

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Kárai Bettina

**Az áramlási citometriai vizsgálat szerepe a myelodysplasiás
szindróma diagnosztikájában és prognosztikájában**

DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2018

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Az áramlási citometriai vizsgálat szerepe a myelodysplasiás szindróma diagnosztikájában és prognosztikájában

Dr. Kárai Bettina

Témavezető:

Dr. Hevessy Zsuzsanna, egyetemi docens



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2018

AZ ÁRAMLÁSI CITOMETRIAI VIZSGÁLAT SZEREPE MYELODYSPLASIÁS SZINDRÓMA DIAGNOSZTIKÁJÁBAN ÉS PROGNOSZTIKÁJÁBAN

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

Írta: Dr. Kárai Bettina okleveles általános orvos

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

Témavezető: Dr. Hevessy Zsuzsanna, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Méhes Gábor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Vereb György, az MTA doktora
Dr. Mikala Gábor, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet könyvtára
2018. november 22. (csütörtök) 12:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Andrikovics Hajnalka, PhD
Dr. Rejtő László, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Méhes Gábor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Vereb György, az MTA doktora
Dr. Andrikovics Hajnalka, PhD
Dr. Mikala Gábor, PhD
Dr. Rejtő László, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme
2018. november 22. (csütörtök) 14:00 óra

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. A myelodysplasiás szindróma definíciója, jelentősége

A myelodysplasiás szindróma (MDS) egy klonális hematológiai megbetegedés, mely a csontvelői hemopoetikus őssejteket érinti.

Az MDS éves incidenciája a világon a teljes populációra 5 eset/100 000 fő. Tekintettel arra, hogy az átlagos életkor MDS esetében 70 év, ha megvizsgáljuk az incidenciát a 60 év feletti korosztályban, akkor az új esetek száma tízszer több is lehet (20-50 új eset/100 000 fő/év). Amennyiben figyelembe vesszük, hogy az MDS a központi regiszterekben a nem megfelelő jelentések miatt alulreprezentált, továbbá, hogy egy sokszor aluldiagnosztizált betegségről van szó, az MDS incidenciája valójában magasabb, inkább közelíti, sőt, akár meg is haladja a 100 új esetet 100 000 főre vonatkoztatva a 60 év feletti korosztályban. Mivel Európa társadalma öregedő, az MDS-es betegek száma évről évre növekedni fog. A betegség összetettségéből adódóan a kezelési költségek változóak. Az enyhébb lefolyású eseteknél is rendszeres követés javasolt a járóbeteg szakellátás keretein belül. Azoknál a betegeknél, akiknél akut myeloid leukémiába (AML) transzformálódott a betegség, vagy súlyos sejtcsereigényesség figyelhető meg, rendszeres fekvőbeteg ellátásra van szükség. Napjainkban lehetőség van célzott, hatékony, ugyanakkor költséges terápiára is, melynek rendszeres alkalmazása jelentősen javítja a betegek várható élettartamát, ám a terápia elhagyása gyors progressziót eredményez. Mindez növekvő terhet ró a társadalomra, mely csak azáltal csökkenthető, ha minden beteg esetében a legoptimálisabb kezelési stratégia kerül meghatározásra, melyhez nélkülözhetetlen a pontos diagnózis felállítása és a megfelelő prognosztikai besorolás.

1.2. Klasszifikációs rendszerek

A megfelelő diagnózis felállítása és a prognosztika megítélése érdekében az elmúlt évtizedekben klasszifikációs rendszerek segítették ezen heterogén betegségen belül homogénebb alcsoportok kialakítását. Az évek során összegyűjtött tapasztalatok alapján az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) 2016-ban az MDS diagnosztikáját segítő módszerek dinamikus fejlődésének hatására új ajánlást adott ki. Nagyobb szerephez jutott az MDS-ben előforduló kiegyensúlyozott és kiegyensúlyozatlan

transzlokációk jelenléte, mely dysplasia nélkül is indikálja az MDS diagnózisának felállítását. Noha számos szomatikus mutációt írtak le az elmúlt években, melyek MDS-sel társultan fordulnak elő, jelenleg két mutáció szerepel a WHO ajánlásában. Az egyik, az „MDS gyűrűs sideroblast szaporulattal” kategória esetén a diagnosztikai határértéket befolyásolja: ha jelen van az *SF3B1* génben a mutáció, akkor a diagnózis már 5% gyűrűs sideroblast esetén felállítható, míg hiányában 15% szükséges. A másik eltérés a *TP53* mutáció, melynek segítségével az egyébként jó kórlefelgyással járó „MDS izolált del(5q)” kategóriában is azonosítani lehet azokat a betegeket, akiknél várhatóan rossz lesz a terápiás válasz és a prognózis.

1.3. Az MDS diagnosztikai algoritmus

A WHO klasszifikációs rendszere az esetek többségében segítséget nyújt az MDS diagnózisának felállításában. Számos esetben azonban nem teljesülnek maradéktalanul a diagnózishoz szükséges feltételek, ám kizárni sem lehet teljes bizonyossággal az MDS-t. Ezekben az helyzetekben, az MDS-t megelőző állapotok felismerésében, valamint az MDS diagnózisának felállításához szükséges minimális diagnosztikai kritériumok megfogalmazásában nyújt segítséget az MDS Nemzetközi Munkacsoportja (International Working Group, IWG of MDS) által kiadott irányelv.

Az MDS diagnosztikai algoritmusának első lépcsőfoka két előfeltétel teljesülése: egyrészt tartós sejtszegénységnek kell fennállnia, másrészt minden egyéb sejtszegénységet és dysplasiát okozó betegséget ki kell zárni. Amennyiben ez a két feltétel teljesül, átléphetünk a következő lépcsőfokra, ahol három MDS-sel összefüggő kritérium van, melyből, ha egy is teljesül, a diagnózis felállítható. A három kritérium a következő: (i). a sejtek több mint 10%-át érintő dysplasiás vonás, mely érinthet egy vagy több sejtvonalat vagy 15% feletti (*SF3B1* mutáció jelenlétekor 5% feletti) gyűrűs sideroblast jelenléte; (ii). MDS-sel összefüggő citogenetikai eltérés; (iii). 5-19% blast a csontvelőben. Az új ajánlás a blastszaporulat tekintetében elfogadja a perifériás vérben detektálható 2-19% myeloblast jelenlétét is a kritérium teljesítéséhez.

Ha a diagnosztikai algoritmus második lépcsőfokának kritériumai nem teljesülnek, további vizsgálómódszerek segítik a diagnózis felállítását, úgymint a biopsziával nyert csontvelői minta hisztológiai/immunhisztológiai vizsgálata, áramlási citometriai analízis vagy szomatikus pontmutáció jelenléte.

