváció sejtes komponenséről, a rosttermelő sejtek mennyiségéről. Számos fibrotikus kórképben úgy, mint primer pulmonalis fibrosisban, sclerodermában, nephrosclerosisban, máj cirrhosisban bizonyították már a rosttermelésért felelős mesenchymalis sejtek proliferációját a kóros szövetben, valamint leírták bizonyos növekedési faktorok szerepét⁹. Ezen növekedési faktorok közül kiemelendő a TGF- β , valamint a PDGF AA és PDGF BB növekedési faktorok^{32,70}.

A PDGF ligandok receptorja a PDGFR, melynek két altípusa ismert, a PDGFR α és PDGFR β . Ezen receptor altípusok különböző mesenchymalis sejteken expresszálódnak, illetve az embryogenesis, organogenesis, valamint a kifejlődött szervezetben gyulladáscitokinek hatására egyes sejtek PDGFR profilja, valamint a PDGFR expresszió mértéke változhat. A PDGF ligandok dimer formában vannak jelen, és receptorukhoz való kötődésük a receptor dimerizációját, valamint auto-foszforilációját eredményezi¹²⁻¹⁴. A PDGF receptorok a tirozin-kináz receptor családba tartoznak, így aktivitásuk tirozin kináz gátlókkal blokkolható.

A PDGFR-ok fibrotikus kórképekben betöltött szerepének ismerete a tirozin kináz gátlók fibrotikus kórképekben való teszteléséhez vezetett. Számos *in vitro* kísérlet

alátámasztotta, a tirozin kináz inhibitorok proliferációt gátló hatását fibroblastokban¹¹. Állatmodelleken a tirozin kináz gátlók kórlefolysra gyakorolt pozitív hatását írták le tüdő fibrosisban, máj cirrhosisban, nephrosclerosisban⁵⁵⁻⁵⁷, azonban klinikai tanulmányok egyelőre ellentmondásosak, vagy még nem készültek el.

Myelofibrosisban is ismeretes a növekedési faktorok termelésének fokozódása^{32,64,72,73}, azonban a stroma sejtek szaporulatának kimutatására ezidáig nem került sor. A tirozin-kináz receptorok gátlása myelofibrosis kezelésében is egy potenciális terápiás célpont, azonban ezt csupán közvetett eredmények támogatják. Imatinibbel kezelt krónikus myeloid leukémias esetekben csökkent a fibrosis mértéke.

A doktori munka egyik célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljuk a normál és fibroticus csontvelői stroma sejtek PDGFR α és PDGFR β expresszióját, illetve meghatározzuk a PDGFR segítségével kimutatható stroma sejtek száma és a rostsaporulat mértéke közötti korrelációt.

A normál csontvelői mintákban a stroma sejteken a PDGFR α és PDGFR β expresszió az alábbiak szerint alakult. PDGFR α expresszió az endothel sejteken, az endostealis rétegben, illetve az interstitialis fibroblastokon elszórtan volt megfigyelhető. PDGFR β expresszió a pericapillaris és perisinusoidalis pericytákon, a nagyobb erek adventitialis rétegében, az endostealis rétegben illetve az interstitialis fibroblastokon volt kimutatható. A zsírsejtek nem mutattak PDGFR expressziót, az endostealis rétegben ko-expresszió volt jelen. Korábban már több tanulmányban leírták a hemopoieticus mikrokörnyezet felépítését¹⁶⁻¹⁸. Az általunk meghatározott PDGFR expresszió részleges átfedést mutat az osteoblastos és vascularis nichsel, hiszen az endostealis rétegben mindkét alegység expressziója, míg a perivascularis areában PDGFR β expresszió volt azonosítható.

A fibrosissal járó minták vizsgálata során a PDGFR expresszió fokozódása volt megfigyelhető, egyes esetekben a PDGFR α expresszió is emelkedett, azonban ez csupán részleges volt, és nem volt minden esetben azonosítható. A PDGFR β expresszió azonban

valamennyi fibrosissal járó esetben fokozott volt. SMA és CD34 ellenes antitestekkel kiegészített kettős-immunhisztokémiai vizsgálatok alapján nem lehetett azonosítani myofibroblast képződést a fibrotikus mintákban. Bár egyes esetekben megfigyelhető volt érszaporulat, a PDGFR β expresszió jelentősen meghaladta a CD34 expresszió mértékét, azaz a fokozott PDGFR β expresszió nem volt magyarázható érszaporulattal, az a fibroblastok szaporulatához volt köthető. Korábbi tanulmányok igazolták az emelkedett serum PDGF szintet myelofibrosisban³², azonban a PDGFR expressziót mutató stromasejtek mennyiségi meghatározására ezidáig nem került sor crista biopsziás mintákban. Ismert, hogy számos, a csontvelőt érintő elváltozás társulhat rostsaporulattal¹, tanulmányunkban igazoltuk, hogy ezen elváltozásokban a stroma sejtes komponensének aktivációja is kimutatható.

