

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**KÓROS THROMBOCYTA-SZÁMMAL VAGY FUNKCIÓVAL JÁRÓ
BETEGSÉGEK KOMPLEX HAEMOSTASEOLOGIAI ÉS
MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI VIZSGÁLATA**

Dr. Rejtő László

Témavezető: Prof. Dr. Udvardy Miklós

**DEBRECENI EGYETEM ORVOS-ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM,
BELGYÓGYÁSZATI INTÉZET
HAEMATOLOGIAI TANSZÉK
DEBRECEN
2004.**

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés	5
Irodalmi előzmények	7
A nagy thrombocyta-számmal járó kórképek elkülönítése - O'Brien-féle filterométer	7
Thrombocyta-eredetű EDRF-NO nagy thrombocyta-számmal járó krónikus myeloproliferatív betegségekből NO a thrombocytákban	9 9
Fokozott thrombocyta-aktivációra és vascularis szövődményekre utaló laboratóriumi vizsgálatok - poszttranszplantációs diabetes mellitus	11
Fluoreszcencia in situ hibridizáció (FISH) és összehasonlító genom-hibridizáció (CGH) jelentősége haematologiai kórképekben	14
Célkitűzések	19
Betegek és módszerek	21
A „shear-dependens” thrombocyta-aggregatio	21
A vérlemezkék NO termelésének vizsgálata	22
Poszttranszplantációs diabetes mellitusban végzett laboratóriumi vizsgálatok	24
PAI-1 mérés	24
tPA mérés	24
Beta-thromboglobulin meghatározás	24
sTM mérés	24
Az endothelium NO-termelése	25
A teljes antioxidáns státusz	25
Összehasonlító genomiális hibridizáció (CGH)	26
Digitális image analízis	27
Fluoreszcencia in situ hibridizáció (FISH)	27

Eredmények	32
A primer és szekunder thrombocytosisok vizsgálata O'Brien-féle filterométerrel	32
A thrombocyták NO-termelésének vizsgálata nagy thrombocyta-számmal járó krónikus myeloproliferatív kórképekben	37
Poszttranszplantációs diabetes mellitusban végzett vizsgálatok	39
A CGH vizsgálatok eredményei	44
A FISH-vizsgálatok eredményei	44
Fontosabb megállapítások	61
Összefoglalás	67
Irodalmi hivatkozások	70
A tézisekhez felhasznált közlemények jegyzéke	85
Egyéb, a tézisekhez szorosan nem kapcsolódó közlemények	86
A tézisekhez kapcsolódó, első szerzőként bemutatott kongresszusi anyagok	89
Nemzetközi folyóiratban megjelent, idézhető absztraktok	91
Köszönetnyilvánítás	92
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai	93

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:

ALL: akut (heveny) lymphoid leukaemia

AML: akut (heveny) myeloid leukaemia

AA: arachidon sav

ADP: adenosin-diphosphat

ADR: adrenalin

β -TG: béta-thromboglobulin

BMT: csontvelő átültetés

CGH: összehasonlító genom-hibridizáció

CCR: komplett citogenetikai remisszió

CHR: komplett haematologiai remisszió

CG: citogenetika

CLL: krónikus lymphoid leukaemia

CML: krónikus myeloid leukaemia

COLL: kollagén

CyA: cyclosporin A

DMPS: dysmyelopoetikus syndroma

ecNOS : endothelialis calmodulin dependens NO szintetáz enzim

EDRF/NO: endothelium eredetű relaxáló faktor/nitrogén-monoxid

ET: essentialis thrombocythaemia

FISH: fluoreszcencia in situ hibridizáció

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

HU: hidroxürea

iNOS: indukálható NO szintetáz enzim

INF: interferon-alfa

KMB: krónikus myeloproliferatív betegség

L-NAME: nitro-L-arginine-metilészter

L-NNA : L-nitro-L-arginine

MP: myeloproliferatív

MCR: major citogenetikai válasz

PAI-I: plasminogen-aktivátor inhibitor-1

Ph: Philadelphia kromoszóma

PHR: részleges haematologiai remisszió

PRV: polycythaemia rubra vera

PTDM: poszttranszplantációs diabetes mellitus

R-I: az első öt másodperc során észlelt thrombocytá-retenció

R-II: a 20.- és 40. másodperc között észlelt thrombocytá-retenció

RM: ristomycin

RT: reaktív thrombocytosis

SNAP: N-acetyl-DL-penicillamine

TAS: teljes antioxidáns kapacitás

Thr: thrombocytá

TM: thrombomodulin; (sTM: solubilis TM)

vWF Ag: von Willebrand antigén

BEVEZETÉS

Különböző betegségek és állapotok eredményezhetnek kóros thrombocytaműködést. A megváltozott vérlemezke-funkciónak később jelentősége lehet az alapbetegség progrediálásában és pathogenesisében is. Máskor, pl. krónikus myeloproliferatív megbetegedésekben (KMB), az enormisan nagy thrombocyta-szám tűnhet a (haemorrhagiás vagy thrombotikus) szövődmények legfontosabb tényezőjének. A kóros thrombocyta-funkció (szerzett thrombocytopathia) legtöbbször ilyenkor is kimutatható, sőt a klinikum is sugallhatja ezt.

Bizonyos betegségekben és állapotokban (pl. nagy thrombocyta-számmal járó myeloproliferatív kórképek-és reaktív thrombocytosisok, diabetes mellitus, poszttranszplantációs diabetes mellitus) a feltételezhető, vagy már bizonyított haemostasis-rendellenességek vizsgálata elméleti jelentőségén túlmenően fontos gyakorlati konzekvenciákat hordozhat. A nagy thrombocyta-számmal járó kórképek, myeloproliferatív és más proliferatív haematologiai betegségek genetikai vizsgálatának szintén nagy gyakorlati jelentősége van: diagnosztikai-és differenciális diagnosztikai szerepük mellett a terápia monitorizálásában és a betegek követésében való alkalmazásuk ma már nem vitatható.

A nagy thrombocyta-számmal járó állapotok vizsgálatára az irodalomból különféle laboratóriumi módszerek ismeretesek, amelyek megkönnyíthetik a primer és szekunder thrombocytosisok elkülönítését. Kellően megbízható és szűrővizsgálati tesztként is alkalmazható módszer azonban nem szerepel az ajánlások között. Újabb lehetőség e két, alapvetően különböző állapot elkülönítésére a „shear”-indukálta thrombocyta-aggregatio (PFA-val, vagy O'Brien-féle filterométerrel való) vizsgálata. E PhD értekezésben az O'Brien - féle filterométer lehetséges szerepét és diagnosztikai előnyét elemeztem a korábban alkalmazható laboratóriumi vizsgálatokkal szemben. Lehetőségeink később kiegészültek egyéb, a haemostasis-működése szempontjából fontos további paraméterek (NO-termelés, újabban F XIII) vizsgálatával is. Más, szintén kóros thrombocyta-működéssel járó állapotok közül

diabetes mellitusban és veseátültetést követően az immunszuppressziós kezelés szövődményeként kialakuló poszttranszplantációs diabetesben vizsgáltuk az in vivo thrombocyta-aktivációt jelző β -thromboglobulin és más, fontos haemostasis-paraméterek (pl. a solubilis thrombomodulin) plazma-szintjét. Vizsgáltuk az egyes laboratóriumi értékek közötti, valamint a releváns labor-és klinikai adatok közötti összefüggéseket. Végül, hazánkban talán az elsők között szerezhettem tapasztalatokat bizonyos molekuláris biológiai (pl. FISH) vizsgálatok gyakorlati alkalmazhatóságáról krónikus myeloproliferatív betegségekben, elsősorban a CML-ben. E vizsgálatokat természetes módon más malignus haematologiai kórképekben is alkalmaztuk. Ez utóbbi vizsgálataim azon törekvésekhez kívánnak kiegészítő adatokat szolgáltatni, amelyek a rosszindulatú vérképzőszervi-betegségek hatékonyabb kezelését és jobb követését szolgálják.

A fentieknek megfelelően az értekezés több alfejezetre, mégis alapvetően két fő részre bontható: a nagy thrombocyta-számmal, vagy kóros vérlemezke-funkcióval jellemezhető kórképek, állapotok haemostasis vizsgálataira, valamint a myeloproliferatív (és ezért kóros thrombocyta-funkcióval jellemezhető) és más proliferatív haematologiai betegségek molekuláris biológiai vizsgálatára.

IRODALMI ELŐZMÉNYEK

Ebben a részben rövid áttekintést adok a primer és szekunder thrombocytosisok differenciális diagnosztikájában jól alkalmazható O'Brien féle filter-tesztről, az intravascularisan képződő NO jelentőségéről, s utalok a nagy thrombocyta-számmal járó krónikus myeloproliferatív betegségekben a thrombocytákban képződött (feltehetőleg csökkent mennyiségű) NO szerepére a thrombotikus szövődmények kialakulásának vonatkozásában. Röviden említésre kerül a hyperglycaemia - érszövődmények - fokozott thrombocyta-aktiváció kapcsolata, ill. a vizsgálatokra alkalmazható laboratóriumi paraméterek, majd szó esik a poszttranszplantációs diabetes mellitus - fokozott cardiovascularis mortalitás - immunszuppressziós kezelés - haemostasis rendellenességek kapcsolatáról. Végül a rosszindulatú haematologiai betegségekben mind nagyobb szerepet kapó CGH és FISH vizsgálatokról lesz szó.

A nagy thrombocyta-számmal járó kórképek elkülönítése - O'Brien-féle filterométer

Krónikus myeloproliferatív betegségben (KMB), (krónikus myeloid leukaemia /CML/, polycythaemia rubra vera /PRV/, myelofibrosis, essentialis thrombocythaemia /ET/) viszonylag gyakran észlelhető kórosan nagy ($400 \times 10^9/L$ feletti) thrombocyta-szám (primer thrombocytosis), amely ET-ben a betegség lényegét képezi (1, 2, 3). A thrombocyták mennyiségi, s igen gyakran minőségi zavarai nem ritkán okoznak vérzéses vagy thrombotikus komplikációkat (2, 4, 5). Myeloproliferatív betegségektől függetlenül, más állapotokhoz társulva - másodlagosan - is előfordul thrombocytosis (pl. infekciókban, krónikus gyulladásos betegségekben, vashiányban, rosszindulatú betegségekben, splenectomia után) (2), ekkor beszélünk reaktív, vagy szekunder thrombocytosisról.

A primer és szekunder thrombocytosisok elkülönítése sokszor nem könnyű. Többfajta laboratóriumi vizsgálat ismeretes (pl. vvs. süllyedés, thrombocyt-aggregatio, vérzés-idő, fibrinogén, interleukin 1 -és 6, C-reaktív protein, von Willebrand antigén szintek), amelyek segítséget jelenthetnek e két, alapvetően különböző állapot elkülönítésében (2, 3, 6). Az eddig ismert, s könnyen elvégezhető tesztek azonban nem kellően szenzitívek. Újabb lehetőség a nagy nyíróerejű áramlási viszonyokat modellező PFA-100 (Platelet function analyzer) (7) és az O'Brien-féle filterométer (8, 9).

Az O'Brien-féle filter-teszt alkalmazásával (8, 9) állandó nyomást biztosító levegőpumpa segítségével (40 Hgmm nyomáson) áramoltatunk át alvadásgátolt vért finom üvegszálból álló (5-10 μm -es pórusnagyságú) filteren. A vizsgálat során a turbulens (nagy nyíróerejű) áramlás következtében kialakuló, döntően fizikai folyamat („high-shear”) indukálta thrombocyt-aktiváció vizsgálható. A vérlemezke-aktiváció és a thrombocyt-thrombus képződés, azaz a filter-teszt eredményének szempontjából a GPIIb/IIIa, a GPIb thrombocyt-membránfehérjék funkciójának és a vWF-nak kiemelkedő szerepe van. Myeloproliferatív betegségekben (a szerzett thrombocytopathia következtében) a GPIIb/IIIa és GPIb funkció várhatóan sérült. Logikus ezért, hogy a nagy thrombocyt-számmal járó állapotok (primer myeloproliferatív és szekunder thrombocytosisok) high-shear körülmények között végzett thrombocyt-aktiváció vizsgálatával valószínűleg megkülönböztethetőek.

Thrombocyta-eredetű EDRF-NO nagy thrombocyta-számmal járó krónikus myeloproliferatív betegségekben

Az L-arginin - NO metabolikus útvonal során felszabaduló EDRF/NO (NO) egy lipophil, igen diffusibilis, rövid féléletidejű, s ezért nehezen mérhető szabad gyök. A guanylate cyclase aktiválásán keresztül emeli a cGMP szintet, amely az intracelluláris Ca-szint csökkenéséhez vezet. Számos fiziológiai és patofiziológiai folyamatban vesz részt.

Az endotheliumból származó NO vasodilatator jellege révén szabályozza az értónust, befolyásolja a vérnyomást, a vér alakos elemeinek interakcióját és érfalhoz való kötődésüket. Antithrombotikus hatásához thrombocyta aktivációt gátló hatása is hozzájárul (40). Az intravasculáris NO szintézis mértéke csökkent pl. diabetes mellitusban, amely döntően az endothelialis L-arginin felhasználási zavar következménye lehet (20, 21, 22). Ennek a jelenségnek valószínűleg szerepe van a diabeteses angiopathia kialakulásában is (20, 21, 22). Az L-arginin- NO metabolikus útvonal eltéréseinek szerepe más betegségek (pl. hypertonia, szeptikus sokk, hypercholesterinaemia, accelerált atherogenesis) pathogenesisében is feltételezhető (23).

Az NO keletkezését az NO-szintáz katalizálja, amelynek ma már számos izoenzime ismert, mégis, alapvetően két fő típusa van, a konstitutív és az indukálható.

NO a thrombocytákban

Az endotheliumból származó NO fontos szerepet játszik a thrombocyta adhaesio és aggregatio gátlásában. Egyre több adat utal arra, hogy az L-arginine - NO metabolikus útvonal magukban a thrombocytákban is megtalálható, amely szintén gátolja a thrombocyták aktivációját és aggregációját (24, 25, 26). Eddigi ismereteink alapján a thrombocyták az NO synthase (NOS) két izoformájával rendelkeznek: a calcium independens, indukálható NOS-sal (iNOS) és a calcium/calmodulin dependens endothel-típusu NOS-sal (ecNOS), amelyek a thrombocyták aktiválódása és aggregációja során aktiválódnak (25, 26).

Míg nyugalmi körülmények között a thrombocytákra gátló hatást kifejtő NO az endotheliumból származik, addig az endothelium sérülésével és a thrombocyták aktiválódásával járó állapotokban a thrombocyta-eredetű NO szintén fontos szerepet játszhat a vérlemezkék további aktiválódásának, kitapadásának, aggregatiojának gátlásában (27, 28, 29, 30).

A thrombocyták NO-képzése mennyiségét tekintve rendkívül csekély, mérésére speciális NO-szenzitív elektród alkalmazására van szükség (31, 32, 33). A nyugvó thrombocyták nem termelnek számottevő mennyiségben NO-t, aktiválódásuk (pl. kollagén-inger) során azonban NO képződik (29). Más thrombocyta-aggregatiót előidéző szerek szintén képesek (változó mértékű) thrombocyta-NO indukcióra (28).

Kis számú klinikai megfigyelés alapján a thrombocyták NO termelése essentialis hypertoniában, migraine-ben, diabetes mellitusban, súlyos coronariasclerosisban csökkenhet, míg uraemiában fokozott (30, 33, 34, 35). Tudomásunk szerint krónikus myeloproliferatív betegségekben a thrombocyták NO termelését még nem vizsgálták.

Nagy thrombocyta-számmal járó krónikus myeloproliferatív betegségekben vérzéses és thrombotikus szövődmények egyaránt előfordulhatnak (4, 5). Leggyakrabban a végtagok és a központi idegrendszer keringési zavarával találkozunk, de a folyamat bármely szervet, szervrendszert érintheti. Gyakoriak a szokatlan helyen fellépő artériás és vénás thrombosisok, pl. a v. portae, vagy mesenterica-rendszert (artériás és vénás oldalt egyaránt) érintő folyamatok. A betegek panaszai sokrétűek lehetnek, többnyire fejfájásra, szédülésre, kéz- és lábujjsibbadásra panaszkodnak, de időnként komolyabb panaszok is előfordulnak, a végtagok lividdé válhatnak, intenzívebb fejfájás léphet fel, akár fatális kimenetelű agyi katasztrófa is kialakulhat (36, 37, 38). A thrombotikus szövődmények multifaktoriálisak, kialakulásukhoz kvalitatív és kvantitatív thrombocyta-anomáliák is hozzájárulhatnak (39). Ezek közül az egyik tényező az intravascularis, thrombocyta-eredetű EDRF-NO termelés zavara is lehet.

Fokozott thrombocyt-aktivációra és vascularis szövődményekre utaló laboratóriumi vizsgálatok - poszttranszplantációs diabetes mellitus

A diabeteses érszövődmények kialakulásának legfontosabb oka az emelkedett vércukorszint (54). A hyperglykaemia önmagában is atherogen, más rizikófaktorral nem rendelkező cukorbetegekben is gyakoribbá teszi az angiopathia előfordulását. Károsítja az endotheliumot, elősegíti az atherogénebb, oxidált LDL kialakulását és érfalba történő lerakódását (41). Normoglykaemiára kell ezért törekedni; azonban még rendezett szénhidrát-háztartás esetén is számos metabolikus eltérés mutatható ki, amelyek az érszövődmények kialakulását segítik.

Diabetes mellitusban a vérlemezkék anyagcseréje megváltozik. Nagyobb mennyiségben termelnek thrombocyt-eredetű növekedési faktort, arachidonsav-anyagcseréjük fokozott ütemű, megnövekedett thromboxan-képzésük és érzékenységük. Erőteljesebb a thrombocyt-adhesio és aggregatio, felületükön több GPIIb és GPIIb/IIIa (fibrinogén kötő) receptort hordoznak (8, 42, 43, 44). A thrombocyták α -denz granulumaiból (a vérlemezkék aktiválódása során) felszabaduló béta-thromboglobulin (β -TG) plazma-szintje a thrombocyt-aktiváció mértékét jelzi. A β -TG szint 1-es és 2-es típusú diabeteses betegekben egyaránt emelkedett, (erről korábbi munkánkban mi is beszámoltunk) (20, 21, 45).

A fokozott thrombocyt-aktiváció és a microvascularis szövődmények kapcsolata elfogadott, bár kérdéses lehet, hogy mi az elsődleges eltérés, a fokozott thrombocyt-aktivitás, vagy az angiopathia, azaz a fokozott thrombocyt-működés oknak, vagy következménynek tartható (46). Ismeretes, hogy mérsékelt thrombocyt-hiperfunkció érszövődmények hiányában is kimutatható, a már kialakult érszövődmények viszont fokozott vérlemezke-aktivációt eredményeznek (47).

A nagyobb (intra- és extracelluláris) glucose-szint az oxidatív folyamatok fokozódásához vezet (21, 45, 48). A prooxidáns és antioxidáns tényezők aránya az előbbieket irányába tolódik el, amely fokozott lipidperoxidációt (oxidatív stressz) eredményez (49). A fokozott szabadgyök-képződés kimutatható a betegek plazmájából és különböző sejteiből egyaránt (48, 49, 50, 51, 52). A felszaporodó szabadgyökök közül a reaktív oxigén-gyökök és szuperoxid-anionok a legfontosabbak. A nagyobb mennyiségben termelődő szabadgyökök a szervezet antioxidáns védekező rendszerének kimerítése után a szervezet saját molekuláit, sejteit károsítják (53).

A fokozott lipidperoxidáció elősegíti az oxidált LDL kialakulását, fokozza annak mennyiségét, s így elsősorban a macroangiopathia kialakulásában van szerepe, de hozzájárul a mikrocirkuláció romlásához is (55). A lipidperoxidációra a plazma totális antioxidáns kapacitásának (TAS) méréséből következtethetünk (56).

Sokáig csak feltételezték, majd az utóbbi években (amint fent már jeleztük) klinikai vizsgálatokban is igazolták, hogy diabetes mellitusban az endothelium-károsodás következtében kevesebb vasculáris EDRF-NO képződik, amelynek fontos szerepe lehet az angiopathia kialakulásában (20, 21, 23). A humán tapasztalatok még mindig hiányosak. Érdekes és fontos lehet ezért az endotheliális EDRF-NO produkció, valamint az endothel-sérülés és az in vivo thrombocyt-aktiváció vizsgálata.

Az endothelium-károsodás megítélése céljából gyakran vizsgált laboratóriumi paraméter a von Willebrand faktor és a solubilis thrombomodulin plazmatikus szintje.

A Willebrand-faktornak a plazmában mérhető szintjét az endothel-sejtek károsodásának korai és egyik legjobb markerének tekintik (46, 57). Plazma-szintje diabetes mellitusban és más, endothel-sérüléssel járó állapotban (pl. atherosclerosisban, vagy hipertensio, hypercholesterinaemia, dohányzás, etc. esetén) általában magasabb.

A thrombomodulin (TM) az endothel-sejtek felszínén, sejthártyáján elhelyezkedő glycoprotein. A thrombin receptoraként, azzal 1:1 arányú komplexet képezve gátolja a thrombin coagulációs aktivitását. A thrombin ebben a formában nagy sebességgel, kb. 1000-szer gyorsabban aktiválja a protein C-t, mint önmagában, ugyanakkor képtelen az V -és VIII-faktorok, valamint a thrombocták

aktiválására. Ily módon a TM alapvetően megváltoztatja a thrombin hatásait, az eredendően procoagulans természetű protease-t anticoagulanssá alakítja. Ezen komplex hatásokon keresztül a TM az intravasculáris coagulatio egyik regulátorának tekinthető (58).

A TM solubilis formában is megtalálható a szervezetben, s így a szérumban, is kimutatható. Mivel a vasculáris endothelium-károsodás során jelentős mennyiségű TM szabadulhat fel, ezért a solubilis TM-t (sTM) az ér-endothelium károsodás újabb markerének tekintik (58).

Szervtranszplantációt követően a beültetett graft túlélését, a betegek életkilátásait korábban döntően az immunrejection szabta meg. A modern immunsuppressziós kezelés bevezetése, mindenekeelőtt a ciklosporin A (CyA) széleskörű klinikai alkalmazása óta a kilöködések száma jelentősen csökkent, ugyanakkor gyakoribbakká váltak a cardiovascularis szövődmények (59, 60, 61). Az egészséges populációhoz képest vesetranszplantáció után (más szervek átültetéséhez hasonlóan) lényegesen (mintegy 5-7-szer) nagyobb cardiovascularis mortalitás észlelhető (62, 63, 64). Gyakori az inzulin-rezisztencia, a dyslipidaemia. Összességében a metabolikus X szindrómához hasonló eltérések, tüneti metabolikus szindróma kialakulása figyelhető meg (65).

Ismert irodalmi adat, hogy veseátültetés után (az immunsuppressziós kezelés következtében) nagyobb PAI-1 aktivitás és hypofibrinolysis észlelhető. A sérült intimában (lokálisan is) fokozott PAI-I expresszió észlelhető (59, 66, 67). A fokozott atherosclerosis és thrombosis-hajlam (amelyhez a csökkent fibrinolysis jelentősen hozzájárul) a két legfontosabb oka a vesetranszplantáltak morbiditásának. Elfogadott, hogy a PAI-I -nek fontos szerepe van a vesék vasculáris rejectiója során a jellegzetes kis ér thrombosisok kialakulásában, a vesék irreversibilis károsodásában, a krónikus graft-elégtelenség kialakulásában (66, 68, 69, 70).

Korábban hazai szerzők is részletesen vizsgálták veseátültetést követően a (steroidot is tartalmazó) immunsuppressziós kezelés indukálta diabetes mellitusban (poszttranszplantációs diabetes mellitusban - PTDM) a gyakori hypertonia, a vérnyomás kóros circadian ritmusa, valamint a lipid-eltérések és a nagyobb cardiovascularis halálozás közötti összefüggéseket (63, 65, 71, 72, 73, 74, 75). Ugyanakkor nem találtunk irodalmi adatot a poszttranszplantációs diabetesben kialakuló haemostasis-rendellenességekről, annak ellenére, hogy a véralvadást és a

thrombocyták túlzott működését diabetesben rendkívül nagyszámú közlemény elemzi.

Feltételezhető, hogy a haemostasis-rendellenességeknek PTDM-ben is fontos szerepük lehet a gyakoribb cardiovascularis morbiditásban és mortalitásban.