1.4. Az MDS prognosztikája

Az MDS esetében megkülönböztethetünk a beteggel és a betegséggel összefüggő prognosztikai faktorokat. A betegek kora, fizikai állapota, mentális státusza és a társbetegségek nagyban befolyásolják a kórlefolyást.

Tekintettel arra, hogy az MDS egy igen heterogén megbetegedés, számos betegséggel összefüggő tényezőt azonosítottak, mely hozzájárul a kórkép prognosztikai megítéléséhez. Éppen ezért a WHO klasszifikációs rendszerénél, mely leginkább morfológián alapul és egyéb hasznos paramétereket csak kismértékben vesz figyelembe, az egyes alcsoportba tartozó betegek esetében a kórlefolyás elég heterogénnek bizonyult. Ezért a rutin diagnosztikában és a terápiára vonatkozó irányelveknél széles körben használt a Nemzetközi Prognosztikai Pontozó rendszer (International Prognostic Scoring System, IPSS) illetve annak módosított változata, az R-IPSS (Revised IPSS). Mindkét pontozó rendszer a blastok százalékat, a kariotípust és a sejtszegénység mélységét vizsgálja. Az R-IPSS előnye, hogy nagy esetszámú tanulmányon alapul, így a ritkábban előforduló citogenetikai eltérések és azok prognosztikai jelentősége is vizsgálhatóvá vált. Az R-IPSS mellett gyakran feltüntetik a betegek WHO alapú prognosztikai rendszerének (WHO classification-based prognostic scoring system, WPSS) kategóriáját is. A diagnosztikai algoritmushoz hasonlóan a prognosztikánál is pontosabb megítélést tesznek lehetővé az olyan új módszerek, mint a szomatikus mutáció vizsgálata és az áramlási citometria eredményei, melyek kiegészítik a klasszikus módszerek segítségével kapott információkat.

1.5. Az MDS diagnózisának felállítását és prognosztikai besorolását segítő további módszerek

Az MDS diagnózisának felállításában és a prognosztika megítélésében a morfológiai és citogenetikai vizsgálatok klasszikus módszerekként alapvető jelentőséggel bírnak, minden diagnosztikai és prognosztikai klasszifikációs rendszer alapját képezik. Azonban napjainkban egyre nagyobb figyelmet kapnak egyéb módszerek is, mint a szomatikus mutáció vizsgálata és az áramlási citometriai analízis, melyek egyre nagyobb szerephez jutnak a normál, reaktív és klonális hematopoiesis differenciálásában, ezáltal az MDS diagnózisának felállításában és prognosztikai besorolásának pontosításában.

1.5.1. Szomatikus mutáció vizsgálata

Az MDS-hez kapcsolódó szomatikus mutáció vizsgálata tekintetében 2014 tekinthető egy mérföldkönek, amikor egymástól függetlenül két munkacsoport közölte eredményeit. Mindkét vizsgálat célja az volt, hogy nagy esetszámú betegmintán (Papaemmanuil és munkatársai tanulmányánál $n=738$; Haferlach és munkatársai tanulmányánál $n = 944$) új generációs szekvenálással felmérjék az MDS-ben előforduló szomatikus mutációkat. Az általuk leírt 15 leggyakrabban detektálható mutáció közül tizennégy ugyanaz a mutáció volt a két tanulmányban, ezek előfordulási sorrendje is nagyban megegyezett. Ma már több mint 40 mutáció ismert, melyek nemcsak a klonalitás megítélését, az MDS és az azt megelőző állapotok azonosítását segítik, hanem előrevetíthetik a kórkép lefolyását és a terápiára adott válaszkészséget.

1.5.2. Áramlási citometriai analízis

Az áramlási citometriai vizsgálat az MDS diagnosztikai irányelve alapján a kötelező, ajánlott és javasolt kategóriák közül az ajánlott módszerek között szerepel. A felszíni és intracelluláris antigének expressziójának változása a normál hematopoiesis során jól ismert. Az elmúlt évtizedekben számos tanulmány írt le a normál expressziós mintázattól eltérő immunfenotípust, mely MDS-ben gyakran fordult elő és segíteni tudta az MDS diagnózisát és prognosztikai besorolását. Jóllehet, nincs egyetlen olyan immunfenotípus jel sem, amely önmagában elegendő a diagnózishoz, azonban a gyakran előforduló eltérések alapján ki lehet alakítani áramlási citometriai pontozó rendszereket (Flow cytometry scoring system, FCSS), melyek akár még szenzitívebbek is lehetnek a dysplasia megítélésében a morfológiai vizsgálatnál. Ezen pontozó rendszerekkel nemcsak az előrehaladott, jelentős dysplasiával, blastszaporulattal rendelkező esetek azonosíthatóak, hanem segítséget tudnak nyújtani az enyhe dysplasiával jellemezhető MDS azonosításában is. Kifejezetten az alacsony rizikójú esetek elkülönítésére alakította ki Ogata és munkatársai az úgynevezett „mini-panelt”, mely mindössze négy paraméterből áll: 1. myeloblast százalék (MB%), 2. granulocita és lymphocita oldalra szórt fényének (side scatter, SSC) aránya, 3. lymphoblastok (LB) aránya a CD34 pozitív sejteken belül, 4. lymphocyták és a myeloblastok CD45 expressziójának átlagos fluoreszcencia intenzitása (mean fluorescence intensity, MFI) hányadosa. A szűrő panel reprodukálhatóságát, magas szenzitivitását és jó specificitását több nemzetközi tanulmány bizonyította magas esetszámú populáció vizsgálatával. Az évtizedek alatt összegyűjtött