Ahhoz, hogy a rosttermelő fibroblastok mennyiségét tükröző PDGFR β expresszió, és a felszaporodott rostozat mennyiségét tükröző MF grádus közötti összefüggést pontosabban megvizsgáljuk, létrehoztunk egy, az MF grádus mintáját követő, négy-fokozatú, szemi-kvantitatív grádus rendszert, a PDGFR β score-t, mely értékei 0 és 3 között mozogtak.

60 eset alapján erős korreláció volt megfigyelhető az MF grádus és a PDGFR β score között (Spearman $r = 0,83$). A stroma rosttartalmát tükröző MF grádus és a stroma sejtes komponensét tükröző PDGFR β score közötti szoros összefüggést, melyet munkacsoportunk írt le elsőként alátámasztja a PDGF myelofibrosisban betöltött szerepét.

A PDGFR β score, az MF grádushoz hasonlóan, normál csontvelői mintában mutathat enyhe emelkedést (PDGFR β -1), azonban ezt az értéket egyetlen esetben sem haladta meg. Vizsgálatunkban nem volt olyan eset, amelyben a rostsaporulat a stroma sejtek számának emelkedése nélkül jelent volna meg. A pathológiás eseteket tartalmazó csoportban ($n=47$) 21 esetben a PDGFR β score magasabbnak bizonyult az MF grádusnál.

Mivel a stroma sejtes proliferáció hypothesisünk alapján megelőzi a rosttermelés beindulását, a doktori munka során megvizsgáltuk a PDGFR expresszió myelofibrosis

progresszióra vonatkozó prediktív értékét myeloproliferatív neoplasiákban, ahol a rostsaporulat megjelenése bizonyítottan prognosztikai szereppel bír, így annak korai kimutatása terápiás szempontból is fontos lehet. Ezen betegcsoportban elsősorban az IPSS használatos a prognózis meghatározására, bár ismert a mutációk és a rostsaporulat prognosztikai szerepe is^{27,36}. A stroma sejtes komponensét tükröző PDGFR β score egy új prognosztikai marker lehet, amely a MF progresszióra gyakorolt hatását vizsgáltuk.

Vizsgálataink során 84 myeloproliferatív neoplasiában szenvedő betegről összesen 193 követéses csontvelő biopsziás minta retrospektív kiértékelésére került sor. Minden esetben megtörtént a rostsaporulat mértékét jelző MF grádus, illetve a sejtes aktivációt jelző PDGFR β score meghatározása. A két érték egymáshoz való viszonya a következő lehetett: A PDGFR β score az MF grádushoz viszonyítva magasabb, alacsonyabb, vagy azzal megegyező értéket mutathatott. A myelofibrosis lefolyása szempontjából pedig két kimenet volt elképzelhető: MF progresszió, mely esetén az MF grádus a kiindulási értékhez viszonyítva emelkedett, valamint nem progrediáló esetek, mely esetén az MF grádus a kiindulási értékhez viszonyítva csökkent, vagy változatlan maradt.

A megadott paraméterek alapján elmondható, hogy az MF grádusnál magasabb PDGFR β score-t mutató esetekben a myelofibrosis progresszió valószínűsége nem tért el szignifikánsan az egyéb alcsoportoktól. A rövid követési idővel rendelkező, illetve a pre-fibroticus esetek vizsgálata hasonló eredményt mutatott.

Az MF grádusnál magasabb PDGFR β score a myelofibrosis progresszióját alacsony szenzitivitással és specificitással határozta meg az összes esetet vizsgálva. A szenzitivitás már magasabbnak bizonyult (82%) akkor, amikor a rövid követési idővel rendelkező esetekre fókuszáltunk. A legmagasabb szenzitivitás (90%) és specificitás (75%) a pre-fibrotikus esetekkel járó alcsoportban volt megfigyelhető.

Összességében elmondható, a pre-fibrotikus, enyhe és súlyos fibrosist mutató esetek együttes vizsgálatakor az emelkedett PDGFR β expresszió prediktív értéke nem volt megerősíthető. A betegség kezdeti szakaszát képező pre-fibrotikus esetekben ugyanakkor az említett prediktív szerep lehetősége továbbra is fennáll, így a továbbiakban ezen betegcsoport részletes vizsgálata válik szükségessé.