Fluoreszcencia in situ hibridizáció (FISH) és összehasonlító genom-hibridizáció (CGH) jelentősége haematologiai kórképekben

Rosszindulatú betegségekben a daganatos sejtek genomjában létrejött génkárosodások (pl. specifikus transzlokációk, deléciók) alapvető jelentőségűek a tumorok, leukaemiák kialakulásában, a betegségek biológiai viselkedésében és klinikai lefolyásában egyaránt. A specifikus kromoszóma eltérések prognosztikus jelentősége egyre inkább ismertté és elfogadottá vált. (82, 83). Ezáltal a kromoszóma vizsgálat, a krónikus myeloid leukaemiában elfoglalt közismerten fontos szerepe mellett, az elmúlt másfél-két évtizedben egyre jobban beépült a heveny leukaemiás betegek komplex diagnosztikai protokolljába is, s abban a pontosabb klasszifikációt és terápiás algoritmus megválasztását segítő, prognosztikai jelentőségű vizsgálattá vált, amely a betegség hosszabb távú követésében is szerepet kaphat (84, 85, 86, 87, 88, 89).

Egyre több adat utal arra, hogy krónikus lymphoid leukaemiában (CLL) is összefüggés van a citogenetikai eredmény és a klinikai lefolyás között (90, 91), jóllehet, ezeknek az összefüggéseknek a pontos jellemzése még nem történt meg. A CLL leggyakoribb típusában, a B-CLL-ben a 12-es kromoszóma trisomiája, valamint a 13-as, 11-es és 17-es kromoszómák hosszú karjának deletiói a jelenleg ismert és legtöbbször leírt és azonosított citogenetikai eltérések (92, 93, 140). A rendelkezésre álló viszonylag kis számú citogenetikai eredmény ellenére is feltételezhető, hogy a sokszor változatos lefolyású, gyakran kezelés nélkül is hosszú évekig egyensúlyban lévő, máskor intenzív kezelésre is refrakter CLL háttérében különböző, eddig fel nem derített kromoszóma-anomáliák állhatnak. A kromoszóma elváltozásoknak a megbízható kimutatása ezért (a különböző haematologiai kórképekben egyaránt) fontos lehet a prognózis megítélésében, a kezelés megtervezésében, a betegség követésében és sok esetben a helyes diagnózisban felállításában is (94, 95).

A genetikai aberrációkról korábban (az 1980-as évek végéig) a **hagyományos citogenetikai vizsgálatok**kal (kromoszómák kariotípus analízisével) nyertek információt. E módszer napjainkban is értékes, fontos, általában elsőként választott vizsgálat a vérképzőszervi rosszindulatú elváltozások genetikai eltéréseinek kimutatására (94), de vannak korlátai. A klasszikus citogenetikai vizsgálatokhoz metafázisú kromoszóma-preparátumok, azaz a tumorsejtek tenyésztése szükséges. A sejt kultúrában a sejteknek csak azon hányada jut mitózisba, amelyek a sejtpreparálás behatásainak ellenállnak. Így a sejtenyésztés sejtjei a kísérleti körülményeknek ellenálló sejteket, s nem az eredeti leukaemiás populációt reprezentálják. A malignus sejteknek olyan szubpopulációja szelektálódhat, amely nem szükségszerűen jellegzetes magára a tumorra, hanem az adott in vitro körülmények között speciális proliferatív előnye van (96). Limitált a vizsgálható metafázisok száma is. A kis mitotikus aktivitású sejtek (pl. CLL-ben) nehezen vagy nem vizsgálhatóak. Ezeket a hátrányokat oldja fel a meta- és interfázisban lévő sejtek vizsgálatára egyaránt alkalmas interfázisú citogenetika (FISH, CGH), lehetővé téve a sejtek sejtenyésztés nélküli citogenetikai jellemzését. (83, 97, 98, 99, 100).

A klasszikus citogenetikát egyre inkább kiegészítő **FISH-technika** az utóbbi években a genom egyes specifikus régióinak mikroszkópos vizualizálására hatékony és értékes módszernek bizonyult. A vizsgálat során a tárgylemezen fixált target DNS-t (amely egyaránt lehet inter- vagy metafázisban lévő sejt) denaturáljuk (magas hőmérséklet, DNS-denaturáló oldat, megfelelő pH.). A kettős helikális szerkezetű DNS-molekulák ilyen körülmények között szétválaszthatóak, s az ugyancsak denaturált, fluoreszcens festékkel megjelölt, komplementer szekvenciákat tartalmazó DNS-szondát ráhibridizáljuk. (A szondák egy-egy kisebb genom-szakaszt jelenítenek meg). A hibridizációt követően, a felesleges szonda többlépcsős eltávolítása után, a sejtmagokat és a kromoszómákat kéken fluoreszkáló DAPI-val, vagyis DNS-specifikus festékkel jelöljük. A kromoszómák és a sejtmag kék színűek lesznek. A hibridizálódott, fluoreszcens festékkel jelölt DNS-szonda megfelelő mikroszkóp segítségével láthatóvá tehető (101, 102).

A FISH-technika végzésekor legtöbbször DNS locus-és centromera-specifikus szondákat alkalmazunk. A centromera-specifikus szondák segítségével a kromoszómák számbeli eltérései vizsgálhatók. E szondák a kromoszómák centromera-régióihoz (az adott kromoszómára jellemző sokszorosán ismétlődő szakaszokhoz) hibridizálódva nagyméretű fluoreszcens szignál formájában jelzik a

sejtekben a vizsgált kromoszómák számát, (diploid voltát vagy pl. mono-triszomia jelenlétét). Centromera-specifikus szonda ma már mindegyik humán kromoszóma számbeli vizsgálatához rendelkezésre áll. A vizsgálat viszonylag gyors, egyszerű és hasznos mindazon leukaemiák vizsgálatakor, melyekben numerikus kromoszóma-anómia lehetséges. Rossz kromoszóma morfológia (technikailag nehezen értelmezhető G-banding) esetén is jól jelzi az eltéréseket (97, 98, 100, 103, 104). A locus-vagy szekvencia-specifikus szondák a deléciók, amplifikációk, ill. transzlokációk vizsgálatára alkalmasak. Lehetővé teszik a citogenetikai eltérések azonosítását interfázisú sejtekben is, s így kimutathatóak a klasszikus citogenetikával nem felderíthető aberrációk is (105, 106, 107). (Megjegyzendő, hogy a citogenetikai vizsgálatokkal (G-banding) kimutatható eltéréseket FISH-technikával vizsgálva, a citogenetikai vizsgálatnak megfelelő abnormitások FISH-sel is kimutathatóak) (108).

A teljes kromoszómát festő (harmadik típusú, szintén minden emberi kromoszóma vizsgálatára rendelkezésre álló) szondák metafázisban lévő sejtek vizsgálatára alkalmasak. Segítségükkel a strukturális eltérések (deléciók és transzlokációk), valamint a kromoszómák számbeli eltérései tanulmányozhatók (97, 98, 102, 104, 109).

Bármely szondát alkalmazzuk is, a FISH-technika mindig célzott vizsgálatot jelent, azaz specifikus DNS-szondákat alkalmazva már ismert kromoszóma-anomáliák kimutatására vagy kizárására alkalmas.

A FISH-technika előnyei a klinikai haematológiában röviden: A). a leukaemiás sejtek in vitro tenyésztése (manipulálása) nem szükséges, ezért a módszer független a rosszindulatú sejtek proliferációjától, azaz annak mértékétől. B). a diagnosztikus és prognosztikus jelentőségű kromoszóma-anomáliák vizsgálatára is alkalmas DNS-szondák lehetővé teszik a már ismert genetikai eltérések (kromoszómák számbeli és strukturális elváltozásainak) vizsgálatát meta- és interfázisban lévő sejtekben egyaránt. C). felhasználható a genetikai anomáliák monitorizálására a kezelést követően, ill. a betegség lefolyása során. D). a klasszikus citogenetikával nem, vagy nem mindig felderíthető aberrációk is kimutathatóak. E). nagyszámú (200, vagy még több) sejt viszonylag gyors vizsgálatát teszi lehetővé, amely további előrelépést jelenthet, hiszen a konvencionális citogenetikai vizsgálatok alkalmával ritkán kerül sor 25-nél több sejt, 25-nél több metafázis vizsgálatára.

A FISH-technika hátránya, hogy specifikus DNS-szondák szükségesek, csak meghatározott (ismert) eltérések vizsgálatára alkalmas, s egy vizsgálat során általában csak kevés kromoszóma - régió vizsgálható.

Az **összehasonlító genomiális hibridizáció (CGH)** a teljes tumor genomban előforduló genetikai anomáliákat tárja fel egyetlen hibridizáció során. Lehetővé teszi az amplifikált vagy deletált DNS szekvenciák feltérképezését (megabázis szintjén) olyan locusokon is, amelyek aberráns volta a korábbi közlések, információk alapján még nem volt ismert (110, 111). Az amplifikált régiók tartalmazhatnak olyan oncogéneket, míg a deletált régiók jelenthetik olyan oncosuppressor gének teljes vagy részleges elvesztését, amelyek jelenléte, ill. hiánya a leukaemiák kialakulása és progressiója szempontjából fontosak. Az eredmények feltételezhetően lehetővé teszik ugyanazon betegből származó leukaemiás sejtek összehasonlítását a betegség különböző stádiumaiban, s így módon fény derülhet bizonyos genetikai változásokra a betegség progressiója során. A CGH (a FISH-hez hasonlóan) in vitro sejt kultúrák alkalmazása nélkül alkalmas a genetikai anomáliák objektívizálására (110, 112).

A koncepció (Kallioneimi leírásának megfelelően) egyszerű: a target, (egészséges egyénből származó, tárgylemezen fixált, metafázisban lévő) kromoszómákat denaturáljuk, etanolban dehidráljuk. Zöld fluoreszcens festékkel jelzett tumor DNS és pirosan fluoreszkáló festékkel jelzett normál referencia DNS 1:1 arányú keverékét ugyancsak denaturálunk, majd hibridizáljuk a denaturált normális kromoszómákat tartalmazó preparátumra. (A „szonda” jelen esetben a normális és leukaemiás sejtekből származó teljes genomiális DNS keveréke). A nem hibridizálódott DNS-t eltávolítjuk. A kromoszómákat "antifade"-ben oldott DAPI-val (kéken fluoreszkáló, a DNS-t specifikusan jelző, a G-sávozáshoz hasonló sávozással kötődő molekula: 1,6diamino-phenyl-indole) jelöljük meg. E három kép eredőjeként kapjuk a „CGH image”-t. A leukaemiás sejtek azon kromoszóma régiói, amelyek nagysága deléciók következtében kisebb, vagy hiányzik, intenzívebb piros fluoreszcenciát mutatnak. Az amplifikált sequenciák erősebb zöld fluoreszcencia következtében válnak kimutathatókká. Amennyiben citogenetikai eltérést nem mutató kromoszómákat (vagy kromoszóma szakaszokat) vizsgálunk, akkor a két szín egyenlő arányú kombinációját (narancssárga fluoreszcenciaként) fogjuk látni. A DNS elváltozások profiljából előtűnnek a leukaemiára jellemző genetikai eltérések. A genetikai aberrációk analízise komputervezérelt képanalizáló rendszerrel történnek. A

fluoreszcencia intenzitás arányokból valamennyi kromoszóma-anomália (deletio, amplificatio) feltérképezhető (97, 98, 104, 110).

Digitális image analízis: a három fluoreszcencia intenzitást zöld, piros és kék optikai szűrők alkalmazásával CCD kamerával rögzítjük. A kromoszómák azonosítása a DAPI-sávozott image segítségével automatizált színes kariotípus analizáló programmal történik.

A CGH-technika előnyei a klinikai haematológiában röviden: A). a teljes tumor genom vizsgálható egyetlen hibridizáció során. B). sejtkultúra, vagy a vizsgálni kívánt sejtekből származó metafázis-generálás nem szükséges. C). korábban nem ismert amplifikált vagy deletált DNS szekvenciák kimutatására is alkalmas.

A vizsgálat szélesebb körű elterjedését elsősorban a jelentős instrumentális háttér igénye nehezíti.

Fontos hangsúlyozni, hogy a klasszikus citogenetikai vizsgálatokat az interfázis-citogenetikai vizsgálatokkal szimultán érdemes elvégezni. A különböző metodikák egymást hasznosan kiegészíthetik. Az egyes vizsgálatok közös értelmezése biztosíthat mind teljesebb információt a vizsgálni kívánt genetikai anomáliákról (85, 98).

CÉLKITŰZÉSEK

Célkitűzésünk volt, hogy megvizsgáljuk:

- 1.** Nagy thrombocyta-számmal járó állapotokban (O'Brien-féle filterométert alkalmazva) mekkora a shear-indukálta thrombocyta-aggregációs vizsgálatok diagnosztikai értéke, haszna? Használható-e mint egyszerű és gyors screening teszt a primer és szekunder thrombocytosisok elkülönítésére? A kapott eredmények alapján merülhetnek-e fel olyan kérdések, amelyek további vizsgálatokat tesznek szükségessé?
- 2.** Az 1990-es évek közepén vált ismertté, hogy a thrombocyták is rendelkeznek az EDRF-NO (NO) termeléshez szükséges NO szintáz enzimmel (26). A vérlemezkékben képződött kis mennyiségű NO csökkenti az aggregálódó thrombocyták számát. A thrombocyta NO generáció zavara elméletileg szerepet játszhat a nagy thrombocyta-számmal járó krónikus myeloproliferatív betegségek thrombotikus szövődményeiben, erre utaló kísérletes adat azonban nem ismeretes. Következő célunk tehát a thrombocytákban képződő NO quantitatív meghatározása volt.
- 3.** Feltételezhető, hogy a haemostasis rendellenességeknek poszttranszplantációs diabetesben is fontos szerepük lehet a gyakoribb cardiovascularis morbiditásban és mortalitásban. Érdeemesnek láttuk ezért megvizsgálni, hogy sikeres veseátültetésben részesült, s az immunosuppressziós kezelés következményeként diabetesessé vált betegekben kimutatható-e a thrombocyták túlműködése és a vascularis endothelium károsodása. Az irodalmi adatok alapján fontos lehet a PAI-I aktivitás, ill. az intravascularis EDRF-NO képződés vizsgálata is.
- 4.** A klasszikus tumor citogenetika értékes módszer a rosszindulatú betegségekben kialakuló kromoszóma-anomáliák felderítésében. A sejttenyészetben azonban a

malignus sejteknek olyan szubpopulációja szelektálódhat, amely nem szükségszerűen jellegzetes magára a tumorra, hanem az adott körülmények között speciális proliferatív előnye van. Limitált a vizsgálható metafázisok száma is. Az utóbbi években előtérbe kerülő fluoreszcencia in situ hibridizációval (FISH) és összehasonlító genomiális hibridizációval (CGH) kívántuk vizsgálni:

Rosszindulatú haematológiai kórképekben a klasszikus citogenetikai vizsgálat FISH/CGH kiegészítése nyújthat-e további információt a betegség pontosabb diagnosztizálásában, a genetikai elváltozások jobb feltérképezésében?

A FISH vizsgálatok eredményei hogyan viszonyulnak a hagyományos citogenetikai vizsgálatok eredményeihez? Szükséges-e beépíteni a leukaemiás betegek komplex diagnosztikus protokolljába? A bcr/abl génátrendeződés (Philadelphia-kromoszóma, mint marker-kromoszóma) FISH vizsgálata mennyire segít CML gyanúja esetén a diagnózis megerősítésében vagy kizárásában, ill. a betegek követésében?

A FISH vizsgálatok segíthetnek-e a kórképek biológiai viselkedésének jobb prognosztizálásában, azaz a terápiás stratégia (kemoterápia, korai transzplantáció szükségessége) megválasztásában?

A perifériás keringésből származó vérminták hasonló eredményességgel vizsgálhatók-e mint az általában alkalmazott csontvelő-minták?

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

1. A primer és szekunder thrombocytosisok elkülönítése céljából a hazánkban még kevésbé ismert *O'Brien-féle filterométer* segítségével vizsgáltuk a „*shear-dependens*” *thrombocyta-aggregatiót*. 53 myeloproliferatív betegségben szenvedő beteget (CML:5; ET:33; PRV:12; pontosan nem klasszifikálható myeloproliferatív syndroma:3) vizsgáltunk. A diagnózis a használatos, s nemzetközileg elfogadott diagnosztikai és laboratóriumi kritériumokon alapult (1, 10 - 13). A betegcsoportot 27 férfi és 26 nő alkotta. Átlagos életkoruk 56 (range: 21 - 89) év volt. Reaktív thrombocytosist 21 betegnél (kilenc férfi és 12 nő) észleltünk. Átlagos életkoruk 52 (range 18 - 88) év volt. Egyes betegeknél pl. malignus tumor, vashiány vagy gyulladásos bélbetegség volt a nagy thrombocyta-szám hátterében. Több beteg esetében a thrombocytosis oka nem vált ismertté, de a nagy thrombocyta-szám spontán rendeződése, s az ép haematopoesist igazoló csontvelő-kép bizonyította a reverzibilis thrombocytosis reaktív voltát.

Egyik csoport tagja sem kapott olyan gyógyszert, amely ismert módon befolyásolja a thrombocyta-működést vagy a haemostasist.

A kontroll csoportot húsz egészséges önként jelentkező (kilenc férfi és 11 nő) alkotta. Átlagos életkoruk 31 (range: 20 - 50) év volt. A haemostasisra, vagy vérlemezkefunkcióra ható gyógyszert nem szedtek. Vércékenységre vagy thrombosisra utaló tünetet nem észleltünk.

Vérvételkor a korábbi leírásnak megfelelően (14), a véralvadási vizsgálatoknál megszokott módon, 3.8%-os nátriumcitrát oldat, valamint Na-heparin volt az alvadásgátló.

Thrombocyta-számlálást korábban fázis kontraszt mikroszkóp segítségével, Fischer és Germer ajánlása szerint, az utóbbi időben sejtszámláló automata segítségével végeztük.

A „shear-dependens” thrombocyta-aggregatio vizsgálatára az O'Brien-féle filterométer segítségével került sor (8, 9, 15, 16). Heparinnal és citráttal alvadásgátolt teljes vért áramoltatunk át egy filteren 40 Hgmm nyomással. Az ilyen körülmények között áramló vérben a thrombocyták aktivációja és aggregációja következik be. A képződő aggregátumok a filter pórusait elzárják. Az eszköz 5 másodpercenként méri a filteren áthaladó cseppek számát. A mérés előtt, a mérés 0 - 5. másodperce között

és a mérés 20 - 40. másodperce közötti cseppeket összegyűjtve thrombocytaszámlálást végeztünk.

Jellemző paraméterek:

-*záró cseppszám*: az a cseppszám, amelyet követően 5 másodperc alatt legfeljebb egy csepp vér halad át a filteren. (Egészséges kontroll személyek heparinnal, ill. citráttal anticoagulált vérmintái esetén a záró cseppszám 11-29; ill. 11-42 volt).

-*thrombocytaretenció (R)*: az első 5 másodperc során (R-I), ill. a 20 - 40. másodperc között (R-II) felfogott cseppekben levő thrombocyták számából és a kiindulási thrombocytaszámból kalkuláljuk. (Az R-I normál értéke heparint, ill. citrátot alkalmazva: 33-98%; ill. 45-89%, az R-II normál értéke 85-100%; ill. 68-100% volt).

Minden esetben megmértük a vérzés-időt (Ivy módszerével, Simplate-II alkalmazásával) és a Willebrand-fehérje (vWF:Ag) plazmaszintjét ELISA módszerrel (17, 18). A thrombocyt aggregatiót öt aggregáló-szer (adrenalin, adenzin-difoszfát, kollagén, ristomycin és arachidonsav) alkalmazásával vizsgáltuk (14). A nagy thrombocytaszámmal járó állapotok további vizsgálatait (pl. PFA-100 készülékkel) tervezzük.

2. A vérlemezkék NO termelésének vizsgálatát egészségesek és nagy thrombocytaszámmal járó krónikus myeloproliferatív betegségben szenvedők mosott thrombocytáinak felhasználásával végeztük. 15 myeloproliferatív betegségben szenvedő beteget (CML:1; ET:8; PRV:3; myelofibrosis: 2; pontosan nem klasszifikálható myeloproliferatív szindróma: 1) vizsgáltunk. A betegcsoportot 10 férfi és 5 nő alkotta. Átlagos életkoruk 65.4 (range: 38 - 80) év volt. A thrombocytaszám minden beteg esetében kórosan nagy ($500 \times 10^9/L$ feletti) volt. A thrombocyták morfológiája és volumene normális volt. A betegek nem szedtek olyan gyógyszert, amely befolyásolja a vérlemezke-funkciót vagy a haemostasiszt. Dohányzók nem vehettek részt a vizsgálatban.

A kontroll csoportot húsz egészséges önként jelentkező (klinikai munkatárs, 7 férfi és 13 nő) alkotta. Átlagos életkoruk 39.8 (range: 29 - 54) év volt. A haemostasisra vagy vérlemezke-működésre ható gyógyszert nem szedtek. Egyik csoport tagja sem kapott nitrit-tartalmú gyógyszert. A kontroll csoportba sem

kerülhetett dohányos. Vértékenységre vagy thrombosisra utaló tünetet nem észleltünk.

Mintavétel: a vénás alvadástgátolt vért (ACD [citrát]-oldat, Beckton-Dickinson) 200 g-n 10 percig centrifugáltuk, háromszor mostuk HEPES-pufferben (pH 7.4), majd a harmadik mosás után a vérlemezkéket 0.9%-os NaCl-ban reszuszpendáltuk. A thrombocytaszámot standard módon $100 \times 10^9/L$ -re állítottuk.

A thrombocytaszuszpenzió NO-termelésének mérése: A méréseket NO-szenzitív mikroelektrodájú speciális készülékkel (ISONOP 200, ISO-NO WPI, Sarasota, Florida) végeztük. Az NO mennyiség standardizálására a gyár által mellékelt SNAP donort használtunk, hat koncentrációt felvéve. Az L-arginin tartalmú pufferben vizsgáltuk a vérlemezkék nyugalmi NO képzését, s ezt alapvonalnak tekintve alkalmaztuk az aktivátorokat: kollagént (2,5 mg/ml), ADP-t (1,0 $\mu\text{g/ml}$), thrombint (3,1 mU/ml), adrenalint (0,25 $\mu\text{g/ml}$), ristomycint (31,5 $\mu\text{g/ml}$). A zárójelben levő számok a mérőfolyadékban levő aktivátor végkoncentrációkat jelzik.

Minden esetben elvégeztük az L-arginin kompetitív metabolikus inhibitoraival is a vizsgálatot (amelyekből nem képes NO képződni). E célra L-NAME-t (nitro-L-arginine-metilészter), és L-NNA-t (L-nitro-L-arginin) alkalmaztunk (28, 31, 33).

Az NO termelés pikoAmper (pA) nagyságrendű elektromos válaszként jelent meg az általunk alkalmazott thrombocytaktivátor rendszerben. A gyorsan emelkedő, majd tetőző áramerősség változást a reakcióidő függvényében görbeként ábrázoltuk, s azt az enzimkémiából jól ismert paraméterekkel jellemeztük: így V_{max} : az időegységre jutó pA változás, a K_m a félmaximális válaszig eltelt idő. Az NO termelés mennyiségi változásaira a V_{max} a jellemző (ezt illesztettük a SNAP standard pontokhoz), míg a képződés gyorsaságát a K_m -érték jelzi. (Nagyobb K_m -érték lassabb termelésre utal).

3. Poszttranszplantációs diabetes mellitusban végzett laboratóriumi vizsgálatok:

53 (a SOTE Transzplantációs Klinikán) sikeres veseátültetésen átesett, s az immunsuppressziós kezelés (steroid + cyclosporin A ± azathioprin ± mofetilium mycophenolicum) miatt diabetes mellitusossá vált betegben vizsgáltuk a szérum PAI-1 aktivitást, a tPA, β -TG és sTM szinteket, valamint az endotheliális NO-termelést és a teljes antioxidáns statuszt. A betegcsoportot 34 férfi és 19 nő alkotta. Átlagos életkoruk 47.6 (range: 14 - 68) év volt. A transzplantáció óta átlagosan 54.8 (range: 2 - 151) hónap telt el.

A kontroll csoportot 29 egészséges klinikai munkatárs (16 férfi és 13 nő) alkotta. Átlagos életkoruk 42.8 (range: 31 - 65) év volt.

PAI-1mérés

A plazmatikus PAI-1 aktivitás mérését enzimatis kromogén reakcióval (Asserachrom PAI-1) végeztük. A nagy PAI-1 aktivitást ma általában az atherosclerosis és a coronaria-betegség független rizikófaktorának tekintik (76). (PAI-1 meghatározásra 47 betegnél került sor).

tPA mérés

Kromogén enzimatis k reakciót használtunk, (Asserachrom t-PA). A nagy tPA szinteket (a nagy PAI-1 aktivitáshoz hasonlóan) független vascularis kockázati tényezőként értékelik. (tPA mérést 47 esetben végeztünk).

Beta-thromboglobulin meghatározás

A thrombocyta aktivációt tükröző beta-thromboglobulin meghatározását ELISA módszerrel végeztük. (Asserachrom β -TG). β -TG meghatározásra 53 beteg esetében került sor.

sTM mérés

A vascularis endothelium-károsodás során jelentős mennyiségű TM szabadulhat fel, ezért a sTM az érendothelium-károsodás újabb markerének tekinthető. Mérését ELISA technikával (Diagnostica Stago „micro-Elisa plate”) végeztük (47 esetben).