tapasztalatok alapján a Nemzetközi/Európai Leukémia Hálózat Áramlási Citometriai MDS munkacsoportja (International/European Leukemia Net Working Group for Flow Cytometry in MDS, ELN IMDSFlow) célul tűzte ki, hogy az áramlási citometriai vizsgálat a WHO által is elismerten, még nagyobb hangsúlyt kapjon az MDS diagnózisának felállításában és a betegek prognosztikai besorolásában. Ennek a célnak eléréséhez nélkülözhetetlen az MDS irányú áramlási citometriai módszer standardizálása, harmonizálása és az ELN ajánlásainak szigorú betartása. A jelenleg érvényben lévő ajánlás szerint az MDS-ben előforduló immunfenotípus eltérések analízisének a mintavételt követően 24 órán belül meg kell történnie. A vizsgálatra a legalkalmasabb a nátrium (Na)-heparinnal alvadásgátolt csontvelői aspirációval nyert minta, alternatívaként etilén-diamin-tetraecetsav (K_3 -EDTA)-val alvadásgátolt minta is használható. Ennek hátterében két dolog áll. Egyrészt az nyilvánvaló, hogy a megkésett mintafeldolgozás a sejtek apoptózisához, majd nekrozisához vezet, másrészt az is ismert jelenség, hogy a K_3 -EDTA és Na-heparin eltérő módon hat a sejtek életképességére. Több tanulmány bebizonyította, hogy az EDTA gyorsítja a sejtek elhalását. Apoptosis során a sejtek magja, a citoskeletális rendszer és a sejtek membránja jellegzetes változáson megy keresztül. Ezen változások a markerek expressziós mintázatában olyan eltérést okozhatnak, melyek utánoszhatják a dysplásiára jellemező jeleket és tévesen MDS diagnózisát támogató jelenséggé lehet értelmezni. Az ELN ajánlás betartásával ki lehet küszöbölni vagy minimalizálni lehet ezen in vitro létrejött változásokat, így csökkenthető a hibás interpretáció lehetősége. Ugyanakkor számos helyzetben elkerülhetetlen a minta szállítása, és ezáltal a késői mintafeldolgozás. Az áramlási citometriai vizsgálatához szükséges eszközöket és az eredmények interpretálásához a munkaerőt az országos centrumok tudják biztosítani, így a centrumtól távoli helyeken működő szakellátásról a minták szállítása elkerülhetetlen.

1.6. Mastocyták biológiája

A mastocyták egy igen heterogén populációnak tekinthetők. Ebből adódóan eltérő élettani folyamatokban vesznek részt, mint például az öröklött és szerzett immunválaszban, a szövetkárosodás esetén a helyreállító folyamatokban (sebgyógyulás, fibrosis, angiogenesis). Azonban, ha a mastocyták tartós stimulációja következik be, akkor a normál funkciók hatása fokozottan jelentkezik, így a mastocyták szerepet játszanak számos megbetegedés kialakulásában.

Morfológiai vizsgálattal a mastocyták emelkedett csontvelői százalékát találták MDS esetében is. Azt is kimutatták, hogy a triptázt expresszáló mastocyták aránya emelkedett. Ezzel összhangban a szérumban a triptáz szintjének meghatározását, mint nem invazív, új biomarkert, a myeloproliferatív kórképek diagnosztikájában ajánlják. A mastocyták szerepe az MDS-ben tisztázatlan.

2. Célkitűzések

Munkánk során a rutinszerűen alkalmazott áramlási citometriai vizsgálat használatakor felmerülő gyakorlati kérdésekre kerestük a választ.

1. Munkánk során célul tűztük ki, hogy a markerek széles spektrumát felhasználva megvizsgáljuk a késői mintafeldolgozás okozta immunfenotípus eltéréseket.
2. Mivel az áramlási citometriai vizsgálatot Na-heparinnal és K₃-EDTA-val alvadésgátolt mintából is el lehet végezni, így arra a kérdésre is kerestük a választ, hogy az alvadéggátló típusa hogyan befolyásolja a vizsgált sejtek immunfenotípusát.
3. Külön figyelmet fordítottunk arra, hogy az antikoaguláns típusa és a CD11b expressziójának vizsgálatára szolgáló antitest klónja hogyan befolyásolja a CD11b expressziójának intenzitását a myeloid populációba tartozó sejteken.
4. Az MDS szűrésére szolgáló „mini-panel” elsősorban a myeloid populációt érintő eltérések vizsgálatán alapul. A hipotézisünk az volt, hogy ha az MDS-ben gyakran érintett erythroid sejtvonalról és a mastocytákról információt adó paramétereket is beleveszünk a „mini-panelbe”, akkor egy MDS vizsgálatára szenzitívebb pontozó rendszert alakíthatunk ki.
5. További célunk volt, hogy a CD71 expressziójának variációs koefficiensével (rCD71CV%) és a mastocyták százalékaival (MC%) kiegészített „mini-panel” MDS szűrésére való alkalmazhatóságát egy második vizsgálati csoporton is elemezzük nyolcszínű jelölési technikával.
6. Végezetül célunk volt annak vizsgálata, hogy milyen körülmények között lehet legpontosabban meghatározni a mastocyták százalékát áramlási citometriai vizsgálattal.

3. Anyagok és módszerek

A tanulmány a hazai és nemzetközi előírásoknak megfelelően készült az Egészségügyi Tudományos Tanács jóváhagyásával (az engedély száma: 20582-2/2017/EKU).

3.1. A preanalitikai faktorok dysplásiás jelek értelmezésére gyakorolt hatását vizsgáló tanulmány felépítése

Ebben a prospektív tanulmányban két betegcsoportot alakítottunk ki. Az első betegcsoportba 23 MDS-re vagy MPN-re utaló klinikai képpel rendelkező beteget soroltunk be, akiknek a mintáit 2014. január és 2015. február között küldték a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Laboratóriumi Medicina Intézetébe (DE ÁOK LMI). Minden betegről három cső csontvelői mintát vettek diagnosztikus célból. Egy K₃-EDTA-val alvadásgátolt csövet a morfológiai, áramlási citometriai és molekuláris onkológiai vizsgálatok elvégzésére, és két cső Na-heparinnal alvadásgátolt csövet, melyből kariotípus meghatározás történt. Munkánk során a diagnosztikai vizsgálatok elvégzése után megmaradt mintákat használtuk. A vizsgálatsorozat elvégzésére mind a 23 betegnek maradt K₃-EDTA-val alvadásgátolt csontvelői mintája, míg Na-heparinnal alvadásgátolt minta 16 esetben volt elegendő. Annak érdekében, hogy felmérjük az alvadásgátló immunfenotípusra gyakorolt hatását a K₃-EDTA-val és Na-heparinnal alvadásgátolt mintákból áramlási citometriai vizsgálatot végeztünk a beérkezés napján (de novo minta). Ezután két egymást követő napon újra megjelöltük és analizáltuk a mintákat, hogy nyomon kövessük a késői mintafeldolgozás során bekövetkező változásokat. A minták a vizsgálat teljes ideje alatt szobahőmérsékleten voltak tárolva.

A második betegcsoportba nyolc olyan beteget válogattunk be, akiknél a hematológiai betegség fennállása kizárásra került. Minden betegnek volt K₃-EDTA-val és Na-heparinnal is alvadásgátolt perifériás vérmintája, melyeket párhuzamosan vizsgáltunk a beérkezés napján és két egymást követő napon. Ennél a betegcsoportnál a myeloid populáció CD11b expressziójának változását vizsgáltuk. A jelölések két különböző klónnal rendelkező monoklonális antitesttel történtek.