Mind a rostsaporulatot tükröző MF grádus, mind pedig a stroma aktiváció sejtes komponensét jelző PDGFR β score, szubjektív vizsgálaton alapuló, szemi-kvantitatív rendszerek, melyek négy, határozott értéket vehetnek fel. Ismeretes ugyanakkor, hogy a stroma aktiváció a csontvelőben nem egyenletes, hanem heterogén megjelenést mutat. A mikroszkópos kiértékelés során a legjellegzetesebb terület alapján történik a minta kiértékelése. Ezen módszerek alkalmasak a myelofibrosis mértékének durva megítéléshez, azonban az újabb anti-fibrotikus terápiák eredményességének megítéléséhez szükség lehet objektív, és pontosabb vizsgálómódszerekre. A doktori munka során kidolgozásra került egy digitális képfeldolgozáson alapuló algoritmus, amely a stroma aktiváció objektív megítélését, és így különböző minták finom összevetését teszi lehetővé. A digitális képanalízis kidolgozását a stroma aktivációt jelző PDGFR β expresszió immunhisztokémiai vizsgálata tette lehetővé. A reticulín festéshez képest, az immunhisztokémiai vizsgálaton alapuló festés hasonló színreakciót eredményez, így annak elemzésére standard beállítások használhatók. A stroma aktiváció sejtes komponensének ilyen jellegű vizsgálatára korábban nem került sor. Bár a digitális képanalízis egyre nagyobb teret nyer a hisztopatológia területén, a komplex felépítésű crista biopsziás minták elemzése egyedi feldolgozást igényel, melyet szintén elsőként dolgoztunk ki.

A digitális képfeldolgozáson alapuló algoritmus DAB kromogén reakciót használó immunhisztokémiai módszerrel jelölt crista biopsziás minták feldolgozására alkalmas. Az eljárás során lehetőség van az immunpozitív, az immunnegatív, valamint az ezek összegét

képező hasznos terület (ROI) azonosítására. Az eljárás során automatikus kizárásra kerülnek a zsírsejtek, a véralvadék, a csontgerendák, illetve a crista biopsziás mintákban gyakran előforduló izom-és kötőszövetes elemek.

Az immunpozitív (Bc) és immunnegatív (Vc), valamint a hasznos terület (ROI) azonosítását követően összesen 13 paramétert definiáltunk, melyek a következők voltak: SumArea, SumPerimeter, SumSkeleton, Number of objects, SumArea/ROI, SumPerimeter/ROI, SumSkeleton/ROI, Number of objects/ROI, Top50Area, Top50Perimeter, Top50Skeleton, Number of objects/Bc, wPerimeter/ROI.

A fentebb felsorolt 13 paraméterből 8 erős korrelációt ($r > 0,75$) mutatott mind az MF grádussal, mind pedig a PDGFR β score-ral. Az erős korreláció alapján tovább vizsgált nyolc paraméter a következő volt: SumArea/ROI, SumPerimeter/ROI, SumSkeleton/ROI, Top50Area, Top50Perimeter, Top50Skeleton, Number of objects/Bc, wPerimeter/ROI.

A jelzett paraméterek közül valamennyi szignifikáns különbséget jelzett a nem-fibrotikus (MF-0) valamint az enyhe (MF-1), közepes (MF-2) és súlyos (MF-3) fibrosist mutató esetek között. Szintén szignifikáns különbség volt látható az enyhe és közepes fibrosist mutató esetek között. Azonban a közepes és súlyos fibrosist mutató esetek között nem volt szignifikáns különbség, melyre magyarázatot adhat az, hogy az MF-2 grádust mutató esetek egy részében a stroma aktiváció sejtes komponensét tükröző PDGFR β score elérte a legmagasabb szintet. ROC-analízis hasonló eredményt mutatott a különböző MF grádussal járó esetek elkülönítésében.

A felsorolt paraméterek közül a skeleton és a terület hasonlóan változnak a különböző mértékű stroma aktiváció során, köztük statisztikailag nincs különbség, így nincs szükség a két paraméter együttes használatára. Figyelembe véve ezt az eredményt, a PDGFR β expresszió, illetve a hasonló mintázatot mutató immunfestések (pl. tenascin) digitális képfeldolgozáson alapuló kiértékelésére 5 paraméter kombinációjának használata javasolható,

melyek a következők: SumArea/ROI, SumPerimeter/ROI, Top50Area, Top50Perimeter, Number of objects/Bc.

A PDGFR β expressziót tükröző objektív paraméterek jól jelzik a crista biopsziás mintákban megfigyelhető heterogenitást, melyre a szemi-kvantitatív módszerek nem adnak lehetőséget. A módszer időigényes, azonban használatával lehetővé válik a követéses crista biopsziás minták objektív összehasonlítása olyan kutatásokban, melyek például az anti-fibrotikus terápiák hatékonyságát vizsgálja.

