

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Dr. Karászi Éva

Témavezető:

Dr. Kappelmayer János

egyetemi docens

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

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Bevezetés	3
Célkitűzések.....	15
Módszerek.....	16
Eredmények	25
Megbeszélés.....	46
Köszönetnyilvánítás	57
Rövidítések jegyzéke	59
A tézisekben előforduló hivatkozások jegyzéke.....	60
A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke.....	79
A tézisekben fel nem használt egyéb tudományos munkák jegyzéke.....	80
Függelék – a tézisek alapjául szolgáló közlemények.....	81

BEVEZETÉS

A malignus hematológiai betegségek gyógyulási esélyének javításában, a terápia sikerességének növelésében lényeges szerepet játszik a pontos diagnózis felállítása, a leukémia típusának korrekt meghatározása. A kezelés várható kimenetelének előrejelzését szolgálja a különböző prognosztikai faktorok detektálása már a betegség kezdetén, melyek ismerete a kemoterápiás kezelést is befolyásolhatja. Mindehhez a tumoros sejtek minél sokoldalúbb karakterizálása, ún. multiparametrikus analízise szükséges, melynek során egyszerre több adatot nyerhetünk a sejtek strukturális és funkcionális jellemzőiről. Az immunfenotípus vizsgálatok a sejtvonal és a sejt érettségi állapotának pontos megállapítása mellett információt nyújtanak a tumoros sejtek arányáról, a kóros marker expressziókról és a malignus sejtcsoporton belül az esetleges szubpopulációkról.

A leukémiás sejtek komplex immunológiai és genetikai jellemzése nem csak a diagnózis felállításában és a prognózis előrejelzésében fontos, hanem követéses vizsgálatok formájában a betegség lefolyása során igen nagy szerepük van a remisszió detektálásában, a minimális reziduális betegség (MRD) kimutatásában és a relapszusok korai felismerésében is. A malignus hematológiai kórképek diagnosztikájában és az MRD immunológiai

kimutatásában ma a direkt jelölt monoklonális antitestekkel végzett áramlási citometriai analízis jelenti a legobjektívebb és legtöbb információt hordozó vizsgálati módszert.

A markervizsgálatok diagnosztikai jelentősége

A sejtfelszíni és intracitoplazmatikus markerként ismert fehérjék zöme relatíve nagy kópiaszámban számban mutatható ki normál és leukémiás sejteken egyaránt. Akut leukémiás minták esetén, a kóros sejtvonal ("lineage") legmegbízhatóbb meghatározására azonban az intracitoplazmatikus antigének szolgálnak, melyek általában már a felszíni markerek megjelenése előtt kimutathatóak (1,2). Az intracelluláris markerek meghatározásához a sejteket permeabilizálni kell, mely jelentősen befolyásolhatja a vizsgálat szenzitivitását és specificitását is (3,4) ezért külön figyelmet igényel a minta előkészítés technikai oldala, azaz a megfelelő permeabilizáló és fixáló szer használata. A myeloid, a T és B lymphoid vonalak elkülönítésére leginkább a mieloperoxidáz (MPO), cyCD3 és cyCD79a használható (5-8). Ezen antigének ellen több antitest klón áll rendelkezésre, melyek specificitása és szenzitivitása eltérő. Emellett az alkalmazott fluoreszcens festékek is befolyásolják a detektálás szenzitivitását. Ezért a permeabilizáló szer megválasztása mellett nem

lényegtelen az alkalmazott antitest klónok ill. a különböző fluorofórok kombinációjának vizsgálata a sejtvonal megbízható azonosításának céljából. Bár az áramlási citometriai vizsgálatokkal a malignitás az esetek többségében jól besorolható a jelenleg ismert markerek segítségével, fontos olyan új markerek keresése, melyek az egyes altípusok elkülönítését biztonságosabbá teszik. Különösen acut myeloid leukémiák (AML) esetén jelenthet nehézséget egyes esetekben a FAB típus szerinti klasszifikáció az immunfenotípus vizsgálatok alapján. A *de novo* esetek diagnosztikai marker vizsgálata során a hármas vagy négyes jelölésű áramlási citometriai analízis alkalmazásával lehet megfelelő módon karakterizálni a sejteket, illetve ez biztosítja reziduális betegség esetén a kóros sejtek szenzitív - és ma elfogadott - kimutatási lehetőségét is (9,10). A széles körben használt hármas jelölés esetén az iránydiagnózis alapján választott panelek az irányadóak, az ezeken kívül alkalmazandó egyéb intracitoplazmatikus és felszíni markerek kombinációját az adott eset anamnesztikus, klinikai vagy laboratóriumi specifikumai befolyásolhatják. A többes markerkombinációk alkalmazásán kívül, illetve ezzel egyidejűleg, egy másik diagnosztikai megközelítés az olyan markerek alkalmazása, melyek különböző intenzitással jelennek meg normál illetve malignus sejteken. A jelölési intenzitás különbsége megadható a hagyományos "dim/bright" elnevezéssel,

(a dim jelzés a gyenge jelölődésre utal, míg a bright elnevezést az intenzív jelölődésre használjuk) vagy az egzakt antigénszám/sejt kvantitatív meghatározásával, melyet bead-ekkel történő kalibráció alapján végzünk. Az irodalomban már több marker esetén igazoltak kvantitatív eltéréseket normál és leukémiás sejtek közt (11-13). Az eltérő sejtfelszíni denzitást mutató fehérjék közt különös fontosak azok, melyek a malignus sejtek funkciója pl. adhézió, aggregáció, transzendotheliális migráció szempontjából jelentőséggel bírnak, mint pl. az integrinek vagy szelektin ligandok (14-16).

Multidrog rezisztencia mechanizmusok: membrán transzporterek

A membrán fehérjék egy része esetén a fenti immunológiai kimutatás nem mindig célravezető, egyrészt mert azok vagy rendkívül alacsony kópiaszámban vannak jelen, vagy nem rendelkezünk a megfelelő antitesttel az extracelluláris doménnel szemben, illetve legfőképpen azért mert a fehérje jelenléténél sokkal fontosabb annak funkcionális aktivitása. Ide tartoznak bizonyos membrán transzporterek, melyek számos molekulát távolítanak el a sejtől aktív pumpafunkcióval (17). A sejtől nagy sebességgel eltávolított anyagok közé tartozik a malignus hematológiai kórképek kezelésében alkalmazott citosztatikumok egy része is, miáltal a sejt – illetve a beteg - egyidejűleg több citosztatikummal szemben

rezisztensé válik (multi-drog rezisztencia jelenség - MDR) (18,19). Az elnevezés abból adódik, hogy szemben a szervezet egyéb specifikus transzport folyamataival - ahol a szubsztrátok köre általában jól meghatározott kémiai szerkezetű vegyületre korlátozódik, - ezek a fehérjék számos eltérő szerkezetű molekulát képesek pumpa mechanizmusuk révén a sejtől eltávolítani, azaz az általuk okozott drog rezisztencia több különböző citosztatikum csoportot érint. A marker vizsgálatok diagnosztikus szerepével szemben ennek detektálása elsősorban terápiás és prognosztikai szempontból fontos.

A citosztatikumok hatástalanságához számos tényező vezethet. Ez lehet magának a tumornak ill. tumor sejteknek a jellegzetessége, vagy adódhat a szervezet sajátosságaiából. Utóbbihoz leginkább farmakokinetikai eltérések tartoznak, mint a gyógyszer nem megfelelő aktiválódása (pl. pro-drog esetén), gyors metabolizmusa vagy ha a tumor lokalizációja ill. keringése nem teszi lehetővé a gyógyszer eljutását a malignus sejtekhez. A citosztatikum rezisztencia vizsgálatánál azonban elsősorban maguknak a tumor sejteknek a tulajdonságait és védelmi rendszereit tudjuk in vitro módszerekkel vizsgálni.

Hematológiai kórképekben és szolid tumorok esetén is az egyik legjelentősebbnek tartott tényező az ún. membrán transzporterek jelenléte,

melyek a citosztatikumokat még hatásuk kifejtése előtt eltávolítják a sejtől, így nem teszik lehetővé a kemoterápiás szer olyan intracelluláris koncentrációjának elérését, mely a malignus sejt elpusztításához szükséges.

A fenti membrán fehérjék az ABC transzporterek (20,21) nagy csoportjába tartoznak (ABC=ATP binding cassette), ide tartozik a P-glikoprotein (Pgp), az MRP család fehérjéi (multidrug resistance related protein) és az újabban leírt BCRP (breast cancer related protein). Valamennyi fehérjének közös sajátossága, hogy az intracelluláris régióban található nukleotid kötő régió (NBD=nuclear binding domain) képes ATP molekulát megkötni és ATP hidrolízise mellett biztosítja a különböző molekulák transzportját. Ezen ABC transzporterek prognosztikai szerepe, a terápiát kedvezőtlenül befolyásoló hatása ma már bizonyítottnak tekinthető (22-24).

A fő membrán transzporterek jellemzése

a. P-glikoprotein

A fehérjét a 7. kromoszómán elhelyezkedő MDR1 gén kódolja. 1280 aminosavból áll, molekula súlya 170 kD, ezért P-170-nek is nevezik. Két homológ doménból álló dimer, melynek mindkét doménja 6 transzmembrán szegmentet tartalmaz és mindkét doménban intracellulárisan helyezkedik el a nukleotid kötő régió (25, 26). Emlősökben egy gén kódolja a két domént és a két nukleotid kötő régiót. A külső felszínen az első és második

transzmembrán szegmentek között található glikozilációs hely, ahol N-hez kapcsolódva kötődik a szénhidrát csoport. Emberben a multi-drog rezisztenciát okozó MDR1 gén által kódolt fehérje mellett létezik egy MDR3 gén által kódolt protein is, melynek a gyógyszer rezisztenciában nincs szerepe. Ez a protein működését tekintve egy flippáz, (foszfatidil-kolin transzlokáz), mely foszfolipidek epébe való transzportját biztosítja (27).

A P-glikoprotein transzport működése nem minden részletében ismert, számos bizonyíték szól amellett, hogy a Pgp-hez közvetlenül kötődnek a gyógyszermolekulák (szubsztrátok) és az ún. revertáló ágensek (modulátorok) is, utóbbiak a gyógyszermolekulák transzportját gátolják és ezáltal a kemoterápiával együtt adva növelik annak hatékonyságát (28-30).

A szubsztrátok ill. modulátorok kötődése a Pgp szerkezetében konformáció változást okoz. A molekulák eltávolítása korábbi elméletek szerint a transzmembrán domének által létrehozott csatornán keresztül történik, újabb elképzelések alapján a flippáz ill. „vacuum cleaner” modell írja le pontosabban a transzporter működését (31,32): eszerint a szubsztrátok még a membrán lipid rétegéből kipumpálódnak, mielőtt a citoplazmát elérnének.

Klinikai szempontból fontos, hogy a leukémia kezelésében használt szerek egy része a Pgp szubsztrátja, így jelenléte a terápia hatástalanságát okozhatja a vinka-alkaloidok (vinkrisztin, vinblasztin), antraciklinek (daunorubicin,

doxorubicin), epipodofillotoxinok (etopozid, tenopozid) esetén. Ezért a Pgp fokozott expressziója az AML klinikai kimenetelét kedvezőtlenül befolyásolja (33-35). Ugyancsak lényeges, hogy a fehérje szubsztrátjai közé tartozik a ciklosporin, szteroidok és Ca csatorna blokkolók (verapamil) is.

A fehérje mRNS-ének kimutatásával és immunoblottinggal a Pgp fiziológiásan számos szövetben detektálható. A transzport funkciónak megfelelően a gastrointestinalis rendszerben, májban, epeutakban, vesében, mellékvesében, placentában és a vér-agy gát területén mutatható ki (36,37).

Szerepe van a felszívódásban, kiválasztásban, szekréción ill. barrierék fenntartásában. Fontos megemlíteni, hogy a Pgp detektálható a hemopoetikus sejtekben is (38,39), mégpedig kifejezett Pgp aktivitás mutatható ki az éretlen, CD34+ őssejtekben, majd a sejtek érésével párhuzamosan csökken a Pgp expresszió és aktivitás.

b. "Multidrug resistance related"fehérjék (MRP1-6)

Ebbe a családba tartozó fehérjék főként organikus anionok transzportjáért felelősek, azaz egyes gyógyszerek glutation, szulfát és glükuronát konjugátumait távolítják el a sejtekből, de emellett a metotrexát transzportjában is részt vesznek. A Pgp-hez hasonlóan szerepük van a vinka-alkaloidokkal, antraciklinekkel és az etopoziddal szemben kialakuló rezisztenciában is (40-42). Az MRP1 a Pgp-hez képest az N terminális

részen egy extra domént tartalmaz, mely 5 transzmembrán szegmentből áll. A fehérje a szervezet számos szervében előfordul. Fiziológiás szempontból fontos, hogy leukotrién 4 transzportját biztosítja (43), melynek a gyulladásos immunválaszban van szerepe. Knock-out egerekben csökkent immunválasz és sterilitás észlelhető. AML-ben negatív prognosztikai faktornak tekinthető: jelenléte bizonyítottan kedvezőtlenül befolyásolja a terápiás választ (44-47). Az MRP2 az MRP1-hez hasonló szubsztrát spektrummal rendelkező transzporter. Fiziológiásan a májban, epeutakban, bélben és vesében fordul elő. Mivel a bilirubin-glükuronidok fő transzportere, hiánya esetén az epeszekréció károsodása, Dubin-Johnson szindróma alakul ki (48). Mindkét transzporter esetén fontos megjegyezni, hogy működésükhöz a redukált glutation (GSH) jelenléte szükséges, feltehetően a gyógyszermolekulák és a GSH kotranszportja miatt.

c. "Breast cancer related protein" (BCRP)

E fehérje szintén membrán transzporter, mely az előbbiektől eltérően egy homodimer, azaz fél-transzporternek is nevezett fehérje. Eddigi vizsgálatok alapján a proteint expresszáló sejtvonalakban mitoxantron, daunorubicin, doxorubicin és topotecan rezisztencia volt igazolható (49,50). Ehhez hasonló eredményeket adtak transzfektált Sf9 sejtekkel végzett, az ATP-áz aktivitás stimulációját mérő kísérletek is. A BCRP ATP-áz aktivitását a Na-

ortovanadát és az N-etilmaleimid gátolta, a verapamilnak nem volt hatása az ATP-áz aktivitásra (51). In vitro tesztekben használt fluoreszcens festékek közül a rodamin 123 a fehérje szubsztrátjának bizonyult, míg a kalcein-acetoximetilészter (kalcein-AM) és kalcein molekulák transzportjában fehérje nem játszik szerepet (52).