3.2. Az MDS szűrésére szolgáló áramlási citometriai pontozó rendszerrel kapcsolatos tanulmány kialakítása

Ennél a tanulmánynál is két vizsgálati csoport volt, egy az új áramlási citometriai pontozó rendszer kialakítását szolgálta, míg egy másikon teszteltük a rendszer hatékonyságát. Mivel az elmúlt években az MDS irányú áramlási citometriai vizsgálatnál átállás történt négyről nyolcszínű jelölési technikára, így míg az első csoportban a pontozó rendszer kialakítását négy színű jelöléssel végeztük, addig a második csoportnál a rendszer paramétereit nyolcszínű jelöléssel detektáltuk, így azt is vizsgáltuk, hogy a technika változtatásának van-e hatása az áramlási citometriai pontozó rendszer használatára. A betegek beválogatása az anamnesztikus adatok, a morfológiai, citogenetikai és áramlási citometriai vizsgálatok eredményei alapján történtek. Az első csoportba tartozó mintákat 2009 decembere és 2014 januárja között küldték a DE ÁOK LMI-be. A második csoport esetében a diagnosztikai kivizsgálás 2014 májusa és 2015 májusa között történt. Az adatokat retrospektíven elemeztük. A kontroll csoportba 25 fő tartozott (18 nő és 7 férfi), akiknél a végső diagnózisok a következők voltak: szisztémás autoimmun kórkép (n=3), immunthrombocytopenia (n=7), terápiával összefüggő megbetegedés (sejtszegénység) (n=9), vashiány (n=2), krónikus veseelégtelenség (n=2) és infekció (n=2). A kontroll alcsoportban az átlagéletkor 53 év volt (23-80 év). Az áramlási citometriai vizsgálatok minden esetben K₃-EDTA-val alvadásgátolt csontvelői mintából történtek a mintavételt követő 1-2 órában.

3.3. Immunfenotípus vizsgálata

A preanalitikai irányú vizsgálatokhoz, valamint az MDS szűrésére szolgáló pontozó rendszer paramétereinek detektálásakor egy cső esetében négy vagy nyolc marker együttes vizsgálata történt. Az antitesteket minden csőnél 50 mikroliter aspirációval nyert csontvelői mintához adtuk, melynek sejtszámát előzetesen 1×10^6 -ra állítottuk be. Ezt követően sötétben 15 percig inkubáltuk a mintákat, majd a vörösvértestek lizálása érdekében 1 mL FacsLysing oldatot adtunk minden csőhöz és ismét inkubáltuk a mintákat 8 percig. Végül 1 mL foszfát-puffer oldattal történt mosás után 500 mikroliter 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk a sejteket. A mintákat négy színű jelölés esetén FACS Calibur, nyolcszínű jelölésnél FACS Canto II áramlási citométeren mértük. Minden csőnél 100 000 eseményt gyűjtöttünk be. Annak érdekében, hogy az eredmények összevethetőek legyenek egymással, az áramlási

citométereket a gyártó utasításainak megfelelően minden nap fluoreszcens mikrogöngyökkel kalibráltuk. Az adatok analízisét 6.1.3. FACS Diva és 1.2 Kaluza szoftverrel végeztük.

3.4. A preanalitikai faktorok immunfenotípusra gyakorolt hatásának vizsgálatához szükséges paraméterek azonosítása

Részletes MDS irányú áramlási citometriai vizsgálat esetén a sejtek azonosítása a következő kapuzás szerint történt: Első lépésként az előre (FSC) és oldalra (SSC) szórt fényt ábrázoló kétváltozós dot-plot-on kizártuk azon eseményeket, melyek a fényszórási karakterük alapján nem tekinthetők valósnak. A myeloblastokat (MB) és lymphoblastokat (LB) az SSC, valamint a CD117 és CD34 expressziójának intenzitása alapján azonosítottuk (MB: CD117+/CD34+/ közepes oldalszórás; LB: CD117-/CD34+/alacsony oldalszórás), majd a CD45 és SSC kétváltozós dot-ploton visszakupuztunk, hogy biztosan csak a MB és LB populációt jelöljük ki. A lymphocytákat, monocytákat és granulocytákat az SSC és CD45, CD33, CD64 vagy HLA-DR expressziójának intenzitása alapján kapuztuk (granulocyta: nagy oldalszórású, CD45+/CD33+/CD64-/HLA-DR-; monocyta: közepes oldalszórású, CD33+/CD64+/HLA-DR+/CD45+; lymphocyta: kis oldalszórású, CD45+/CD33-/CD64-/HLA-DR-+). Az erythroid prekursorok a CD45-/CD71+ immunfenotípussal jellemezhetők. A plazmasejtek az élénk CD38 expressziójuk alapján különülnek el a többi sejtípustól.

Miután a sejtípusokat minden cső esetében azonosítottuk, 37 különböző paramétert vizsgáltunk mind az K₃-EDTA-val mind a Na-heparinnal alvadásgátolt minták esetében. A beérkezés napján mért paramétereket, melyek magukban foglalták számos marker átlagos fluoreszcencia intenzitásának (MFI), a CD71 marker variációs koefficiensének és több sejtpopuláció százalékanak vizsgálatát, az első és második napon újrajelölés után mért paraméterekhez hasonlítottuk.

A tanulmány második felében a granulocyták és monocyták CD11b expresszióját vizsgáltuk. Nemcsak önmagában az alvadásgátlónak és a késői mintafeldolgozásnak a hatását akartuk feltárni, hanem arra is kerestük a választ, hogy a monoklonális antitest klónja hogyan befolyásolja a preanalitikai faktorok okozta változásokat. A fluoreszcein isotiocianát (FITC) festékkel jelölt CD11b antitest klónja ICRF44, míg a fikoeritrin (PE) festékkel jelzett antitest klónja D12. A fényszórási karakterük alapján nem valós események kizárása után a monocyták és granulocyták kapuzása az első tanulmányhoz hasonlóan SSC és CD33, CD64, CD45 és HLA-DR expressziójának intenzitása alapján történt.

3.5. MDS szűrésére szolgáló áramlási citometriai pontozó rendszer kialakítása

A valós eseményeket itt is a fényszórási karakterek alapján azonosítottuk, majd kijelöltük a vizsgálni kívánt populációkat: MB (CD34+/CD117+/CD45dim/közepes oldalszórás), LB (CD34+/CD117-/alacsony oldalszórás), granulocyt (CD45+/nagy oldalszórás), lymphocyt (CD45+/alacsony oldalszórás), erythroid prekursor (CD71+/CD45-), mastocyt (CD117++). A „mini-panel” négy paraméterénél az eredeti, a panel kidolgozásánál használt határértékeket vettük figyelembe, míg az erythroidok CD71rCV és a mastocyták százaléknál új határértékeket állapítottuk meg a kontroll csoport adatai alapján (CD71 rCV: 85,8%, MC%: 0.039%). Amennyiben egy adott mintánál a vizsgált paraméterek eltértek a határértéktől, egy pontot adtunk. Ezt követően az így kialakult hat paraméterből álló pontozó rendszer diagnosztikai és prognosztikai hatékonyságát vizsgáltuk két betegcsoporton.