Az endothelium NO-termelése

Az NO rendkívül rövid (3-5 sec.) féléletidejű molekula, hamar NO₂-vé, ill. NO₃-má alakul. Az endotheliális NO-produkció mérése közvetlenül ugyan nehezen végezhető el, a szérum/vizelet nitrit-nitrát tartalma azonban már könnyebben mérhető, s annak mennyisége az endothelium NO termelését tükrözi. (A szérumban és vizeletben lévő nitrát nitrát redukázzal nitritté redukálható. A nitrát redukciójával keletkezett és a redukció előtt jelenlévő nitrit Griess reakcióval meghatározható). Ily módon viszonylag egyszerű, non-invazív módszert alkalmazva vizsgálhatjuk az intravascularis EDRF-NO termelést (45).

A teljes antioxidáns státuszt (TAS) a „Total Antioxidant Status” kittel (Randox, Wales, UK) mértük (56).

A HgA1-C, urea, creatinine, koleszterin, triglicerid méréseket a Transzplantációs Klinika központi laboratóriumában végezték.

4a. Összehasonlító genomális hibridizáció (CGH)

Öt betegünknel (3 CLL; 1 CML és 1 ALL) végeztünk sikeres CGH vizsgálatot. A vizsgálatok során felhasznált csontvelő és perifériás vérminták minden esetben a DEOEC II Belklinikán kezelt betegekből származtak. A vizsgálatokat a DEOEC Etikai Bizottságának irányelveinek figyelembe vételével végeztük.

A CGH analízist Kallioneimi és mtsai által kidolgozott módszerrel, korábbi leírások alapján végeztük (110, 113, 114, 115, 116). A hibridizációhoz szükséges DNS-t leukaemiás sejtekből, ill. normális perifériás lymphocytákból Promega „Genomic DNA Purification Kit”-tel preparáltuk, a kit leírásának megfelelően. A leukaemiás sejtekből származó DNS-t nick-translatioval (zölden fluoreszkáló) Spectrum Green-12-dUTP-vel, a normális DNS-t (vörösén fluoreszkáló) Spectrum Red-5-dUTP-vel jelöltük meg a gyártó (Vysis, Inc. Downers Grove, IL USA) protokolljának megfelelően. A nick translatiohoz „Vysis, CGH Nick translation kit”-et használtunk. A kísérleti körülményeket úgy állítottuk be, hogy a jelzett DNS-fragmentumok hossza 300 és 3000 bázispár között legyen. A hibridizációs keverék a leukaemiás és a normális (jelzett) DNS-ből 200-200 ng-ot, ill. 20 ug jelöletlen Cot-1 DNS-t (GIBCO) tartalmazott, amelyet 1 térfogat 0.3 M nátrium-acetáttal (ph: 5.3) és 100% hideg etanollal kicsaptunk. A DNS-t levegőn megszáritottuk, majd feloldottuk 10 µl hibridizációs oldatban, amely 70% formamidot, 10% dextran szulfátot és 2 x SSC-t tartalmaz. (1 X SSC: 0.15 M NaCl, 0.015 Na-citrát, pH:7.0). Ezt követte az oldatban lévő DNS denaturálása (73 C-on, öt percig), majd 37 C-on 30 percig állni hagytuk. A tárgylemezeken lévő (egészséges férfiből származó) target (metafázisban lévő) kromoszómákat (Vysis Inc.) 3-5 percig 73 C-on denaturáltuk, emelkedő koncentrációjú etanol sorban (70%, 85%, 100%) dehidráltuk, majd levegőn szárítottuk. A hibridizációs elegyet a tárgylemezre cseppentettük és légmentesen lezártuk. A hibridizáció időtartama 72 óra volt. Ez alatt a készítményeket 37 C-os nedves kamrában tartottuk. A hibridizációt követően a nem hibridizálódott DNS-t a hibridizációs lemezekről eltávolítottuk: a lemezeket egymást követően három alkalommal hibridizációs mosófolyadékban (50% formamid, 2 x SSC, pH:7.0), majd kétszer 2 X SSC-ben (pH: 7.0) 45 C-on, ezután egyszer 2 X SSC-ben, majd kétszer PN pufferben (0.1 M NaH₂PO₄, 0.1 M Na₂HPO₄, Nonident P40, pH:8), szobahőmérsékleten, alkalmanként 10-10 percig mostuk, majd a lemezeket

ultratiszta vízben leöblítettük és levegőn megszáraitottuk. A sejtmagokat anti-fade oldatban (Vysis Inc.) oldott DAPI-val festettük.

Digitális image analízis: a három fluoreszcencia intenzitást zöld, piros és kék optikai szűrők alkalmazásával CCD kamerával (Compulog, IMAC-CCD-230, 8 bit felbontás, Metasystem GmbH) rögzítjük. (Mintánként 8-10 metafázis vizsgálata kívánatos). A képanalizáló rendszer a Zeiss Axioplan 135-ös mikroszkópon (Carl Zeiss, Jena, Németország) alapszik, amelyhez számítógép-vezérelt kvantitatív képfeldolgozó rendszert (ISIS, Metasystem GmbH, Altiusheim, Németország) kapcsolunk. A kromoszómák azonosítása a DAPI-sávozott image segítségével automatizált színes kariotípus analízáló programmal végezhető. A zöld fluoreszcencia a hibridizálódott leukaemiás DNS-től, a piros fluoreszcencia a hibridizálódott normális DNS-től származik. A kromoszóma-eltérések meghatározása a zöld/vörös fluoreszcencia intenzitás hányadosok aránya alapján végezhető. Az egyes metafázisokra vonatkozó kromoszóma profilokat átlagolva az adott betegsége jellemző átlag eltérésekről nyerünk információt. DNS-többlet állapítható meg azokban az esetekben, amelyekben a zöld/vörös fluoreszcencia intenzitás aránya meghaladja az 1.15-öt. DNS-vesztést esetén ez az arány 0.85-nél kisebb. Ezeket a határértékeket normál-normál hibridizációk átlagértékeiből határoztuk meg. Mivel a Cot-1 DNS a kromoszómák centroméra közeli régióit blokkolja, ezeket a szakaszokat a CGH-vizsgálat során nem értékeltük.

4b. Fluoreszcencia in situ hibridizáció (FISH)

82 betegnél (CML, vagy annak gyanúja: 44; leukocytosis: 4, ALL: 7; AML: 6; AML M3 (vagy gyanúja): 8; CLL: 13; DMPS/AML: 1) összesen 140 hibridizációt (FISH vizsgálatot) végeztünk. Az esetek nagyobb felében CML, vagy annak gyanúja, ill. leukocytosis miatt történtek a vizsgálatok, s a bcr/abl transzlokáció jelenlétét, ill. annak kvantitatív változását vizsgáltuk (7a,b,c,d tbl., 10a,b,c tbl., 11. tbl.). Ugyanennek a transzlokációnak a jelenlétét kerestük ALL-ben (12. tbl.), több alkalommal AML-ben is (13.tbl.). AML M3-ban, ill. ennek gyanúja esetén a promyelocytás leukaemiára specifikus t(15;17) jelenléte, ill. kvantitatív változása volt a kérdés (14. tbl.). Néhány esetben (AML-ben) egyes kromoszómák (pl. 1, 7, 8, stb)

számbeli anomáliáját is vizsgáltuk (13.tbl). CLL-ben legtöbbször a 12-es kromoszóma triszómiáját (15. tbl.), míg egy beteg esetében, (akinek betegsége DMPS-ből AML-be transzformálódott) a 7-es kromoszóma számbeli eltérését vizsgáltuk. A transzlokációkat, ill. a kromoszómák számbeli eltérését direkt jelzett lokusz-specifikus, ill. centroméra-specifikus Vysis szondákkal végeztük. Egyes betegeknél szimultán végzett hibridizációkkal több kromoszóma-anomáliát is vizsgáltunk. Több betegnél ismételt vizsgálatokra is sor került, azaz a FISH-technikát „citogenetikai követésre” is használtuk.

A FISH-vizsgálatokat a DEOEC. II. sz. Belklinikán kezelt és gondozott betegek csontvelő és/vagy perifériás vérmintáiból származó fehérvérsejtek felhasználásával végeztük. 10 ml (hypotóniás) kromoszóma izoláló oldatba (9 ml 0.075 M KCl, 1 ml (0.25%) Tripsin EDTA oldat (Sigma) és 80 µl colchicin (Sigma)) frissen levett 100-400 µl vért vagy csontvelőt pipettáztunk. A szuszpenziót (37 C-on) 20 percig inkubáltuk (s ez a vörösvértestek lysisét eredményezte). Ezt követően 5 perces centrifugálás következett, majd a felülúszó leöntését követően a sejteket (3-6 alkalommal) 3:1 metanol:ecetsavban (Fluka) fixáltuk, majd a sejteket tárgylemezre cseppentettük, s a FISH analízisig –20 C-on tároltuk.

A hibridizációt megelőzően a tárgylemezeken lévő preparátumot denaturáltuk (5 percig, 73 C-on 70% formamide/2xSSC-ben), majd emelkedő koncentrációjú alkohol-sorban (70%, 85%, 100%) dehidráltuk, majd levegőn szárítottuk. A szondákat a gyártó (Vysis) leírásának megfelelően 5 percig, 73 C-on denaturáltuk, ezt követően a tárgylemezre cseppentettük, majd légmentesen lezártuk. A hibridizáció időtartama 12-16 óra volt. Ez alatt a készítményeket 37 C-os nedves kamrában tartottuk. A hibridizációt követően a tárgylemezeket 50% formamide/2xSSC-ben 30 percig 45 C-on, majd 10 percig 2xSSC-ben 45 C-on, ezt követően 2xSSC/0.1% NP-40-ben, szobahőn, 5 percig mostuk. A lemezeket levegőn megszáritottuk, majd a sejtmagokat DAPI-val megfestettük. Az eredményeket Zeiss Axioplan fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Németország) értékeltük ki, megfelelő optikai szűrőket alkalmazva. Az egyes vizsgálatok során 100-200 interfázisú sejtet értékeltünk ki. A vizsgálatokat kontroll (egészséges egyénből származó perifériás lymphocitákon való) hibridizációval egészítettük ki (116).

A leggyakrabban a Philadelphia kromoszóma (Ph), azaz a t(9;22) (q34;q11.2) jelenlétét vizsgáltuk: lényege, hogy a 9-es kromoszóma q34-es régiójában lokalizálódó c-ABL onkogén a 22-es kromoszóma BCR génje mellé transzlokálódik.

Egy fúziós kiméra-gén keletkezik. A 22-es kromoszómán lévő BCR lókuszt zöld, míg az ABL lókuszt piros színnel fluoreszkáló DNS szondával jelöljük meg. Normális sejtekben a szondák egymástól távol, különálló szignálként jelennek meg. Ph-kromoszóma jelenlétekor a sejtekben a kromoszómális szegmentek transzlokációja miatt a két fluoreszcens szignál egymás mellé kerül, a szignálok részleges átfedése utal a transzlokációra. A bcr/abl transzlokáció FISH-vizsgálatát még a közelmúltban is klinikailag relevánsabbnak tartottuk a PCR-vizsgálatnál (117), ez ma már megkérdőjelezhető.

A krónikus myeloid leukaemia (CML) a malignusan transzformálódott őssejtek klonális betegsége (118, 119, 120). Krónikus fázisa citogenetikailag a Philadelphia kromoszóma (Ph) megjelenésével, azaz a 9-es és a 22-es kromoszómák közötti transzlokációval jellemezhető: t(9;22)(q34;q11.2) (121, 122). A 9-es kromoszóma q34-es régióján lokalizálódó c-ABL onkogén és a 22-es kromoszóma BCR génjének átrendeződése és a betegség kialakulása, ill. fennmaradása közötti okozati összefüggés többszörösen bizonyított. E kromoszóma aberráció citogenetikai vagy molekuláris biológiai (FISH, PCR, etc.) módszerekkel történő kimutatása fontos a betegség diagnosztikájában, a differenciális diagnózisban (pl. más krónikus myeloproliferatív kórképektől vagy éppen a kezelést nem igénylő leukocytosisoktól való elkülönítésben) és a betegek követésében. A korábbi terápiás eljárásokkal szemben az interferon-alfa (INF), majd újabban Glivec alkalmazásával a Ph-pozitív sejtek számának csökkentése, citogenetikai remisszió elérése is lehetséges, amely lehet teljes (Ph-pozitív sejtek: 0%), részleges (1-34%), vagy enyhe (35-90%). Major citogenetikai válaszról teljes és részleges remisszió esetén beszélhetünk (117, 120, 123). Tekintettel arra, hogy a citogenetikai válasz minősége és a prognózis között szoros összefüggés van, a betegek citogenetikai követése, a Ph- kromoszómát hordozó sejtek arányának változása a kezelés hatásának megítélésében is igen fontos. A CML-ben alkalmazható különböző terápiás lehetőségekre, INF- és Glivec-protokollokra, ill. több fontos, ismert adatra nem térünk ki, vagy csak röviden említjük, s utalunk több, kiváló hazai dolgozatra (124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131).

A 7. (a, b, c, d) táblázatokban feltüntetett 28 beteg közül 24-nél CML, míg a kilencedik betegnél myelofibrosis, a 14.-nél Ph-negatív CML, a 26.-nál neutrofil leukaemia, s a 27. betegnél pontosan nem definiálható krónikus myeloproliferatív betegség igazolódott. Nyolcadik betegünk FISH-vizsgálatára hidroxürea-kezelést követően került sor betegség 88. hónapjában. Külön figyelmet érdemel a 23. beteg,

akinél 2.5 évtizedes korábbi (busulfan, hidroxiauera) kezelést követően került sor a FISH-vizsgálat elvégzésére. A többi, újonnan felismert beteget a FISH-vizsgálat elvégzése előtt nem kezeltük. A későbbiekben (a táblázatokban feltüntetetteknek megfelelően) hidroxiauera, interferon, később Glivec kezelésben részesültek, ill. két esetben allogén csontvelő-átültetésre is sor került.

A következő csoport (10.a-c táblázat) 21 tagjának alapbetegsége, ill. citogenetikai vizsgálatának eredménye korábbról ismert volt. Betegségük felismerésekor interfázis citogenetikai vizsgálat elvégzésére nem volt lehetőség. (Kivételt képez az az öt beteg, akik az első, ill. második táblázatokban egyaránt szerepelnek, s akik egy-öt csillaggal hasonlóan vannak megjelölve). FISH-analízisre 6-75 hónapos (az optimálisnál legtöbbször kisebb dózisú) INF-kezelést követően került sor. Az 1., 3., 4., 6., 7., 9., 18., 19., 20. és 21 betegek esetében ismételt vizsgálatokat is végeztünk, azaz a FISH-technikát ezen betegek citogenetikai követésére is alkalmaztuk (10.a-c tbl).

A következő csoportba négy, leukocytosis miatt tartósan obszervált beteg került. A FISH elvégzésére differenciáldiagnosztikai megfontolásokból, CML-től való elkülönítés céljából került sor (11. táblázat).

A 12. táblázatban hét ALL-es betegünk szerepel, akiknél a Ph-kromoszóma jelenlétét vizsgáltuk. Az első beteg esetében csontvelő-fibrosis miatt csak perifériás vér vizsgálatára volt lehetőség. A többi betegnél csontvelő-aspirációval nyert sejteket vizsgáltunk. (A Ph-kromoszóma vagy a bcr/abl transzlokáció vizsgálata heveny leukaemiákban is igen fontos. Ennek az aberrációnak a jelenléte rossz prognosztikus jelnek tekintendő, s arra utal, hogy kemoterápiával ezek a betegek nem gyógyíthatóak meg. Gyógyulás csak allogén őssejt-átültetéstől remélhető).

AML-ben összesen 14 beteg FISH-vizsálatára került sor. Közülük nyolcnál heveny promyelocytás leukaemia lehetősége miatt a t(15;17) jelenlétét vizsgáltuk. (A vizsgálat elve, ill. az alkalmazott szondák színe azonos a bcr/abl transzlokáció vizsgálatához). (14. táblázat). Az 1. és 5. betegnél ismételt vizsgálatokat is végeztünk. A 14. táblázatban szereplő 4. beteg a 7c. táblázat 17. helyén is szerepel. A többi AML-es betegünkben (a 13. táblázatnak megfelelően) a Ph-kromoszóma jelenlétét, ill. a 7., 8., ill. más kromoszómák számbeli eltéréseit vizsgáltuk.

CLL-ben a 12-es kromoszóma triszómiája az egyik leggyakoribb kromoszóma-anomália. Ezt vizsgáltuk 13 CLL-es betegünkben (15. táblázat). A 12-es kromoszóma

vizsgálatán kívül néhány esetben a 7., egy betegnél pedig a 8. kromoszóma számbeli anomáliáját is vizsgáltuk centroméra-specifikus szondák felhasználásával.

EREDMÉNYEK

1. A primer és szekunder thrombocytosisok vizsgálata O'Brien-féle filterométerrel:

A KMB-ben szenvedő 53 beteg közül 52 esetében került sor heparinnal, 35-ben pedig citráttal antikoagulált teljes vér vizsgálatára (1. és 2. tbl). Antikoagulánsként heparint alkalmazva a záró cseppszám 18, az R-I 10, az R-II 31 esetben volt kóros. Citráttal antikoagulált vérmintáink vizsgálatakor a záró cseppszám 23, az R-I 24, az R-II 27 esetben bizonyult kórosnak. (1-3 ábra és 1. tbl).

1. tbl.

Myeloproliferatív betegségekben és reaktív thrombocytosisokban kapott kóros eredmények

	Myeloproliferatív betegségek		Reaktív thrombocytosisok	
	Heparin n=52 (%)	Citrát n=35 (%)	Heparin n=21 (%)	Citrát n=18 (%)
Záró cseppszám	18 (34.6)	23 (65.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
R-I	10 (19.2)	24 (68.6)	0 (0.0)	0 (0.0)
R-II	31 (59.6)	27 (77.1)	3 (14.3)	1 (5.6)

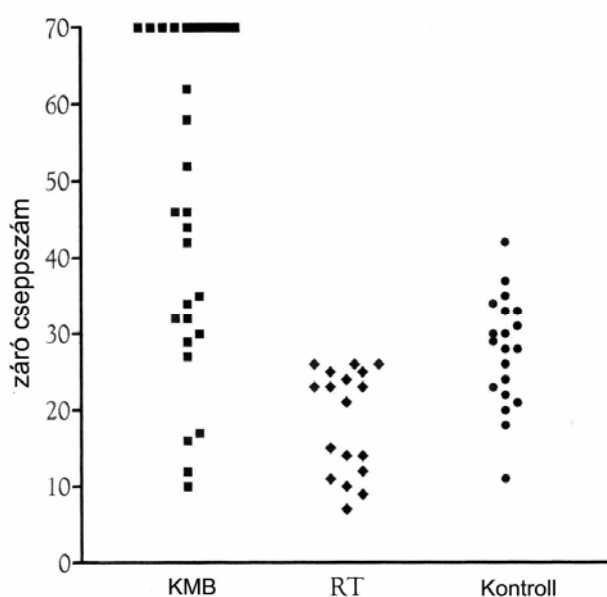
2. tbl.

A záró cseppszám, a thrombocyta-retenció I és II (R-I és RII) megoszlása krónikus myeloproliferatív betegségekben (KMB), reaktív thrombocytosisban (RT) és a kontroll csoportban

	Heparinnal alvadásgátolt vérminták			Citráttal alvadásgátolt vérminták		
	KMB	RT	Kontroll	KMB	RT	Kontroll
	n = 52	n = 21	n = 20	n = 35	n = 18	n = 20
	Záró cseppszám			Záró cseppszám		
átlag	25	14	21	52	19	28
SD	12	4	5	21	7	7
	thrombocytá retenció - I (%)			thrombocytá retenció - I (%)		
átlag	48.4	73.1	72.5	37.7	71.6	68.6
SD	18.5	13.4	14.8	16.1	14.2	11.0
	thrombocytá retenció - II (%)			thrombocytá retenció - II (%)		
átlag	74.8	93.1	95.0	53.7	91.9	87.8
SD	18.7	7.8	4.4	17.9	8.4	9.6

1. ábra.

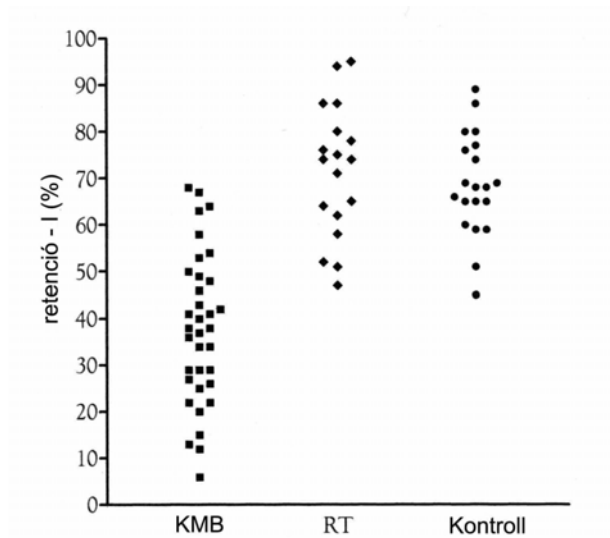
A záró cseppszám megoszlása krónikus myeloproliferatív betegségekben (KMB), reaktív thrombocytosisokban (RT) és a kontroll csoportban. (Citráttal alvadásgátolt vérmintákban).



KMB-ben a betegek kb. 65%-ában volt kóros a záró cseppszám

2. ábra.

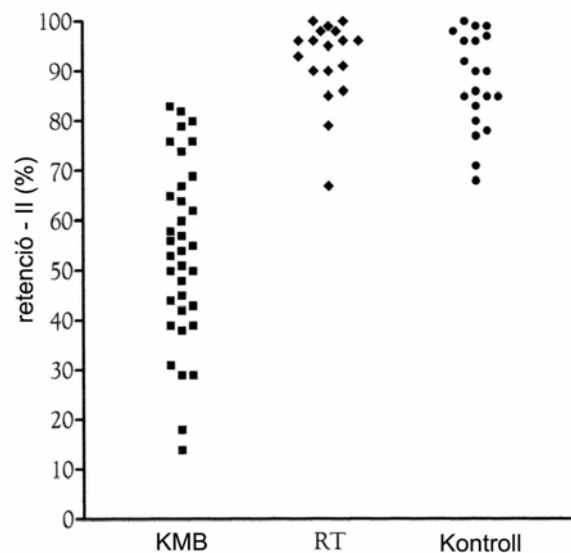
A thrombocytá-retenció I megoszlása krónikus myeloproliferatív betegségekben (KMB), reaktív thrombocytosisokban (RT) és a kontroll csoportban. (Citráttal alvadásgátolt vérmintákban).



KMB-ben a betegek kb.2/3-ában kisebb (kóros) az R-I

3. ábra.

A thrombocyta-retenció II megoszlása krónikus myeloproliferatív betegségekben (KMB), reaktív thrombocytosisokban (RT) és a kontroll csoportban. (Citráttal alvadásgátolt vérmintákban).



KMB-ben a legmarkánsabban (a betegek 77%-ában) az R-II vált kórossá

A reaktív thrombocytosisos csoportban 21 heparinos, 18 citrátos vizsgálat volt (1. táblázat). Heparin alkalmazásakor a záró cseppszám és az R-I minden esetben a normális tartományba esett, míg az R-II 3 alkalommal volt ál-pozitív. A 18 citrátos

vizsgálat közül a záró cseppszám és az R-I egy esetben sem, míg az R-II egy esetben bizonyult ál-pozitívnak.

A vérzés-időt a krónikus myeloproliferatív betegségekben csupán a betegek 13%-ban találtuk kórosnak.

A thrombocytá-aggregatio 86%-ban volt kóros adrenalin alkalmazásakor, 64%-ban, ha ADP-t alkalmaztunk aggregáló szernek. Collagen, arachidonsav és ristomycin alkalmazásakor kisebb (36, 23 és 28) százalékban észleltünk csökkent thrombocytá-aggregatiót.

A vWF:Ag plazmaszintje a myeloproliferatív csoportban átlagosan 1.19 (range: 0.16 - 0.36) U/L, a reaktív thrombocytosisos csoportban átlagosan 1.72 (range: 0.48 - 0.97) U/L volt.