Immunoblottinggal ill. mRNS detektálásával kapott eredmények alapján a transzporter a vékony-és vastagbélben, a májban az epe canaliculusokban, az emlő lebenyeiben és ductusaiban, valamint a placentában mutatható ki fiziológiásan, ahol a Pgp-hez hasonlóan különböző anyagok transzportjában van szerepe (53). Malignitásokban főként AML-ben, NHL-ben írták le multi-drog rezisztenciát okozó jelentőségét, de ezek az eredmények még megerősítésre várnak.

Multidrog rezisztencia detektálására alkalmazható módszerek

Az MDR kimutatására több módszer alkalmas, melyek eredményei azonban nem ritkán eltérő információt hordozhatnak, illetve klinikai laboratóriumi körülmények között kivitelezhetőségük is jelentősen különbözik (54).

a. A fehérjék mRNS-ének kimutatása RT-PCR-ral (24,55). A módszer hátránya, hogy az RNS mennyiség nem feltétlenül mutat korrelációt a fehérje jelenlétével és működésével az esetleges transzlációs szintű szabályozó mechanizmusok miatt, valamint nem különíthető el a normál és

tumoros sejtekből származó mRNS. Az eredmények kvantitatív értékelése is nehézkes, általában csak pozitív és negatív eredmények adhatók meg.

b. a fehérjék kimutatása monoklonális antitestekkel áramlási citometriás módszerrel vagy immuncitokémiai módszerekkel az MDR meghatározásnak egy gyakran választott módja (56-58). Ebben az esetben az eredmények értékelése jelenthet problémát: egyes szerzők a pozitív sejtek százalékos arányát adják meg, mások a fluoreszcencia intenzitás izotípus kontrollhoz viszonyított rátáját használják. Fontos a megfelelő antitest használata, Pgp esetén célszerűbb külső epitóphoz kötődő antitestet választani, míg MRP1 esetén ilyen klónok nem állnak rendelkezésre, így szükséges a sejtek permeabilizálása. A fehérje mennyiségének pontos kvantitálásához beadek használhatók, melyekkel kalibrációs görbe alapján a sejt felszíni molekula szám kalkulálható. A Pgp detektálására leggyakrabban használt antitest klónok az MRK-16, 4E3, UIC2, C219, JSB-1, míg az MRP1 kimutatására az MRPm6, MRPm5 és MRPr1 klónok alkalmazhatók. Érdeemes megjegyezni, hogy az UIC2 antitest reaktivitását a szubsztrátok ill. modulátorok okozta konformáció változás növeli (UIC2 shift) ill. hogy az UIC2 antitest kötődése gátolja a Pgp aktivitását (59,60).

c. A fehérjék tényleges működésével, így a várható klinikai kimenetellel az ún. funkcionális tesztek korrelálnak leginkább, ezek ugyanis a fehérjék által

kifejtett transzport aktivitást mérik. Ezekben a tesztekben fluoreszcens szubsztrátokat használunk és vagy az effluxot, és így az intra-és extracelluláris tér között megoszló fluoreszcenciát detektáljuk a disztribúciós típusú assayk-ben, vagy az ún. akkumulációs típusú tesztekben az intracellulárisan felhalmozódó fluoreszcenciát mérjük. Az Pgp/MRP1 szubsztrát fluoreszcens festékek közül leginkább a rodamin-123, daunorubicin, kalcein-AM, JC-1, DiOC2, Hoechst használatosak (61-65). Inhibitoroként verapamil, ciklosporin, kinidin, és PSC 833 alkalmazható in vitro.

d. az ún. "cell survival assay"-vel in vitro vizsgálható a sejtek túlélése különböző citosztatikumok jelenlétében. A teszt előnye, hogy pontos információt nyújt az egyes kemoterápiás szerek hatásáról, hátránya időigényessége.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A diagnosztikai (immunfenotípus) vizsgálatok terén:

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

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

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

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtpermeabilizálási eljárások és jelölések

Kereskedelmi forgalomban is elérhető hat permeabilizálásra használt kit összehasonlítását végeztük el 21 normál és akut leukémiás minta analízisével két centrum Áramlási Citometriai Részlegén (DEOEC, KBMPI és Salamancái Egyetem). A minták megoszlása az alábbi volt: 4 normál perifériás vérminta, 3 normál csontvelő, 6 AML minta, 6 precursor-B ALL, valamint 2 T-ALL. (A leukémiás minták között csontvelő és perifériás vér is volt). A vizsgálatokat minden esetben a diagnózis felállításakor, a kezelés megkezdése előtt végeztük el. Összehasonlításként minden betegnél párhuzamos vizsgálatok történtek permeabilizált és nem permeabilizált mintákból.

A permeabilizálás kivitelezésére számos kit van forgalomban, melyek lényege, hogy a permeabilizáló szer a sejtmembrán átjárhatóságát növeli, majd ezt követően a sejtekhez adott monoklonális antitest az intracelluláris fehérjékhez kötődik. A minta előkészítés során általában első lépésben történik a sejtek fixálása, ezt követi a permeabilizálás, bár egyes kitekben a két lépés egyidejűleg zajlik. A kitekben fixálóként leginkább paraformaldehidet, permeabilizáló szerként pedig szaponin alapú

vegyületeket használnak. A procedurát minden esetben a gyártó előírásainak megfelelően végeztük el, ennek során a Cytifix/Cytoperm (Pharmingen), Fix and Perm (Caltag Laboratories), Intraprep (Immunotech), Intrastain (DAKO), Permeacyte (Bio-E) és a Permeafix (Ortho) kiteket hasonlítottuk össze.

Emellett vizsgáltuk a három legfontosabb intracelluláris marker ellen termelt antitest klónok és különböző fluoreszcens konjugátumaik (FITC, PE) kombinációját. Az alkalmazott klónok: MPO-7, CBL-MPO-1 és H-43-5 MPO esetén, UCTH-1, Hit3a és S4.1 cyCD3 esetén, míg a cyCD79a detektálására a különböző fluorofórokkal jelölt HM57 klónt használtuk.

Minden esetben direkt immunfluoreszcens technikát alkalmaztunk, vagyis a gyártó által FITC-el vagy PE-el jelölt antitestet használtuk. A pozitív és negatív sejtek elkülönítésére autofluoreszcens minta vagy izotípus kontroll segítségével történt. Leukémiás minták esetén a malignus sejtek szelektív analízise miatt felszíni CD45 jelölést végeztünk a permeabilizálás előtt, és a CD45 dim populáció sajátosságait vizsgáltuk. A mérések FACScan és FACScalibur flow cytométereken történtek. A készülékek beállításához és a kalibrációhoz a standard előírások szerinti protokollokat alkalmaztuk. A méréseknél 10 000 sejt adatait gyűjtöttük be list mode file-okban. Az eredményeket minden kombináció esetén a pozitív sejtek százalékos

arányában ill. átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) formájában adtuk meg. Statisztikai analízis során a szignifikancia szintek meghatározásához Wilcoxon és Kruskal –Wallis tesztekkel használtuk.

PSGL-1 kvantitatív meghatározás

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

A vizsgálatokat egészséges és akut myeloid leukémiás betegek mintáin végeztük el a következő megoszlás szerint: 20 perifériás vér és 5 csontvelő egészséges egyénből, 15 perifériás vér és 5 csontvelő AML-es betegekből (M1, M2, M4, M5). A PSGL-1 expresszió kvantitatív meghatározásához a QIFI kítet (DAKO) használtuk az alábbiak szerint: $4-5 \times 10^5$ sejtet $10 \mu\text{g/ml}$ végkoncentrációjú PL-1 antitesttel inkubáltunk 60 percig 4°C -on. A sejteket PBS-ben kétszer mostuk, majd $50 \mu\text{l}$ 50-szeresére hígított FITC-el jelölt második (egér ellenes) antitestben (DAKO) reszuszpendáltuk és 45 percig 4°C -on inkubáltuk. A vvt-eket Facs Lysing oldatban (Becton Dickinson)

lizáltuk, majd a sejteket 1% PFA-ban fixáltuk. A mérést FACScan áramlási citométeren konstans detektor feszültségértékek mellett végeztük el. A PSGL-1 expressziót az FL-1 (FITC) csatornán mért MFI érték alapján kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg, az eredményeket antitest kötő képesség (antibody binding capacity, ABC) formájában adtuk meg. A kalibrációs görbe felvételéhez ismert mennyiségű antitesttel fedett és azonos második antitesttel jelölt beadeket használtunk. A kitben az MFI értékek és a sejtfelszíni molekulaszám, azaz az ABC értéke a 3 800-550 000/sejt tartományban lineáris.

A blastok kiválasztásához leukémiás mintákban a CD45 dim blast populáció sejtjeit jelenítettük meg a forward scatter (FSC) – side scatter (SSC) felhőképen (dot ploton) és ezek CD162 expresszióját vizsgáltuk, míg normál minták esetén a CD33/CD34 koexpressziót mutató blastok szelektív analízisét végeztük el. Statisztikai analízisekben a Mann-Whitney U tesztet használtuk.

Kalcein teszt

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

intracelluláris észterázok hasítása következtében kalcein keletkezik, mely fluoreszkáló, hidrofil molekula, és nem szubsztrátja a Pgp-nek, (az MRP1 pedig csak igen lassan képes a kipumpálására). A tesztben a fehérje blokkolására ún. revertáló ágens, modulátor használható, mely ebben a tesztben verapamil (Vp) (68,69). Ez mind a Pgp mind az MRP1 aktivitását gátolja (70-72). Az intracelluláris fluoreszcencia intenzitást a revertáló ágens jelenlétében (Vp+) és hiányában (Vp-) detektálva a Pgp/MRP1 aktivitás mértékére következtethetünk, ahol kvantitatív eredményt a fluoreszcencia intenzitások különbségéből kaphatunk a $[FI(Vp+) - FI(Vp-)]/FI(Vp+) \times 100$ képlet alapján. A kapott eredmény a multi-drog rezisztencia aktivitás faktor (MAF), melyet 3-3 párhuzamos mérés fluoreszcencia intenzitás értékeinek átlagából számoltunk. Értéke a Pgp és az MRP1 együttes aktivitását méri, és az eredmény jól korrelál a Pgp/MRP1 szubsztrát citosztatikumok kipumpálásának mértékével.

A teszthez a mononukleáris sejteket Ficollon szeparáltuk, majd 1 ml Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) oldatban reszuszpendáltuk. Ezt követően a sejteket verapamillal (75 μ M) ill. anélkül inkubáltuk 37°C-on 5 percig, majd a sejteket kalcein-AM-el töltöttük fel 200 μ M végkoncentrációban (10 perc, 37°C). A inkubációs idő alatt a transzportereket expresszáló sejtekben revertáló ágens hiányában megtörténik a kalcein-AM kipumpálása. A

reakciót centrifugálással állítottuk le, majd a sejtek életképességének vizsgálatára propidium-jodidot (PI) adtunk a sejtszuszpenzióhoz (0,01 mg/ml végkoncentráció). A mérést maximum 24 óra 4°C-on történő tárolás után végeztük el Becton Dickinson FACSCalibur ill. FACScan áramlási citométereken.

A kalcein teszt reagenseinek stabilitás vizsgálata

A verapamil törzsoldat (8mM, HBSS-ben oldva) és a kalcein törzsoldat (100µM, DMSO-ban oldva) 4°C-on és -20°C-on történő 1 éves eltarthatóságát vizsgáltuk, ehhez méréseket végeztünk a 0., 1., 3., 6., és 12. hónapokban. A kalcein-AM oldat esetén Perkin Elmer spektrofotofluoriméterrel a kalcein fluoreszcenciáját detektáltuk az esetleges hidrolízis megállapítására. A verapamil oldat stabilitásának vizsgálatához MDR pozitív KBV-1 sejtvonalakon végeztünk méréseket. A sejteket DMEM mediumban 5% CO₂ mellett 37°C-on tenyésztettük, az MDR pozitív sejtvonalt fenntartását 0,2 µg/ml Vinblastin hozzáadásával biztosítottuk.

A minták eltarthatóságának vizsgálata

A teszt alkalmazásának fontos eleme a preanalitikai hibák csökkentése. Ennek különös jelentősége van funkcionális tesztek esetében, mert fontos, hogy nem fixált, élő sejtekkel dolgozzunk, és biztosítsuk a transzportfunkcióhoz szükséges ATP ellátást. Ezek érdekében

megvizsgáltuk a minták optimális tárolhatóságát szobahőmérsékleten és 4°C-on, teljes csontvelő és Ficollon szeparált kalceinnel feltöltött sejt szuszpenzió esetében. A minta előkészítést ill. a mérést a fentiek szerint végeztük el a 0., 6., és 24. órában.

Kalcein teszt kombinálása felszíni marker jelöléssel

Kísérleteinkben a CD45 panleukocytá markert alkalmaztuk, mely az éretlen sejteken alacsony intenzitással expresszálódik, így a CD45 dim populáció szelektív analízisével a tumoros sejtek MAF értéke kalkulálható. A minta előkészítés lépései röviden: a sejtek kalceinnel való inkubálása után a mikrocentrifugálást követően a sejteket PI-ot nem tartalmazó 50 µL HBSS oldatban reszuszpendáltuk, melyhez 10 µM végkoncentrációban adtuk a PerCP vagy PECy5 festékekkel jelölt anti-CD45 antitestet ill. az azonos jelölésű izotípus kontrollt. 20 perces szobahőmérsékleten történő inkubálás után a sejteket mostuk, majd HBSS-ben reszuszpendáltuk és 24 órán belül áramlási citométeren lemértük.