3.6. A mastocyták detektálása áramlási citometriával

Mivel korábban a mastocyták százalékát nem vették bele áramlási citometriai pontozó rendszerbe, így ezt a paramétert részletesebben is megvizsgáltuk. A mastocyták élénk CD117 expressziójuk alapján jól elkülönülnek a többi sejttípustól. Egyrészt vizsgáltuk a preanalitikai faktorok hatását a CD117 expressziójának intenzitására és a mastocyták százalékára 7 beteg K3-EDTA-val és Na-heparinnal alvadásgátolt csontvelői mintájának vizsgálatával. Másrészt, az MDS szűrésére szolgáló áramlási citometriai pontozó rendszer hatékonyságának növelésére irányuló tanulmány betegcsoportjainak részletesebb vizsgálatával ellenőriztük, hogy a mastocyták emelkedett aránya az MDS-es betegeknél összefüggést mutat-e reaktív folyamatra utaló jelekkel (perifériás fehérvérsejtszám, csontvelői plazmasejt százalék), ugyanis a mastocyták aránya reaktív folyamatoknál emelkedhet. Továbbá megnéztük, hogy az emelkedett mastocyt (CD117++) szám és az aspirációval nyert csontvelői magvas sejtek száma között van-e kapcsolat.

3.7. Statisztikai analízis

A preanalitikai faktorok immunfenotípusra gyakorolt hatását vizsgáló tanulmányban az alacsony esetszámba való tekintettel nem parametrikus tesztet használtunk. Két összetartozó csoport esetében az elemzéseket Wilcoxon-teszttel, míg több összetartozó csoportnál a

Friedman-tesztel végeztük, post-hoc tesztként a Dunn-tesztet alkalmaztuk. Az áramlási citometriai pontozó rendszerről szóló tanulmányban az adatok megoszlását Shapiro-Wilk-tesztel ellenőriztük. Két független csoport adatainak vizsgálatakor normál eloszlásnál a Student-féle t tesztel, míg nem normál eloszlásnál a Mann-Whitney U tesztel végeztük a számításokat. Szignifikánsnak tekintettünk egy különbséget, ha a p értéke kisebb, mint 0,05. Az áramlási citometriai pontozó rendszer specificitásának és szenzitivitásának meghatározása a ROC (Receiver Operating Characteristic) analízissel történt, az IPSS-el való korrelációt pedig Spearman-tesztel végeztük. Khí négyzet-próbát használtunk a diszkrét változók közötti összefüggés vizsgálatára. Az eseménymentes túlélés becslését Kaplan-Meier-féle analízissel végeztük, a különbséget log-rank tesztel vizsgáltuk. A számításokhoz és az ábrák elkészítéséhez SPSS 20.0 és GraphPad Prism 6.0 statisztikai programokat használtunk.

4. Eredmények

4.1. Preanalitikai faktorok hatása az immunfenotípusra

4.1.1. Vizsgált sejtek immunfenotípusának összehasonlítása de novo mintáknál

Amikor önmagában az alvadásgátló típusának immunfenotípusra gyakorolt hatását vizsgáltuk a mintavételt követően 1-2 órán belül, a K₃-EDTA-val és Na-heparinnal alvadásgátolt mintáknál 14 paraméternél találtunk szignifikáns különbséget. A Na-heparinnal alvadásgátolt mintáknál mérthez képest hat paraméter szignifikánsan magasabb a K₃-EDTA-val alvadásgátolt mintáknál: a CD4 MFI érték a monocytákon, a CD117 MFI érték a myeloblastokon, a CD45 MFI érték a lymphocytákon, CD71 rCV%-a az erythroid prekurzorokon és a plazmasejtek százaléka és CD38 MFI értéke. Nyolc paraméter szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a K₃-EDTA-val alvadásgátolt mintáknál: az SSC és a CD45, CD11b, valamint CD33 expressziójának átlagos intenzitása a granulocytákon, a CD11b, CD13 MFI érték a monocytákon, a CD34 MFI érték a myeloblastokon és a CD71 MFI érték az erythroid prekurzorokon. Annak ellenére, hogy a CD34, CD117 és CD71 markerek expressziójának intenzitása szignifikáns különbséget mutatott a K₃-EDTA és Na-heparinnal alvadásgátolt minták között, az ezen markerek segítségével kijelölt myeloblast, lymphoblast és erythroid prekurzorok százaléka nem tért el szignifikánsan a kétféle módon alvadásgátolt mintákban.

4.1.2. A késleltetett mintafeldolgozás okozta immunfenotípus-eltérések

Egy nappal később történt mintafeldolgozás következtében a K₃-EDTA-val alvadásgátolt mintáknál tíz, míg a Na-heparinnal alvadásgátolt mintáknál csak négy paraméternél figyeltünk meg szignifikáns változást. Ezen paraméterek közül kettő bizonyult a legérzékenyebbnek: a myeloblastok CD117 és a plazmasejtek CD38 expressziójának intenzitása. Mindkét markernél az alvadásgátló típusától függetlenül jelentősen csökkent az expresszió intenzitása a késői mintafeldolgozás okozta változások következtében.

Újabb egy nap eltelte után, a második npra, ugyanolyan mértékű immunfenotípus eltérést láttunk a K₃-EDTA-val és Na-heparinnal alvadásgátolt mintáknál. A megvizsgált paraméterek közül tizenöt esetben tapasztaltunk szignifikáns csökkenést a K₃-EDTA alvadásgátló használatakor. A Na-heparinnal alvadásgátolt mintáknál három paraméter esetében szignifikáns emelkedést, míg tizenkettőnél szignifikáns csökkenést detektáltunk. Kilenc paraméter változott szignifikánsan az alvadásgátló típusától függetlenül: a granulocyták oldalra szórt fényének karaktere, a monocyták CD4, CD64, CD33 expressziójának intenzitása és a CD14 pozitív monocyták aránya, a preB karakterű sejtek és lymphocyták százaléka, a lymphocyták CD45 és erythroid prekurzorok CD71 MFI értéke.

A mintavételtől számított két nappal később elvégzett áramlási citometriai vizsgálatkor a K₃-EDTA-val történt alvadásgátló használatakor tizenkettő, Na-heparinnál tizennyolc paraméter volt változatlan a mintavétel után 1-2 órán belül, friss mintából történt analízis eredményeihez képest.