A thrombocytá-szám, a záró cseppszám, az I. és II. retenció - és a vWF:Ag közötti korreláció analízis során nem találtunk összefüggést a thr-szám és a vWF:Ag szintek között sem a KMB-esetekben, sem a reaktív thrombocytosisokban. Szignifikáns korrelációt észleltünk a záró cseppszám és a vWF:Ag-szintek között a reaktív thrombocytosisokban a heparinos módszerrel ($p=0,016$), amely összefüggés még szembetűnőbb, ha citrátot alkalmaztunk antikoagulánsként ($p=0,0048$). Nem volt összefüggés viszont e két érték között a KMB-eseteiben ($p=0,28$ és $0,24$). Az R-I és vWF:Ag közötti összefüggések vizsgálata során szignifikáns összefüggést kaptunk a myeloproliferatív-betegségekben a heparinos módszerrel ($p=0,047$), amely összefüggés nem eléggé vagy gyengén volt csak szignifikáns reaktív thrombocytosisokban ($p=0,064$). A myeloproliferatív betegségek kimutatására érzékenyebb citrátos módszerrel ennek az ellenkezőjét kaptuk, a korreláció csak reaktív thrombocytosisokban volt szignifikáns ($p=0,017$ vs. $0,64$) Nem találtunk összefüggést az R-II és az antigén-szintek között egyik csoportban sem, akár a heparinos, akár a citrátos módszert alkalmaztuk.

A filter-teszt legfontosabb eredménye tehát (3. és 4. tbl): a citrátos módszer minden esetben szenzitívebb a heparinosnál. A két csoport minden paramétere (záró-cseppszám, R-I, R-II) szignifikánsan különböző. A citrátos minták R-II értékének szenzitivitása 77,1%, specificitása 94,4%, azaz megfelelő a nagy thrombocytá-számmal járó állapotok vizsgálatához. A fals-negatív (22,9%) és fals pozitív (5,6%) esetek aránya akceptálható.

3. tbl.

Az eredmények statisztikai jellemzésre

	Záró cseppszám		R-II	
	heparin	citrát	heparin	Citrát
Szenzitivitás (%)	34.6	65.7	59.6	77.1
Specifictás (%)	100	100	85.7	94.4
Fals - negatív (%)	65.4	34.3	40.4	22.9
Fals - pozitív (%)	0	0	14.3	5.6

4. tbl.

A három csoport (KMB, RT és kontroll) laboratóriumi paramétereinek összehasonlítása t-próbával

	Heparinos vérminták			Citrátos vérminták		
	KMB v RT	KMB v Kontroll	RT v Kontroll	KMB v RT	KMB v Kontroll	RT v Kontroll
	Záró cseppszám			Záró cseppszám		
Különbség ± SE	10.95 ± 1.828	3.762 ± 1.951	-7.188 ± 1.412	33.27 ± 5.075	24.08 ± 3.887	-9.194 ± 2.303
p érték	<0.0001	0.0580	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0003
	thrombocyta retenció - I (%)			thrombocyta retenció - I (%)		
Különbség ± SE	-24.73 ± 3.891	-24.08 ± 4.629	0.6452 ± 4.396	-33.87 ± 4.491	-30.86 ± 3.671	3.006 ± 4.094
p érték	<0.0001	<0.0001	0.8840	<0.0001	<0.0001	0.4676
	thrombocyta retenció - II (%)			thrombocyta retenció - II (%)		
Különbség ± SE	-18.31 ± 3.106	-20.21 ± 2.782	-1.905 ± 1.972	-38.23 ± 3.627	-34.04 ± 3.714	4.194 ± 2.945
p érték	<0.0001	<0.0001	0.3414	<0.0001	<0.0001	0.1630

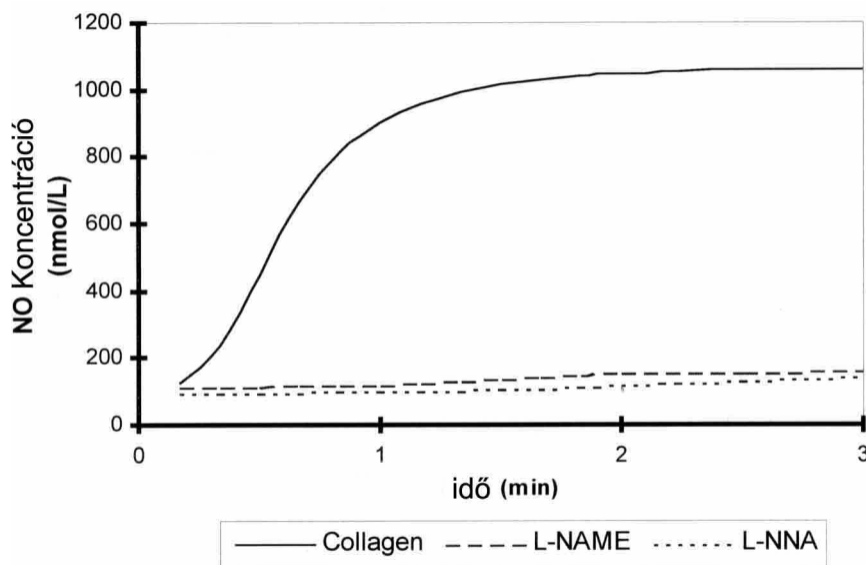
2. A thrombocyták NO-termelésének vizsgálata nagy thrombocyta-számmal járó krónikus myeloproliferatív kórképekben:

A thrombocyta NO válasz az aktivátor alkalmazását követően 20-40 másodpercen belül jelentkezett. Az L-Arg. kompetitív antagonistái (L-NAME, L-NNA) jelenlétében a thrombocyták NO termelésének mértéke legalább 90%-kal csökkent

(4. ábra). Az 5. ábrán a különböző aktivátorokra adott NO-válasz látható egészséges személy mosott thrombocytaiból készült szuszpenzióban. Az 5. táblázatban a mosott vérlemezkékben a különféle ingerekre képződő, 100000 thrombocyta-ra számolt átlagos NO-koncentrációt (nmol/L/100000 thrombocyta), valamint kinetikus paraméterként az átlagos K_m -értéket (ez abszolút értékben a reakció sebességével fordítottan arányos), valamint szórásaikat tüntették fel.

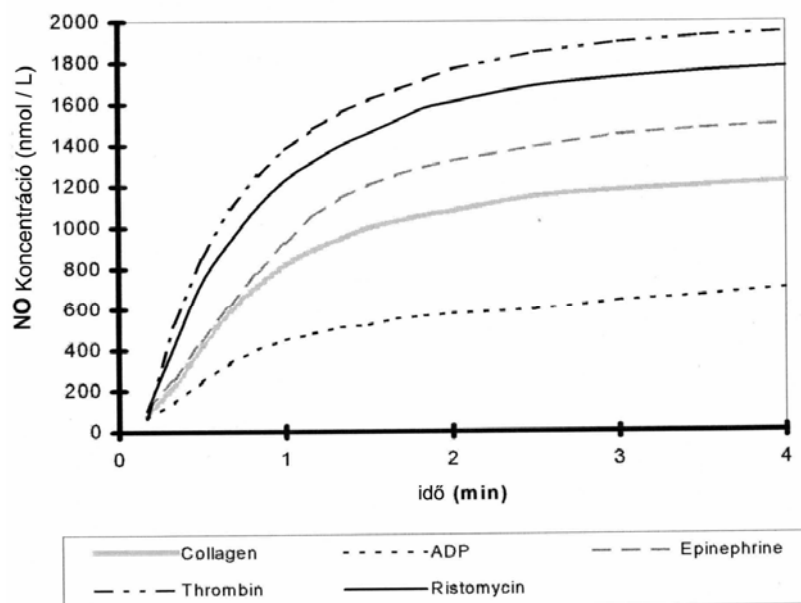
4. ábra.

A thrombocyta NO-képzése, ill. az L-Arg. specifikus inhibitorainak hatása. (A felső görbe az L-Arg. pufferben a kollagén adása után megjelenő thrombocyta NO-választ jelzi, míg az alsó két görbe esetén a pufferben az L-Arg. mellett L-NAME vagy L-NNA (az NO-szintézis kompetitív inhibitorai) is volt. Látható, hogy az inhibitorok mellett nem alakult ki NO-képződés).



5. ábra.

Jellegzetes thrombocyta NO-válasz vérlemezke-aktivátorokra. (Egészséges személy).



5. tbl.

A thrombocyták NO-képzésének mennyisége (nmol/L/100000 thrombocyta) és sebessége (K_M) a vizsgált egészségesekben és nagy thrombocyta-számmal járó myeloproliferatív betegség (KMB) miatt gondozottakban

Csoport	Collagen		ADP		Epinephrine		Thrombin		Ristomycine	
	V_{max} nmol/L	K_M Min	V_{max} nmol/L	K_M min	V_{max} nmol/L	K_M min	V_{max} nmol/L	K_M min	V_{max} nmol/L	K_M min
No.	20		13		17		20		17	
Kontroll n=20	1185.9± 395.3	3.19 ± 1.29	508.3 ± 136.6	4.52 ± 1.25	1500.5 ± 318.3	3.15 ± 1.12	1950.5 ± 438.3	2.40 ± 0.775	1771.2 ± 601.9	2.01 ± 1.56
No.	15		13		13		15		12	
KMB n=15	422.2* ± 109.5	1.87* ± 0.96	76.1* ± 19.5	1.65* ± 0.84	738.9* ± 236.7	2.89 ± 0.77	625.3* ± 248.3	1.49* ± 0.42	446.4* ± 108.4	1.56 ± 0.64

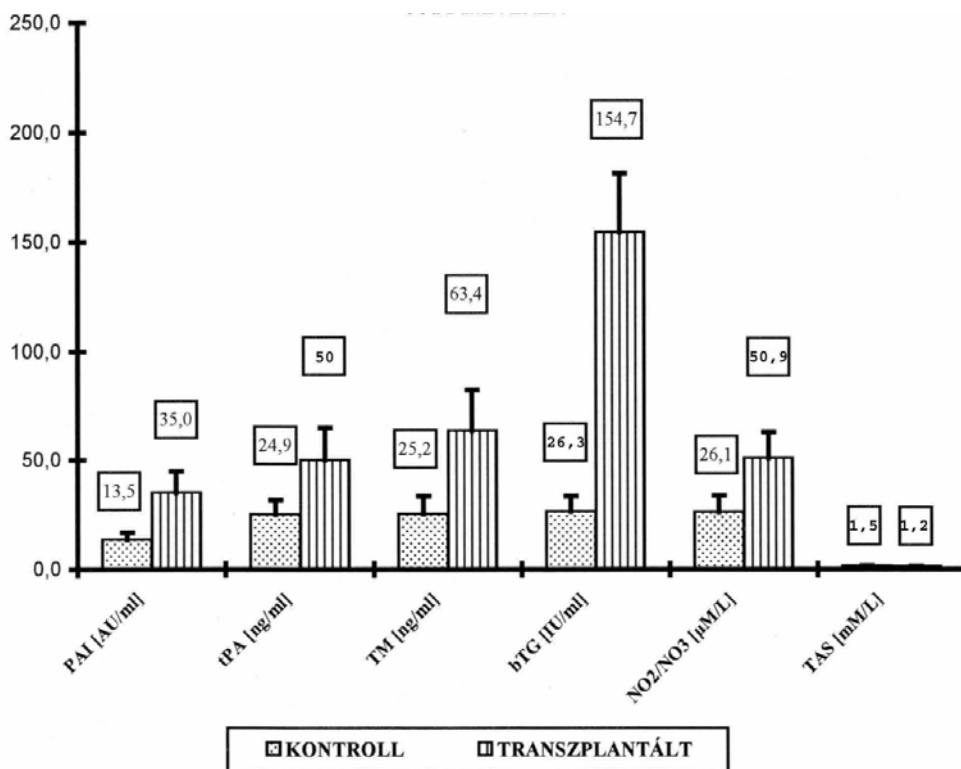
Az eredményekben észlelt jelentős szórás ellenére KMB-ben a thrombocyták NO-termelése statisztikailag is szignifikáns mértékben csökkentnek bizonyult a kontrollcsoportéhoz képest. Az NO-képződés mértéke aktivátor-dependens, s jól gátolható NO-szintézis inhibitorokkal.

3. Poszttranszplantációs diabetes mellitusban végzett vizsgálatok:

Poszttranszplantációs diabeteses betegekben lényegesen nagyobb, a kontrollokéhoz képest több mint kétszeres PAI-1 aktivitást és tPA szintet mértünk. Említést érdemel, hogy az irodalomban egyre nagyobb figyelmet kapott a fibrinolysis és az artériás betegségek közötti kapcsolat. Szintén markánsan, (a PAI-1-hez hasonló mértékben) nőtt a plasma sTM szintje, amely a sérült endothel-sejtekből szabadul fel. A legszembetűnőbb mértékben az in vivo thrombocyta-aktivációt tükröző béta-thromboglobulin plasma-szintje nőtt meg. (A betegcsoportban csaknem hatszor nagyobb értékeket mértünk). Várakozásunkkal szemben a kontroll csoportban észleltünk kisebb intravasalis NO-képzést (6. ábra és 6. tbl).

6. ábra.

Poszttranszplantációs diabetes mellitusban vizsgált haemostasis-paraméterek



6. tbl.

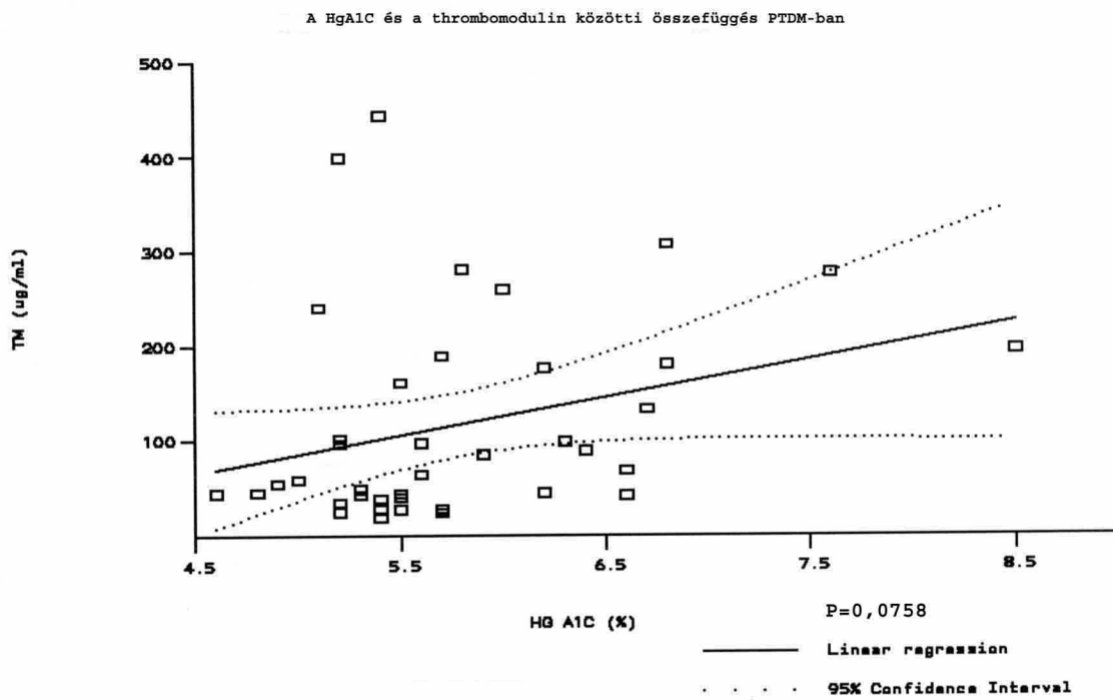
**POSZTTRANSZPLANTÁCIÓS DIABETES
MELLITUSBAN VIZSGÁLT HAEMOSTASIS -
PARAMÉTEREK**

	KONTROLL			BETEG		
	n	ÁTLAG	SDEV	n	ÁTLAG	SDEV
PAI [AU/ml]	21	13,52	± 3,28	47	35,03 *	± 9,95
tPA [ng/ml]	29	24,96	± 6,75	47	50,06*	± 14,89
TM [ng/ml]	28	25,24	± 8,20	47	63,43*	± 19,06
βTG [IU/ml]	29	26,34	± 7,18	53	154,74*	± 26,66
NO₂/NO₃ [μmol/l]	29	26,10	± 7,68	53	50,89*	± 11,89
TAS [mmol/ml]	23	+1,553	± 0,11	47	1,265*	± 0,18

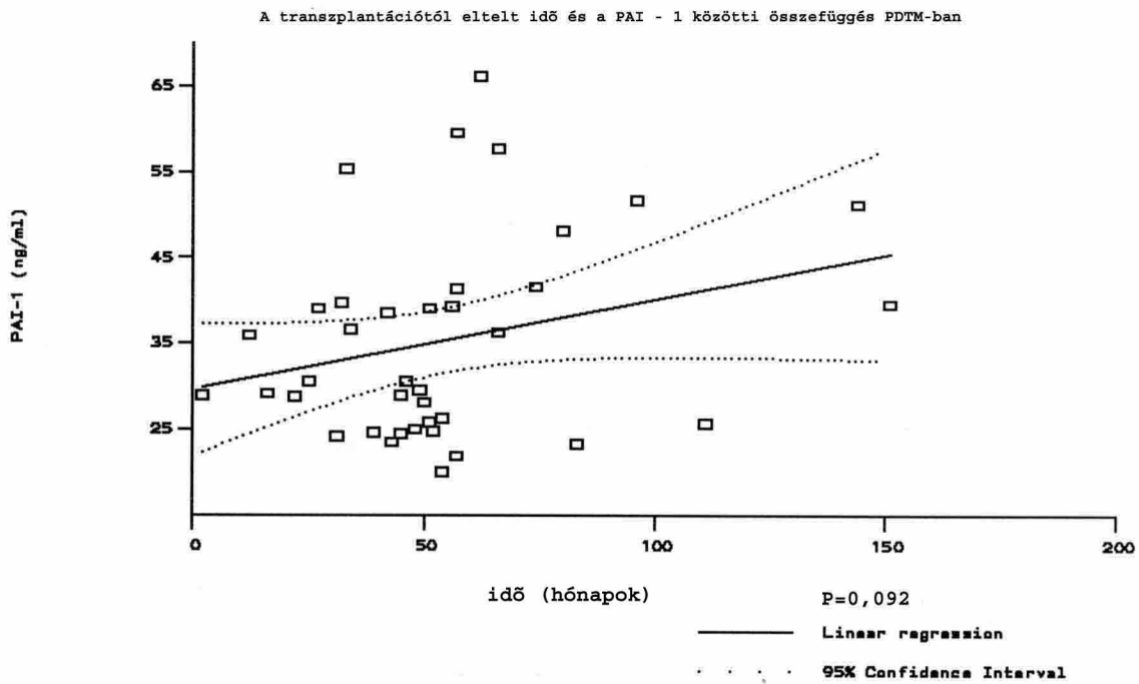
* Szignifikáns differencia

A vizsgált haemostasis-paraméterek és a glycal-Hg, vesefunkciók, lipidek valamint a transzplantáció óta eltelt idő közötti korreláció vizsgálatok során hat esetben találtunk figyelemre méltó pozitív korrelációt: szoros, de „nem eléggé szignifikáns” összefüggést a HgA1-C - thrombomodulin ($p=0.0758$) (7. ábra) ill. a transzplantációtól eltelt idő és a PAI-1 ($p=0.092$) között (8. ábra). A korreláció szignifikánsnak bizonyult a creatinine - β TG ($p=0.01$) (9. ábra); a triglicerid - thrombomodulin ($p=0.001$) (10. ábra); a triglicerid - PAI-1($p=0.028$) (11. ábra) valamint a transzplantációtól eltelt idő és a tPA ($p=0.0289$) között (12. ábra)

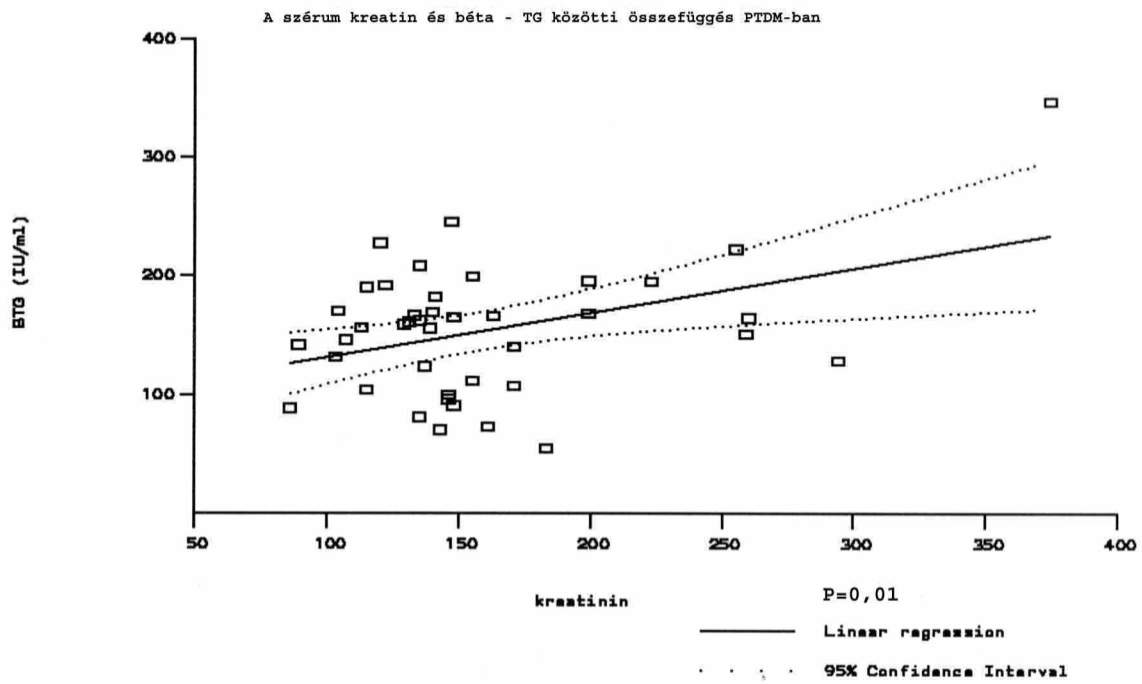
7. ábra.



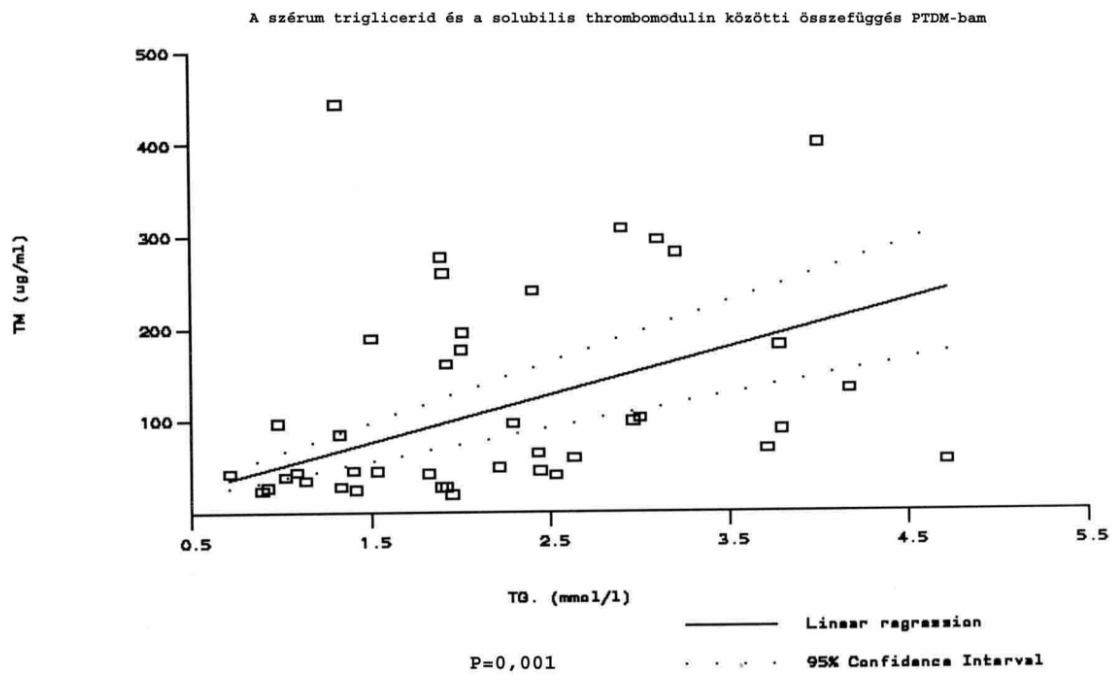
8. ábra.