Pgp molekulaszám meghatározása

Kísérleteinkben kvantitatíve meghatároztuk a felszíni molekulaszámot, a kalibrációhoz fix mennyiségű antitestet tartalmazó bead-eket használtunk és az eredményeket antitest kötő képesség formájában adtuk meg (ABC: antibody binding capacity, QIFI Kit, DAKO). Az így kapott sejtfelszíni

molekula számot összevetettük a MAF értékével. A méréseket sejtvonalakon és klinikai mintákon kiviteleztük, indirekt immunfluoreszcens teszt formájában. Röviden, $4-5 \times 10^4$ sejtet jelöletlen MRK16 antitesttel inkubáltunk $10 \mu\text{g/ml}$ végkoncentrációban 30 percig 37°C -on. A sejteket PBS-ben mostuk kétszer, majd 50 x hígítású FITC konjugált egér ellenes IgG antitesttel (DAKO) inkubáltuk a sejteket 45 percig 4°C -on. Még egy mosási lépést és a vörösvértestek lízisét követően a sejteket 1% paraformaldehidben fixáltuk. A mérést 24 órán belül elvégeztük BD FACSCALibur áramlási citométeren. Minden mérésnél a fluoreszcens kalibrációs beadek szimultán futtatása is megtörtént konstans FL-1 beállítás mellett, majd ezek alapján a sejtenkénti ABC kalkulálható volt, mely 1-1 arányú antigén-antitest kötődés esetén a felszíni molekulaszám meghatározására alkalmas.

Betegek és a kemoterápiás kezelés

A DEOEC II. Belklinika és az Országos Hematológiai és Immunológiai Intézet beteganyagából 93 de novo leukémiás beteg mintájának analízisét végeztük el. A betegek megoszlása diagnózis szerint 65 AML és 28 ALL volt. Az AML csoporton belül a FAB típus osztályozás alapján 9 M1, 11 M2, 6 M3, 25 M4, 7 M5, 1 M6, 3 M7 szubtípus és 3 bifenotípusos leukémia szerepelt. A diagnózis felállításához a morfológiai jegyek mellett minden

esetben immunfenotípus vizsgálatokat végeztünk. Emellett egyéb prognosztikai faktorok (életkor, fvs szám, CD34+ sejtek aránya, LDH) együttes feldolgozása is megtörtént. Az AML csoportban a betegek átlag életkora 50.5 év volt, 40 férfi és 25 nő részvételével.

A betegek remissziós indukciós kezelése 7+3 protokoll alapján történt, melyben Ara-C $200\text{mg}/\text{m}^2$ 7 napig majd antraciklinek (adriamicin $45\text{mg}/\text{m}^2$ vagy daunoblasztin $60\text{ mg}/\text{m}^2$ és idarubicin $12\text{ mg}/\text{m}^2$) 3 napig történő adása szerepelt. Ez M4/M5 leukémiák esetében kiegészült $100\text{ mg}/\text{m}^2$ etopozid 4 napos hozzáadásával. A betegek kezelése egy vagy két ciklusból állt, majd a csontvelő értékelésére a 4. héten került sor. Az irodalomban és a szakmai gyakorlatban elfogadott elvek szerint a csontvelői blastok 5% alatti arányát minősítettük komplett remissziónak.

A szignifikancia szintek meghatározásához a Student féle t-tesztet használtuk, a különböző prognosztikai faktorok szerepének multiparametrikus elemzésére Cox féle regressziót alkalmaztunk, míg a Kaplan-Mayer görbe elemzéséhez a log rank tesztet végeztük el.

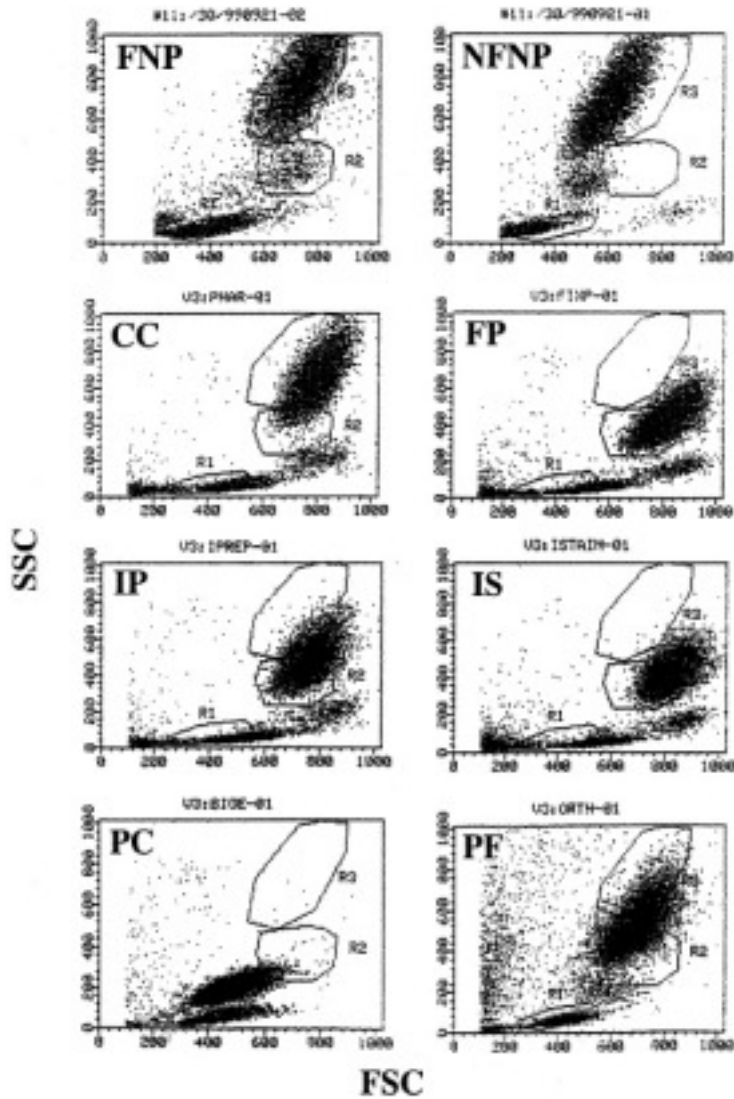
EREDMÉNYEK

Permeabilizálási technikák összehasonlító elemzése

1. Fényszórási tulajdonságok és az autofluoreszcencia változása

A permeabilizálás következtében gyakorlatilag minden permeabilizáló szer használata esetén változnak a sejtek fényszórási jellegzetességei, melyek az FSC-SSC dot plot képeken a nem permeabilizált minta képéhez viszonyítva szembetűnőek (1. ábra). Ez utóbbi, kontrollként használt normál perifériás vérminta esetében csak a vörösvértestek lizálása és a sejtek 1% PFA-ban való fixálása történt meg. Az egyes sejtípusokban az FSC csatornaszámok átlagértékét és szórását számszerűen is ábrázoltuk. Ezek alapján a legjobb eredményeket a Cytofix/Cytoperm és Permeafix reagensekkel kaptuk, míg a Permeacyte reagenssel a sejtek fényszórási tulajdonságai olymértékben megváltoztak, hogy a sejtpopulációk megbízható elkülönítése nem volt lehetséges, ezért ezzel a reagenssel további vizsgálatokat nem végeztünk. Megjegyzendő, hogy a sejtípusok adatait összegezve valamennyi permeabilizáló szer esetén szignifikáns különbséget kaptunk az FSC érték emelkedésében a nem permeabilizált mintához viszonyítva, mely a perifériás vér lymphocytái és a csontvelői lymphoid elemek esetén volt a legkifejezettebb. A sejtek autofluoreszcenciája (MFI érték) a permeabilizálás

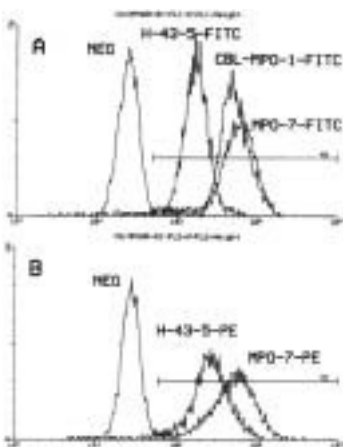
következtében minden esetben növekedést mutatott mind az FL-1 (FITC), mind az FL-2 (PE) csatornákon.



1. ábra Fényszórási jellemzők változása a perifériás vér sejtjein különböző fixáló/permeabilizáló reagensek használata után. Valamennyi FSC-SSC dot plot képen azonos kapukat használtunk, melyeket a PFA-val fixált és nem permeabilizált normál perifériás minta (FNP) sejtpopulációihoz állítottunk be. Rövidítések: NFNP: nem fixált, nem permeabilizált, CC: Cytofix/Cytoperm, FP: Fix and Perm, IP: Intraprep, IS: Intrastain, PC: Permeacyte, PF: Permeafix

2. Mieloperoxidáz

A FITC-el jelölt három klón (MPO-7, CBL-MPO-1 és H-43-5) összehasonlításában a permeabilizáló szerek összesítésével nyert adatok és az egyes permeabilizáló szerek külön-külön használatával kapott páronkénti adatok is az MPO-7 szignifikánsan jobb szenzitivitását igazolták a másik két klónnal szemben az MFI értékek alapján. Hasonló eredményt adott a PE-el jelölt antitestek vizsgálata is (2. ábra). A FITC és PE konjugátumok összevetésében az utóbbiak magasabb MFI értéke, ezzel nagyobb szenzitivitása igazolódott. Álpozitív reakciót csak a Cytofix/Cytoperm alkalmazásakor észleltünk mindhárom klón esetén. A pozitív sejtek százalékos aránya nem változott lényegesen a különböző klónok használatával.



2. ábra Különböző anti-MPO klónok átfedő hisztogramjai Cytofix/Cytoperm permeabilizálást követően. Az MPO-7 klón a legnagyobb szenzitivitását mind a FITC

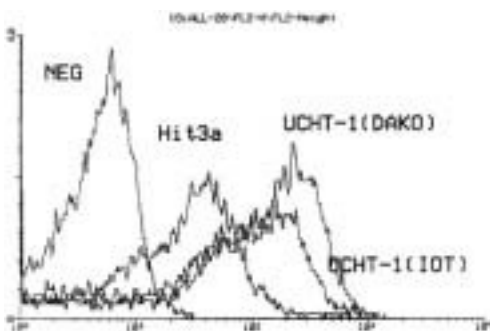
mind a PE jelölt antitestek esetén. Figyelmet érdemel az autofluoreszcens minta magas MFI értéke.

3. cyCD79a

Három forgalmazótól származó HM57 klón (PE) vizsgálatával a Pharmingen antitestje minden permeabilizáló szer használata mellett szignifikánsan alacsonyabb MFI értéket mutatott, mint a DAKO és az Immunotech reagense. Álpozitív reakciót egyik klón esetén sem észleltünk és a pozitív sejtek százalékos aránya sem különbözött lényegesen az egyes klónok alkalmazásakor.

4. cyCD3

Az S4.1 klón esetén jelentős álpozitivitást észleltünk myeloblastokon, ezért a további vizsgálatok a másik két antitesttel történtek, melyek közül az UCTH-1 mutatott magasabb MFI értékeket és a pozitív sejtek százalékos aránya is magasabb volt, mint a Hit3a antitest esetén (3. ábra).



3. ábra. Intracelluláris CD3 detektálása felszíni CD3 negatív T-ALL-ben. AZ UCTH-1 és a Hit3a klón is PE jelölt antitest.

5. Permeabilizáló oldatok

A 2. és 3. ábrán bemutatott hisztogramok valamennyi permeabilizáló reagens esetén hasonlóak voltak. Az MFI értékek összehasonlítása során nem találtunk szignifikáns különbséget a permeabilizáló ágensek között.

Kvantitatív PSGL-1 meghatározás normál és malignus sejteken.

1. PSGL-1 expresszió normál hemopoetikus sejteken

Perifériás vér sejtjein végzett vizsgálatok alapján a lymphocyták PSGL-1 dim és PSGL-1 bright csoportra különültek el. Hármasszínű jelöléssel végzett analízisek szerint a B sejtek feleltek meg az alacsony CD162 jelölődésű sejteknek, míg a T sejtek és NK sejtek PSGL-1 expressziója lényegesen magasabb volt. A monocyták és neutrophilek intenzív CD162 expressziót mutattak.

Normál csontvelő analízisekor a CD162 expresszió növekedését figyeltük meg a hemopoetikus sejtek érése során: lényegesen alacsonyabb volt a myeloid progenitorok PSGL jelölődése, mint az érett myeloidoké. Ez utóbbiaknál is kifejezettebb expressziót detektáltunk a monocyta vonal sejtjein, azon belül azonban a CD162 jelölődés nem differenciált az éretlen monoblastok/promonocyták és az érett monocyták között. PSGL-1 vs. SSC dot ploton a rutin diagnosztikában is használt CD45-SSC dot plothoz

hasonlóan egy, a lymphoid, monocyta és granulocyta populációk ill. az érett és éretlen sejtek között differenciáló képet kaptunk. A leukémiás csontvelő képe az akkumulálódó sejtek típusának megfelelően változik.