8 ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

Összefoglalásképpen a doktori munka eredményeként az alábbi új megállapítások voltak megfogalmazhatók:

1. A csontvelői stroma sejtek normál körülmények között eltérő mintázattal mutatnak PDGFR α és PDGFR β expressziót, melyek elsősorban az erekhez és a csontgerendákhoz asszociáltan jelennek meg.
2. Csontvelői rostsaporulattal járó kórképekben fokozott PDGFR β expresszió figyelhető meg.
3. Az aktivált stromasejtek számát tükröző PDGFR β score rendszer szoros korrelációt mutat a rostsaporulat mértékét tükröz MF grádussal.
4. A fokozott PDGFR β expresszió MF progresszióra gyakorolt potenciális prediktív szerepe volt megállapítható pre-fibrotikus, myeloproliferatív neoplasiák esetén, ennek bizonyításához további minták vizsgálata szükséges.
5. Az általunk kifejlesztett, digitális képfeldolgozáson alapuló algoritmus nagy specificitással képes a vérképző állomány és az immunpozitív areák automatizált azonosítására.
6. A digitális képfeldolgozáson alapuló, a PDGFR β expressziót mutató stromasejtek által alkotott hálózat méretét és komplexitását tükröző paraméterek erős korrelációt mutatnak a mikroszkópos módszerrel meghatározott grádus értékekkel és megbízhatóan alkalmazhatók követéses minták összehasonlító elemzésére.

9 ÖSSZEFOGLALÁS

A csontvelői stroma aktivációját jelző reticulín- illetve kollagén szaporulat, azaz myelofibrosis számos onkohematológiai kórképben előfordulhat, valamint megjelenhet szolid tumor csontvelői infiltrációja során is. A myelofibrosis jelenlétének myeloproliferatív neoplasiák – ezen belül is primer myelofibrosis – illetve myelodysplasias szindróma esetén prognosztikai szerepe van. Korábbi tanulmányokból ismeretes, hogy a rostsaporulatért felelős stroma sejtek proliferációjában jelentős szerepe van a vérlemezke eredetű növekedési faktornak (PDGF). A PDGF receptor fokozott expresszióját több fibrotikus kórképben leírták, és ezen kórképekben a tirozin-kináz gátló terápiával kapcsolatos kísérletek is elkezdődtek. Myelofibrosis esetében a PDGFR expresszió megjelenése nem tisztázott.

A doktori munka célja volt a PDGFR expressziós profiljának meghatározása normál csontvelői állományban, valamint a PDGFR expresszió és a myelofibrosis (MF) grádus közötti kapcsolat vizsgálata. További cél volt a fokozott PDGFR expresszió prediktív értékének meghatározása MF progresszió szempontjából. A tanulmány utolsó lépésében egy, a stroma aktiváció mértékét és megoszlását objektíven jelző módszer kidolgozására került sor.

A doktori munka során a PDGFR α és β alegység eltérő expressziós profilját határoztuk meg, és szoros összefüggést találtunk a PDGFR β expresszió és az MF grádus között. Vizsgálataink alapján a pre-fibrotikus esetekben prediktív értéke lehet az emelkedett PDGFR β expressziónak myeloproliferatív kórképekben, azonban ennek alátámasztására további vizsgálatok szükségesek. A PDGFR β immunhisztokémiai vizsgálattal feldolgozott crista biopsziás minták digitalizálását követően egy olyan képanalízisen alapuló módszer kifejlesztésére került sor, amely képes automatikus módon, nagy specificitással a vérképző állomány, illetve az immunpozitív területek felismerésére, illetve azok objektív elemzésére.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a PDGFR β expresszió immunhisztokémiai vizsgálata a csontvelői stroma aktiváció sejtes komponensének megbízható markere.

10 SUMMARY

Reticulin and collagen accumulation, directing to stromal activation, can occur in different oncohematological conditions and even in solid tumor metastasis in the bone marrow. The occurrence of myelofibrosis (MF) has prognostic impact in myeloproliferative neoplasias – first of all in primary myelofibrosis – and in myelodysplastic syndrome. Platelet derived growth factor (PDGF) produced by megakaryocytes has a major role in the proliferation of fiber producing cells. On the other hand, the overexpression of PDGF receptor (PDGFR) can be seen in several fibrotic disorders. Currently, some studies focus on the potential therapeutic role of tyrosine-kinase inhibitors in these alterations.

The aim of the PhD work was to examine the PDGFR expression pattern in the normal bone marrow and to assess the correlation between the PDGFR expression and MF grade. Further, the predictive potential of PDGFR overexpression in progressive myelofibrosis was evaluated. Finally, an objective image analysis method was introduced to detect the amount and distribution of the cellular component during stromal activation of the bone marrow.