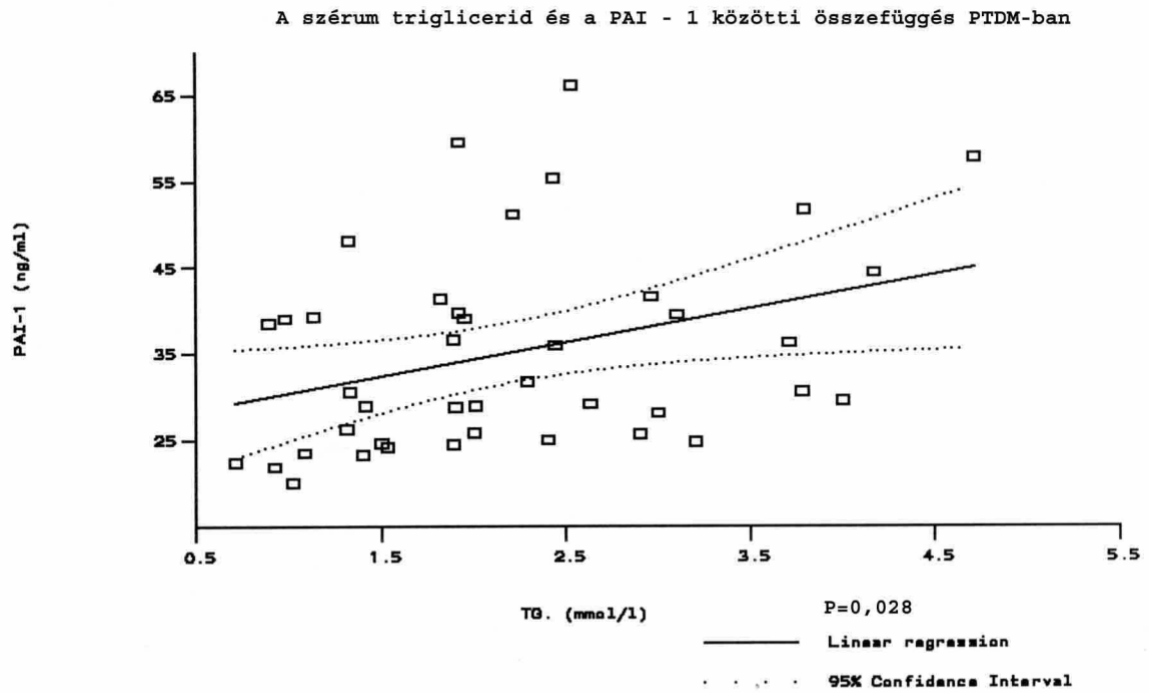
9. ábra.



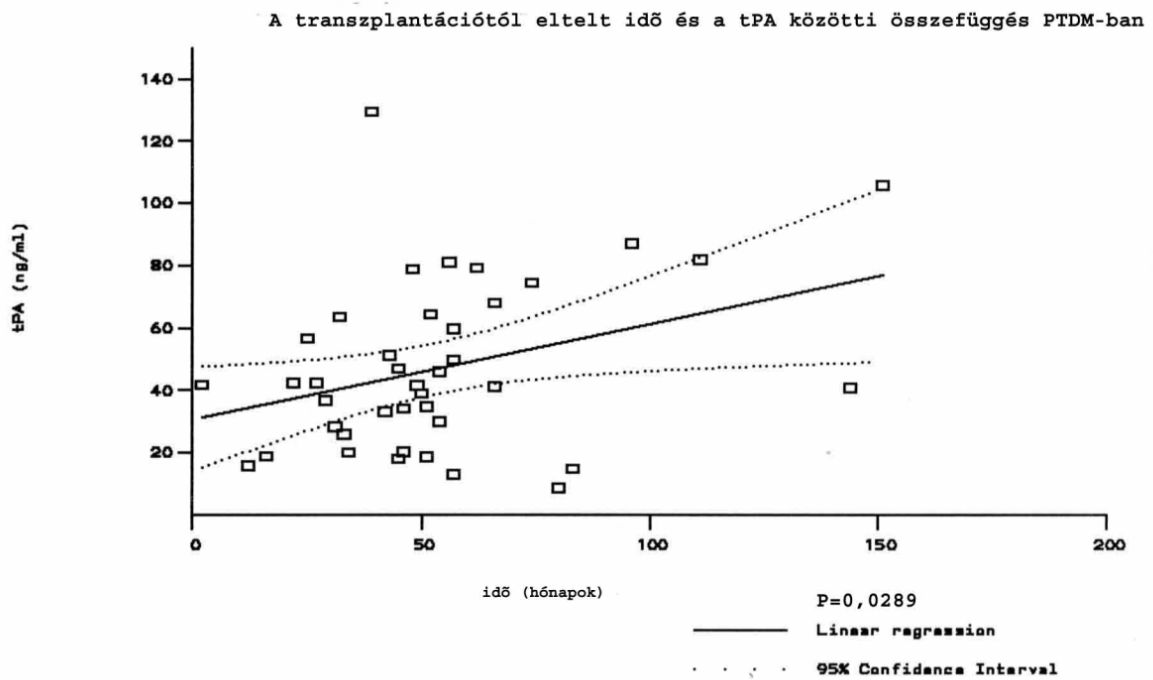
10. ábra.



11. ábra.



12. ábra.



4a. A CGH vizsgálatok eredményei:

Egy CLL-es betegnél találtunk eltérést: raritásként a 7-es kromoszóma triszómiáját, melyet később FISH-sel is sikerült bizonyítani. (A citogenetikai vizsgálat 8-as triszómia mellett szólt. 7-es és 8-as kromoszóma centroméra-specifikus szondák felhasználásával 7-es triszómia igazolódott, a nyolcadik kromoszóma diploidnak bizonyult). További két CLL-es, egy CML-es és egy ALL-es beteg esetében kariotípus-anomáliát nem találtunk.

4b. A FISH-vizsgálatok eredményei:

CML, (vagy alapos gyanúja) miatt 44 beteget vizsgáltunk, s összesen 77 hibridizációt végeztünk. (Több beteg esetében ismételten is vizsgáltuk a BCR/ABL transzlokáció jelenlétét, ill. a pozitív sejtek arányának változását).

INF-kezelés megkezdése előtt 28 beteg FISH-vizsgálatára került sor. Ezeknek a betegeknek az adatai a 7. (a-d) táblázatokban láthatók. A klinikai adatok CML-re utaltak. 24 esetben a FISH-vizsgálat eredménye is alátámasztotta a CML feltételezett diagnózisát. A kilencedik (nő) betegnél átrendeződést nem találtunk, a citogenetikai vizsgálat sem jelzett Ph-kromoszómát. Leletei myelofibrosist bizonyítottak. További három beteg (a 14., 26. és 27.) esetében vizsgálataink (a hagyományos citogenetikai vizsgálatok eredményeit megerősítve) BCR/ABL (azaz Ph) negativitást igazoltak, s a végső diagnózis Ph-negatív CML, neutrofil-leukaemia, ill. pontosan nem definiálható krónikus myeloproliferatív betegség lett.

Citogenetikai vizsgálatra aspirálható csontvelő hiányában négy esetben nem került sor: Az első betegnél a perifériás vérből izolált fehérvérsejtek BCR/ABL pozitivitása CML mellett szólt. A diagnózist követően 16 hónappal idegdonor transzplantációban részesült. A csontvelő-átültetés óta komplett haematologiai remisszióban van. Ph-kromoszómát hordozó sejteket ismételten végzett FISH-vizsgálattal sem találtunk. (A kontroll vizsgálatok eredményei a táblázatban nincsenek feltüntetve). A 2. és 22. betegeknél szintén a perifériás vér FISH-vizsgálata biztosította a korrekt diagnózist, majd (a 22. esetében) tette lehetővé a Glivec-kezelést. A 24. beteg adatai (a crista-biopsiát is beleértve) myelofibrosis (agnogen myeloid metaplasia mellett) szóltak. Aspirálható csontvelő hiányában, jelentős citopenia ellenére, vénás vérből származó fehérvérsejtek FISH-vizsgálata igazolta a BCR/ABL transzlokációt, azaz bizonyított CML-t.

7a. tbl.

FISH-vizsgálatok CML-ben, (vagy annak gyanúja esetén) INF kezelés előtt I.

Betegek (kor/nem)	FISH (kóros: +) (pozitív sejtek %)		Citogenetika	Prognózis	Haematologiai remisszió	Megjegyzés, lefolrás
	csontvelő	vér				
1. 30é/ffi	Nem nyerhető	+ 15%	Nem történt (myelofibrosis)	Jó	Nincs	A dg. után 16 hónappal si- keres MUD. <u>CHR</u> -ban van.
2. 57é/ffi	Nem nyerhető	+ 11%	Nem történt (myelofibrosis)	Intermedier	Nincs	Eltűnt, nem követhető.
3. 27é/nő		+ 90% dupla:1%	Ph +	Jó	CHR (2 hónap)	Három hónappal betegsé- ge felismerése után acce- lerált, majd blastos fázis. Követés:12 hó, <i>meghalt</i> .
4.* 54é/ffi	+ 87%	+ 77%	Ph +	Intermedier	CHR (2 hónap)	Követés: 39 hó. <i>Meghalt</i> . Th: 5 ME INF/die
5. 54é/ffi	+ 91% dupla:3%		Ph + (85%)	Rossz	CHR (4 hónap)	Követés: 30 hó. <u>CHR</u> -ban van. Th: 3 ME INF/die
6. 37é/ffi	+ 88% dupla:4%		Ph:+	Intermedier	PHR	Hat hónappal betegségé- nek felismerése után gyors <u>acceleráció</u> , majd BMT.
7. 56é/nő	Nem nyerhető	+ 10%	Ph: -	Jó		PCR: pozitív. Gyorsan kialakuló <u>blastos</u> <u>fázis</u> , <i>meghalt</i> .
8. 50é/ffi		+ 13%	Ph-	Jó	Nincs	A FISH-vizsgálat betegsé- gének 88. hónapjában tör- tént. A 104. hónapban blastos fázis, <i>exitus</i> .
9. 62é/nő		- 0%	Ph:-			Myelofibrosis

7b. tbl.

**FISH-vizsgálatok CML-ben, (vagy annak gyanúja esetén)
INF kezelés előtt II.**

Betegek (kor/nem)	FISH (kóros: +) (pozitív sejtek: %)		Citogenetika	Prognózis	Haematologiai remisszió	Megjegyzés, lefolrás
	csontvelő	vér				
10. 27é/ffi	+ 86% dupla:2%	+ 81% dupla:1%	Ph: + 80%	Blastos fázis	-	Követés: 8 hónap. CML <u>blastos fázis</u> ban került felismerésre.
10. Kontroll	+ 44%					Kemoterápia (mini ICE) után.
11.** 61é/nő	+ 82% dupla:3%	+ 91% dupla:1%	Ph: + 100%	Intermedier	PHR	Követés: 10 hónap. 5 ME/m2/die INF és orális Ara-C kezelés mellett sem alakult ki citogenetikai javulás, vagy CHR. <u>Meghalt.</u>
12. 67é/nő	+ 70%	+ 72%	Ph: + 100%	Jó	CHR (2.5 hónap)	Követés: 36 hónap. Kezelés: 5 ME/m2/die INF és orális Ara-C, majd Glivec, ill.HU. CHR-ban van.
13. 51é/nő	+ 87%		Ph: + 100%	Jó	CHR (3 hónap)	Követés: 26 hónap. Kezelés:INF +Ara C, majd HU, később Glivec. <u>Meghalt.</u>
14. 73é/ffi	- 0%		Ph: -	Intermedier	CHR (6 hónap)	Követés: 12 hónap. Kezelés: HU CHR-ban van.
15. 64é/ffi	+ 83% dupla: 1%		Ph: +	Roszz		Követés: 14 hónap. A diagnózis után 6 hónappal acceleratio, majd <u>blastos fázis</u> . <u>Meghalt.</u> Kezelés: HU.

7c. tbl.

FISH-vizsgálatok CML-ben, (vagy annak gyanúja esetén) INF kezelés előtt III.

Betegek (kor/nem)	FISH (kóros: +) (pozitív sejtek %)		Citogenetika	Prognózis	Haematologiai remisszió	Megjegyzés, lefolyás
	csontvelő	vér				
16. *** 40/ffi	+ 96%	+ 93%	Ph: + (100%)	Jó	CHR (4 hónap)	Követés: 39 hónap, CHR-ban van. Kezelés: 10ME INF/nap, majd Glivec.
17. 65/ffi	+ 88%		Ph: -	Rossz		Követés: 9 hónap, <u>meghalt</u> . Blastos fázisban került felismerésre. Kezdetben AML (M3)-ra utaló morfológia. A t(15;17)-et ismételt citogenetikai és FISH vizsgálat sem igazolta.
18. **** 50/ffi	+ 93%	+ 94%	Ph: + (100%)	Intemedier	CHR (3 hónap)	Követés: 31 hónap. CHR-ban van. Kezelés: 9 ME INF/nap és orális Ara-C, majd INF, később Glivec
19. 60/nő		+ 96%	Ph: + (100%)	Intemedier	CHR (2,5 hónap)	Követés: 30 hónap. Kezelés: HU, majd Glivec CHR-ban van.
20. ***** 47/ffi		+ 87%	Ph: +	Jó	CHR (2 hónap)	Követés: A 40 hónapban blastos fázis. <u>Meghalt</u> . Kezelés: 9 ME INF/nap, majd Glivec.
21. 34/nő	+ 90%		Ph: +	Intemedier		Követés: 1 hónap kezelés: HU
22. 51/nő	Nem nyerhető	+ 93%	Nem történt (myelofibrosis)	Intemedier		Követés: 18 hónap. A dg. után 2 hónapal <u>acceleratio</u> . Kezelés: 3 x3 ME INF/hét és HU, majd Glivec. ÉI. CHR-ban van.
23. 55/nő	+ 90%		Ph: +	Jó	CHR	Követés: 26 év. INF-fet nem kapott. CHR-ban van.

7d. tbl.

FISH-vizsgálatok CML-ben, (vagy annak gyanúja esetén) INF kezelés előtt IV.

Betegek (kor/nem)	FISH (kóros: +) (pozitív sejtek %)		Citogenetika	Prognózis	Haematologiai remisszió	Megjegyzés, lefolrás
	csontvelő	vér				
24. 28/nő		+ 12%	Nem történt (myelofibrosis)	Accerelált fázis	Nincs	Crista biopsia myelofibrosist jelzett. Követés: 16 hónap CML accelerált fázisban került felismerésre. <u>Meghalt.</u>
25. 70/fi	+ 69%	NT	Ph: + (100%)	Intermedier	CHR	Követés: 13 hónap. CHR-ban van. Kezelés: Litalir, 3ME INF/die, majd Givec
26. 55é/fi	- 0%	NT	Ph: -		Nincs	Neutrofil leukémia
27. 69/nő	NT	- 4%	Ph: -			Pontosan nem definiálható krónikus myeloproliferatív betegség. (CMPD). (Kezdetben CML merült fel).
28. 68/nő	NT	+ 16%	Ph: -	Accerelált fázis	Nincs	6 ével korábban ALL miatt kezeltük. Később CML accelerált fázist észleltünk. Követés: 5 hónap <u>Meghalt.</u>

További négy, FISH-sel BCR/ABL pozitívnak bizonyuló betegben (a 7., 8., 17., 28. esetekben) a citogenetikai vizsgálat nem jelezte a Ph-kromoszóma jelenlétét.

A FISH-analíziseket részben csontvelői, részben perifériás vérből származó sejteken végeztük. Hat alkalommal egy időben nyert csontvelői és perifériás vérmintákon párhuzamos vizsgálatokat is végeztünk, hasonló eredménnyel. A sejtek 100%-át érintő génátrendeződést egyetlen esetben sem láttunk. A betegek jó, intermedier és rossz prognosztikus csoportokba való besorolását, valamint a haematologiai remisszió kialakulásának megítélését a 8. és 9. táblázatok alapján végeztük (132, 133).

7. tbl.

Prognosztikai tényezők és csoportok frissen felismert CML-ben

Rossz prognosztikai tényezők

Kor \geq 60 év

Lép \geq 10 cm-el meghaladja a bal bordaívet

Blastok: \geq 3% a vérben vagy \geq 5% a csontvelőben

Thrombocytaszám: \geq 700 X 10⁹ / l

Basophilarányok: \geq 7% a vérben vagy \geq 3 % a csontvelőben

Jó, intermedier és rossz prognózisú csoportok

Jó prognózis: 0 vagy 1 tényező esetén

Intermedier: 2 tényező esetén

Rossz prognózis: 3 vagy több tényező esetén

9. tbl.

A haematologiai remisszió megítélése CML-ben

	Kategória	Kritériumok
Haematologia remisszió	Komplett	normális fvs.-szám < 10 X 10 ⁹ / l és qualitativ vércép normális thr-szám: < 450 X 10 ⁹ / l A betegség összes tünete megszűnik
	parciális	normális fsv-szám: < 10 X 10 ⁹ / l fiatal-sejtek a periférián, vagy splenomegalia, vagy thrombocytosis: < a kiindulási érték 50 %-a

A 28 beteg közül hat (a 3., 5., 6., 10., 11., 15. betegek) esetében észleltünk (kis százalékban) dupla Ph-pozitivitást. E kis számok óvatosan kezelendők, azonban

a hat beteg közül négy esetében gyors accelerációt, ill. blastos fázis kialakulását észleltük, azaz a betegség felismerésekor (akár kis százalékban) kimutatható dupla Ph-pozitivitás rossz prognózist sejtet, s intenzívebb kezelés szükségességét veheti fel.

Vizsgálataink fontos tanulsága, hogy a FISH-vizsgálat mind csontvelői, mind perifériás sejteken elvégezhető, a parallel végzett vizsgálatok eredményei megfelelően korrelálnak, azaz nem feltétlenül szükséges rendszeres csontvelő-vizsgálat elvégzése. A betegek követésére (a kezelés közben, annak következtében változó Ph-kromoszóma pozitív sejtek arányváltozásának megítélésére) a kisebb megterhelést jelentő vénás vérvétel, ill. a keringésből szeparált fehérvérsejtek vizsgálata is megfelelő lehet.

A fentiek logikus következménye, hogy a FISH-technika azon betegek számára is informatív, hasznos, ill. diagnosztikus erejű vizsgálat lehet, akiknél technikai okok miatt csontvelő-aspirációra, citogenetikai vizsgálatra nincs lehetőség, vagy annak eredménye negatív. A hetedik betegünknel a hagyományos citogenetikai vizsgálattal nem lehetett Ph-pozitivitást demonstrálni. A FISH-vizsgálat BCR/ABL pozitivitást igazolt. A későbbiekben elvégzett PCR-vizsgálat, ill. a klinikai lefolyás (gyorsan kialakuló blastos fázis) is támogatta a FISH-által jelzett BCR/ABL átrendeződés valós voltát. A 8. beteg érdekessége, hogy (negatív citogenetikai és PCR vizsgálat alapján) sokáig Ph-negatív CML-nek kellett tartanunk. A PCR-nél kevésbé szenzitív FISH-technika jelezte a BCR/ABL átrendeződést. (A későbbiekben megismételt PCR-vizsgálat eredménye szintén pozitív lett).

A 10., blastos fázisban lévő fiatal CML-es betegünknel mini ICE kezelést követően szignifikáns Ph-pozitivitás csökkenést igazoltunk.

A 23., idős nőbetegünknel 26 évvel korábban került felismerésre a CML. INF-fet nem kapott. Ph-pozitivitása FISH-sel is megerősíthető volt. Betegsége benignus lefolyásának oka nem ismert.

A FISH-vizsgálatok során minden esetben meghatároztuk a Ph-pozitív sejtek arányát. Hagyományos citogenetikai vizsgálattal ez nehezebben határozható meg. Jól látszik azonban, hogy a konvencionális citogenetikai vizsgálattal 100%-os Ph-pozitivitással jellemzett betegek közül egy esetben sem tudtuk megerősíteni a BCR/ABL átrendeződés 100%-os gyakoriságát FISH-technikával. Ez a residuális egészséges haematopoesis (a korábban gondoltnál jelentősebb) jelenlétére utal.

A klinikai paramétereken alapuló (Sokal-score-rendszerhez hasonló információ-tartalmat hordozó) Kantarjian és munkatársai által javasolt score rendszer (amely segítségével a betegek jó, intermedier és rossz prognózisú csoportokba sorolhatók) és a FISH-vizsgálatok eredményei között ellentmondás lehetséges. A FISH-vizsgálatok pl. a 3., 6., és 11. beteg esetében rossz prognózist sugallt, a klinikai score-rendszer alapján azonban a „jó” és „intermedier” csoportban kapott helyet. A betegség lefolyása a feltételezhető „rossz prognózist” igazolta. A klinikai paramétereken alapuló score-rendszer fontos eleme a frissen felismert CML-es betegek jellemzésének, információ tartalma mindazonáltal nem éri el a genetikai vizsgálatokét. Adott esetben a genetikai vizsgálatok eredménye nagyobb súllyal értékelendő.

21, INF-fel kezelt CML-es betegnél összesen 42 alkalommal végeztünk FISH-vizsgálatot. (Voltak közös, már az előző csoportban is feltüntetett betegek is, ezért 44, s nem 49 a CML-ben vizsgált betegek száma). Az előző csoporthoz hasonlóan itt is szerepelnek mind csontvelőből, mind vénás vérből származó fehérvérsejtek hibridizációs vizsgálatai. Parallel vizsgálatokra ebben a csoportban 10 esetben került sor, az eredmények jól korreláltak (10. a,b,c táblázatok).

10.a. tbl.

INF-fel kezelt CML-es betegek I.

Betegek (kor/nem)	FISH (kóros:+) (pozitív sejtek %)		Citogenetika (a betegség felismerésekor)	Prognózis	Haematológiai remisszió	Citogenetikai válasz	Az INF- kezelés tartama a FISH végzésekor	INF (median dózis)	Megjegyzés, lefolyás
	csontvelő	vér							
1. 44 é/nő		+ (6%)	Ph +	Jó	CHR (4 hónap)	Teljes/részleges?	60 hónap	2x5 ME/hét	Követés: 96 hónap CHR-ban van
1. Kontroll	+ (6%)	+ (8%)				(citogenetika: Ph -)	67 hónap	2x5 ME/hét	
1. Kontroll	- (3%)					CCR	73 hónap	2x5 ME/hét	
2. 58é/ffi	fibrosis	+ (61%) dupla: 1%	Ph +	Jó	CHR (3 hónap)	Enyhe	23 hónap	5 ME/nap	Követés: 67 hónap. 55hónap CHR-ban, majd blastos fázis, <u>exitus</u> .
3. 32é/ffi	+ (23%)		Ph +	Jó	CHR (2 hónap)	Részleges	12 hónap	2x5 ME/hét	Követés: 39 hónap Blastos fázis, <u>exitus</u> .
3. Kontroll		+ (90%) dupla: 3%				Progresszió	26 hónap		
4. 54é/ffi *	fibrosis	+ (93%) dupla: 1%	Ph +	Intermediér	CHR (2 hónap)	Nincs (Progresszió)	22 hónap	5 ME/nap	Követés: 39 hónap Acceleratio, majd <u>exitus</u> .
5. 37é/ffi	+ (86%)		Ph + (100%)	Intermediér	CHR (4 hónap)	Enyhe	12 hónap	10 ME/nap	Követés: 35 hónap Blastos fázis, <u>exitus</u> .
6. 34é/ffi		+ (20%)	Ph -	Rossz	CHR (6 hónap)	Részleges	12 hónap	4,5 ME/nap	Követés: 70 hónap CHR-ban van. INF, majd Glivec. (CG-i romlás miatt)
6. Kontroll		+ (20%)				Részleges	24 hónap	4,5 ME/nap	
6. Kontroll		+ (73%)				Enyhe (progresszió)	29 hónap	6 ME/nap	
7. 40é/nő		+ (20%)	Ph + (100%)	Jó	PHR	Részleges	24 hónappal a BMT után	5x3 ME/hét	Követés: 96 hónap CHR-ban van. INF, majd Glivec. (CG-i romlás miatt).
7. Kontroll	+ (52%)	+ (64%)				Enyhe	32 hónappal a BMT után	5x3 ME/hét	
7. Kontroll	+ (70%)					Enyhe	64 hónappal a BMT után	5x3 ME/hét	
8. 49é/ffi	+ (96%)	+ (96%) dupla: 2%	Ph +	Jó	CHR (2 hónap)	Nincs	34 hónap	5 ME/nap	Követés: 60 hónap CHR-ban van

10.b. tbl.

INF-fel kezelt CML-es betegek II.