2. PSGL-1 expresszió kvantitatív meghatározása

A fenti eredmények számszerű vizsgálatát is elvégeztük a különbségek egzakt meghatározása céljából. Ezek alapján az alábbi eredményeket kaptuk (1. táblázat):

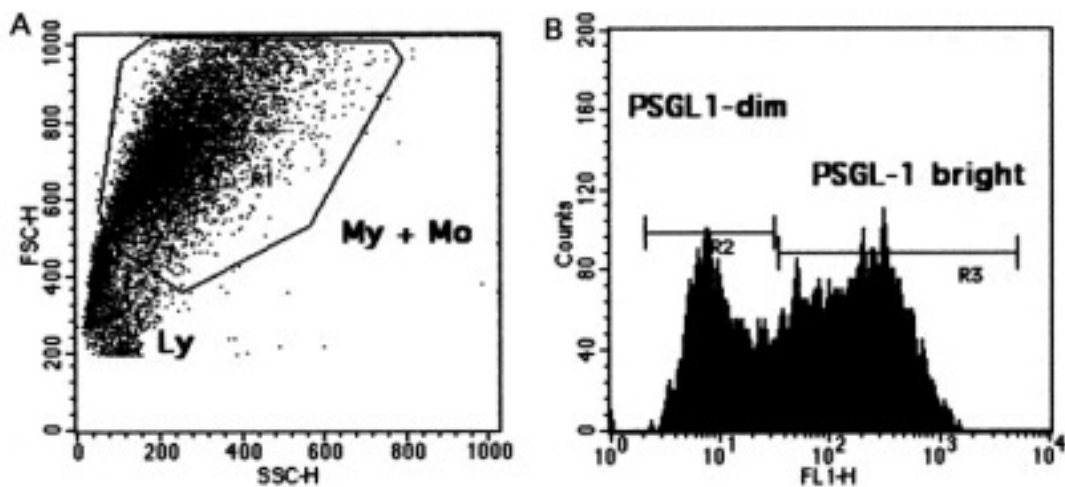
	ABC (átlag±SD)	MFI értékek variációs koefficiense (%)
neutrophilek	26 500 ± 4 500	17
monocyták	47 200 ± 9 900	21
T-sejtek és NK sejtek	38 200 ± 26 000	68
B-sejtek	2 600 ± 1 500	58
AML myeloblastok	12 000 ± 5 300	44
Normál myeloblast	12 600 ± 2 100	17
Promonocyták/monoblastok	41 000 ± 20 300	51
promyelocyta/myelocyta/metamyelocyta	19 000 ± 7 100	37

1. táblázat ABC (antibody binding capacity) értékek és azok szórása normál perifériás vér sejtjein és egészséges valamint leukémiás egyénből származó csontvelői myeloid prekurzorokon

a. A leukémiás myeloblastok PSGL-1 expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az érett sejteké. A blastok szelektív kiválasztása CD45 dim jelölődésük alapján történt.

b. A monocyta vonalon belül az expresszió széles határok között változott, de nem volt szignifikáns különbség a monoblast/promonocyta és az érett monocyta populáció értékei között

c. A számszerű adatok azt tükrözik, hogy a monoblastok CD162 expressziója szignifikánsan magasabb, mint a myeloblastoké, és a két populáció értékei nem mutattak átfedést, ami lehetővé teszi a két prekurzor sejt elkülönítését. Ezek alapján a blastokban detektált alacsony PSGL-1 expresszió AML M1 ill. M2 mellett szól. AML M4 esetében a két populáció együttes jelenléte miatt egy PSGL-1 dim és egy PSGL-1 bright sejtcsoport különíthető el (4. ábra).



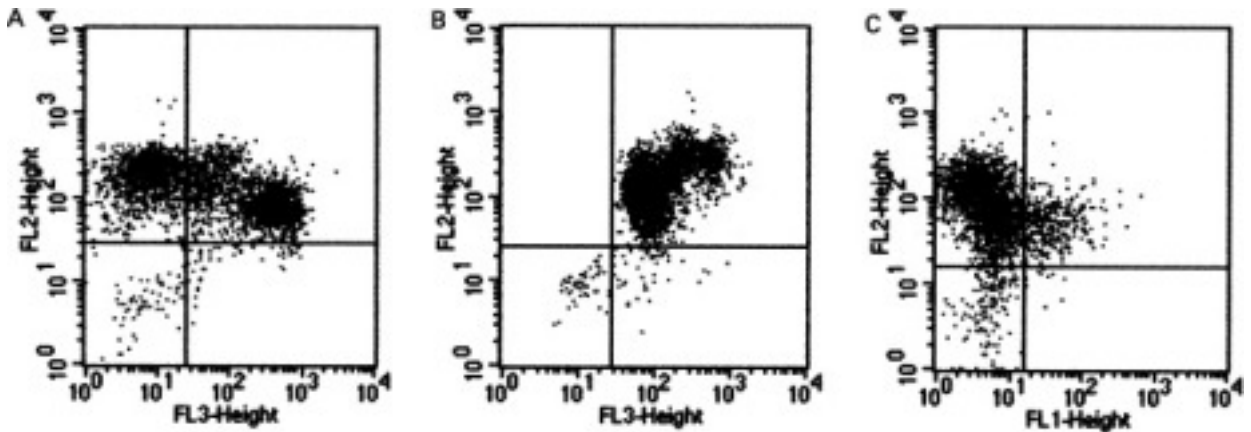
4. ábra. AML M4 csontvelői minta: myeloid dominancia kevés lymphoid (Ly) sejttel. A hisztogram analízis alapján a myeloid sejtek PSGL-1 expressziója bimodális eloszlást mutat – myeloblast (My) és monoblast (Mo) populáció különíthető el

d. Normál myeloblastok jelölődése nem különbözött lényegesen a malignus blastok expressziójától. Ezen esetekben a blastok szelektív vizsgálatát a CD34/CD33 koexpressziót mutató sejtek analízisével biztosítottuk.

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

f. CML akcelerált fázisában, valamennyi myeloid prekursor jelenlétében elvégezve a vizsgálatot a prekursorokon kapott érték átlaga a myeloblastok ill. az érett myeloidok felszíni molekula száma közé eső értéket adott, mely megfelel annak az elképzelésnek, hogy a sejtek CD162 expressziója az érés során fokozódik.

g. Háromszínű analízisekben a CD162 jelölés az éretlen sejtek azonosítására alkalmas, melyet mutat, hogy a CD162 dim sejtek a CD34 őssejt markerrel ill. egyes AML-ekben a blastokon expresszálódó és kedvezőtlen prognosztikai faktornak számító CD7 markerrel mutatott koexpressziót (5. ábra).



5. ábra Háromszínű analízis AML M2-ben. A függőleges tengelyen (FL2) minden dot ploton a PSGL-1 jelölődés látható (CD162PE). A vízszintes tengelyen CD34PECy5 (A), CD45 PEcy5 (B) és CD7FITC (C) festést ábrázoltuk.

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

1. A kalcein teszt reprodukálhatóságának vizsgálata

MDR pozitív sejtvonal, egészséges és leukémiás egyén perifériás véréből származó sejtek analízise a MAF értékek széles tartományában tette lehetővé a reprodukálhatóság vizsgálatát. Az igen magas MAF értéket mutató rezisztens sejtvonalon (KBV-1) kaptuk a legkisebb szórást, de elfogadható a variációs koefficiens értéke a betegekből ill. egészséges egyénekből származó minták esetén is. Az eredmények egyben a teszt hitelességét is jelzik, hiszen lényegesen magasabb MAF értéket mértünk a rezisztens sejtvonalon, mint az emberi mintákon (2. táblázat).

Minta	MAF értékek	CV (%)
	átlaga	n=10
KBV1 sejtvonala	97.9	0.3
AML minta	45.8	11
Normál minta	16	13

2. táblázat A kalcein teszt reprodukálhatóságának vizsgálata sejtvonalaikon és klinikai mintákon (egészséges és leukémiás egyén perifériás vérből). A MAF értékek széles tartományában minden mintából 10 egymást követő minta előkészítést és mérést végeztünk el 50 μ M Verapamilt használva modulátorként. Az eredmények a 10-10 mérés átlagát és variációs koefficiensét (CV) mutatják.

2. A kalcein teszt reagenseinek stabilitás vizsgálata

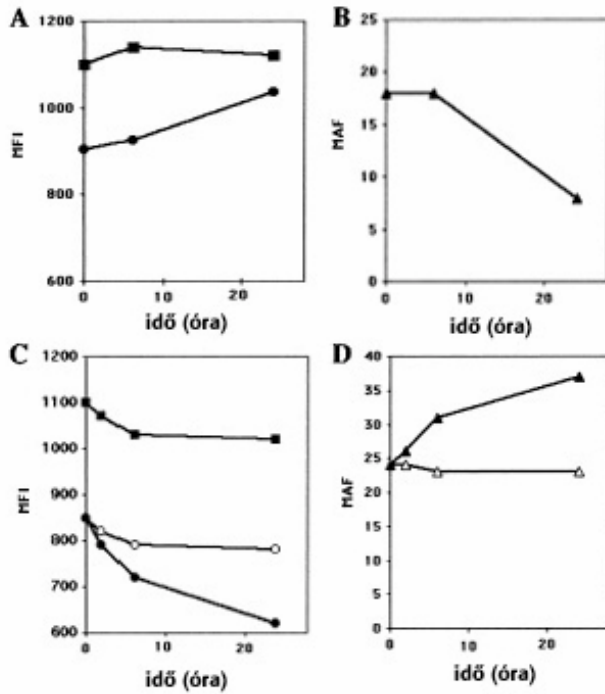
A kalcein-AM oldat -20°C -on tárolva 1 évig stabil, azonban 4°C -os tárolás mellett fél év után jelentős fluoreszcencia növekedés tapasztalható, mely feltehetően a pH változás és az ennek következtében létrejövő hidrolízis következménye. A verapamil törzsoldat mind 4°C -on, mind -20°C -on eltartható 1 évig anélkül, hogy gátló funkciója csökkenne. Ezek figyelembevételével a teszthez szükséges reagensek -20°C -on történő együttes tárolása ajánlható.

3. Minták eltarthatóságának vizsgálata

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

csökkenését látjuk. Bár ebben az esetben a PI pozitivitás nem mutat szignifikáns emelkedést, az ATP depléciónak miatt a 24 óráig tárolt mintában a magasabb FI(Vp-) érték a transzport funkciók csökkenését jelzi. Mindez a ténylegesnél alacsonyabb MAF értéket eredményez. Kísérleteink alapján a mintavétel után a perifériás vér ill. csontvelő feldolgozása 6 órán belül meg kell, hogy történjen, ezidő alatt ugyanis még nincs lényeges csökkenés a MAF értékében.

A Ficollon szeparált és kalceinnel feltöltött sejtek szuszpenziója 4°C-on 24 órán át tárolható, annak MAF értéke nem változik, mert ezen a hőmérsékleten a pumpafunkció blokkolva van, nincs jelentős változás a Vp+ és Vp- minták FI értékében. Szobahőmérsékleten történő tárolás esetén azonban a kalcein kipumpálása folytatódik a verapamillal nem blokkolt rendszerekben, ami a FI csökkenéséhez és ezáltal a MAF érték növekedéséhez vezet. Ezért az előkészített minta hűtőben való tárolása szükséges és a mérést 24 órán belül el kell végezni (6. ábra).

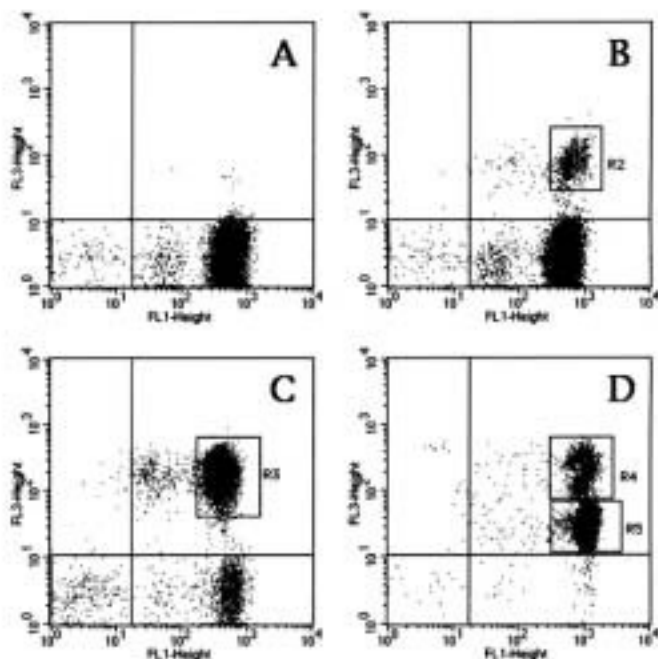


6. ábra Teljes csontvelői minta analízise 0, 6, és 24 órás tárolás után. A: Vp- minta (●) MFI értéke szignifikánsan emelkedett 24 óra alatt, míg a Vp+ mintáé (■) nem változott lényegesen. Ez a MAF érték jelentős csökkenéséhez vezetett (B). Ficollon szeparált, kalceinnel feltöltött mononucleáris sejteket szobahőn tárolva (●) a Vp- minta MFI értéke szignifikánsan csökkent, a 4°C-on tárolt Vp- sejteké (○) nem változott lényegesen. A Vp+ minták (■) MFI értéke minimális változást mutatott (C). Ezek következtében a MAF érték jelentősen növekedett a szobahőn tárolt mintában (▲), míg nem változott a 4°C-on tárolt sejtekben (△).