A következő tizenegy paraméternél sem a késői mintafeldolgozásnak sem az alvadásgátló típusának nincs hatása: a granulocyták CD10, CD16 és CD33 MFI értéke; a CD10 pozitív granulocyták százaléka, a monocyták HLA-DR MFI értéke; a myeloblastok CD45 és CD34 MFI értéke; a lymphoblastok, erythroid prekurzorok és plazmasejtek százaléka, valamint az erythroidok CD71 rCV% értéke.

4.1.3. Preanalitikai faktorok hatása a myeloidok CD11b expressziójára

A mintavétel után azonnal és a mintavétel után két nappal történt analízis eredményeit összehasonlítva eltérő jelenséget figyeltünk meg a CD11b expressziója tekintetében a különböző típusú alvadásgátlók használatakor. K₃-EDTA-val alvadásgátolt mintáknál a CD11b expresszió MFI értéke napról napra csökkent a myeloidokon, míg Na-heparinnál emelkedő tendenciát mutatott. D12 klónnal rendelkező, phycoerythrin (PE) fluoreszcens

festékkel konjugált CD11b monoklonális antitest használatakor a granulocytaikon szignifikáns változást figyeltünk meg a két nappal később történt mintafeldolgozás esetében függetlenül az alvadásgátló típusától. Míg a fluorescein isothiocyanate (FITC) fluoreszcens festékkel jelölt, ICRF44 klónnal rendelkező monoklonális antitest esetén a K₃-EDTA-val alvadásgátolt mintáknál a CD11b expressziójának intenzitása stabil maradt. Monocytaknál ennek az ellenkezőjét találtuk: ennél a sejtpopulációnál a D12 klón használatakor a Na-heparinnal alvadásgátolt minta esetében nem volt hatása a késői mintafeldolgozásnak.

4.2. MDS szűrésére alkalmas áramlási citometriai pontozó rendszer diagnosztikai és prognosztikai ereje

4.2.1. Az áramlási citometriai pontozó rendszer kialakítását célzó tanulmány eredményei

Az áramlási citometriai pontozó rendszer kialakítását segítő kontroll és MDS-es betegcsoport laboratóriumi eredményei közül a hemoglobin-koncentrációnál, a fehérvérsejtszámnál és az abszolút neutrophil számnál találtunk szignifikáns különbséget. A thrombocyta szám nem tért el egymástól jelentősen, melynek magyarázata az lehet, hogy a kontroll csoportba hét ITP-s beteget is beválogattunk.

4.2.1.1. A négyszínű jelölési technikával kialakított hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozó rendszer diagnosztikai hatékonysága

Első lépésként az áramlási citometriai pontozó rendszer hat paraméterének alakulását vizsgáltuk meg a kontroll és az MDS-es betegcsoport között. Szignifikáns különbséget találtunk a következő paramétereknél: MB%-nál ($p < 0,001$), a granulocyta és lymphocyta SSC hányadosánál ($p = 0,003$), a CD34 pozitív sejteken belül a LB%-nál ($p < 0,001$), az erythroid prekursorok CD71 rCV%-ánál ($p = 0,004$), és a mastocyták százalékánál ($p = 0,001$). Egy paraméternél, a lymphocyták és myeloblastok CD45 MFI értékének hányadosánál, nem volt szignifikáns különbség a két csoport között. Ennek háttérében az állhat, hogy MDS-nél, dysplastikus jelként, a CD45 expressziójának intenzitása nőhet és csökkenhet is a myeloblastokon.

Második lépésként összehasonlítottuk az eredetileg négy paraméterből álló és a módosított, hat paraméter alapján kialakított áramlási citometria pontozó rendszer ROC görbéit. Azt találtuk, hogy ha a kardinális négy paramétert kiegészítjük a mastocyták százalékaival és az erythroid populációról információt adó CD71 rCV% értékkel, akkor a szenzitivitás 65%-ról 84%-ra emelkedett, miközben a specificitás magas (80%) maradt. A görbe alatti terület ennek megfelelően 0,789-ről (95% CI: 0,689-0,889) 0,87-re (95% CI: 0,785-0,948) növekedett.

4.2.1.2. A négyszínű jelölési technikával kialakított hat paraméterből álló áramlási citometria pontozó rendszer prognosztikai jelentősége

A morfológiai vizsgálat, citogenetikai analízis és az anamnesztikus adatok alapján MDS csoportba sorolt betegeket az áramlási citometria pontozórendszer alapján további két rizikócsoportba soroltuk. A betegek 37%-a (n=19), akik 0, 1, vagy 2 pontot értek el a hat paraméterből álló áramlási citometria pontozó rendszer alapján, az alacsony rizikójú (flow low risk, FLR) csoportba került. A többi beteget (n=32), akiknek több mint 2 pontjuk volt, a magas rizikócsoportba (flow high risk, FHR) soroltuk. Az általános laboratóriumi paraméterek közül szignifikánsan alacsonyabb hemoglobin-koncentráció látható a FHR csoportban. Ezzel összhangban azt találtuk, hogy az FHR csoportba tartozó betegek szignifikánsan nagyobb eséllyel kaptak transzfúziót (OR=3,51, 95% CI: 1,07-11,59, p=0,036). A myeloblastok százaléka, mely nemcsak az áramlási citometria pontozó rendszerek, hanem minden az MDS prognosztikájának vizsgálatára kialakított rendszer alapeleme, szignifikánsan különbözött a két rizikócsoportnál (p=0,009). Habár a citogenetikai eltérések tekintetében nem volt statisztikailag jelentős eltérés a két rizikócsoport között, a legsúlyosabb, komplex kariotípus eltéréssel rendelkező betegek az FHR csoportba tartoztak. Az esemény-mentes túlélés vizsgálatához 46 betegnek az adatai álltak rendelkezésünkre, közülük kettő csontvelő-transzplantáción átesett beteg került kizárásra. Így a 44 betegnél a hat paraméterből álló áramlási citometria pontozó rendszer alapján felállított két rizikócsoport között vizsgáltuk az esemény-mentes és teljes túlélést, mely szignifikáns különbséget mutatott (p=0,001, p=0,008).