Betegek (kor/nem)	FISH (kóros:+) (pozitív sejtek %)		Citogenetika (a betegség felismerésekor)	Prognózis	Haematológiai remisszió	Citogenetikai válasz	Az INF- kezelés tartama a FISH végzésekor	INF (median dózis)	Megjegyzés, lefolyás
	csontvelő	vér							
9. 45 é/ffi	+ (81%) dupla: 1%	+ (77%) dupla: 2%	Ph + (100%) (A FISH- vizsgálatok végzésekor is)	Jó	CHR (8 hónap)	Enyhe	6 hónap	9 ME/nap	Követés: 52 hónap CHR-ban van. (INF és HU mellett alakul ki). Citogenetikailag nem javult - Glivec th. mellett átmeneti citogenetikai javulás.
9. Kontroll	+ (92%)	+ (90%) dupla: 4%				Nincs	12 hónap		
9. Kontroll	+ (95%) dupla: 3%					Nincs	23 hónap		
9. Kontroll	+ (33%)					Részleges	(Glivec)	-	
9. Kontroll	+ (92%) dupla: 16%					Nincs	(Glivec)	-	
10. 27é/ffi		+ (68%)	Ph +	Intermediér	CHR (3 hónap)	Enyhe	6 hónap	3x9 ME/hét	Követés: 16 hónap A 13. hónapban <u>blastos fázis, meghalt</u> .
11. 63é/nő	+ (69%) dupla: 1%	+ (68%)	Ph +	Intermediér	CHR (6 hónap)	Enyhe	7 hónap	6 ME/nap	Követés: 22. hónapban (CHR-ban) <u>elkötözött</u> .
12. 60é/ffi	Nem nyerhető	+ (79%) dupla: 1%	Ph +	Rossz	CHR (8 hónap)	Enyhe	8 hónap	4x3 ME/hét	Követés: 68 hónap A 35. hónapban <u>acceleratio. Meghalt</u> .
13. 21é/nő	+ (88%)	+ (81%)	Ph +	Rossz	CHR (2,5 hónap)	Enyhe	75 hónap	3x6 ME/hét	Követés: 121 hónap A 94.hónapban <u>ABMT. ÉI, CHR-ban van.</u> Th: INF, majd Glivec
14. 42é/ffi	+ (92%) dupla: 2%	+ (86%) dupla: 1%	Ph +	Intermediér	CHR (6 hónap)	Nincs	50 hónap	6x6 ME/hét	Követés: 98 hónap CHR-ban van. Th: INF, majd Glivec.
15. 51é/ffi		+ (33%)	Ph -	Intermediér	Nincs	Részleges	22 hónap	4x3 ME/hét	Követés: 86 hónap. PCR: (12. hó): neg. PCR: (34. hó): poz. Th: INF, majd Glivec, Meghalt.

10.c.tbl.

INF-fel kezelt CML-es betegek III.

Betegek (kor/nem)	FISH (kóros:+) (pozitív sejtek %)		Citogenetika (a betegség felismerésekor)	Prognózis	Haematológiai remisszió	Citogenetikai válasz	Az INF- kezelés tartama a FISH végzésekor	INF (median dózis)	Megjegyzés, lefolyás
	csontvelő	vér							
16. 50 é/nő	+ (84%) dupla: 1%	+ (89%) dupla: 1%	Ph +	Jó	CHR (6 hónap)	Enyhe	37 hónap	3x5 ME/hét	Követés: 47 hónap, ekkor <u>CHR-ban volt, majd elkötözött</u>
									Meghalt?

Az első (44 éves nőbeteg) érdekessége, hogy csak kisdózisú (2x5 ME/hét) INF kezelést tolerált. Gyorsan (4 hónap alatt) kialakuló komplett haematologiai remisszió után bő hat év elteltével tudunk FISH-vizsgálattal komplett citogenetikai remissziót bizonyítani. A második (58 éves férfi betegnél) a dupla Ph-pozitivitás rossz prognózist sejtetett. Annak ellenére, hogy 3 hónap alatt komplett haematologiai remisszió alakult ki, ennek fenntartása a későbbiekben a megszokottnál intenzívebb kombinált (INF + HU + folyamatos, kisdózisú, s.c. Ara-C) kezelést tett szükségessé. A 3. és 4. betegnél a citogenetikai romlás, ill. a dupla Ph-kromoszóma megjelenése előre jelezte alapbetegségük progrediálását, az accelerációt, ill. a blastos fázis kialakulását. A 7., allogén csontvelő-átültetésen átesett betegünknél (bár klinikailag panaszmentes volt), a FISH-vizsgálat jelezte a Ph-pozitív sejtek perzisztálását, ill. a későbbiekben arányuk fokozódását. A jó klinikai állapot fenntartásában, a Ph-pozitív klón háttérbe szorításában feltehetően fontos szerepe volt a transzplantációt követően folyamatosan alkalmazott INF-kezelésnek. A 7., ill. 6., 9., 19. betegeknek a FISH-vizsgálat citogenetikai romlást jelzett, s indokolta a Glivec-kezelés elkezdését.

Az előző csoporthoz hasonlóan a FISH-vizsgálat a Ph-negatív (6, 15.) betegekben is jelezte a BCR/ABL átrendeződés jelenlétét.

A dupla Ph-pozitivitás prognosztikai jelentősége több esetben ismét nagyobbak bizonyult, mint a klinikai paramétereken alapuló score-rendszeré.

Az INF-fel kezelt betegek között (10. a-c tbl) egy alkalommal, (az 1. betegnél) merült fel a teljes citogenetikai remisszió lehetősége (negatívvá váló citogenetikai

lelet, valamint a hibahatárhoz közel álló FISH vizsgálati eredmény alapján). Egy, csontvelő-átültetés után relabáló, majd INF-kezelésben részesített (a 7.), valamint négy, 6-24 hónapja INF-fel kezelt (a 3., 6., 15., és 21.) betegnél részleges citogenetikai válasz igazolódott. (A 3., 6. és 7. betegnél a későbbiekben a citogenetikai remisszió mértéke romlott). Tíz, (a 2., 5., 9., 10., 11., 12., 13., 16., 17. és 20) betegnél észleltünk enyhe választ, négy (a 8., 14., 18. 19.) betegnél nem volt citogenetikai javulás, míg a 4. betegnél citogenetikai progressziót észleltünk. A kilencedik esetben az INF-kezelést követően adott Glivec hatására átmeneti citogenetikai javulást láttunk. . Az INF-fel kezelt beteg közül tehát hat esetében volt major, tíznél pedig enyhe (minor) citogenetikai válasz. 18 beteg került tartósan CHR-be, s ketten PHR-be. Kiemelendő, hogy egy, betegsége felismerésekor rossz prognózisú betegnél is CHR és major citogenetikai remisszió alakult ki. Az INF hatékonysága jelentős egyéni különbségeket mutathat: A 10.a. tbl. első betegénél kisdózisú (heti 2x5 ME) INF-kezelés is lényegében teljes citogenetikai remissziót, míg az ötödik esetében napi 10 ME is csak enyhe citogenetikai választ eredményezett. A jelzett eredményeket az irodalomban általában javasolt dózisoknál kisebb INF-adagok adásával kaptuk.

Négy, leukocytosis miatt obszervált, citogenetikai vizsgálat során Ph-negatívnak minősített betegnél is végeztünk FISH-vizsgálatokat (11. tbl). A harmadik beteg. perifériás vérmintájában a sejtek 16%-a mutatott BCR/ABL átrendeződést. Fokozódó leukocytosis ($20 \times 10^9/L$ -ig emelkedő fehérvérsejt-szám), anaemia és thrombocyta-szám csökkenés miatt ismételt csontvelő-vizsgálatot végeztünk: az első, csaknem normális viszonyokat mutató csontvelői képpel ellentétben CML nyugodt fázisának megfelelő viszonyokat láttunk. A FISH vizsgálat pozitív eredményét PCR-vizsgálat is megerősítette. INF- monoterápiát kezdtünk. Kisdózisú kezelés (hetente 2x3 ME, később 3x3 ME) mellett vérképe javult, splenomegaliája csökkent.

11. tbl.

Leukocytosis miatt vizsgált betegek

Betegek (nem/kor)	FISH (kóros: +) (pozitív sejtek %)		Citogenetika	Megjegyzés, lefolyás
	csontvelő	vér		
1. nő/27év	- (0%)		Ph -	Követés: 30 hónap.

A t(9;22), azaz a BCR/ABL átrendeződés jelenlétét hét ALL-es betegben is vizsgáltuk (12. tbl.). Egy beteg kivételével csontvelőből nyert sejteket vizsgáltunk. A hagyományos karyotípus-vizsgálat egy esetben sem jelzett kromoszóma-anomáliát. FISH-vizsgálattal az ötödik beteg esetében, a sejtek kis százalékában (a hibahatárt meghaladó mértékben) láttunk BCR/ABL átrendeződést. A beteg terápia-refrakternek bizonyult.

12. tbl.

A t(9;22) vizsgálata ALL-ben FISH-technikával

Betegek (nem/kor)	FISH (kóros: +) (pozitív sejtek: %)		Citogenetika	Megjegyzés, lefolyás
	csontvelő	vér		
	fibrosis			Követés: 4 hét.

FISH-

AML-ben 32 hibridizációt végeztünk, s összesen 14 beteget vizsgáltunk (13. és 14. táblázatok).

13. tbl.

FISH-vizsgálatok AML-ben

Betegek (nem/kor)	Vizsgált kromoszómák, transzlokációk	FISH (kóros: +) (pozitív sejtek: %)	Citogenetika	Megjegyzés, lefolyás
1. ffi/32é	1	-	46 X,Y	AML M2, <u>Meghalt</u>
	7	-		
	8	-		
	13	-		
	17	-		
	18	+ (20% ; monosomia)		
	X	-		
	Y	-		
	t(9;22)	-		
	t(15;17)	-		
2. nő/65é	7	+ (9%; monosomia)	46 X,X	AML M1, <u>Meghalt</u>
3. ffi/69é	7	+/- (5.5%; monosomia)	46 X,Y	AML M2, <u>Meghalt</u>
	8	- (4%; monosomia)		
4. nő/52é	t(9;22)	-	46 X,X	Myelofibrosisból transzformálódott
5. nő/72é	t(9;22)	-	46 XX	AML M2 <u>Meghalt</u>
6. ffi/64é	t(9;22)	+ (11%)	46 X,Y	(CLL-es beteg. Betegsé- gének 39.-ik hónapjában kibontakozó AML). <u>Meghalt.</u>

14. tbl.

A t(15;17) vizsgálata AML M3 lehetősége esetén

Betegek (nem/kor)	FISH (kóros: +) (pozitív sejtek: %)		Citogenetika	Megjegyzés, lefolyás
	csontvelő	vér		
1. ffi/58 é	+ (7%)	+ (6)	46 X,Y	Dg: AML M3 Kö... ..
1.(kontroll) (a dg után 8 hónappal)		- (1%)		

A 13. táblázatban feltüntetett vizsgálatokat (részben lokus-specifikus szondákkal, részben centromera-specifikus szondákkal, numerikus anomáliák vizsgálata céljából) csontvelőből származó fehérvérsejteken végeztük. Az első, terápia refrakter férfi betegnél a 18. kromoszóma monosomiáját észleltük. A második betegnél a 7. kromoszóma monosomiája igazolódott, míg a következő betegnél a 7-es monosomia gyanúja volt csak felvethető. A 13. táblázatban szereplő betegek közül a hatodik

érdemel még figyelmet, akinek alapbetegsége CLL volt. Betegségének 39. hónapjában második betegségként AML igazolódott, amely BCR/ABL pozitívnak és terápia refrakternek bizonyult. A jelzett eltéréseket hagyományos citogenetikai vizsgálatokkal nem lehetett kimutathatni.

A 14. táblázatban feltüntetett nyolc betegnél heveny promyelocytá leukaemia lehetősége miatt végeztünk FISH-vizsgálatokat, s az AML M3-ra specifikus kromoszóma aberráció, a t(15;17) jelenlétét vizsgáltuk. A vizsgált nyolc beteg közül öt esetében bizonyítottuk a transzlokáció jelenlétét, s igazolódott AML M3. A t(15;17)-negatív esetekben (promyelocytás leukaemiára emlékeztető morfológia ellenére) myelomonocytás leukaemia, CML blastos fázis és AML-be transzformálódó DMPS lett a végső diagnózis. Mint a táblázatból is kitűnik, a transzlokáció vizsgálatát részben diagnosztikus céllal, részben a betegek követése miatt végeztük: az első és ötödik beteg esetében a negatívvá váló FISH-eredmény is segítette, ill. tette teljessé a remisszió megítélését. Ebben a betegcsoportban különösen érdemes hangsúlyozni a FISH-vizsgálat jelentőségét, hiszen a citogenetikai vizsgálatok nem jelezték a t(15;17) jelenlétét.

CLL-es betegeink FISH-vizsgálatait a 15. táblázatban foglaltuk össze. Elsősorban a 12-es kromoszóma trisomiáját vizsgáltuk, amely az egyik leggyakoribb genetikai anomália CLL-ben. 12-es kromoszóma számbeli eltérést nem találtunk. Kromoszóma-aberrációt egyedül az 5. beteg esetében észleltünk: korábban végzett CGH vizsgálat a 7-es kromoszóma trisomiáját jelezte. A hagyományos citogenetikai vizsgálat (a kromoszómák hasonlósága miatt) 8-as trisomiára utalt. A 7-es kromoszóma centromera-régiójára specifikus szonda felhasználásával egyértelműen igazolódott a 7-es kromoszóma számbeli rendellenessége.

15. tbl.

FISH-vizsgálatok CLL-ben

Betegek (nem/kor- stádium (Rai))	FISH (vizsgált kromoszómák: 7; 8;12)		Citogenetika	Megjegyzés, lefolrás
	csontvelő	vér		
1. ffi/74é - st. I		kr. 7; 12: diploid	46 X,Y	Követés: 78 hónap. Él.
2. nő/52é - st.II		kr. 7; 12: diploid	nem tenyésztett	Követés: 28 hónap.
2. (kontroll), st.II	kr. 12: diploid		46 X,X	Meghalt.
3. ffi/59 - st. II	kr. 12: diploid		nem tenyésztett	Követés: 96 hónap Meghalt

S végül egy, AML-be transzformálódott DMPS-es betegünk esetében szintén sikerült bizonyítani a 7-es kromoszóma numerikus anomáliáját (80%-os monoszómiáját).

FONTOSABB MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. Ismert, hogy myeloproliferatív betegségekben a thrombocyták mennyiségi zavara mellett sok esetben szerzett thrombocyta- működészavar is megfigyelhető (2, 3, 6),

melynek felismerése adott esetben segítséget jelenthet a helyes diagnózis felállításában.

Az irodalomból különféle laboratóriumi vizsgálatok ismeretesek, amelyek megkönnyíthetik a primer és secunder thrombocytosisok elkülönítését (2, 3, 6), kellően megbízható, s screening-tesztként is alkalmazható módszer azonban nem szerepel az ajánlások között. O'Brien eredményeivel (19) összhangban megfigyeléseink arra utalnak, hogy myeloproliferatív thrombocythaemiában a thrombocyta-retenció csökkent, a filter későn, vagy nem záródik.

A filter-teszt eredménye a legtöbb, nagy thrombocyta-számmal jellemezhető, krónikus myeloproliferatív betegség miatt gondozott betegünk esetében kóros volt.

Eredményeink szerint elsősorban a citrátos minták R-II értéke alkalmazható screening tesztként. A záró cseppszám és az R-I kevésbé szenzitív. (Ha valamely részeredmény -záró cseppszám, R-I, R-II - pozitivitása esetén a tesztet globálisan kórosnak minősítjük, csökken a vizsgálat specificitása, azaz nő az ál-pozitív betegek aránya).

Az O'Brien-féle filterométer screening-tesztként való alkalmazása segíti a nagy thrombocyta-számmal járó állapotok differenciális diagnosztikáját. Normális eredmények esetén inkább a reaktív thrombocytosisok ismert okait célszerű tisztázni. Kóros eredmény (R-II) a részletes haematologiai kivizsgálást indokolja.

A vérlemezkékre gyakorolt nyírási erők a thrombocyta -membrán GP Ib és GP IIb/IIIa expresszióját idézik elő, amely vWf-jelenlétében thrombocyta-aggregatiót eredményez. Logikusnak tűnik, hogy a filter-teszt során észlelt eltérések oka (legalábbis részben) a nem megfelelő GP Ib és GP IIb/IIIa - vWF kapcsolat lehet, amely elképzelést a megelőzően jelzett vizsgálatok statisztikai eredményei is támogatnak. Felvethető tehát, hogy MP betegségekben az észlelt eltérések, a kóros filter - teszt értékek hátterében a thrombocyta membrán GP Ib és GP IIb/IIIa szerzett defektusa állhat. Ezt megerősítendő, nagy thrombocyta-számmal járó KMB-ben a vérlemezke-membrán glycoproteinek vizsgálatát tervezzük.

További terveink közé tartozik (parallel mérések végzésével) az O'Brien-féle filter-teszt és a PFA összehasonlító vizsgálata, diagnosztikus értékük, szenzitivitásuk, specificitásuk összevetése. A betegek követése során ismételt mérések végzésével a (hidroxiurea, interferon, anagrelid, ill. aspirin) kezelés monitorizálását is tervezzük. E vizsgálatok segíthetik az előnyösebb hatású gyógyszer (vagy kombináció) kiválasztását, azaz a betegek optimálisabb kezelését.

2. A mosott humán thrombocyták rendkívül csekély mennyiségű NO képzése in vitro rendszerben, L-Arg. jelenlétében, fiziológias aktiváló anyagok alkalmazásával (melyeket a laboratóriumi diagnosztikában is rutinszerűen, s hasonló koncentrációban használunk) az általunk alkalmazott elektrokémiai módszerrel jól vizsgálhatónak bizonyult.

Az NO szintézis jól ismert, gyakran használt kompetitív metabolikus inhibitorait alkalmazva több mint 95%-os NO válasz csökkenés következett be, mely igazolja az NO képzésre vonatkozó eredmények specifikus voltát.

Vizsgálataink megerősítik azt a tényt, hogy nyugvó thrombocytá nem termel NO-t in vitro körülmények között.

Adataink arra utalnak, hogy a thrombocytá NO válasz az in vitro rendszerben a myeloproliferatív thrombocytosisokban jelentősen csökken.

Az O'Brien féle filterométerrel végzett vizsgálatok és a thrombocytá NO vizsgálatok eredményei segítségével jobban magyarázhatjuk a myeloproliferatív thrombocytosisokban egyaránt észlelhető thrombotikus és haemorrhagiás szövődmények kialakulását: A szerzett thrombocytopathia, a GPIb, GP IIb/IIIa defektus vérzéses szövődményekre, míg a csökkent NO termelés (aktívabb thrombocytá-működést eredményezve) inkább thrombotikus vascularis komplikációkra hajlamosít. (Ezek az adatok kiegészíthetők 33 primér thrombocytosisos betegünk plasma F XIII-szint meghatározásának eredményével: myeloproliferatív thrombocytosisban nagyobb volt a plasma F XIII szintje és aktivitása, amely szintén hozzájárulhat a thrombotikus vascularis szövődmények kialakulásához).

Feltételezésünkkel összhangban, irodalmi adatok szerint is valószínűsíthető „sajátos” kvantitatív és kvalitatív thrombocytá-anomália myeloproliferatív betegségekben (39).

3. Poszttranszplantációs diabetes mellitusban endothelium-sérülésre, károsodott fibrinolysisre és fokozott thrombocytá-aktivációra utaló laboratóriumi eltéréseket észleltünk. Ezek az eltérések ok-okozati összefüggésben lehetnek a transzplantáció után ismertén fokozott (az egészséges populációhoz képest 5-7-szer gyakoribb) cardiovascularis morbiditással és mortalitással.

A jelentősen fokozott thrombocyta-aktiváció nem csak az atherosclerosis progressziójában, a macroangiopathia pathogenesisében lehet kulcsfontosságú, de a vesekárosodás (microangiopathia) kialakulásában is fontos szerepet játszhat. (Erre a creatinine - β TG közötti szignifikáns korreláció utal).

Jobb vércukor és lipid-értékek biztosításával PTDM-ben is késleltethetjük az angiopathia, ill. a cardiovascularis szövődmények kialakulását, hiszen kisebb lesz az endothel-sérülés és a fibrinolysis-károsodás mértéke. Irodalmi adatok alapján krónikus rejectio során nagyobb szérumszintű triglicerid-szintek észlelhetők (77). A nagyobb triglicerid-szintek vizsgálataink szerint nagyobb PAI-I aktivitással, azaz csökkent fibrinolysissel társulnak. Ez utóbbi, irodalmi adatok szerint (68, 69, 77), segíti a kis ér thrombosisok, azaz a vascularis rejectio kialakulását.

Ismert módon a cyclosporin A önmagában alig diabetogén, steroiddal együtt adva azonban kifejezetten azzá válik. Kombinált (steroid + CyA) kezelés esetén potenciózzák egymás diabetogén, endothel- és fibrinolysis károsító hatását. PTDM-ben nagy PAI-1 értékeket mértünk, amely hypofibrinolysist jelez. A transzplantációtól eltelt idő és az endothel-károsodás, ill. a fibrinolysis csökkenése közötti korreláció a tartósan steroidot is tartalmazó immunszuppressziós kezelés toxicitására, a hosszan tartó steroid-kiegészítésnek a szövődmények kialakulására és progressziójára gyakorolt jelentős hatására hívja fel a figyelmet. A hypofibrinolysis az allograft működésének romlásához, krónikus graft-elégtelenség kialakulásához, vascularis rejectióhoz, valamint fokozódó atherosclerosis-hoz vezethet.

A steroid-mentes immunszuppresszió (CyA monoterápia) a steroidot is tartalmazó kombinációkhoz hasonló, vagy tartósabb graft működést és túlélést biztosíthat egyes adatok szerint (78, 79, 80, 81).

A modern immunszuppressziós kezelés általában kivédi az immurejectiót, ugyanakkor elősegíti a krónikus vascularis rejectio kialakulását. Az adekvátabb immunszuppressziós kezelés (steroid mentes protokollok), ill. a rizikó-adaptált immunszuppresszió kidolgozásában a haemostasis-vizsgálatoknak meghatározó szerepet kellene kapniuk.

4. A heveny és krónikus leukaemiák diagnosztikájában és kezelésében egyre nagyobb szerepe van a háttérben álló genetikai anomáliák mind pontosabb megismerésének, feltérképezésének. Egyes betegségekben (pl. CLL-ben) mind

hangsúlyosabbá válik a rizikó-adaptált kezelés, amelyhez a különböző prognosztikai faktorok ismerete elengedhetetlen. A prognosztikai tényezők között kiemelt jelentőséggel bírnak a kromoszóma-aberrációk (pl. a számbeli eltérések, deléciók), amelyek a hagyományos citogenetikai vizsgálatokkal sokszor felismerhetők, de nem elhanyagolható arányban rejtve is maradhatnak. A CGH alkalmazásával a leukaemiás sejtek teljes genomra kiterjedő genetikai analízise, (pl. prognosztikai jelentőséggel bíró numerikus kromoszóma-eltérések, deléciók pontosabb felismerése) válik lehetségessé. Sikeres (még kis számú) CGH vizsgálataink alapján úgy gondoljuk, hogy a későbbiekben a CGH-vizsgálatok gyakoribb alkalmazása a hagyományos citogenetikai vizsgálatokkal együtt, azokat részben kiegészítve segíteni fogják a genetikai anomáliák pontosabb felismerését, hozzájárulva a rizikó-adaptált kezelés jobb megvalósításához, s további (fontos) prognosztikai tényezők megismeréséhez.

Az allogén csontvelő-átültetés és az INF-kezelés megváltoztatta és perspektivikusabbá tette a CML kezelését. Reálissá vált a háttérben álló genetikai anomália befolyásolása, a betegek túlélése hosszabb lett. A citogenetikai válasz minősége fontos, független, túlélést befolyásoló prognosztikai tényezőnek bizonyult (134). A citogenetikai válasz korrelál a túléléssel: jobb citogenetikai válasz esetén hosszabb túlélés várható. Az újabban alkalmazott Glivec kezelés mellett a túlélés várhatóan tovább javul, ennek pontos megítélése azonban (az idő rövideje miatt) még nem lehetséges. Ugyanígy, az imatinib-kezelés eredményeként kialakuló citogenetikai válasz prediktív értékét sem lehet még pontosan megítélni (135, 136). A fentiek logikus következményeként a BCR/ABL transzlokáció pontos kimutatása (a betegség felismerésekor és követése során egyaránt) rendkívül fontossá vált. Vizsgálataink alapján a BCR/ABL átrendeződés FISH-vizsgálatának gyakorlati jelentősége a következőkben foglalható össze:

1. A diagnózis pontosítása (Ph-pozitivitás jobb megítélése, leukocytosisok differenciális diagnosztikája, atípusos és kezdeti CML felismerése).
2. Csontvelő és perifériás vérminták egyaránt vizsgálhatók.
3. Citogenetikai vizsgálatra nem alkalmas betegek esetében is elvégezhető.

4. A kromoszóma-aberrációt a hagyományos citogenetikai vizsgálatnál nagyobb pontossággal jelzi.
5. A Ph-pozitív sejtek arányváltozásának a vizsgálatával az INF (és egyéb)-kezelés hatékonyságát mutatja, amely a terápiás siker (sikertelenség) fontos jellemzője. Kérdéses lehet, hogy a FISH-vizsgálat alkalmas-e a Glivec-kel kezelt betegek citogenetikai követésére. Az ezzel kapcsolatos irodalmi adatok egymásnak ellentmondásosak (137, 138, 139). E kérdés megválaszolásához vizsgálatunk folytatásával magunk is keressük a választ.
6. A csontvelő-átültetés javallatának a megítélése.
7. Transzplantáción átesett betegek követése.
8. INF- kezelés hatására még a rossz prognózisú csoportban is kialakulhat major citogenetikai válasz, amelynek nagy jelentősége van a krónikus fázis prolongálásában, ill. a jobb túlélési idők biztosításában.
9. A korábbi metafázist igénylő citogenetikai vizsgálatok adataival ellentétben, interfázisos citogenetikai (FISH) vizsgálatokkal kezeletlen CML-es betegek csontvelő (vagy vér) mintáiban sem mutatható ki feltétlenül nagy (95-100) százalékban a Ph-kromoszóma jelenléte. Ez módosíthatja a reziduális normális haematopoesis, valamint a jelenleg is alkalmazott citogenetikai válasz kritériumainak megítélését.