4. A kalcein teszt kombinálása felszíni marker jelöléssel

A teszt alkalmazása során lényeges, hogy szelektíven a leukémiás sejtek rezisztenciáját mérjük és lehetőleg kizárjuk a vizsgálatból a normál csontvelői sejteket. A két populáció elkülönítésére áramlási citometriás módszer esetén lehetőség van a malignus sejtekre jellemző markerek alkalmazásával. Kettős jelölések alkalmazásával a CD45 dim blast-

populációra kapuzva ezen tumoros sejtek MAF értékét számolhatjuk, ezáltal a normál csontvelői sejtek zavaró hatását kiküszöbölhetjük. Technikai problémát vet fel a többes jelölés alkalmazása, a kalcein fluoreszcenciája ugyanis igen erős az alkalmazott koncentrációban, így az eredetileg FL-1 detektorral mért fluoreszcencia az FL-2 detektor tartományában is mérhető jelet ad, ezáltal a PE festék mérését zavarja. A kalcein és a felszíni marker fluoreszcenciájának biztonságos elkülönítésére ezért megfelelő kompenzáció után az FL-3 detektor mérési tartományában (>650 nm) jelet adó CD45 PerCP vagy CD45PECy5 használható. Ebben az esetben azonban el kellett tekintenünk az életképesség PI-vel történő vizsgálatától. Eredményeink azt mutatták, hogy a kalcein teszt kombinálása felszíni marker jelöléssel biztonságosan alkalmazható adott sejtpopuláció MAF értékeinek meghatározására mind normál mind leukémiás minták esetén, ha az FL-3 tartományban jelet adó antitestet használunk (7. ábra).



7. ábra FL1 - FL3 dot plotok: a vízszintes tengelyen a kalcein fluoreszcenciája látható, az FL3 csatornán a felszíni jelölés PE-Cy5 konjugált antitestekkel. A: izotípus kontroll, B: felszíni CD19, C: felszíni CD3. A pozitív sejtek a jobb felső kvadránsban láthatók. D: CD45 jelölés acut myeloid leukémiás mintában. A CD45 dim populáció a myeloblastoknak felel meg (R5)

5. Pgp molekulaszám meghatározása monoklonális antitesttel

Több tanulmány elemzi a funkcionális teszttel kapott eredmények és az antitestekkel történő jelölés korrelációját. Sok esetben igen eltérő eredmények adódnak, melyek magyarázata lehet, hogy a funkcionális tesztekkel több transzport fehérje aktivitását mérjük, míg a monoklonális antitest csak egy proteinről ad felvilágosítást (efflux+/Pgp- esetek), vagy a fehérje jelen van ugyan, de nem működik, ill. az antitest keresztreakciót mutat a más sejtfelszíni proteinekkel, melyeknek a drog rezisztenciában

nincs szerepük (efflux-/Pgp⁺ esetek). Az indirekt immunfluoreszcenciás méréseket és a kalcein teszttel kapott eredményeket összevetve azt találtuk, hogy a KBV-1 rezisztens sejtvonalon a MAF érték 98, az ehhez tartozó felszíni molekula szám pedig 500 000 volt sejtenként. A közepes rezisztenciát mutató KB8-5 sejtvonalon a MAF értéke csak 20%-al csökkent, míg a receptorszám több mint 90%-al (36 000/sejt). Vagyis a MAF érték még meglehetősen magas, de a fehérjeszám már szignifikánsan csökkent. Beteg minták esetén, ahol a MAF érték 0 és 60 közötti (leginkább 40 alatti), a fehérje sejtenkénti kópiaszáma igen alacsony, és ennek meghatározása nem differenciál biztonsággal az MDR pozitív és MDR negatív esetek között. Ez a megfigyelés nem csak a kópiaszám meghatározás vonatkozásában érvényes, hanem hasonló megfigyeléseket tettünk a fehérje expressziót detektáló antitestes jelölés esetén is (MRK16), ahol az eredményeket az izotípus kontrollhoz viszonyított fluoreszcencia intenzitások hányadosaként adtuk meg. Mindez azt jelzi, hogy a funkcionális teszt szenzitívebb indikátora a multi-drog rezisztencia fennállásának, mint a Pgp antigén expresszió vizsgálata ill. utal egyéb pumpa funkciók (pl. MRP1) lehetséges szerepére (3. táblázat).

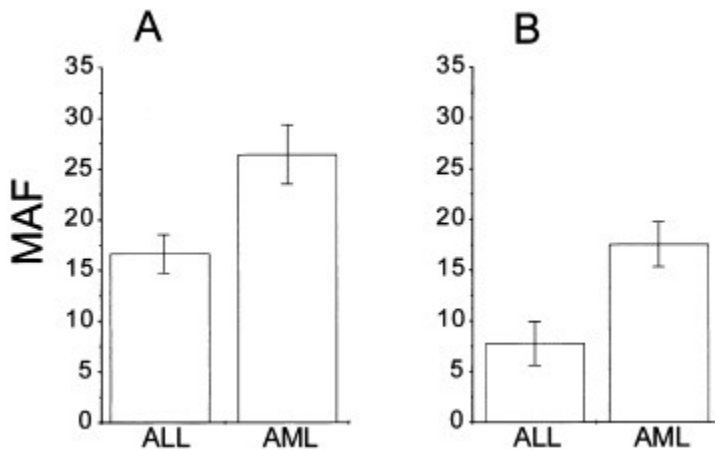
Pgp-MDR1				
	MAF	(ABC)	MRK16 pozitív sejtek %-os aránya	MFI ráta
KBV-1sejtvonal	98	500 000	100	85
KB8-5 sejtvonal	80	36 000	98	12
AML (NR)	33	< 3 800	12	2.8
AML (R)	15	< 3 800	8	2.0

3. táblázat Az MDR aktivitás és a Pgp expresszió összehasonlítása: rezisztens sejtvonalakon és AML betegek csontvelői mintáin (NR: non-responder, R: responder) meghatároztuk a MAF értéket, a sejtfelszíni molekula számmal korreláló antitest kötő képességet (ABC, antibody binding capacity), és az MRK 16 antitesttel végzett vizsgálatokban a pozitív sejtek %-os arányát és az izotípus kontroll MFI értékéhez viszonyított rátát. Az összefüggés nem lineáris, a MAF értékek jobban differenciálnak az MDR pozitív és negatív esetek között, mint az expresszió vizsgálata.

A teszt eredmények és a betegség klinikai kimenetelének korrelációja

1. MAF értékek összehasonlítása AML és ALL betegcsoportok esetén.

A minta előkészítés során fennálló minimális különbségek következtében a két centrum beteganyagában kissé eltérő MAF értékeket kaptunk, ezért ebben az összehasonlításban külön kezeltük a centrumok beteganyagát. Mindkét esetben jól látható azonban a tendencia, mely az irodalomban is ismert tény, hogy AML-ek esetén gyakoribb a de novo fennálló rezisztencia, mint ALL-ben. A különbségek a lymphoid és myeloid leukémiás csoportok között szignifikánsnak adódtak (8. ábra).

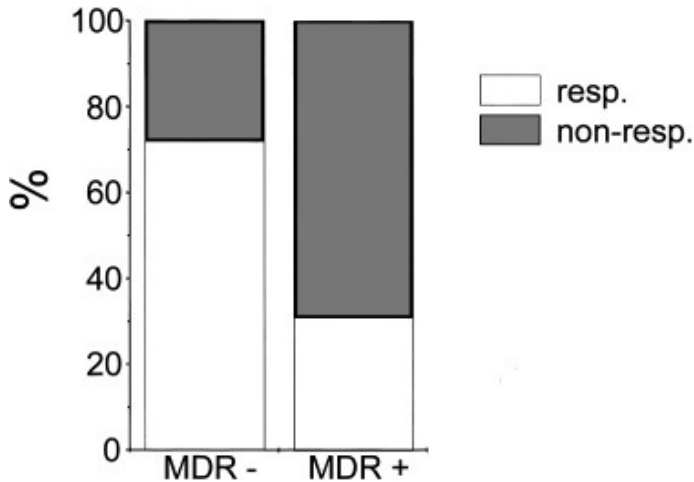


8. ábra MAF értékek összehasonlítása AML és ALL betegekben. A: DEOEC, Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézet B: Országos Hematológiai és Immunológiai Intézet. A MAF értékek átlaga AML-ben mindkét centrumban szignifikánsan magasabb, mint ALL-ben. A: MAF értékek átlaga 26.5 AML-ben (n=22) és 16.6 ALL-ben (n=14)(p=0.029) B: 17.6 és 7.8 a MAF értékek átlaga AML-ben (n=43) és ALL-ben (n=14) (p=0.021)

2. A MAF érték összefüggése a remisszió indukciós kezelésre adott válasszal: a teszt prediktív értéke

Mivel a MAF érték referencia tartományának meghatározásához AML esetében a normál csontvelői blastok MDR aktivitását kellene ismernünk, és ennek a mérése igen körülményes, ezért anyagunkban a klinikai válasz alapján egy olyan cut-off érték meghatározása törekedtünk, mely megbízhatóan elkülöníti az MDR pozitív és MDR negatív eseteket. Ennek érdekében a betegeket responder (R) és non-responder (NR) csoportba soroltuk. Respondernek tekintettük azokat, akiknél az egy vagy két

kemoterápiás ciklus alatt komplett remisszió elérhető volt, a non-responder csoportban természetesen a 4. héten 5% fölött volt a blastok aránya a csontvelőben. Meghatároztuk a MAF értékek átlagát a responder és non-responder csoportban mindkét centrumban, mely 14,1 ill. 17,1 volt a responder és 23,3 ill. 32,9 a non-responder csoportban (OHII és DEOEC eredményei egyenként). A cut-off értéket a MAF_{R+SEM} és a MAF_{NR-SEM} (SEM: standard error of mean) értékek átlagaként kalkuláltuk, mely 20-nak adódott a budapesti centrumban és 25-nek a DEOEC beteganyagában. Ezen cut-off értékek alá ill. felé eső MAF értékek alapján az MDR pozitív és MDR negatív esetek elkülöníthetők. Az így létrejött MDR + és MDR- csoportokban meghatároztuk a responderek és non-responderek arányát. Az MDR negatív csoportban a betegek 72%-a jól reagált a kezelésre, vagyis a teszt negatív prediktív értéke 72%, ezzel a biztonsággal jelzi a negatív eredmény a terápia hatékonyságát. Az MDR pozitív csoportban a betegek 69%-ban nem lehetett komplett remissziót elérni, vagyis ennyi volt a non-responderek aránya. A kalcein assay pozitivitása tehát 69%-os biztonsággal jelzi a terápia hatástalanságát (pozitív prediktív érték) (9. ábra).

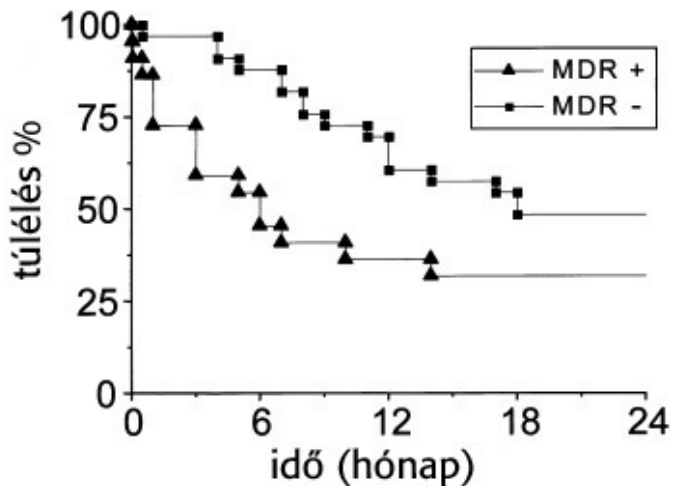


9. ábra A kalcein teszt pozitív és negatív prediktív értéke: cut-off érték alapján az AML betegeket mindkét centrumban MDR pozitív és MDR negatív csoportokba osztottuk. Az MDR negatív csoportban a responderek (resp) aránya 72% volt (negatív prediktív érték), míg az MDR pozitív csoportban 69% -ban találtunk non-respondereket (non-resp) (pozitív prediktív érték). A kalcein teszttel meghatározott MDR aktivitás és az indukciós kezelésre adott válasz között szignifikáns összefüggést találtunk ($p=0,004$)

3. A teszt eredmények és a hosszútávú túlélés összefüggése

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

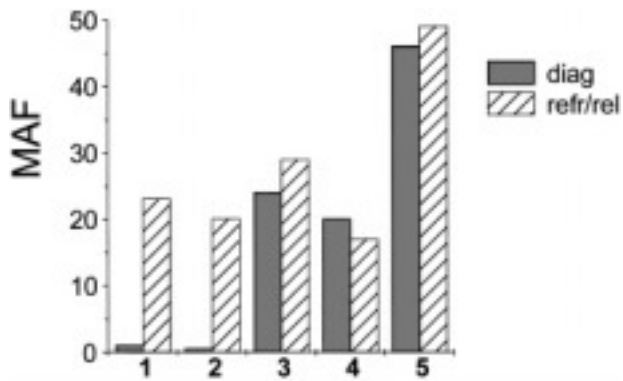
túlélés ideje háromszorosa (18 hónap) az MDR pozitív betegek 50%-os túlélésének (10. ábra).



10. ábra MDR pozitív és MDR negatív betegek Kaplan-Mayer túlélési görbéje. Az átlagos követési idő $11,7 \pm 11,1$ hónap volt, a vizsgálatba 8 hónapnál hosszabb követési idő esetén vettük be a betegeket. A két csoport túlélése között jelentős, de statisztikailag nem szignifikáns különbséget találtunk ($p=0,07$)

4. Követéses vizsgálatok szelektált esetekben

Néhány betegnél az MDR meghatározását nem csak a diagnózis felállításakor, hanem a betegség lefolyása során később is (refrakter szakban ill. relapszus idején) elvégeztük. Ezekben az esetekben alapvetően kétféle mintázatot láttunk: vagy a kezdetben alacsony MAF érték később lényegesen megemelkedett és a beteg MDR pozitívvá vált, vagy a de novo fennálló MDR pozitivitás változatlan maradt a betegség későbbi fázisában is (11. ábra).



11. ábra MDR aktivitás meghatározása a diagnózis felállításakor (diag) és relapsus idején vagy refrakter szakban (refr/rel). Az első két esetben MDR negatív betegeknél követéses vizsgálattal MDR pozitivitást észleltünk (gyógyszer indukálta rezisztencia), a többi esetben az MDR aktivitás nem változott jelentősen a betegség lefolyása kapcsán

MEGBESZÉLÉS

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

A sejtvonal azonosításának legmegbízhatóbb módja az intracelluláris markerek alkalmazása, melyek közül leginkább a MPO, cyCD79a és cyCD3 használatos a myeloid, B és T lymphoid vonalak identifikálására (5-8).