4.2.2. A hat paraméterből kialakított áramlási citometriai pontozó rendszer alkalmazhatóságát bizonyító tanulmány eredményei

Amennyiben összehasonlítjuk a hat paraméterből álló pontozórendszer kialakítását szolgáló négyszínű jelölési technikával vizsgált MDS-es csoport és a rendszer alkalmazhatóságának vizsgálatára létrehozott nyolcszínű jelölési technikát használó MDS csoport között a hat paramétert, kettő esetben láttunk szignifikáns különbséget: MB% ($p=0,011$) és a lymphocyta/MB CD45 MFI értékének hányadosa esetén ($p=0,021$). A nyolcszínű jelölési technikával analizált MDS csoportba több alacsonyabb rizikójú beteg került besorolásra, ez okozza a szignifikánsan alacsonyabb MB%-ot. Amikor részletesebben vizsgáltuk a lymphocyta/MB CD45 MFI értékének hányadosát, azt találtuk, hogy a lymphocyták esetében, melyek jól használhatóak az MDS-nél belső kontroll populációnak, nincs szignifikáns különbség a csoportok között, míg az MB CD45 MFI értéke szignifikánsan alacsonyabb a nyolcszínű jelöléssel vizsgált MDS csoportnál. Tehát a magasabb lymphocyta/MB CD45 MFI hányados leginkább az MDS heterogenitásából adódik, nem az eltérő fluoreszcens festék típusa vagy az áramlási citométer beállítása okozza. A granulocyták és lymphocyták SSC hányadosánál ($p=0,002$), a CD34 pozitív sejteken belül a LB%-nál ($p<0,001$), az erythroid prekursorok CD71 rCV%-ánál ($p=0,001$), és a mastocyták százalékanál ($p=0,023$) ennél a csoportnál is szignifikáns különbséget találtunk a kontrollhoz képest.

Az áramlási citometriai pontozó rendszer diagnosztikai hatékonyságának vizsgálata érdekében ROC analízis segítségével összehasonlítottuk a két MDS csoportnál a négy és hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozó rendszer specificitását és szenzitivitását. A négy paraméterből álló pontozó rendszer esetében a több alacsony rizikójú beteget tartalmazó nyolcszínű jelölési technikával vizsgált MDS-es csoportnál a szenzitivitás alacsonyabbnak (42%) bizonyult, mint a másik MDS csoportnál (65%). Ezzel szemben a hat paraméteren alapuló pontozórendszerrel az érzékenység nem tért el jelentősen a két MDS csoportnál (84%-négyszínű jelölési technikán alapuló, 81%-nyolcszínű jelölési technikát alkalmazó MDS csoport). Hat paraméter használata esetén nemcsak az érzékenység, hanem a görbe alatti terület is növekedett, 0,917-ről (95% CI: 0,837-0,996) 0,957-re (95% CI: 0,902-1,00). Ez alapján megállapítható, hogy a hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozó rendszer jobban el tudja különíteni az egyéb hematológiai betegségben szenvedő betegeket az MDS-es betegektől még az alacsony rizikóval rendelkező MDS-es eseteknél is.

Az új áramlási citometriai pontozó rendszer eredménye alapján a második MDS csoportot is két részre osztottuk, hogy megvizsgálhassuk a rendszer prognosztikai jelentőségét. Az előző tanulmányhoz hasonlóan itt is szignifikáns különbséget találtunk a hemoglobin-koncentráció és az MB% esetében az FLR és FHR rizikócsoportok között. A hemoglobinszint szignifikánsan alacsonyabb ($p=0,021$) az MB% magasabb ($p=0,02$) volt. A transzfúzióigény is az előző tanulmánynál látottakhoz hasonlóan alakult. Az FLR rizikócsoportban a betegek 38%-ánál, míg az FHR csoportnál a betegek 58%-ánál volt szükség rendszeres transzfúzióra. Citogenetikai eltérés szempontjából ennél az MDS csoportnál sem találtunk szignifikáns különbséget a rizikócsoportok között.

Végezetül megnéztük a korrelációt a hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozó rendszer és az R-IPSS között. A négy színű jelölési technika alkalmazásakor $r=0,32$, $p=0,02$, míg nyolc színű jelölési technikával meghatározva a paramétereket $r=0,507$, $p=0,02$.

4.3. A mastocyták vizsgálata áramlási citometriával

Hét aspirációval nyert csontvelői mintánál tudtunk mastocytákat azonosítani, melynek százaléka nagyban függött az alvadásgátló típusától. A K_3 -EDTA-val alvadásgátolt mintáknál szignifikánsan magasabb mastocytá százalékat mértünk a Na-heparinnal alvadásgátolt mintákhoz képest, mind a mintavételt követő azonnali, mind az egy, illetve két nappal később mért minták esetében. Megvizsgálva a CD117 expressziójának intenzitását a kétféle alvadásgátló esetében, nem látható szignifikáns eltérés. Habár a CD117 expressziójának intenzitása a második nappal az alvadásgátló típusától függetlenül csökkent, a mastocyták százalékat nem befolyásolta, ugyanis a kései mintafeldolgozás nem volt hatással a mastocyták százalékarára. Tehát nem a mastocyták azonosítását szolgáló marker expressziójának változása okozza a különböző százalékos értéket a K_3 -EDTA-val és Na-heparinnal alvadásgátolt mintáknál.

A mastocyták MDS-es betegeknél detektált magasabb százalékanak vizsgálata érdekében a hat paraméterből álló áramlási citometriai pontozó rendszer kialakítását szolgáló MDS csoportot két részre osztottuk az alapján, hogy a mastocyták aránya határérték (0,039%) alatt vagy felett volt. Ezt követően megvizsgáltuk a két csoport betegeinek perifériás fehérvérsejtszámát, az aspirációval nyert csontvelői minta magvas sejtjeinek számát és a csontvelői plazmasejtek százalékat. Egyik esetben sem találtunk szignifikáns különbséget a magas ($n=21$) és az alacsony ($n=30$) mastocytá százalékkal rendelkező betegek között.

5. Megbeszélés

5.1. A késleltetett mintafeldolgozás és az alvadásgátló típusának hatása az áramlási citometriával detektált dysplásiás jelek értelmezésére

A preanalitikai faktorok immunfenotípusra gyakorolt hatását vizsgáló tanulmány legfontosabb megállapítása, hogy az alvadásgátló típusa jelentősen befolyásolja a késői mintafeldolgozás következtében kialakult immunfenotípus-eltérések számát és azok mértékét. Továbbá az alvadásgátló típusa már a kiindulási antigén expressziós mintázatra is hatással van, amikor még nincs, vagy csak minimális mennyiségben van jelen apoptotizáló sejt. Az ELN alvadásgátló típusára tett ajánlásának megfelelően azt tapasztaltuk, hogy a Na-heparin használata esetén a különböző sejttypusok antigénjeinek expressziós intenzitása stabilabb. Jóllehet, még Na-heparin alkalmazásakor is detektáltunk néhány esetben szignifikáns eltérést akár csak egy nappal később történt mintafeldolgozás esetén is. Amennyiben az áramlási citometriai eredmény interpretálását végző személy nincs tisztában azzal, hogy az alvadásgátló típusa vagy a késői mintafeldolgozás mely markerek expressziójának intenzitását, milyen irányban és mértékben képes megváltoztatni, akkor ezeket az eltéréseket könnyen dysplastikus jelként értelmezheti. Ezáltal tévesen MDS-re utaló eredményt adhat ki, vagy sokkal előrehaladottabb stádiumba való besorolást indikálhat.