CML-hez hasonlóan a FISH-technika AML-ben és ALL-ben is jól alkalmazható a BCR/ABL átrendeződés vizsgálatára, valamint AML M3-ban a diagnosztikus t(15;17) kimutatására és ennek (azaz a betegek citogenetikai) követésére. Ugyan így fontos szerepe lehet heveny leukaemiákban a numerikus (és strukturális) kromoszóma anomáliák feltérképezésében. Annak ellenére, hogy CLL-es betegeink között csak egy esetben észleltünk kromoszóma-eltérést (raritásként a hetedik kromoszóma triszómiáját), a későbbiekben a FISH-vizsgálatok folytatását tervezzük CLL-ben is, amelytől a betegek kezelését befolyásoló, egyben prognosztikai jelentőségű genetikai eltérések pontosabb kimutathatóságát várjuk.

Összességében tehát a már alkalmazott (és terveink szerint a későbbiekben matrix-CGH-val is kiegészítendő) molekuláris biológiai vizsgálatokat a rosszindulatú vérképző szervi betegségekben szenvedő betegeink ellátásának javítására kívánjuk felhasználni. A fentiekén túlmenően választ keresünk arra az újabb feltételezésre,

hogy a Glivec valóban eredményezhet-e genetikai instabilitást, s ez hogy viszonyul bizonyos kedvezőtlen citogenetikai prognosztikai faktorok (pl. 9q del) jelenlétéhez. A genetikai instabilitás vizsgálatára a FISH-technika is jól alkalmazható: az acceleratióra utaló citogenetikai eltérések (pl. +8, +19, +21, i(17q), dupla Ph-kromoszóma) megfelelő (pl. centroméra-specifikus, locus-specifikus) szondákkal pontosan vizsgálhatóak és követhetőek. A matrix-CGH hatékonyabbá teheti a terápia (pl. Glivec) refrakteritásra prediszponáló genotípus felismerését, ill. a klonális evolúció követését. A CML-en túlmenően myeloma multiplex-ben, CLL-ben, ill. heveny leukaemiákban is a genetikai prognosztikai faktorok teljesebb és pontosabb felismerését várjuk, amely a kezelés árnyaltabbá tételét, a rizikó-adaptált kezelés teljesebbé tételét vonja maga után.

Összefoglalás

1. A myeloproliferatív betegségekben észlelhető thrombocytosisok elkülönítése a reaktív thrombocytosisoktól időnként komoly differenciális diagnosztikai gondot okoz. A primer és szekunder thrombocytosisok elkülönítésére magunk a hazánkban még kevésbé ismert O'Brien-féle filter-tesztet vizsgáltuk. Antikoagulánsként citrátot használva az O'Brien-féle filter-teszt (R-II értékének) szenzitivitása 77.1%-nak, specificitása 94.4%-nak bizonyult. Eddigi vizsgálataink alapján az O'Brien-féle filter-teszt hasznos a nagy thrombocyta-számmal járó állapotok elkülönítő diagnosztikájában. Normális eredmények esetén elsősorban a reaktív thrombocytosisok ismert okait célszerű keresni, míg kóros eredmények

esetén a beteg haematologiai kivizsgálása is indokolt. A filter-teszt alkalmazását (PFA-val együtt) a terápia megtervezéséhez, (a megfelelő gyógyszer, vagy gyógyszer-kombináció kiválasztáshoz) is tervezzük.

2. Az utóbbi évek vizsgálatai szerint az NO synthase (iNOS, ecNOS) a thrombocytákban is megtalálható, amelyek a vérlemezkék aktiválódása és aggregációja során aktiválódnak. A thrombocyták aktiválódása során képződő minimális mennyiségű (thrombocyta eredetű) NO fontos szerepet játszik a vérlemezkék további aktiválódásának, kitapadásának, aggregációjának gátlásában. Egészségesek és nagy thrombocyta-számmal járó krónikus myeloproliferatív betegségekben szenvedők mosott thrombocytáit különböző aggregáló szerekkel (pl. thrombin, kollagén, epinephrin, stb) aktiváltuk. A betegcsoportban jelentősen csökkent NO-választ észleltünk. Feltételezésünk szerint a csökkent NO-termelés aktívabb thrombocyta-működést eredményezhet, s hozzájárulhat az angiopathia és a thrombotikus szövődmények kialakulásához.

3. Veseátültetést követően a betegek morbiditásának és mortalitásának legfontosabb okai a fokozott atherosclerosis és thrombosis-hajlam. E szövődmények kialakulásában a csökkent fibrinolysis és lipid-eltérések szerepe kiemelt jelentőségű. A transzplantáció utáni PAI-1 aktivitás fokozódás az irodalmi adatok alapján bizonyítottan tekinthető. Más haemostasis-paraméterek (pl. tPA, TM) változásai csak részben ismertek, s az adatok sokszor ellentmondásosak.

53 veseátültetésen átesett, immunszuppressziós kezelés (steroid + cyclosporin A ± azathioprin ± mofetilium mycophenolicum) indukálta diabetes mellitusos betegben vizsgáltuk a szérum PAI-1, tPA, β -TG és sTM-szinteket. A kontroll csoporthoz képest több mint kétszeres PAI-1 aktivitást és tPA szintet észleltünk, amely fokozott atherogen kockázatra utal. A sTM csaknem háromszoros emelkedése endothelium-károsodást jelez. A legfeltűnőbbben a β -TG szint emelkedett, s ez fokozott in vivo thrombocyta-aktivációra utal. Az immunszuppressziós kezelés indukálta poszttranszplantációs diabetesben a hypofibrinolysis mellett fokozott thrombogenitással, accelerált atherosclerosisial kell számolni, amely eltérések fokozott cardiovascularis morbiditáshoz és mortalitáshoz,

részben graft dysfunctio kialakulásához és annak progressziójához vezethetnek. A fenti haemostasis eredmények is alátámasztják, hogy az immunszuppressziós kezelés által indukált diabetesnek komoly vascularis következményei vannak, s egyben steroid-mentes immunszuppressziós protokollok előnyben részesítésére ösztönöznek.

4. Malignus haematologiai betegségekben a daganatos sejtek genomjában létrejött génkárosodások alapvető jelentőségűek a leukaemiák kialakulásában, biológiai viselkedésükben és klinikai lefolyásukban egyaránt. A kromoszóma elváltozásoknak a megbízható kimutatása ezért fontos lehet a helyes diagnózis felállításában, a prognózis megítélésében, a kezelés megtervezésében és a betegség követésében egyaránt.

A CGH legfőbb előnye a teljes genomra kiterjedő átfogó genetikai vizsgálat lehetősége. A módszertől a pathogenesis és prognózis szempontjából egyaránt fontos anomáliák pontosabb vizsgálatát, megismerését és a klonális evolúció jobb követhetőségét várjuk.

A FISH-technika lehetőséget biztosít a kromoszóma-eltérések célzott, gyors kimutatására. Alkalmas a diagnosztikai és prognosztikai jelentőségű kromoszóma-anomáliák felismerésére, a genetikai aberrációk monitorizálására, azaz a betegség követésére. Eredményeink szerint a FISH-technika segítségével heveny és idült leukaemiákban egyaránt eredményesen (a hagyományos citogenetikai vizsgálatnál pontosabban) vizsgálhatjuk a BCR/ABL átrendeződés jelenlétét, annak kvantitatív változását, amely fontos a diagnózisban, a differenciális diagnózisban és a betegek követésében, a kezelés eredményességének megítélésben egyaránt. A csontvelői és perifériás sejtek lényegében hasonló eredménnyel vizsgálhatóak, azaz a betegek citogenetikai követésére a perifériás vérminták FISH-vizsgálata megfelelő, ritkábban végzett csontvelő-vizsgálattal is lehetséges. A BCR/ABL átrendeződéshez hasonlóan más (ismert) transzlokációk, strukturális és numerikus anomáliák egyaránt hatékonyan vizsgálhatók.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Murphy S., Iland H., Rosenthal D.S. és mtsa: Essential thrombocythemia: an interim report from the polycythemia vera study group. *Sem. Hematol.*, 1986, 23, 177 - 182.
2. Péterfy M.: Myeloproliferativ thrombocytosis, esszenciális thrombocythaemia. *Magy. Belorv. Arch.*, 1996, 49, 275-278.
3. Zahavi J., Zahavi M., Firsteter E., és mtsai: An abnormal pattern of multiple platelet function abnormalities and increased thromboxane generation in patients with primary thrombocytosis and thrombotic complications. *Eur. J. Haematol.*, 1991, 47, 326 - 332.
4. Kwong Y. L., Liang R. H. S., Chiu E. K. W., és mtsai: Essential thrombocythemia: A retrospective analysis of 39 cases. *Am. J. Hematol.*, 1995, 49, 39 - 42.

5. Randi M. L., Stocco F., Rossi C. L. és mtsai: Thrombosis and haemorrhage in thrombocytosis. Evaluation of a large cohort of patients (357 cases). *J. Med.*, 1991, 22, 213-223.
6. Messinezy M., Westwood N., Sawyer B. és mtsai: Primary thrombocythaemia: a composite approach to diagnosis. *Clin. Lab. Haemat.*, 1994, 16, 139-148.
7. Kundu S. K., Heilmann E. J., Sio R. és mtsai: Description of an in vitro platelet function analyzer - PFA-100. *Semin. Thromb. Hemost.*, 1995, 21 (Suppl.2), 106-112.
8. O'Brien J. R., Salmon G. P.: Shear stress activation of platelet glycoprotein IIb/IIIa plus von Willebrand factor causes aggregation: filter blockage and the long bleeding time in von Willebrand's disease. *Blood*, 1987, 70, 1354-1361.
9. Boda Z., Rák K.: A "Shear-stress" okozta thrombocyta-adhézió és -aggregáció in vitro vizsgálata az O'Brien-féle filter-tesztben. *Magy. Belorv. Arch.*, 1994, 6, 433-439.
10. Murphy S., Peterson P., Iland H., és mtsai: Experience of the polycythemia vera study group with essential thrombocythemia: a final report on diagnostic criteria, survival, and leukemic transition by treatment. *Sem. Hematol.*, 1997, 34, 29 - 39.
11. Nowell P. C., Hungerford D. A.: A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science*, 1960, 132, 1497-1499.
12. Rowley J. D.: A new consistent chromosome abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 1973, 243, 290-293.
13. Murphy S.: Diagnostic criteria and prognosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin. Hematol.*, 1999, 36 (Suppl. 2): 9-13.
14. Pfliegler G., Boda Z., Udvardy M. és mtsai: Platelet function studies in myeloproliferative disorders. *Folia Haemat.*, 1986, 113, 655-662.
15. Boda Z., Tornai I., Rák K.: Studies of the platelet filter test (shear dependent platelet aggregation) in patients with uncommon haemorrhagic disorders. *Blood Coag. Fibrinol.*, 1996, 7, 162-164.
16. O'Brien J. R.: Shear-induced platelet aggregation. *Lancet.*, 1990, 335, 711-713.
17. Zimmerman T. S., Ratnoff O. D., Powel A. E.: Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease. *J. Clin. Invest.*, 1971, 50, 244-254.

18. Zimmerman T. S., Roberts J., Edgington T. S.: Factor VIII related antigen: multiple molecular forms in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1975, 72, 5121-5125.
19. O'Brien J. R., Salmon G. P.: An independent haemostatic mechanism: shear induced platelet aggregation. In: Liu C Y, Chien S, ed. *Fibrinogen, thrombosis, coagulation, and fibrinolysis*. Plenum Press, New York, 1991: 287-296.
20. Huszka M., Káplár M., Rejtő L., Tornai I., Palatka K., László P., Udvardy M.: The association of reduced endothelium derived relaxing factor-NO production with endothelial damage and increased in vivo platelet activation in patients with diabetes mellitus. *Thromb. Res.*, 1997, 86, 173-180.
21. Udvardy M., Káplár M., Rejtő L., Tornai I., Palatka K., László P., Huszka M.: Increased in vivo platelet activation and reduced intravascular endothelium-derived relaxing factor and nitrate/nitrite production in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Platelets*, 1998, 9, 257-260.
22. Moncada S., Palmer R., Higgs E A.: Nitric oxide, physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 1991, 43: 109-142.
23. Huszka M., Káplár M., Rejtő L., Udvardy M.: The effects of in vitro platelet activation on platelet derived nitric oxide (NO) production in healthy humans and in diabetes mellitus. In: *The Biology of Nitric Oxide*. 2000. Part 7, 86-90.
24. Muruganandam A., Mutus B.: Isolation of nitric oxide synthase from human platelets. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, 1200: 1-6.
25. Sase K., Michel T.: Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci.*, 1995, 57: 2049-2055.
26. Mehta J L., Chen L Y., Kone C B., Mehta P., Turner P.: Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J. Lab. Clin. Med.*, 1995; 125: 370-377.

27. Zhou Q., Hellermann G R., Solomonson L P.: Nitric oxide release from resting human platelets. *Thromb. Res.*, 1995, 77: 87-96.
28. Freedman J E., Loscalzo J., Barnard M R, Alpert C., Keaney J F., Michelson A D.: Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J. Clin. Invest.*, 1977, 100: 350-356.
29. Radomski M W., Palmer R M J., Moncada S.: An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, 87: 5193-5197.
30. Berkels R., Stockklauser K., Rösen P., Rösen R.: Current status on platelet NO synthases. *Thromb. Res.*, 1997, 87: 51-55.
31. Malinski T., Radomski M W., Taha Z., Moncada S.: Direct electrochemical measurement of nitric oxide released from human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, 194: 960-965.
32. Radomski M W., Zakar T., Salas E.: Nitric oxide in platelets. *Meth. Enzymol.*, 1996, 269: 88-107.
33. Udvardy M., Káplár M., Rejtő L., Szász R., Huszka M.: Csökkent in vitro thrombocytá endothel eredetű relaxáló faktor/nitrogén-monoxid (EDRF/NO) képzés cukorbetegben a vérlemezke-aktiváció során. *Diabetologia Hungarica*, 2001, 9: 63-67.
34. Gordge M P., Neild G H.: Platelets from patients on haemodialysis show impaired responses to nitric oxide. *Clin. Sci.*, 1992, 83: 313-318.
35. Cadwagn T M., Benjamin N.: Evidence for altered platelet nitric oxide synthesis in essential hypertension. *J. Hypertension* 1993, 11: 417-420.

36. Orlandi E., Castelli D., Brusamolino E., Canevari A., Morra E., Lazzarino M., Bernasconi C.: Hemorrhagic and thrombotic complications in polycythaemia vera. A clinical study. *Haematologica*, 1989, 74: 45-49.
37. Schafer A I.: Bleeding and thrombosis in the myeloproliferativ disorders. *Blood*, 1984, 64: 1-12.
38. Cancelas J A., Garcia-Avello A., Garcia-Frade L J.: High plasma levels of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in polycythaemia vera and essential thrombocythemia are associated with thrombosis. *Thromb. Res.*, 1994, 75: 513-520.
39. Prchal J T.: Elevated hematocrit, risk of thrombosis, and polycythemia vera. *Blood*, 2003, 101: 4229.
40. Rák K.: Vaszkuláris hematológia: új diszciplína a kardiológia és a hematológia mezsgyéjén. *Elméleti Orvostudomány*, 2002, 3: 167-176.
41. DeFronzo R A., Ferrannini E.: Insulin resistance. A multifacated syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension dyslipidaemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, 1991, 14: 173-194.
42. Brown A S., Martin J F.: The megakaryocyte platelet system and vascular disease. *Eur J Clin Invest*, 1994, 24 (Suppl. 1): 9-15.
43. Tschoepe D.: The activated megakaryocyte-platelet-system in vascular disease: focus on diabetes. *Semin Thromb Hemost*, 1995, 21: 152-160.
44. Udvardy M.: Diabeteses angiopathia és haemostasis, a hyperglykaemia szerepe. *Diab Hung*, 1998, 6 (Suppl): 35-39.
45. Huszka M., Káplár M., Rejtő L., Palatka K., Udvardy M.: Csökkent intravasculáris endothel eredetű NO (nitrát/nitrit)- termelés összefüggése az endothel -

- károsodással és a fokozott thrombocyt-aktivációval diabetes mellitusos betegekben. *Diab Hung*, 1999, 7: 31-36.
46. Rák K., Beck P., Udvardy M., Pfliegler Gy., Misz M., Boda Z.: Plasma levels of beta thromboglobulin and factor VIII related antigen in diabetic children and adults. *Thromb Res*, 1983, 29: 155-162.
47. Tschoepe D., Driesch E., Schwippert B., Lampeter E F on behalf of the DENIS Study Group: Activated platelets in subjects at increased risk of IDDM. *Diabetologia*, 1997, 40: 573-577.
48. Giugliano D., Ceriello A., Paolisso G.: Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, 1996, 19: 257-267.
49. Ceriello A., Bortolotti N., Pirisi M., Crescentini A., Tonutti L., Motz E., Russo A., Giacomello R., Stel G., Taboga C.: Total plasma antioxidant capacity predicts thrombosis-prone status in NIDDM patients. *Diabetes Care*, 1997, 20: 1589-1593.
50. Baynes J W., Thorpe S R.: Role of oxidative stress in diabetic complications. *Diabetes*, 1999, 48: 1-9.
51. Vijayalingam S., Parthiban A., Shanmugasundaram K R., Mohan V.: Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med*, 1996, 13: 715-719.
52. Bryszewska M., Zavodnik I B., Niekurzak A., Szosland K.: Oxidative process in red cell from normal and diabetic individuals. *Biochem Mol Biol Int*, 1995, 37: 345-354.
53. Sundaram R K., Bhaskar A., Vijayalingam S., Viswanathan M., Mohan R., Shanmugasundaram K R.: Antioxidant status, and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci*, 1996, 90: 255-260.

54. Takács J.: A cukorbetegség szövődményei. In: Diabetes mellitus. Melania, 1998, 129.
55. Ceriello A., Bortolotti N., Motz E. és mtsai: Meal-induced oxidative stress and low-density lipoprotein oxidation in diabetes: the possible role of hyperglycemia. *Metabolism*, 1999, 48: 1503-1508.
56. Miller N J., Rice-Evans C., Davie M J és mtsai: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 1993, 84: 407-412.
57. Rák K.: „Vascularis haematologia”. (Újabb eredmények és mai törekvések a haemostasis-kutatásban). *Magy Belorv Arch*, 1994, 6: 461-466.
58. Maruyama I., Shinmyozu K.: Soluble thrombomodulin: as marker of endothelial injury. *Rinsho Byori*, 1994, 42: 563-568.
59. Verpooten G A., Cools F J., Van der Planken M G és mtsai: Elevated plasminogen activator inhibitor levels in cyclosporin-treated renal allograft recipients. *Nephrol Dial Transplant*, 1996, 11: 347-51.
60. Paul L C., Fellström B.: Chronic vascular rejection of the heart and kidney - have rational treatment options emerged? *Transplantation*, 1992, 53: 1169-1179.
61. Paul L C.: Chronic rejection of organ allografts: Magnitude of the problem. *Transpl Proc*, 1993, 25: 2024-2025.
62. Gerő L., Földes K., Maklár E és mtsai: Efficacy and safety of fluvastatin treatment in kidney transplant diabetic recipients treated with steroid and cyclosporine: 1-year follow up. *Eur J Int Med*, 1997, 8 (Suppl 1): 129 (Abstr).
63. Gerő L., Földes K., Maklár E és mtsai: A szérum lipid szintek változása vesetranszplantáció után tartós immunszuppresszív kezelésben részesülő

- cukorbetegekben fluvastatin kezelés hatására. *Magy Belorv Arch*, 1996, 49: 99-102.
64. Földes K., Maklár E, Vargha P és mtsai: Effect of diet and fluvastatin treatment on the serum lipid profile of kidney transplant, diabetic recipients: a 1-year follow up. *Transpl Int*, 1998, 1(Suppl 1): 65-68.
65. Gerő L., Földes K.: A poszttranszplantációs diabetes mellitusól. *Diab Hung*, 1995, 3: 181-185.
66. Wang Y., Pratt J R., Hartley B és mtsai: Expression of tissue type plasminogen activator and type 1 plasminogen activator inhibitor, and persistent fibrin deposition in chronic renal allograft failure. *Kidney Int*, 1997, 52: 371-377.
67. Malyszko J., Malyszko J S., Pawlak K és mtsai: The coagulo-lytic system and endothelial function in cyclosporine-treated kidney allograft recipients. *Transplantation*, 1996, 62: 828-830.
68. Wang Y., Pratt J R., Tam F W és mtsai: Up-regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor messenger RNA with thrombotic changes in renal grafts. *Transplantation*, 1996, 61: 684-689.
69. Elhasade A S., Perkowska A., Paczek L és mtsai: The effect of cyclosporine on regulators of fibrinolysis in plasma from renal allograft recipients. *Ann Transplant*, 1998, 3: 13-18.
70. Porta B., Pérez-Ruixo J J., Górriz J L és mtsai: Population pharmacokinetics of cyclosporine in kidney transplant patients. *Transplant Proc*, 1999, 31: 2246-2247.
71. Gerő L., Barna I., Földes K és mtsai: 24 órás ambuláns vérnyomás-monitorozás vesetranszplantációban részesült diabeteses betegekben. *Hypertonia és nephrologia*, 1998, 2: 24-29.

72. Barna I., Váradi A., Gara P és mtsai: Relationship between diurnal blood pressure variability and left ventricular mass in patients with essential and renal hypertension, and in patients after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transpl*, 1997, 12: A63.
73. Gerő L., Barna I., Földes K és mtsai: 24-H blood pressure monitoring in kidney transplant recipients with posttransplant diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1996, 39(Suppl. 1): A290.
74. Podder H., Gerő L., Földes K és mtsai: Treatment of metabolic disorders with fluvastatin after renal transplantation. *Transplant Proc*, 1997, 28: 216-219.
75. Gerő L., Földes K., Barna I és mtsai: Napszaki vérnyomáscingadozás vesetranszplantált diabeteses betegekben - israpidin hatása a nocturnal hypertoniára. *Diab Hung*, 1998, 6(Suppl. 1): 17.
76. Udvardy M., Boda Z.: Fibrinolysis és érbetegségek. *Orv. Hetil*, 1996, 34: 1851-1855.
77. Fernandez -Miranda C., Morales J M., Porres A és mtsai: Increased lipoproteins and fibrinogen in chronic renal allograft dysfunction. *Am J Nephrol*, 1997, 17: 445-449.
78. Ponticelli C., Tarantino A., Montagnino G és mtsai: Use of steroids in renal transplantation. *Transplant Proc*, 1999, 31: 2210-2211.
79. Majorca R., Cristinelli L., Brunori G és mtsai: Prospective controlled trial of steroid withdrawal after six month in renal transplant patients treated with cyclosporine. *Transplant Proc*, 1988, 20(Suppl 3):121-125.
80. Guliankar A C., Belisky P., MacDonald A S és mtsai: Randomized controlled trial of steroids versus no steroids in stable cyclosporine-treated renal graft recipients. *Transplant Proc*, 1991, 23: 990-991.

81. Schulak J A., Mayes J T., Moritz C E és mtsai: A prospective randomized trial of prednisone versus no prednisone maintenance therapy in cyclosporine-treated and azathioprine-treated renal transplant patients. *Transplantation*, 1990, 49: 327-332.
82. Bloomfield C D., de la Chapelle A.: Chromosome abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia: Clinical and biological significance. *Semin Oncol*, 1987, 14: 372-383.
83. Uner A H., Hutchison R E., Davey F R.: Applications of in situ hybridization in the study of hematologic malignancies. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 1994, 8: 771-784.
84. Fisher K., Scholl C., Sálát J., és mtsai: Design and validation of DNA probe sets for a comprehensive interphase cytogenetic analysis of acute myeloid leukemia. *Blood*, 1996, 88: 3962-3971.
85. Harrison C J.: The management of patients with leukaemia: the role of cytogenetics in this molecular era (review). *Br J Haematol*, 2000, 108: 19-30.
86. Rák K.: Minimális reziduális betegség a hematológiában. *Orv Hetil*, 2001: 142: 1091-1095.
87. Zvara Á., Hackler L., Puskás L.: Új molekuláris módszerek a leukaemiák diagnosztizálására, osztályozására és a betegség prognosztizálására. *LAM*, 2003, 13: 111-119.
88. Golub T R.: The Genetics of AML: An update in proceedings of the American Society of Hematology. 1999, 102-111.
89. Appelbaum F R.: Molecular diagnosis and clinical decisions in adult acute leukemia. *Sem Hemat*, 1999, 36: 401-410.