We concluded, that different expression patterns of the PDGFR α and β isoforms characterize the bone marrow stromal cells. A strong correlation between MF grade and PDGFR β score could be established. On the basis of our observations, PDGFR β overexpression may be predictive for MF progression in pre-fibrotic cases, although further examinations are needed to prove it. Using digitalized a newly developed software algorithm we proposed an automated method, which recognizes hemopoetic bone marrow parenchyma and immunpositive areas with high specificity. This method reflected significant differences in stromal activity and demonstrated intraparenchymal heterogeneity in different hematopathological conditions of the bone marrow. In summary, PDGFR β expression proved

to be a reliable and useful marker of the cellular component during stromal activation in the bone marrow.

11 IRODALOMJEGYZÉK

1. Kuter DJ, Bain B, Mufti G, Bagg A, Hasserjian RP. Bone marrow fibrosis: Pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. *Br J Haematol.* 2007;139(3):351-362.
2. Hoffman R, Rondelli D. Biology and treatment of primary myelofibrosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2007:346-354.
3. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica.* 2005;90(8):1128-1132.
4. Koopmans SM, van Marion AM, Schouten HC. Myeloproliferative neoplasia: A review of clinical criteria and treatment. *Neth J Med.* 2012;70(4):159-167.
5. Buesche G, Ganser A, Schlegelberger B, et al. Marrow fibrosis and its relevance during imatinib treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2007;21(12):2420-2427.
6. Buesche G, Teoman H, Wilczak W, et al. Marrow fibrosis predicts early fatal marrow failure in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2008;22(2):313-322.
7. Tripodo C, Sangaletti S, Piccaluga PP, et al. The bone marrow stroma in hematological neoplasms--a guilty bystander. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8(8):456-466.
8. Gomori G. Silver impregnation of reticulum in paraffin sections. *Am J Pathol.* 1937;13(6):993-1002.5.

9. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(4):255-273.
10. Martyre MC. TGF-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of myelofibrosis in myeloproliferative disorders. *Leuk Lymphoma.* 1995;20(1-2):39-44.
11. Rajkumar VS, Shiwen X, Bostrom M, et al. Platelet-derived growth factor-beta receptor activation is essential for fibroblast and pericyte recruitment during cutaneous wound healing. *Am J Pathol.* 2006;169(6):2254-2265.
12. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999;79(4):1283-1316.
13. Funa K, Uramoto H. Regulatory mechanisms for the expression and activity of platelet-derived growth factor receptor. *Acta Biochim Pol.* 2003;50(3):647-658.
14. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008;22(10):1276-1312.
15. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;295(1):139-145.
16. Lichtman MA. Structure of the marrow and the hematopoietic microenvironment. In: *Williams manual of hematology.* 8th ed. McGraw Hill Professional; 2011.
17. Nagasawa T, Omatsu Y, Sugiyama T. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: The role of reticular cells. *Trends Immunol.* 2011;32(7):315-320.

18. Guerrouahen BS, Al-Hijji I, Tabrizi AR. Osteoblastic and vascular endothelial niches, their control on normal hematopoietic stem cells, and their consequences on the development of leukemia. *Stem Cells Int.* 2011;2011:375857.
19. Krause DS, Scadden DT, Preffer FI. The hematopoietic stem cell niche--home for friend and foe? *Cytometry B Clin Cytom.* 2013;84(1):7-20.
20. Ehniger A, Trumpp A. The bone marrow stem cell niche grows up: Mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med.* 2011;208(3):421-428.
21. Bauermeister DE. Quantitation of bone marrow reticulin-a normal range. *Am J Clin Pathol.* 1971;56(1):24-31.
22. Wadleigh M, Tefferi A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms according to the 2008 world health organization criteria. *Int J Hematol.* 2010;91(2):174-179.
23. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, et al. Initial bone marrow reticulin fibrosis in polycythemia vera exerts an impact on clinical outcome. *Blood.* 2012;119(10):2239-2241.
24. Buhr T, Hebeda K, Kaloutsi V, Porwit A, Van der Walt J, Kreipe H. European bone marrow working group trial on reproducibility of world health organization criteria to discriminate essential thrombocythemia from prefibrotic primary myelofibrosis. *Haematologica.* 2012;97(3):360-365.
25. Cervantes F. Management of essential thrombocythemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:215-221.
26. Tefferi A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2013;88(6):507-516.