A rendelkezésre álló markerek nem minden esetben biztosítják az AML altípusok elkülönítését. Bár vannak sejtfelszíni fehérjék, melyek az esetek zömében segítséget nyújtanak a granulocytá, monocytá és megakaryocytá vonalak differenciálásában, ezek mellett nagy jelentősége lehet további markerek azonosításának, melyek vagy sejtvonal specifikusak, vagy expressziójuk mértéke különbözik ez egyes sejtvonalakon. A kvantitatív áramlási cytometria eszközével általunk vizsgált CD162 (PSGL-1) molekula ilyen markernek bizonyult, mely eltérő expressziót mutat a granulocytá és a monocytá vonal sejtjein, ezáltal a két sejtvonal elkülönítésére alkalmas.

A korrekt diagnózis felállítása mellett a klinikai onkológiában jelentős igény van a malignus sejtek citosztatikum rezisztenciájának, mint prognosztikai

faktornak a detektálására is, hiszen ennek ismerete meghatározhatja a választott kemoterápiás kezelést vagy indikálhatja modulátorok, revertáló ágensek hozzáadását a kemoterápiához.

Vizsgálatainkat ezen három témakör (intracelluláris markerek, PSGL-1 expresszió és MDR kimutatás) köré csoportosítottuk, ezek eredményeit a következőkben foglaljuk össze.

Az intracitoplazmatikus markerek detektálásánál lényeges kérdés a minta előkészítés technikai oldala, nem megfelelő reagensek alkalmazása ugyanis álpozitív és álnegatív eredményekhez vezethet. A detektálás szenzitivitásának és specificitásának vizsgálatára hat kereskedelmi forgalomban elérhető permeabilizáló kitnek ill. különböző monoklonális antitest klónoknak és ezek fluoreszcens konjugátumainak kombinációit hasonlítottuk össze. Valamennyi kit esetén lényeges változást észleltünk az FSS-SSC szignálokban, ez azonban a Permeacyte reagens kivételével nem zavarta a sejtpopulációk felismerhetőségét és elkülönítését. Minden esetben az autofluoreszcencia növekedését tapasztaltuk a permeabilizálás következtében. Korábbi tanulmányok szerint maguk a lizáló/fixáló szerek is lényeges eltéréseket okozhatnak a fényszórási tulajdonságokban és a felszíni marker jelölődésekben is (73). Különböző permeabilizáló szereket elemző tanulmányok megfigyeléseinkhez hasonlóan a fényszórási jellemzők

kismértékű változását írják le, mely a diagnosztikai alkalmazást nem zavarja és ezen permeabilizáló reagensek a párhuzamosan alkalmazott felszíni jelölést is lehetővé teszik (74-75).

Az MPO elleni antitestek közül az MPO-7 klón bizonyult a legszenzitívebbnek, és a PE konjugátumok minden esetben intenzívebb jelet adtak a FITC konjugátumokkal szemben, melyet a festék nagyobb fluorofór tartalma, jobb kvantum hatásfoka és emissziós maximuma magyaráz. A Cytotfix/Cytoperm reagens használatával valamennyi klón esetén kismértékű álpozitív jelölődést észleltünk lymphoblastokban. Ezek az eredmények arra hívják fel a figyelmet, hogy a kellően szenzitív és specifikus MPO jelöléshez figyelmet kell fordítani a klón, fluoreszcens jelölés és permeabilizáló reagens legoptimálisabb kombinációjának megválasztására.

A B sejtek azonosítására használt cyCD79a klón (HM57) esetén a DAKO és az Immunotech reagensei ajánlhatók a Pharmingen antitestjével szemben, az erősebb fluoreszcens jel miatt. AML blastokban egy esetben sem észleltünk álpozitív jelölődést.

A T sejtek detektálásában az UCTH-1 anti-cyCD3 klón bizonyult a legszenzitívebbnek (DAKO és Immunotech termék). A Hit3a antitest lényegesen gyengébb MFI értéket adott, míg az S4.1 klónnak az álpozitív reakciók miatt nem megfelelő a specificitása.

Eredményeink alapján tehát a myeloid, B és T lymphoid vonalak az MPO, cyCD79a és cyCD3 intracitoplazmatikus markerekkel biztonsággal azonosíthatók, ha a fenti permeabilizáló kitek (Fix and Perm, Intrastain, Intraprep, Permeafix) és lehetőleg egy PE-el konjugált szenzitív klón (MPO-7, HM57, UCTH-1) kombinációit választjuk.

A myeloid leukémiák diagnózisában az immunfenotípus vizsgálatok jelentősége limitált, a FAB típusokhoz nem mindig rendelhetők egyértelmű marker kombinációk (76,77). Jelenleg is folyamatban vannak a sejtek minél pontosabb és biztosabb azonosítását célzó kutatások. Ezek között egyre nagyobb diagnosztikus jelentősége van az olyan sejtfelszíni molekulák analízisének, melyeknek a sejtek adhéziójában, mobilizációjában van szerepe. Ilyen molekula a PSGL-1 is, melynek AML-ben és normál myeloid sejtekben való expresszióját már korábban is vizsgálták (78-80), nem születtek azonban kvantitatív adatok az expresszió mértékéről. A molekula N terminális részével reagáló monoklonális antitestet használva indirekt immunfluoreszcenciával, kalibrációs beadek segítségével határoztuk meg a sejtfelszíni molekula számot egészséges és leukémiás egyének csontvelői és perifériás sejtjein. Normál csontvelőben igen alacsony jelölődést találtunk a myeloid prekurzorokon, míg érett sejteken lényegesen magasabb MFI értékeket detektáltunk, mely a differenciálódás során fokozódó expressziót

jelzi. A monocyta vonal sejtjein a PSGL-1 expresszió szignifikánsan magasabb volt, azon belül azonban nem találtunk különbséget az éretlen monoblast/promonocyta és az érett monocyta populáció értékei között. Szignifikáns különbség adódott azonban leukémiás betegekből származó myeloblastok és monoblastok CD162 jelölődése között, a két populáció értékei nem mutattak átfedést, mely a granulocyta és a monocyta vonal egyik elkülönítési lehetőségét jelenti. Mivel a monocyta CD14 marker az AML M4/M5 esetek kb. felében mutat pozitivitást ill. esetenként más szubtypusokban (M2) is detektálható, nem differenciál biztonsággal M4/M5 ill. M1/M2 leukémiák között (81,82). A jelenleg használt immunfenotípus vizsgálatokat a CD162 marker kvantitatív meghatározásával kiegészítve a fenti szubtypusok elkülöníthetők.

Normál és leukémiás myeloblastok PSGL-1 expressziójában nem találtunk különbséget, amit fontos tudni a reziduális leukémiás sejtek keresése szempontjából: ezek alapján ugyanis ez a marker önmagában nem alkalmas az MRD kimutatására. Bár egyes adatok szerint a normál myeloblastok adhéziója a sztrómához erősebb, mint a malignus hemopoetikus sejteké (83,84), eredményeink alapján ez nem a PSGL-1 expresszióval hozható összefüggésbe.

Ugyanazon AML-es beteg csontvelői és perifériás blast sejtjein szimultán végzett vizsgálatok arra utalnak, hogy a két populáció PSGL-1 expressziója között. Ebből adódhat a következtetés, hogy a leukémiás sejtek közül nem az alacsony PSGL-1 expressziót mutató populáció kerül ki a keringésbe az esetleges csökkent adhézió és fokozott mobilizáció miatt. Knock out egerekkel kapott eredmények alapján azonban valószínű, hogy alacsony PSGL-1 expresszió esetén a leukocytosis oka a neutrophilek elhúzódó cirkulációja, megszokottnál hosszabb élettartama a perifériás keringésben. A PSGL-1 esetében fontos megjegyezni, hogy a monoklonális antitesttel detektált expresszió mértéke nem feltétlenül korrelál a fehérje funkciójával: a funkcionáló receptor kialakulásához poszttranszlációs módosítás (szializáció, fukoziláció, szulfatálás) szükséges (85).

Prognosztikai faktorok közül a citosztatikum rezisztencia funkcionális kimutatását végeztük el. Bár igen sok módszer létezik az MDR detektálására, különböző centrumok eredményei nem minden esetben összevethetők, sőt a különböző metodikákkal nyert eredmények sem mindig koherensek (62,86-88). Fontos tehát megbízható, könnyen kivitelezhető és klinikai eredményekkel is korreláló tesztek kialakítása, és a módszer standardizálása.

Vizsgálatainkban egy kvantitatív funkcionális tesztet, a kalcein tesztet alkalmaztuk beteg minták mérésére két centrumban végzett tanulmány formájában. A teszt előnye, hogy a kalcein-AM mind a Pgp-nek, mind az MRP1-nek szubsztrátja, így verapamilt használva inhibitoroként, - mely szintén mindkét fehérje aktivitását blokkolja - a két protein által együttesen létrehozott transzport aktivitást detektálhatjuk. Egyéb funkcionális teszthez képest előnyt jelent, hogy szemben más fluoreszcens festékekkel (pl. rodamin 123) a kalcein nem kötődik szubcelluláris kompartmentekhez, és hogy az eredmények kvantitálhatók multidrog rezisztencia aktivitás faktor (MAF) formájában. További előnyt kínál a szelektív inhibitorok használata, melyekkel lehetőség van a Pgp és az MRP1 aktivitásából eredő rezisztencia elkülönítésére (71,89).

Kísérleteinkben a teszt már korábban standardizált formájának (68,69) rutin laboratóriumi diagnosztikában való alkalmazását, optimalizálásának feltételeit vizsgáltuk. Ennek során méréseket kivitelezünk sejtvonalakon és klinikai mintákon, melyek a teszt megfelelő reprodukálhatóságát és az eredmények hitelességét igazolták.

A teszt komponensek eltarthatóságának vizsgálatával igazoltuk, hogy -20°C-on mind a fluoreszcens méréshez használt kalcein-AM festék, mind a

transzporterek blokkolására alkalmazott verapamil törzsoldatok formájában 1 évig stabil, funkcióját megőrzi.

A preanalitikai hibák csökkentése érdekében a mintavételt követően különböző időpontokban végeztük el a MAF meghatározást. Ezen mérések konklúziójaként megállapítottuk, hogy a perifériás vér/csontvelő feldolgozása a levétel után 4-6 órán belül szükséges, míg az előkészített, kalceinnel feltöltött sejtek 4°C-on 24 óráig tárolhatók.

Az eredmények szelektivitásának növelésére célszerű felszíni marker jelölés alkalmazása, mely lehetővé teszi a leukémiás sejtek MDR aktivitásának mérését és a normál sejtek kizárását a vizsgálatból. Irodalmi adatok alapján a malignus sejtek azonosítására leginkább CD34 jelölés használható (90-93), de vizsgálhatjuk a CD45 dim populáció MDR aktivitását is (94). Megjegyzendő, hogy nem csak egészséges csontvelői sejtek analízise igazolta a normál CD34+ sejtek fokozott Pgp expresszióját és funkcióját az érett sejtekkel szemben, hanem kalcein teszttel végzett funkcionális MDR teszt során a CD34+ leukémiákban is szignifikánsan nagyobb Pgp aktivitás volt kimutatható a CD34- blastok aktivitásával szemben (71). Eredményeink alapján a kalcein tesztben kombinált jelölés esetén a leukémiás sejtek jelölésére a kalcein erős fluoreszcenciája miatt fontos hogy az FL-3

detektorba jelet adó fluorophort (PerCP vagy PECy5) használjunk megfelelő kompenzáció mellett.

Az MDR detektálása esetén konszenzus protokoll ajánlása alapján helyes két különböző módszer használata (95,96), pl. funkcionális teszt és monoklonális antitest együttes alkalmazása. Nagyobb klinikai beteganyagban ilyen jellegű összehasonlítást nem végeztünk, de néhány mintában meghatároztuk a sejtfelszíni receptorszámot és vizsgáltuk ennek a MAF értékkel mutatott korrelációját. Ezek alapján a MAF érték és a felszíni molekulaszám összefüggése nem lineáris, a klinikai minta viszonylag alacsony tartományába eső MAF érték (<50) esetén a Pgp szám nehezen meghatározható, a kalibrációs görbe szűk alsó tartományába esik, míg a hozzájuk tartozó MAF értékek széles skálán változnak. Így ez a meghatározás nem differenciál kellőképpen az MDR pozitív és MDR negatív esetek között, a funkcionális teszt az MDR aktivitás szenzitívebb indikátorának tekinthető. Fontos megjegyezni, hogy az expresszió és a funkció vizsgálata adhat eltérő eredményt, mivel a funkcionális teszt egyéb transzporterek aktivitását is méri így az efflux +/Pgp- esetek magyarázhatók, míg a nem eléggé specifikus antitestek használata vezethet efflux-/Pgp+ esetek észleléséhez (97).

A klinikai mintákon kapott eredményeink alapján a 93 de novo acut leukémiás beteg vizsgálatával az irodalmi eredményekkel egyezően AML-es betegekben az MDR aktivitás szignifikánsan magasabb értékét találtuk az ALL betegcsoporttal összehasonlítva. Eredményeink között nem ábrázoltuk, de elvégeztük 40 egészséges egyén mononucleáris sejtjeiből is a MAF meghatározást, melynek átlag értéke nem különbözött szignifikánsan az ALL csoport betegeiből kapott átlagtól.

A teszt cut-off értékének meghatározásánál nem hagyatkozhattunk a normál myeloblastok MAF értékére, hanem klinikai adatok alapján húztuk meg ezt a határértéket. A responder és non-responder csoport átlagértékét és szórását figyelembe véve a kettő közötti értéket jelöltük meg cut-off értéknek, ezek alapján betegeinket MDR pozitív és MDR negatív csoportba osztottuk. Megállapítottuk, hogy a kalcein teszt negativitása 72%-os prediktív értékkel előre jelzi a terápia hatékonyságát és jobb a túlélés ebben a csoportban, míg az MDR pozitivitás detektálásakor az esetek 69%-ban kedvezőtlen terápiás válaszra és rövidebb túlélésre számíthatunk.