90. Han T., Ozer H.: Prognostic importance of cytogenetic abnormalities in patients with chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 1984, 310: 288-292.
91. O'Brien S., del Giglio A., Keating M.: Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1995, 85: 307-318.
92. Han T., Henderson E S.: Prognostic significance of karyotypic abnormalities in patients in B-cell chronic lymphocytic leukemia: an update . *Semin Hematol*, 1987, 24: 257-263.
93. Telek B., Rejtő L., Kiss A., és mtsai: Új perspektívák a krónikus lymphoid leukaemia kezelésében. 2004. (Közlésre elküldve).
94. P. Szabó G., Balogh E., Jakab Zs. És mtsai: A citogenetikai vizsgálatok és fluoreszcencia in situ hibridizáció párhuzamos alkalmazásának jelentősége krónikus granulocytás leukaemiában és myelodysplasiás szindrómában a 8-as triszómia és a 7-es monoszómia kimutatására. *Orv Hetil*, 2002, 143: 2775-2779.
95. Clare N., Hansen K.: Cytogenetics in the diagnosis of hematologic malignancies. *Hematology/Oncology clinics of North America*. 1994, 8: 785-807.
96. James L A.: Comparative genomic hybridization as a tool in tumour cytogenetics. *J Pathol*, 1999, 187: 385-395.
97. Balázs M., Ádány R.: Molekuláris morfológiai módszerek a laboratóriumi medicinában. *LAM*, 2001, 11: 340-346.
98. Kearney L.: The impact of the new FISH technologies on the cytogenetics of haematological malignancies (review). *Br J Haematol*, 1999, 104: 648-658.
99. Cremer T., Landegent J., Bruckner A. és mtsai: Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNA with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: detection of trisomy 18 with probe L1.84. *Human Genetics*, 1986, 74: 346-352.

100. Luke S., Shepelsky M.: FISH: recent advances and diagnostic aspects. *Cell Vis*, 1998, 5: 49-53.
101. Balázs M., Mayall B H., Pinkel D. és mtsai: Karyotypic heterogeneity and its relation to labelling index in interphase breast tumor cells. *Cytometr*, 1995, 20:62-73.
102. Telek B., Rejtő L., Mezei G. és mtsai: Molekuláris biológiai vizsgálatok krónikus lymphoid leukaemiában. *Orv. Hetil*, 2001, 142: 833-837.
103. Fox J L., Hsu P H., Legator M S. és mtsai: Fluorescence in situ hybridization: powerful molecular tool for cancer prognosis. *Clin Chem*, 1995, 41: 1554-1559.
104. Sági Z., Bodó M.: FISH diagnosztika. *Magyar Onkológia*, 2002, 46: 25-32.
105. Gebhart E., Trautmann U és mtsai: Chromosomal heterogeneity of aneuploid leukemic cell populations detected by conventional karyotyping and by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anticancer Res*, 1993, 13:1857-1862.
106. Chen Z, Morgan R.: Application of fluorescence in situ hybridization in hematological disorders. *Cancer Genet Cytogenet*, 1992, 63: 62-69.
107. Sacchi N., Magnani I., Kearney L. és mtsai: Interphase cytogenetics of the t(8;21)(q22;q22) associated with acute myelogenous leukemia by two-color fluorescence in situ hybridisation. *Cancer Genet Cytogenet*, 1995, 79: 97-103.
108. Cox-Froncillo M C., Cantonetti M.: Cytogenetic analysis is non-informative for assessing the remission rate in chronic myeloid leukemia (CML). Patients on interferon-alfa therapy. *Cancer Genet Cytogenet*, 1995, 84: 15-18.
109. Carter N P., Ferguson Smith M A., Perryman M T. és mtsai: Reverse chromosome painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics. *J Med Genet*, 1992, 29: 299-307.

110. Kallioneimi A., Kallioneimi O P., Sudar D. és mtsai: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 1992, 258: 818-821.
111. Bentz M., Huck K, du Manuir S. és mtsai.: Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood*, 1995, 85:3610-3618.
112. Knuutila S., Bjorkqvist A M., Autio K. és mtsai: DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol*, 1998, 152: 1107-1123.
113. Balázs M., Ádám Zs., Treszl A. és mtsai: Chromosomal imbalances in primary and metastatic melanomas revealed by comparative genomic hybridization. *Cytometry*, 2001, 46:222-232.
114. Hovey R M., Chu L., Balázs M. és mtsai: Genetic alterations in primary bladder cancers and their metastases. *Cancer Res*, 1998, 58: 3555-3560.
115. Nagy M., Balázs M., Ádám Zs. és mtsai: Genetic instability is associated with histological transformation of follicle center lymphoma. *Leukemia*, 2000, 14: 2142-2148.
116. Méhes L., Balázs M., Róza Á., Rejtő L. és mtsai: Cytogenetic aberrations in familial chronic lymphocytic leukaemia: a report of two sibling. 2004. (Közlésre elküldve).
117. Faderl S., Talpaz M., Kantarjian H M. és mtsai: Should polymerase chain reaction analysis to detect minimal residual disease in patients with chronic myelogenous leukemia be used in clinical decision making? *Blood*, 1999, 93: 2755-2759.

118. Faderl S., Talpaz M., Estrov Z. és mtsai: The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 1999, 341: 164-172.
119. Fialkow P J., Jacobson R J., Papayannopoulou, T.: Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet, and monocyte/macrophage. *Am J Med*, 1977, 63: 125-130.
120. Oláh É.: A klinikai genetika alapjai. *Medicina*, 1999, Budapest, 163-169.
121. Nowell P C., Hungerford D.: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 1960, 132: 1497. Abstract.
122. Rowley J D.: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa banding. *Nature*, 1973, 243: 290-293.
123. Talpaz M., Kantarjian H M., Kurzrock R. és mtsai: Interferon alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myelogenous leukemia. *Ann Intern Med*, 1991, 114: 532-538.
124. Fekete S.: Interferon-kezelés hematológiai megbetegedésekben. *Gyógyszereink*, 1995, 45: 263-268.
125. Lehoczky D.: Idült myeloid leukaemia (CML). *Magy. Belorv. Arch.*, 1998, 51(Suppl. 2): 67-70.
126. Sréter L.: Krónikus myeloproliferatív megbetegedések. *Orv Hetil*, 1998, 139: 1779-1783.
127. Ujj Gy.: A krónikus myeloproliferatív betegségek (plocythaemia vera, idült granulocytás leukaemia, haemorrhagiás thrombocythaemia) mai kezelése. *Gyógyszereink*, 1996, 46: 68-72.
128. Ujj Gy.: Az interferon-kezelés krónikus myeloid leukaemiában, „hajas” sejtes leukaemiában és myeloma multiplexben. *Magy Belorv Arch*, 1998, 51: 417-425.

129. Varga Gy., Borbényi Z., Vezendi K., és mtsa: Interferon-kezeléssel szerzett tapasztalataink myeloproliferatív kórképekben. *Gyógyszereink*, 1995, 45: 284-286.
130. Udvardy M.: Az α -interferon-kezelés szerepe krónikus myeloid leukaemiában. *Orv Hetil*, 2000, 141: 67-70.
131. Rák K.: A krónikus myeloid leukaemia mai kezelése. *Orv Hetil*, 2003, 144: 405-412.
132. Faderl S., Talpaz M., Estrov Z. és mtsa: Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Ann Intern Med*, 1999, 131: 207-219.
133. Kantarjian H M., Giles F J., O'Brien S M. és mtsa: Clinical course and therapy of chronic myelogenous leukaemia with interferon-alpha and chemotherapy. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1998, 12: 31-80.
134. Mahon F X., Fabéres C., Pueyo S. és mtsai: Response at three month is a good predictive factor for newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients treated by recombinant interferon- α . *Blood*, 1998, 92, 4059-4065.
135. Deininger M W N.: Cytogenetic studies in patients on imatinib. *Semin Hematol*, 2003, 40(suppl2): 50-55.
136. Burchert A., Woelfl S., Schmidt M. és mtsai: Interferon-alpha but not the ABL-kinase inhibitor imatinib (STI571) induces expression of myeloblastin and a specific T-cell response in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2003, 101: 259-264.
137. Reinhold U., Hennig E., Leiblein S. és mtsai: FISH for BCR-ABL on interphase of periferal blood neutrophils but not of unselected white cells correlates with bone marrow cytogenetics in CML patients with imatinib. *Leukemia*, 2003, 17: 1925-1929.
138. Kantarjian H M., Cortes J E., O'Brien S. és mtsai: Imatinib mesylate therapy in newly diagnosed patients with Philadelphia chromosome-positive chronic

myelogenous leukemia: high incidence of early complete and major cytogenetic responses. Blood, 2003, 101: 97-100.

139. Goldberg S L., Madan R A., Rowley S D. és mtsai: Myelodysplastic subclones in chronic myeloid leukemia: implications for imatinib mesylate therapy. Blood, 2003, 101:781.

140. Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A. és mtsai. Genomic aberration and survival in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med, 2000, 343: 1910-1916.

A TÉZISEKHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Rejtő L., Schlammadinger Á., László P., Kiss A., Telek B., Boda Z.: A nagy thrombocyta-számmal járó kórképek elkülönítése az O'Brien-féle filter-teszt segítségével. Orv. Hetil., 139: 1961-1964, 1998.

2. Rejtő L., Schlammadinger Á., László P., Kiss A., Telek B., Boda Z.: Use of a platelet filter test in patients with thrombocytosis. Platelets, 11: 64-68. 2000. Impakt factor: 0.882

3. Rejtő L., Balázs M., Ádány R., Rák K., Telek B., Kiss A., Ujj Gy., Mezei G., Balogh E., Udvardy M.: Fluoreszcencia in situ hibridizációval szerzett tapasztalataink a krónikus myeloid leukaemia diagnosztikájában és követésében. Orv. Hetil. 141: 2133-2137, 2000.

4. **Rejtő L., Huszka M., Káplár M., Udvardy M.:** Effects of in vitro platelet activation on platelet derived nitric oxide production in healthy humans and in chronic myeloproliferative diseases with elevated platelet counts. *Plateletes*, 14: 283-286, 2003. Impakt factor: 1.477

EGYÉB, A TÉZISEKHEZ SZOROSAN NEM

KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Rejtő L., Telek B.:** Akut leukaemiák kiegészítő (szupportív) kezelése. *Magy. Belorv. Arch.* 44: 241-245, 1991.

2. **Kiss J., Telek B., D. Tóth F., Rejtő L., Surányi P., Rák K.:** HTLV-related markers in a hungarian patient with adult T-cell leukemia. *Leuk. Res.*, 16: 1125-1131, 1992. Impaktfaktor: 1.479. Citáció: 1

3. **Telek B., Kiss J., D. Tóth F., Krasznai G., Ujj Gy., Rejtő L., Kiss A., Rák K.:** Eosinophil leukaemia: Philadelphia chromosoma negatív krónikus myeloid leukaemia ritka formája? *Orv. Hetil.*, 135: 1087-1089, 1994. Citáció: 1.

4. **Rejtő L., Kiss A., Telek B., Rák K.:** Az akut promyelocytás leukaemia tretinoin kezelése. *Magy. Belorv. Arch.* 47: 491-493, 1994.

5 **Telek B., Kiss A., Ujj Gy., Rejtő L., Batár P.:** A myeloma multiplex klinikuma és diagnosztikája. *Magy. Belorv. Arch.* 50: 45-50, 1997.

6. Ujj Gy., Telek B., Rejtő L., Batár P., Kiss A.: A myeloma multiplex szövődményei. *Magy. Belorv. Arch.* 50: 50-56, 1997.
7. Boda Z., László P., Rejtő L., Tornai I., Pfliegler Gy., Rák K.: Thromboembolia prophylaxis kis molekulatömegű heparin alkalmazásával thrombophiliás terhesekben. *Orv. Hetil.*, 137: 183-185, 1996.
8. Boda Z., László P., Rejtő L., Tornai I., Pfliegler Gy., Rák K.: Low molecular weight heparin as thromboprophylaxis in familial thrombophilia during the whole period of pregnancy. *Thromb. Haemost.*, 76: 124-128, 1996. Impaktfaktor: 4.267. Citáció: 2.
9. Huszka M., Káplár M., Rejtő L., Tornai I., Palatka K., László P., Udvardy M.: The association of reduced endothelium derived relaxing factor-NO production with endothelial damage and increased in vivo platelet activation in patients with diabetes mellitus. *Thromb. Res.*, 86: 173-180, 1997. Impaktfaktor: 1.461. Citáció: 19.
10. Rejtő L., Kiss A., Telek B., Ujj Gy., Udvardy M., Vitális Zs., Rák K.: Az essentialis thrombocythaemia kezelésével szerzett tapasztalataink. *Magy. Belorv. Arch.*, 51: 112- 116, 1998.
11. Udvardy M., Rejtő L., Káplár M., Pfliegler Gy., Altorjay I.: A gliplizid serkenti az in vitro plazminogengenerációt és az alvadékkoldást. *Magy. Belorv. Arch.*, 51: 117-121, 1998.
12. Rejtő L.: Az interferon- α szerepe a polycythaemia vera és az esszenciális thrombocythaemia kezelésében. *Magy. Belorv. Arch.*, 51: 409-415, 1998
13. Boda Z., László P., Pfliegler Gy., Tornai I., Rejtő L., Schlamadinger Á.: Thrombophilia, antikoaguláns terápia és terhesség. *Orv. Hetil.*, 139: 3113-3116, 1998.
14. Altorjay I., Palatka K., Vitális Zs., Rejtő L., Gyórfy Á., Udvardy M.: Felső tápcsatornai vérzések korszerű ellátása erre specializált gastrointestinális részlegen. *Orv. Hetil.*, 139: 2121-2126, 1998.
15. Telek B., Kiss A., Ujj Gy., Rejtő L., Kappelmayer J., Batár P., Nemes Z., Rák K.: A "hajas" sejtes leukaemiáról: saját tapasztalatok (1977-1998). *Orv. Hetil.*, 140: 987-991, 1999.
16. Udvardy M., Káplár M., Rejtő L., Tornai I., Palatka K., László P., Huszka M.: Increased in vivo platelet activation and reduced intravascular endothelium-derived relaxing factor and nitrate/nitrite production in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Platelets.* 9: 257-260, 1998. Impaktfaktor: 0.736. Citáció: 2.
17. Huszka M., Káplár M., Rejtő L., Palatka K., Udvardy M.: Csökkent intravasculáris endotheleredetű NO (nitrát/nitrit)-termelés összefüggése az endothelkárosodással és a fokozott thrombocyta-aktivációval diabetes mellitusos betegekben. *Diab. Hung.* 7: 31-36, 1999.

18. Boda Z., László P., Pfliegler Gy., Tornai I., Rejtő L., Schlamadinger Á.: Low molecular weight heparin as thromboprophylaxis throughout pregnancy in heritable thrombophilic women. Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis, 5: 198-199, 1999. Impaktfaktor: 0.659.
19. Sanson B.J., Simioni P., Tormene D., Moia M., Friederich P. W., Huisman M. V., Prandoni P., Bura A., Rejtő L., Wells P., Mannucci P. M., Girolami A., Büller H. R., Prins M. H.: The incidence of venous thromboembolism in asymptomatic carriers of a deficiency of antithrombin, Protein C, or Protein S: a prospective cohort study. Blood, 94: 3702-3706. 1999. Impaktfaktor: 8.782. Citáció: 34.
20. Rejtő L.: Prolymphocytás leukaemia. Magy. Belorv. Arch. 53: 171-173, 2000.
21. 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 leukaemiában. Orv. Hetil., 142: 833-837, 2001.
22. Karászi É., Jakab K., Homolya L., Szakács G., Holló Zs., Telek B., Kiss A., Rejtő L., Nahajevszky S., Sarkai B., Kapplemayer J.: Calcein assay for multidrog resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia. British Journal of Haematology, 112: 308-314, 2001. Impaktfaktor: 2.815. Citáció: 4.
23. Boda Z., László P., Pfliegler Gy., Tornai I., Rejtő L., Schlamadinger Á.: A kis molekulatömegű heparin (LMWH) alkalmazása thrombophiliás terhesekben. Transzfúzió. 34: 71-75, 2001.
24. Udvardy M., Reményi Gy., Rejtő L., Káplár M.: Gondolatok a diabeteszes angiopathia-hajlam vascularis hematologiai vizsgáló módszereiről. Diab. Hung., 9: 205-211, 2001.
25. Udvardy M., Káplár M., Rejtő L., Szász R., Huszka Marianna.: Csökkent in vitro thrombocytá endothel eredetű relaxáló faktor/nitrogén-monoxid (EDRF/NO) képzés cukorbetegben a vérlemezke-aktiváció során. Diabetologia Hungarica, 9: 63-67, 2001.
26. Telek B., Rejtő L., Kiss A., Batár P., Reményi Gy., Rák K., Udvardy M.: Fludrabinkezeléssel szerzett tapasztalataink és az irodalom áttekintése. Orv. Hetil., 24: 1459-1465, 2002.
27. 32. Méhes L., Simon Á., Rejtő L., Kiss A., Reményi Gy., Batár P., Telek B., Udvardy M.: CD38 sejtfelszíni marker prognosztikai jelentősége krónikus lymphoid leukaemiában. Orv. Hetil., 31: 1531-1535, 2003.
28. Telek B., Rejtő L., Kiss A., Méhes L., Batár P., Udvardy M.: Új perspektívák a krónikus lymphoid leukaemia kezelésében. 2004. Orv. Hetil. (Közlésre elküldve).

A TÉZISEKHEZ KAPCSOLÓDÓ, ELSŐ SZERZŐKÉNT BEMUTATOTT KONGRESSZUSI ANYAGOK

1. **Rejtő L.**, Káplár M., Tornai I., Boda Z., Rák K., Udvardy M.: A solubilis thrombomodulin az ér-szövődmények markere diabetes mellitusban. Északkelet Magyarországi Belgyógyász Szakcsoport Ülés, Eger, 1995.
2. **Rejtő L.**, Káplár M., Tornai I., Boda Z., Rák K., Udvardy M.: Soluble thrombomodulin as a marker of diabetic vascular complications. Krakkó, 1995. Okt.
3. **Rejtő L.**, Schlammadinger Á., László P., Kiss A., Telek B., Boda Z.: A nagy thrombocytaszámmal járó állapotok jellemzése az O'Brien-féle filter-teszt segítségével. Magyar Thrombosis és Haemostasis Társaság IV. Kongresszusa, Szeged, 1997. Okt.
4. **Rejtő L.**, Káplár M., Huszka M., Szabó K., Udvardy M.: Komplex endothelium-funkció vizsgálatok a vasculáris eredetű diabeteses szövődményekben. Magyar Diabetes Társaság XIV. Kongresszusa, Eger, 1998. Ápr.
5. **Rejtő L.**: A citogenetika, a komparatív genom és egyéb hibridizációs technikák jelentősége a klinikai haematológiában. Magyar Belgyógyász Társaság XXXVII. Nagygyűlése, 1998. Nov. Budapest. (referátum)

6. **Rejtő L.**, Huszka M., Gerő L., Földes K., Udvardy M.: A szérumban plasminogén aktivátor inhibitor 1 (PAI-1), szöveti plasminogén aktivátor (tPA), béta-thromboglobulin (β -TG) és thrombomodulin szintek változása a vesetranszplantáció után tartós immunszuppresszív kezelésben részesülő cukorbetegségben. Országos Haemostasis Konferencia, Alsópáhok, 1999. nov.
7. **Rejtő L.**, Balázs M., Rák K., Telek B., Kiss A., Ujj Gy., Mezei G., Udvardy M.: A fluorescentia in situ hibridizáció (FISH) jelentősége a krónikus granulocytás leukaemia (CGL) diagnosztikájában, követésében - saját tapasztalatok. XVII. Magyar Haematológiai Kongresszus, 1999, Budapest. (poszter)
8. **Rejtő L.**, Balázs M., Rák K., Telek B., Kiss A., Ujj Gy., Mezei G., Udvardy M.: Fluorescentia in situ hibridizációval (FISH) szerzett tapasztalataink krónikus myeloid leukaemia (CML) diagnosztikájában és követésében. Északkelet-Magyarországi Belgyógyász Szakcsoport Ülés, Miskolc, 1999.
9. **Rejtő L.**: Idült myeloid leukaemia. Debrecen DAB, 2000. márc. 27.
10. **Rejtő L.**, Balázs M., Telek B., Kiss A., Udvardy M.: Fluoreszcencia in situ hibridizációval szerzett tapasztalataink a krónikus myeloid leukaemia diagnosztikájában és követésében. Szeged, Fiala Haematológusok Fóruma, 2000. Ápr.
11. **Rejtő L.**, Balázs M., Telek B., Kiss A., Szász R., Mezei G., Udvardy M.: Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the diagnosis and follow-up of chronic myeloid leukemia (CML). 5. EHA Kongresszus, 2000. Jun., Birmingham. (poszter).
12. **Rejtő L.**, Huszka M., Jenei E., Káplár M., Udvardy M.: Az in vitro thrombocyta-aktiváció hatása a thrombocyta-eredetű NO termelésre egészséges embereken és nagy thrombocyta-számmal járó krónikus myeloproliferatív betegségeken. Északkelet-Magyarországi Belgyógyász Szakcsoport Ülés, 2000. Okt., Debrecen.
13. **Rejtő L.**, Huszka M., Káplár M., Udvardy M.: Az in vitro thrombocyta-aktiváció hatása a thrombocyta-eredetű NO termelésre egészséges embereken és nagy thrombocyta-számmal járó krónikus myeloproliferatív betegségeken. 2001. ápr., Debrecen. (TDK és PhD konferencia).
14. **Rejtő L.**: CGH. („Innovatív haematologia” szimpózium, DAB, 2002. Nov.7, Debrecen).

NEMZETKÖZI FOLYÓIRATBAN MEGJELENT IDÉZHETŐ ABSZTAKTOK

Huszka M., **Rejtő L.**, Káplár M., Palatka K., Tornai I., Udvardy M.: Monitoring the EDRF-NO system in different diseases using new methods for determination NO₂/NO₃ of body fluids. Zeitschrift für Gastroenterologie, German Journal of Gastroenterology Band XXXV 1997. 35: (380) Impact Faktor : 1.021

Eiben Gy., Huszka M., **Rejtő L.**, Káplár M., Palatka K., Tornai I., Udvardy M.: Monitoring the antioxidant status in liver diseases and patients with diabetes mellitus Zeitschrift für Gastroenterologie, German Journal of Gastroenterology Band XXXV 1997.35: (374) Impact Faktor : 1.021

Huszka M., Káplár M., **Rejtő L.**, Palatka K., Udvardy M.: The association of in vivo platelet activation with NIDDM and IDDM with EDRF-NO reduction Archives of Pharmacology, Supp.No.1, Vol. 356, No. 4, 1997 Impact Faktor : 0,528.

Huszka M., Káplár M., **Rejtő L.**, Udvardy M.: The effect of in vitro platelet activation on platelet derived nitric oxide(NO) production in healthy humans and diabetes mellitus. Acta Physiologica Scandinavica Vol. 167, Suppl. 645, 1999. Impact Faktor : 1.204.

Huszka M., Palatka K., **Rejtő L.**, Udvardy M.: The association of the L-arginine: nitric oxide (NO) pathway and antioxidant status in inflammatory bowel disease Fundamental and Clinical Pharmacology Vol.13 Supp.1, pp 310, 1999 Impact Faktor : 1,226

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönettel tartozom Ph.D. témavezetőmnek, prof. Dr. Udvardy Miklósnak szakmai és emberi támogatásáért, baráti segítségéért.

Nagyon köszönöm Rák Kálmán Professzor úr önzetlen segítségét, tanácsait, biztató szavait.

Köszönöm Boda Zoltán Professzor úrnak, hogy segítségével hozzájárult munkám elkészítéséhez.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Ádány Róza Professzornőnek, hogy lehetővé tette a Megelőző Orvostani Intézetben végzett FISH és CGH vizsgálatokat.

Nagyon köszönöm Dr. Balázs Margit Tanárnőnek a genetikai vizsgálatok kivitelezéséhez, értelmezéséhez nyújtott segítségét.

Huszka Marianna tudományos munkatárs az EDRF/NO meghatározásban, Galáth Béláné és Kovács Györgyné asszisztensek a FISH-vizsgálatokban, Gránitz Erzsébet asszisztens az O'Brien-féle filterométerrel kapcsolatos vizsgálatokban segítettek, munkájukat köszönöm.

Köszönöm a tézisekhez felhasznált közleményekben szereplő társszerzők (Prof. Udvardy Miklós, Prof. Boda Zoltán, Prof. Rák Kálmán, Prof. Ádány Róza, Telek Béla, Kiss Attila, Schlamadinger Ágota, László Pál, Balázs Margit, Ujj György,

Balogh Erzsébet, Huszka Marianna) összes segítségét, valamint a Belgyógyászati Klinika minden dolgozója által kapott támogatást.

II.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK KÜLÖNLENYOMATAI