27. Gianelli U, Vener C, Bossi A, et al. The european consensus on grading of bone marrow fibrosis allows a better prognostication of patients with primary myelofibrosis. *Mod Pathol.* 2012;25(9):1193-1202.
28. Vener C, Fracchiolla NS, Gianelli U, et al. Prognostic implications of the european consensus for grading of bone marrow fibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis. *Blood.* 2008;111(4):1862-1865.
29. Mesa RA. The evolving treatment paradigm in myelofibrosis. *Leuk Lymphoma.* 2013;54(2):242-251.
30. Thiele J, Kvasnicka HM. Myelofibrosis in chronic myeloproliferative disorders--dynamics and clinical impact. *Histol Histopathol.* 2006;21(12):1367-1378.
31. Kreipe H, Hussein K, Göhring G, Schlegerberger B. Progression of myeloproliferative neoplasms to myelofibrosis and acute leukaemia. *J Hematopathol.* 2011;4:61-68.
32. Hasselbalch HC. The role of cytokines in the initiation and progression of myelofibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013;24(2):133-145.
33. Lataillade JJ, Pierre-Louis O, Hasselbalch HC, et al. Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? from concept to evidence. *Blood.* 2008;112(8):3026-3035.
34. Beham-Schmid C, Apfelbeck U, Sill H, et al. Treatment of chronic myelogenous leukemia with the tyrosine kinase inhibitor STI571 results in marked regression of bone marrow fibrosis. *Blood.* 2002;99(1):381-383.

35. Buesche G, Hehlmann R, Hecker H, et al. Marrow fibrosis, indicator of therapy failure in chronic myeloid leukemia - prospective long-term results from a randomized-controlled trial. *Leukemia*. 2003;17(12):2444-2453.
36. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, Martínez-Trillos A, Casetti I, Colomer D, Pieri L, Pratorcorona M, Rotunno G, Sant'Antonio E, Bellini M, Cavalloni C, Mannarelli C, Milanesi C, Boveri E, Ferretti V, Astori C, Rosti V, Cervantes F, Barosi G, Vannucchi AM, Cazzola M. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(7):1062-9.
37. Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, Pardanani AD, Cortes-Franco J, Thomas DA, Estrov Z, Fridman JS, Bradley EC, Erickson-Viitanen S, Vaddi K, Levy R, Tefferi A. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N Eng J Med*. 2010; 363(12):1117-27.
38. Cazzola M, Della Porta MG, Travaglino E, Malcovati L. Classification and prognostic evaluation of myelodysplastic syndromes. *Semin Oncol*. 2011;38(5):627-634.
39. Marisavljevic D, Rolovic Z, Cemerikic V, Boskovic D, Colovic M. Myelofibrosis in primary myelodysplastic syndromes: Clinical and biological significance. *Med Oncol*. 2004;21(4):325-331.
40. Lambertenghi-Delilieri G, Annaloro C, Oriani A, Soligo D. Myelodysplastic syndrome associated with bone marrow fibrosis. *Leuk Lymphoma*. 1992;8(1-2):51-55.
41. Fu B, Jaso JM, Sargent RL, et al. Bone marrow fibrosis in patients with primary myelodysplastic syndromes has prognostic value using current therapies and new risk stratification systems. *Mod Pathol*. 2014;27(5):681-689.

42. Niino D, Tsuchiya T, Tomonaga M, Miyazaki Y, Ohshima K. Clinicopathological features of acute megakaryoblastic leukaemia: Relationship between fibrosis and platelet-derived growth factor. *Pathol Int.* 2013;63(3):141-149.
43. Wanko SO, de Castro C. Hairy cell leukemia: An elusive but treatable disease. *Oncologist.* 2006;11(7):780-789.
44. Burger JA, Sivina M, Ravandi F. The microenvironment in hairy cell leukemia: Pathways and potential therapeutic targets. *Leuk Lymphoma.* 2011;52 Suppl 2:94-98.
45. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: Insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol.* 2014;24:71-81.
46. Kaplan RN, Psaila B, Lyden D. Bone marrow cells in the 'pre-metastatic niche': Within bone and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25(4):521-529.
47. Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F. Mechanisms of disease: Pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8(8):443-455.
48. Williams LT. Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor. *Science.* 1989;243(4898):1564-1570.
49. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Essential cell biology.* 4th ed. Garland Science; 2014.
50. Betsholtz C, Raines EW. Platelet-derived growth factor: A key regulator of connective tissue cells in embryogenesis and pathogenesis. *Kidney Int.* 1997;51(5):1361-1369.

51. Abdollahi A, Li M, Ping G, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. *J Exp Med*. 2005;201(6):925-935.
52. Nishioka Y, Azuma M, Kishi M, Aono Y. Targeting platelet-derived growth factor as a therapeutic approach in pulmonary fibrosis. *J Med Invest*. 2013;60(3-4):175-183.
53. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2014;370(22):2071-2082.
54. Ikura Y, Morimoto H, Ogami M, Jomura H, Ikeoka N, Sakurai M. Expression of platelet-derived growth factor and its receptor in livers of patients with chronic liver disease. *J Gastroenterol*. 1997;32(4):496-501.
55. Pinzani M, Milani S, Herbst H, et al. Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis. *Am J Pathol*. 1996;148(3):785-800.
56. Yoshiji H, Noguchi R, Kuriyama S, et al. Imatinib mesylate (STI-571) attenuates liver fibrosis development in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(5):G907-13.
57. Neef M, Ledermann M, Saegesser H, et al. Oral imatinib treatment reduces early fibrogenesis but does not prevent progression in the long term. *J Hepatol*. 2006;44(1):167-175.
58. Gay S, Jones RE, Jr, Huang GQ, Gay RE. Immunohistologic demonstration of platelet-derived growth factor (PDGF) and sis-oncogene expression in scleroderma. *J Invest Dermatol*. 1989;92(2):301-303.