Vizsgáltuk egyéb prognosztikai faktorok korrelációját a klinikai kimenetellel, ezek között azonban csak a betegek életkora mutatott statisztikailag szignifikáns összefüggést a terápiára adott válasszal és a

túléléssel, a CD34 arány, fvs szám, LDH érték esetén ilyen fajta korrelációt nem tudunk igazolni.

Vizsgálataink olyan metodikai kérdésekre terjedtek ki, melyek a leukémia diagnosztika pontosítását, könnyebbé tételét és a prognózis megítélését célozták. Eredményeink alapján állást foglaltunk (i) a sejtvonal azonosításában fontos intracelluláris markerek antitest klónjainak és a permeabilizáló szereknek a kívánatos kombinációjáról (ii) a PSGL-1 expresszió diagnosztikai jelentőségéről, mely a kvantitatív áramlási cytometria módszerével alkalmas az AML szubtypusok elkülönítésére (iii) a multidrog rezisztencia detektálására használt funkcionális teszt, a kalcein teszt optimalizálásának feltételeiről és a teszt klinikai eredményeiről. Ezen módszerek a már alkalmazott metodikákkal együtt hozzájárulnak a leukémiás sejtek sajátosságainak komplex megítéléséhez és ezzel a terápia hatékonyságának növeléséhez.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Muszbek László professzor úrnak, hogy a Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézetbe visszatérve lehetőségem nyílt a korábban itt folytatott kísérletes munkáim alapján PhD téziseim megírására és köszönöm a folyamatos biztatást és segítségnyújtást, mellyel munkámhoz nagymértékben hozzájárult.

Köszönöm témavezetőmnek, dr. Kappelmayer Jánosnak, hogy felkeltette érdeklődésemet a hematológiai témaköre iránt, hogy közös munkáink során a leukémia diagnosztika számos új módszerét megismerhettem és hogy szakmai fejlődésemet az itt töltött évek alatt támogatta, kutatómunkára és fejlődésre inspirált, közreműködésével betekintést nyerhettem hazai és külföldi munkacsoportok munkájába. Külön köszönöm a kísérletek végzésében és értékelésében nyújtott szakmai segítséget.

Köszönettel tartozom Kissné Sziráki Valéria szakasszisztensnek és Veszprémi Anikó asszisztensnek, akik gyakorlati tanácsaikkal, türelmükkel és segítőkészségükkel támogatták kísérletes munkáimat.

Köszönöm Buzás Edinának és Koós Zoltánnénak, valamint Antal Csabának a közlemények és a tézisek írása közben nyújtott technikai segítségüket és tanácsaikat.

Köszönöm az Intézet valamennyi dolgozójának, hogy megértésükkel, jó kedélyükkel támogatták munkámat és kellemes hangulatot biztosítottak a munkavégzéshez.

Köszönöm klinikusainknak, Dr. Kiss Csongor, Dr. Kiss Attila és Dr. Telek Béla tanár uraknak, hogy mellettük szakmailag hasznos és jó hangulatú együttműködésben lehetett részem úgy a rutin hematológiai diagnosztika, mint az együtt végzett kutatómunka során.

Köszönettel tartozom Dr. Sarkadi Balázs professzor úrnak és munkacsoportjának a calcein assay elsajátításában nyújtott segítségükért, szakmai tanácsaikért, és hogy mindig bizalommal fordulhattam hozzájuk kollaborációs munkáink során.

Köszönöm családomnak, hogy az otthoni nyugodt légkör megteremtésével, türelmükkel és megértésükkel biztosították számomra a munkához szükséges feltételeket, és hogy biztatásukkal végig kísérték munkámat.

Rövidítések jegyzéke

ABC = antibody binding capacity (antitest kötő képesség)

ALL = acut lymphoid leukémia

AML = acut myeloid leukémia

BCRP = breast cancer related protein (emlő rákokhoz kapcsolódó protein)

Kalcein-AM = Kalcein - acetoximetilészter

FAB = French – American – British

FITC = fluoreszcein izotiocianát

FSC = forward scatter (előre szórt fény)

HBSS = Hank's Balanced Salt Solution

MDR = multidrug resistance (multi-drog rezisztencia)

MFI = mean fluorescence intensity (átlagos fluoreszcencia intenzitás)

MRD = minimal residual disease (minimális reziduális betegség)

MPO = mieloperoxidáz

MRP = multidrug resistance related protein (multi-drog rezisztenciához kapcsolódó protein)

PBS = phosphate buffer salina

PE = fikoeritrin

PFA = paraformaldehid

Pgp = P-glikoprotein

PI = propidium - jodid

PSGL-1 = P szelektin glikoprotein ligand -1

SSC = side scatter (oldalra szórt fény)

Vp = Verapamil

A TÉZISEKBEN ELŐFORDULÓ HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE

1. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. 1995. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological characterization of leukemias. *Leukemia* **9**: 1783 - 1786
2. Drach D, Drach J, Glassl H, Gattringer C, Huber H. 1993. Flow cytometric detection of cytoplasmic antigens in acute leukemias: implications for lineage assignment. *Leuk Res* **17**: 455 - 456
3. Lanza F, Latorraca A, Moretti S, Castagnari B, Ferrari L, Castoldi G. 1997. Comparative analysis of different permeabilization methods for the flow cytometry measurement of cytoplasmic myeloperoxidase and lysozyme in normal and leukemic cells. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* **30**: 134 -144
4. Groeneveld K, Te Marvelde JG, Van den Beemd, MW, Hooijkaas H, van Dongen JJ. 1996. Flow cytometric detection of intracellular antigens for immunophenotyping of normal and malignant leukocytes. *Leukemia* **10**: 1383 -1389
5. Storr J, Dolan G, Coustan Smith E, Barnett D, Reilly JT. 1990. Value of monoclonal anti-myeloperoxidase (MPO7) for diagnosing acute

leukaemia. *J Clin Pathol* **43**: 847 - 849

6. Dworzak MN, Fritsch G, Froschl G, Printz D, Gardner H. 1998. Four-color flow cytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase –positive lymphoid precursors in pediatric bone marrow. CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny. *Blood* **92**: 3203 - 3209
7. Campana D, van Dongen JJ, Mehta A, Coustan Smith E, Wolvers Tetteroo IL, Ganeshaguru K, Janossy G. 1991. Stages of T-cell receptor protein expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **77**: 1546 - 1554
8. Praxedes MK, De Oliveira LZ, Pereira W da V, Quintana IZ, Tabak DG, 1994. De Oliveira MS. Monoclonal antibody anti-MPO is useful in recognizing minimally differentiated acute myeloid leukaemia. *Leuk Lymphoma* **12**: 233 - 239
9. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. 1997. US-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry* **30**: 214-230

10. Rothe G, and Schmitz G. for the Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis. 1997. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies *Leukemia* **10**: 877-895
11. Bikoue A, George F, Poncelet P, Mutin M, Janossy G, Sampol J. 1996. Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression: normal adult values. *Cytometry* **26**: 137-147
12. Lavabre-Bertrand T, Janossy G, Ivory K, Peters R, Secker-Walker L, Porwit-MacDonald A. 1994. Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry: I. CD10 expression. *Cytometry* **18**: 209-217
13. Porwit-MacDonald A, Janossy G, Ivory K, Swirsky D, Peters R, Wheatley K, Walker H, Turker A, Goldstone AH, Burnett A. 1996. Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. IV. CD34 overexpression in acute myelogenous leukemia M2 with t(8;21). *Blood* **87**: 1162-1169
14. Mazo IB, Gutierrez-Ramos JC, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD, Andrian UH. 1998. Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med* **188**: 465-474

15. McEver RP, Cummings RD. 1997. Perspective series: Cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* **100**: 485-492
16. Möhle R, Murea S, Kirsch M, Haas R. 1995. Differential expression of L-selectin, VLA-4 and LFA-1 on CD34+ progenitor cells from bone marrow and peripheral blood during G-CSF enhanced recovery. *Exp Hematol* **23**: 1535-1542
17. Gottesman MM, Pastan I. 1993. Biochemistry of the multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Ann Rev Biochem* **62**: 385-427
18. Dalton WS. 1997. Mechanism of drug resistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol* **34**: 3-8
19. Bradshaw DM, Arceci RJ. 1998. Clinical relevance of transmembrane drug efflux as mechanism of multidrug resistance. *J Clin Oncol* **16**: 3674-3690
20. Sharom FJ. 1997. The P-Glycoprotein efflux pump: How does it transport drugs? *J Membr Biol* **160**: 161-175
21. Klein I, Sarkadi B, Váradi A. 1999. An inventory of human ABC proteins. *Biochem Biophys Acta – Biomembranes* **1461**: 237-262

22. Hegewisch-Becker S, Hossfeld DK. 1996. The MDR phenotype in hematologic malignancies: prognostic relevance and future perspectives. *Ann Hematol* **72**:105-117
23. Gsur A, Zöchbauer S, Götzl M, Kyrle PA, Lechner K, Pirker R. 1993. MDR1 RNA expression as a prognostic factor in acute myeloid leukemia: an update. *Leuk Lymphoma* **12**: 91-94
24. van den Heuvel-Eibrink MM, Sonneveld P, Pieters R. 2000. The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia. *Int J Clin Pharmacol Ther* **38**: 94-110
25. Chin JE, Soffir R, Noonan KE, Choi K, Roninson IB. 1989. Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein). *Mol Cell Biol* **9**: 3808-3820
26. Higgins CF. 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism - an overview. *Res Microbiol* **152**: 205-210
27. Smith AJ, Timmermans-Hereijgers JL, Roelofsen B, Wirtz KW, van Blitterswijk WJ, Smit JJ, Schinkel AH, Borst P. 1994. The human MDR3 P-glycoprotein promotes translocation of phosphatidylcholine through the plasma membrane of fibroblasts from transgenic mice. *FEBS Lett* **14**: 263-266

28. Merlin JL, Guerci AP, Marchal S, Bour C, Colosetti P, Kataki A, Guerci O. 1998. Influence of SDZ-PSC833 on daunorubicin intracellular accumulation in bone marrow specimens from patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **103**: 480-487
29. Kaye SB. 1998. Multidrug resistance: clinical relevance in solid tumours and strategies for circumvention. *Curr Opin Oncol* **10**: 15-19
30. Lowenberg B, Sonneveld P. 1998. Resistance to chemotherapy in acute leukemia. *Curr Opin Oncol* **10**: 31-35
31. Higgins CF. 1994. Flip-flop: the transmembrane translocation of lipids. *Cell* **79**: 393-395
32. Bolhuis H, van Veen HW, Poolman B, Driessen AJ, Konings WN. 1997. Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS Microbiol Rev* **21**: 55-84
33. Del Poeta G, Stasi R, Aronica G, Venditti A, Cox MC, Bruno A, Buccisano F, Masi M, Tribalto M, Amadori S, Papa G. 1996. Clinical relevance of P-glycoprotein expression in de novo acute myeloid leukaemia. *Blood* **87**: 1997-2004
34. Hunault M, Zhou D, Delmer A, Ramond S, Viguie F, Cadiou M, Perrot JY, Levy V, Rio B, Cymbalista F, Zittoun R, Marie JP. 1997. Multidrug resistance gene expression in acute myeloid leukemia: major prognosis

- significance for in vivo drug resistance to induction treatment. *Ann Hematol* **74**: 65-71
35. Marie JP, Zhou DC, Gurbuxani S, Legrand O, Zittoun R. 1996. MDR/P-glycoprotein in hematological neoplasms. *Eur J Cancer* **32**: 1034-1038
36. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. 1987. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 265-269
37. Sugawara I, Kataoka I, Morishita Y, Hamada H, Tsuruo T, Itoyama S, Mori S. 1988. Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16. *Cancer Res* **48**: 1926-1929
38. Chaudhary PM, Roninson IB. 1991. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* **66**: 85-94.
39. Drach D, Zhao S, Drach J, Mahadevia R, Gattlinger C, Huber H, Andreeff M. 1992. Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype. *Blood* **80**: 2729-2734

40. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. 2000. A family of drug transporter: the multidrug resistance associated proteins *J Nat Canc Inst* **92**: 1295-1302
41. Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler D. 1996. Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res* **56**: 988-994
42. Holló Z, Homolya L, Hegedűs T, Sarkadi B. 1996. Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells. *FEBS Letters* **383**: 99-104
43. Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SP, Deeley RG, Keppler D. 1994. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem* **269**: 27807-27810
44. Nooter K, Westerman AM, Flens MJ, Zaman GJ, Scheper RJ, van Windenger, KE, Burger H, Oostrum R, Boersma T, Sonneveld P. 1995. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers. *Clin Cancer Res* **1**: 1301-1310
45. Nooter K, Burger H, Stoter G. 1996. Multidrug resistance-associated protein (MRP) in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* **20**: 381-387

46. Legrand O, Simonin G, Beauchamp-Nicoud A, Zittoun R, Marie JP. 1999. Simultaneous activity of MRP1 and Pgp is correlated with in vitro resistance to daunorubicin and with in vivo resistance in adult acute myeloid leukemia. *Blood* **94**: 1046-1056
47. Legrand O, Simonin G, Perrot JY, Zittoun R, Marie JP. 1999. Both Pgp and MRP1 activities using calcein-AM contribute to drug resistance in AML. *Adv Exp Med Biol* **457**: 161-175.
48. Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R, Keppler D. 1996. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* **23**: 1061-1066
49. Ross DD, Karp JE, Chen TT, Doyle LA. 2000. Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood* **96**: 365-368.
50. Ross DD. 2000. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia* **14**: 467-473
51. Ozvegy L, Litman T, Szakacs G, Nagy Z, Bates S, Varadi A, Sarkadi B. 2001. Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun* **285**: 111-117

52. Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD, Miyake K, Resau JH, Bates SE. 2000. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci* **113**: 2011-2021
53. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH. 2001. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* **61**: 3458-3464
54. Pall G, Spitaler M, Hofmann J, Thaler J, Ludescher C. 1997. Multidrug resistance in acute leukemia: a comparison of different diagnostic methods. *Leukemia* **11**: 1067-1072
55. Chevillard S, Vielh P, Validire P, Marie JP, Faussat AM, Barbu V, Bayle C, Benard J, Bonnal C, Boutonnat J, Calvo F, Charrier J, Clary A, Colosetti P, Danel-Moore L, Decremoux P, Delvincourt C, Finat-Duclos F, Genne P, Kataki A, Kouyoumdjian JC, Lacave R, Maugard C, Merlin JL, Robert J. 1997. French multicentric evaluation of mdr1 gene expression by RT-PCR in leukemia and solid tumours. Standardization of RT-PCR and preliminary comparisons between RT-PCR and immunohistochemistry in solid tumours. French Network of the Drug

- Resistance Intergroup, and Drug Resistance Network of Assistance Publique-Hopitaux de Paris. *Leukemia* **11**: 1095-1096
56. Okochi E, Iwahashi T, Tsuruo T. 1997. Monoclonal antibodies specific for P-glycoprotein. *Leukemia* **11**: 1119-1123
57. Lehne G, De Angelis P, Clausen OP, Egeland T, Tsuruo T, Rugstad HE. 1995. Binding diversity of antibodies against external and internal epitopes of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein. *Cytometry* **20**: 228-237
58. Filipits M, Suchomel RW, Lechner K, Pirker R. 1997. Immunocytochemical detection of the multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein in acute myeloid leukaemia: impact of antibodies, sample source and disease status. *Leukaemia* **11**: 1073-1077
59. Goda K, Nagy H, Bene L, Balázs A, Arceci R, Mechetner E, Szabó G. 2000. Conformational heterogeneity of P-glycoprotein. *Cancer Detect Prev* **24**: 415-421
60. Nagy H, Goda K, Arceci R, Cianfriglia M, Mechetner E, Szabó G. 2001. P-Glycoprotein conformational changes detected by antibody competition. *Eur J Biochem* **268**: 2416-2420
61. Broxterman HJ, Sonneveld P, Feller N, Ossenkoppele GJ, Wahrer DCR, Eekman CA, Schoester M, Lankelma J, Pineda HM, Lowenberg B,

- Schuurhuis GJ. 1996. Quality control of multidrug resistance assays in adult acute leukaemia: correlation between assays for P-glycoprotein expression and activity. *Blood* **87**: 4809-4816
62. Feller N, Kuiper CM, Lankelma J, Ruhdal JK, Scheper RJ, Pinedo HM, Broxterman HJ. 1995. Functional detection of MDR1/P170 and MRP/P190-mediated multidrug resistance in tumour cells by flow cytometry. *Br J Cancer* **72**: 543-549
63. Holló Zs, Homolya L, Hegedűs, T, Müller M, Szakács G, Jakab K., Antal F, Sarkadi B. 1998. Parallel functional and immunological detection of human multidrug resistance proteins, P-glycoprotein and MRP1. *Anticancer Res* **18**: 2981-2987
64. Lamy T, Drenou B, Grulois I, Fardel O, Jacquelinet C, Goasguen J, Dauriac C, Amiot I, Bernard M, Fauchet R, Le Prise PY. 1995. Multi-drug resistance (MDR) activity in acute leukaemia determined by rhodamin 123 efflux assay. *Leukemia* **9**: 1549-1555
65. Bosch I, Crankshaw CL, Piwnica-Worms D, Croop JM. 1997. Characterization of functional assays of multidrug resistance P-glycoprotein transport activity. *Leukemia* **11**: 1131-1137
66. Lacombe F, Durrieu F, Briais A, Dumain P, Belloc F, Bascans E, Reiffers J, Boisseau MR, Bernard P. 1997. Flow cytometry CD45 gating

for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia* **11**: 1878-1886

67. Gratama JW, D'hautcourt JL, Mandy F, Rothe G, Barnett D, Janossy G, Papa S, Schmitz G, Lenkei R. 1998. Flow cytometric quantitation of immunofluorescence intensity: problems and perspectives. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry* **33**: 166-178
68. Holló Zs, Homolya L, Davis CW, Sarkadi B. 1994. Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochim Biophys Acta*, **1191**: 384-388
69. Homolya L, Holló Zs, Müller M, Mechetner EB, Sarkadi B. 1996. A new method for a quantitative assessment of P-glycoprotein-related multidrug resistance in tumour cells. *Br J Cancer* **73**: 849-855.
70. Szakács G, Jakab K, Antal F, Sarkadi B. 1998. Diagnostics of multidrug resistance in cancer. *Pathol Oncol Res* **4**: 251-257
71. Legrand O, Simonin G, Perrot JY, Zittoun R, Marie JP. 1998. Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. *Blood* **91**: 4480-4488
72. Olson DP, Taylor BJ, Ivy SP. 2001. Detection of MRP functional activity: calcein AM but not BCECF AM as a Multidrug Resistance-related Protein (MRP1) substrate. *Cytometry* **46**: 105-113

73. Pizzolo G, Vincenzi C, Nadali G, Veneri D, Vinante F, Chilosi M, Basso G, Connely MC, Janossy G. 1994. Detection of membrane and intracellular antigens by flow cytometry following Ortho Permefix fixation. *Leukemia* **8**: 672-676
74. Van Lochem EG, Groeneveld K, Te Marvelde JG, van den Beemd MW, Hooijkaas H, van Dongen JJ. 1997. Flow cytometric detection of intracellular antigens for immunophenotyping of normal and malignant leukocytes: testing of a new fixation-permeabilization solution. *Leukemia* **11**: 2208-2210
75. Macey MG, McCarthy DA, Milne T, Cavenagh JD, Newland AC. 1999. Comparative study of five commercial reagents for preparing normal and leukemic lymphocytes for immunophenotypic analysis by flow cytometry. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* **38**: 153-160
76. Khalidi HS, Medeiros LJ, Chang KL, Brynes RK, Slovak ML, Arber DA. 1998. The immunophenotype of adult acute myeloid leukemia: high frequency of lymphoid antigen expression and comparison of immunophenotype, French-American-British classification, and karyotypic abnormalities. *Am J Clin Pathol* **109**: 211-220
77. del Canizo MC, San Miguel JF, Gonzalez M, Anta JP, Orfao A, Lopez-Borrasca A. 1987. Discrepancies between morphologic, cytochemical,

and immunologic characteristics in acute myeloblastic leukemia. *Am J Clin Pathol* **88**: 38-42

78. Laszik Z, Jansen PJ, Cummings RD, Tedder TF, McEver RP, Moore KL. 1996. P-selectin glycoprotein ligand is broadly expressed in cells of myeloid lymphoid and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood* **88**: 3010-3021
79. Tracey JB, Rinder HM. 1996. Characterization of the P-selectin ligand on human hematopoietic progenitors *Exp Hematol* **24**: 1494-1500
80. Vila L, Thomas X, Campos L, Sabido O, Archimbaud E. 1995. Expression of VLA molecules on acute leukemia cells: relationship with disease characteristics. *Exp Hematol* **23**: 514-518
81. Fergedal M, Astrom M, Tidefelt U, Karlsson MG. 1998. Differences in CD14 and alpha-naphthyl acetate esterase positivity and relation to prognosis in AML. *Leuk Res* **22**: 25-30
82. Tisone JA, Bohman JE, Theil KS, Brandt JT. 1997. Aberrant expression of CD19 as a marker of monocytic lineage in acute myelogenous leukemia. *Am J Clin Pathol* **107**: 283-291
83. Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF. 1987. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukemia. *Nature* **328**: 342-344

84. Verfaillie CM, McCarthy JB, McGlave PB. 1992 Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* **90**: 1232-1241
85. Li F, Wilkins PP, Crawley S, Weinstein J, Cummings RD, McEver RP. 1996. Post-translational modifications of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P- and E-szelektin. *J Biol Chem* **271**: 3255-3264
86. De Moerloose B, Dhooge C, Philippe J. 1999. Discordance of P-glycoprotein expression and function in acute leukemia. *Adv Exp Med Biol* **457**: 107-118
87. Lizard G, Maynadie M, Roignot P, Lizard-Nacol S, Poupon MF. 1995. Evaluation of multidrug resistant phenotype by flow cytometry with monoclonal antibodies and functional tests. *Bull Cancer* **82**: 211-217
88. Lizard G, Roignot P, Maynadie M, Lizard-Nacol S, Poupon MF, Bordes M. 1995. Flow cytometry evaluation of the multidrug-resistant phenotype with functional tests involving uptake of daunorubicin, Hoechst 33342, or rhodamine 123: a comparative study. *Cancer Detect Prev* **19**: 527-534
89. Brugger D, Herbart H, Gekeler V, Seitz G, Liu C, Klingebiel T, Orlikowsky T, Einsele H, Denzlinger C, Bader P, Niethammer D, Beck

- JF. 1999. Functional analysis of P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein related multidrug resistance in AML-blasts. *Leuk Res* **23**: 467-475
90. Sonneveld P, Wiemer E. 1997. Assays for the analysis of P-glycoprotein in acute myeloid leukemia and CD34 subsets of AML blasts. *Leukemia* **11**: 1160-1165
91. Suarez L, Vidriales B, Garcia-Larana J, Lopez A, Mediavilla JD, Martin-Reina V, Tormo M, Gonzalez-San Miguel JD, Lavilla E, Garcia-Boyero R, Orfao A, San Miguel JF. 2001. Multiparametric analysis of apoptotic and multi-drug resistance phenotype in elderly patients with acute myeloid leukemia according to the blast cell maturation stage. *Haematologica* **86**: 1287-1295
92. van den Heuvel-Eibrink MM, Wiemer EA, de Boevere MJ, van der Holt B, Vossebeld PJ, Pieters R, Sonneveld P. 2001. MDR1 gene-related clonal selection and P-glycoprotein function and expression in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* **97**: 3605-3611.
93. Tafuri A, Gregorj C, Petrucci MT, Ricciardi MR, Mancini M, Cimino G, Mecucci C, Tedeschi A, Fioritoni G, Ferrara F, Di Raimondo F, Gallo E, Liso V, Fabbiano F, Cascavilla N, Pizzolo G, Camera A, Pane F, Lanza F, Cilloni D, Annino L, Vitale A, Vegna ML, Vignetti M, Foa R,

Mandelli F. 2002. MDR1 protein expression is an independent predictor of complete remission in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **100**: 974-981.

94. Tsimberidou AM, Paterakis G, Androutsos G, Anagnostopoulos N, Galanopoulos A, Kalmantis T, Meletis J, Rombos Y, Sagriotis A, Symeonidis A, Tiniakou M, Zoumbos N, Yataganas X. 2002. Evaluation of the clinical relevance of the expression and function of P-glycoprotein, multidrug resistance protein and lung resistance protein in patients with primary acute myelogenous leukemia. *Leuk Res* **26**: 143-154.
95. Beck WT, Grogan TM, Willman CL, Cordon-cardo C, Parham DM, Kuttish JF, Andreff M, Bates SE, Berard CW, Boyett JM, Brophy NA, Broxterman HJ, Chan HSL, Dalton WS, Dietel M, Fojo AT, Gascoyne RD, Head D, Houghton PJ, Srivastava DK, Lehnert M, Leith CP, Paietta E, Pavelic ZP, Rimsza L, Roninson IB, Sikic BI, Twentyman PR, Warnke R, Weinstein R. 1996. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations. *Cancer Res* **56**: 3010-3020
96. Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Eijdem L, Slovak ML, McConnell TS, Head DR, Weick J, Grever MR, Appelbaum FR, Willman CL. 1999.

Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* **94**: 1086-1099.

97. Leith CP, Chen IM, Kopecky KJ, Appelbaum FR, Head DR, Godwin JE, Weick JK, Willman CL. 1995. Correlation of multidrug resistance (MDR1) protein expression with functional dye/drug efflux in acute myeloid leukaemia by multiparameter flow cytometry: identification of discordant MDR-/efflux+ and MDR1+/efflux- cases. *Blood* **86**: 2329-2342

A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ MUNKÁK JEGYZÉKE:

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

A tézisekben fel nem használt egyéb tudományos munkák jegyzéke:

1. Szondy Zs, Reichert U, Bernardon JM, Michel S, Tóth R, **Karászi É**, Fésüs L: Inhibition of activation-induced apoptosis of thymocytes by all-*trans* and 9-*cis* retinoic acids is mediated via retinoic acid receptor alpha *Biochem J* 1998; 331: 767-774 IF: 4,28
2. Jakab Zs, Balogh E, **Karászi É**, Kappelmayer J, Kiss Cs, Oláh É: Variant differ from t(4;11)? *Med Ped Oncol* 2002; 39:63-65 IF: 1,301
3. **Karászi É**, Kiss Cs, Jakab Zs, Szegedi I, Hevessy Zs, Kappelmayer J: Gyermekkori akut leukémiák vizsgálata sejtfelszíni markerek és ploiditás alapján *Gyermekgyógyászat*, 1998; 4: 319-329
4. Mezei G, **Karászi É**, Telek B, Ujj Gy, Rejtő L, Kiss A, Rác K, Udvardy M, Rák K: A chronicus lymphoid leukémia biológiája *Magyar Belorvosi Archívum* 2000; 53: 103-107
5. Telek B, Rejtő L, Mezei G, **Karászi É**, Kappelmayer J, Balázs M, Kiss A, Ujj Gy, Rák K, Udvardy M.: Molekuláris biológiai vizsgálatok krónikus lymphoid leukémiában *Orvosi Hetilap* 2001; 142: 833-839