59. Klareskog L, Gustafsson R, Scheynius A, Hallgren R. Increased expression of platelet-derived growth factor type B receptors in the skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1990;33(10):1534-1541.
60. Bournia VK, Evangelou K, Sfikakis PP. Therapeutic inhibition of tyrosine kinases in systemic sclerosis: A review of published experience on the first 108 patients treated with imatinib. *Semin Arthritis Rheum.* 2013;42(4):377-390.
61. Prey S, Ezzedine K, Doussau A, et al. Imatinib mesylate in scleroderma-associated diffuse skin fibrosis: A phase II multicentre randomized double-blinded controlled trial. *Br J Dermatol.* 2012;167(5):1138-1144.
62. Wang S, Wilkes MC, Leof EB, Hirschberg R. Imatinib mesylate blocks a non-smad TGF-beta pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. *FASEB J.* 2005;19(1):1-11.
63. Kimura A, Katoh O, Hyodo H, Kuramoto A, Satow Y. Platelet derived growth factor expression, myelofibrosis and chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma.* 1995;18(3-4):237-242.
64. Bock O, Loch G, Busche G, von Wasielewski R, Schlue J, Kreipe H. Aberrant expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor-alpha is associated with advanced bone marrow fibrosis in idiopathic myelofibrosis. *Haematologica.* 2005;90(1):133-134.
65. Bedekovics J, Kiss A, Beke L, Karolyi K, Mehes G. Identification of NPMc+ acute myeloid leukemia in bone marrow smears. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2013;21(1):73-78.

66. Szeghalmy Sz, Bedekovics J, Mehes G, Fazekas A. Digital measurement of myelofibrosis associated platelet derived growth factor receptor β (PDGFR β) expression in bone marrow biopsies. *CIT*. 2013;21(1):49-58.
67. Calabi L. A study of the skeleton of plane figures. Parke Mathematical Laboratories, Carlisle, Massachusetts. 1965.
68. Sonka M, Hlavac L, Boyle R. Image processing analysis and machine vision. 3rd ed. CL-Engineering; 2007.
69. Wilkins BS, Radia D, Woodley C, Farhi SE, Keohane C, Harrison CN. Resolution of bone marrow fibrosis in a patient receiving JAK1/JAK2 inhibitor treatment with ruxolitinib. *Haematologica*. 2013;98(12):1872-1876.
70. McLornan DP, Mead AJ, Jackson G, Harrison CN. Allogeneic stem cell transplantation for myelofibrosis in 2012. *Br J Haematol*. 2012;157(4):413-425.
71. Martyre MC. TGF-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of myelofibrosis in myeloproliferative disorders. *Leuk Lymphoma*. 1995;20(1-2):39-44.
72. Katoh O, Kimura A, Itoh T, Kuramoto A. Platelet derived growth factor messenger RNA is increased in bone marrow megakaryocytes in patients with myeloproliferative disorders. *Am J Hematol*. 1990;35(3):145-150.
73. Abboud SL. A bone marrow stromal cell line is a source and target for platelet-derived growth factor. *Blood*. 1993;81(10):2547-2553.

12 TÁRGYSZAVAK

Myelofibrosis, csontvelő, PDGFR, primer myelofibrosis, immunhisztokémia, digitális képanalízis.

KEYWORDS

Myelofibrosis, bone marrow, PDGFR, primary myelofibrosis, immunohistochemistry, digital image analysis

13 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetem fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Méhes Gábornak a hematopathologia területének megismerésében nyújtott segítségével, a PhD disszertáció és közlemények elkészítésében való támogatásért, a vizsgálatok tervezése és kivitelezése során nyújtott szakmai iránymutatásért, a kutatói munkához szükséges infrastruktúra biztosításáért, a szakmai konferenciákon való részvételi lehetőségekért.

Köszönet illeti a Pathológiai intézet vezető asszisztensét, Beke Líviát az immunhisztokémiai vizsgálatok beállításáért, fáradhatatlan munkájáért, valamint az immunhisztokémiai labor valamennyi dolgozóját is köszönet illeti, Szeőcs Juditot, Tóth Mónikát, Kovács Jánosnét, akik lehetővé tették a szövettani minták feldolgozását. Külön köszönöm Rigó Gyulánának a metszetek rendszerezésében és festésében nyújtott segítségét.

Köszönöm a Belgyógyászati Intézet munkatársainak a tudományos munkában nyújtott aktív részvételét. Külön köszönet illeti Kiss Attila Professzor Urat figyelmességéért és

szakmai támogatásáért. Szintén köszönetet mondok a Belgyógyászati Intézet asszisztenseinek, Baráthné Évának és Kiss Zsuzsannának segítségükért.

Köszönöm az Informatikai Kar munkatársainak Szeghalmy Szilviának és Dr. Fazekas Attilának a digitális képanalízis kidolgozásában aktív részvételüket, fáradhatatlan munkájukat.

Köszöneti illeti munkatársaimat, akik szakmai távollétek során feladataim ellátásában segítettek, külön köszönöm Dr. Irsai Gábornak és Dr. Hendrik Zoltánnak segítségüket.

Köszönöm családomnak és páromnak, Feksz Gergelynek a PhD munka során nyújtott támogatást és türelmet.

14 TÁMOGATÁSOK

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt által nyújtott személyi támogatással valósul meg. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. A kutatás infrastruktúrája a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 sz. „Vaszkuláris és kardiális kutatóhálózat: Az ér- és a kardiovaszkuláris betegségek patomechanizmusai, diagnosztikái, farmakológiai befolyásolhatóságuk az alapkutatás szintjén” című pályázat által biztosított forrásból valósul meg.



Iktatószám: DEENKÉTK/169/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Bedekovics Judit
Neptun kód: DA081R
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10036513

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bedekovics, J., Szeghalmy, S., Beke, L., Fazekas, A., Méhes, G.:** Image analysis of platelet derived growth factor receptor-beta (PDGFR β) expression to determine the grade and dynamics of myelofibrosis in bone marrow biopsy samples.
Cytom. Part B-Clin. Cytom. 86 (4), 31 p., 2014.
IF:2.231 (2012)
2. **Bedekovics, J., Kiss, A., Beke, L., Károlyi, K., Méhes, G.:** Platelet derived growth factor receptor-beta (PDGFR β) expression is limited to activated stromal cells in the bone marrow and shows a strong correlation with the grade of myelofibrosis.
Virchows Arch. 463 (1), 57-65, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-013-1434-0>
IF:2.676 (2012)

További Közlemények

3. **Bedekovics J., Méhes G.:** A csontvelőfibrosis patomechanizmusa és előfordulása neoplasticus kórképekben.
Orvosi Hetilap. 155 (10), 367-375, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2014.29823>





DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



4. Selmeczi A., Udvardy M., Illés Á., Telek B., Kiss A., Batár P., Reményi G., Szász R., Ujj Z., Márton A., Ujfalusi A., Hevessy Z., Pinczés L., Bedekovics J., Rejtő L.: Heveny myeloid leukaemiás betegek kezelésével szerzett tapasztalataink (2007-2013).
Orv. Hetil. 155 (17), 653-658, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2014.29884>
5. Bedekovics, J., Rejtő, L., Telek, B., Kiss, A., Hevessy, Z., Ujfalusi, A., Méhes, G.: Identification of NPMc+ Acute Myeloid Leukemia in Bone Marrow Smears.
Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 21 (1), 73-78, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/PAI.0b013e318256da37>
IF:1.828 (2012)
6. Szeghalmy, S., Bedekovics, J., Méhes, G., Fazekas, A.: Digital Measurement of Myelofibrosis Associated Platelet Derived Growth Factor Receptor β (PDGFR β) Expression in Bone Marrow Biopsies.
J. Comput. Inf. Sci. Eng. 1, 47-56, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2498/cit.1002109>
IF:0.488 (2012)
7. Bedekovics J., Hevessy Z., Kappelmayer J., Kiss C., Csáthy L.: Sejtfelszíni antigének expressziójának változása a gyermekkori akut lymphoblastos leukaemia kezelése alatt-négyszínű MRD-detektálással szerzett tapasztalataink.
Hematológia-Transzfuziológia. 43 (3), 215-224, 2010.
8. Bedekovics J., Rejtő L., Telek B., Udvardy M., Ujfalusi A., Oláh É., Hevessy Z., Kappelmayer J., Kajtár B., Méhes G.: Mutáns nucleophosmin fehérje kimutatása akut myeloid leukaemiában: Az NPMc+ AML biológiai és klinikai jellemzői.
Orv. Hetil. 150 (22), 1031-1035, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2009.28623>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 7.223

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 4.907

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

Debrecen, 2014.07.11.

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ☎ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. ☎ Tel.: (52) 518-600
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu ☎ Honlap: lib.unideb.hu