Legjobb tudásunk szerint most először történt a preanalitikai faktorok hatásának vizsgálata a markerek széles spektrumán, különböző sejttypusokon, nyolcszínű jelölési technika alkalmazásával. Korábbi nemzetközi tanulmányokban általában a myeloid populációra koncentráltak és csak egy vagy néhány marker változását vizsgálták. Ezen tanulmányok eredményei alapján néhány paraméter esetében egyértelmű, hogy a késői mintafeldolgozás hogyan fogja megváltoztatni az adott paramétert függetlenül a mintánál használt alvadásgátló típusától. Ilyen paraméter a granulocyták oldalra szórt fényének karaktere, melynek intenzitása apoptózis hatására konzekvensen csökkent. Ezt morfológiai vizsgálattal is igazolhatjuk, hisz például jól ismert jelenség az apoptózis során kialakuló piknotikus mag. Citráttal, heparinnal vagy EDTA-val alvadásgátolt teljes vér, illetve izolált fehérvérsejtek esetén is az apoptotizáló myeloidokon csökkent intenzitású CD16, CD43 és élénkebb CD45 expressziót detektáltak. Ugyanakkor a késői mintafeldolgozás következtében apoptotizáló sejteknél a CD11b expressziójának intenzitás változásáról ellentmondásos információkat olvashatunk a nemzetközi irodalomban: néhány tanulmány fokozott, míg

mások csökkent CD11b expressziót írtak le a megkésett mintafeldolgozás következményeként. Az eredmény a tanulmányokban használt minta típusától, a mintafeldolgozástól, és a vizsgálat kivitelezésétől függött. A CD11b fehérje a neutrophil granulocyta granulumaiban tárolódik, így az expresszió intenzitása nagymértékben függ a granulocyták aktivációjától. A neutrophilek aktivációja bekövetkezhet a mintafeldolgozás során (pl.: fehérvérsejtek szeparálása) vagy a vizsgálat kivitelezésekor is, például ha nem spontán apoptózist, hanem mesterségesen kiváltott apoptózist vagy apoptózis elősegítő technikákat alkalmaznak. Azonban, ahogy azt a Saxton és munkatársai által végzett tanulmány eredményei is sugallják az aktiváció kiváltó oka nem mindig egyértelmű. Vizsgálatuk során hat EDTA-val alvadásgátolt teljes perifériás vérmintát analizáltak sejtstabilizáló oldat jelenlétében (Cyto-Chex) és anélkül. Azt találták, hogy négy óra eltelte után vizsgálva a szobahőmérsékleten tartott, stabilizáló oldatot nem tartalmazó mintáknál a granulocyta CD11b expressziójának intenzitása nőtt. Ugyanakkor Hodge és munkatársai azt találták, hogy a fehérvérsejteken az Annexin V jelölődés, mely az apoptózis során a sejtfelületre áthelyeződő foszfatidil-szerinhez kötődik, hat óra eltelte után detektálható. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a Saxton és munkatársai által a nem stabilizált, de nyugalomban hagyott mintákon detektált fokozott CD11b expresszió hátterében nem apoptózis, hanem inkább az intracellulárisan elhelyezkedő CD11b fehérjének a sejtmembrán külső felületére történő spontán kihelyeződése állhat. Tehát az apoptózis előtt és alatt bekövetkező aktiváció következményeit mindig figyelembe kell venni.

Munkánk során azt láttuk, hogy a CD11b expressziójának intenzitása az alvadásgátló típusának függvényében változott a megkésett mintafeldolgozás során: Na-heparin használatakor fokozódott, míg K₃-EDTA esetében csökkent az antigén expressziója. Eredményeink alátámasztják azt, hogy a minta típusa megszabja a CD11b expressziójának viselkedését. Az alvadásgátló típusa nemcsak a sejtek életképességére hat, hanem az antigén-antitest között létrejövő kötés kialakulását is meghatározza. Repo és munkatársai által végzett tanulmány rámutatott arra, hogy hogyan tudja az alvadásgátló befolyásolni a myeloidokon detektált CD11b expressziójának intenzitását. Kimutatták ugyanis, hogy a D12 klónnal rendelkező monoklonális antitest antigénhez kötődéséhez kétértékű kation szükséges, melyet az EDTA megköt, így akadályozza az antigén-antitest közötti kötés kialakulását. Repo és munkatársai vizsgálatának eredményét támogatják a mi eredményeink is, hiszen a D12 monoklonális antitest használatakor kation kelátor, EDTA, jelenlétében a CD11b expressziójának intenzitása már a kiindulási mintán csökkentnek bizonyult a Na-heparinnal alvadásgátolt mintákhoz képest. A CD11b csökkent expressziója markánsan tovább csökkent

egy nap eltelte után. Amikor egy másik klónt, az ICRF44-t használtuk, az EDTA-val alvadásgátolt mintákban nem változott a CD11b expressziójának intenzitása a granulocytaikon a késői mintafeldolgozás hatására. Emellett vizsgálataink eredménye a CD11b expresszióját befolyásoló újabb aspektusra mutatott rá. A csontvelői mintáknál a Na-heparinnal alvadásgátolt minták esetében a késői mintafeldolgozás következtében csökkent a CD11b expressziója a monocytákon, míg a granulocytaikon nem változott. Ezzel szemben a Na-heparinnal alvadásgátolt teljes perifériás vérminta vizsgálatakor szignifikánsan fokozott CD11b expressziót detektáltunk a monocytákon és granulocytaikon a napok múlásával. A csontvelői és perifériás vérminta vizsgálata során látott eltérő jelenség hátterében az állhat, hogy a két mintatípus esetében eltérő sejtpopulációkat vizsgáltunk, melyeknek különböző lehet az intracelluláris CD11b tartalékuk. A perifériás vérmintánál egyrészt normál minták voltak, másrészt csak érett granulocytá és monocytá alakok voltak jelen. Ezzel ellentétben a csontvelői mintáknál pathológiás mintákat vizsgáltunk, melyben a minta természetéből adódóan myeloid előalakok (promyelocytá, myelocytá, promonocytá) is voltak.

A legtöbb általunk vizsgált markernél korábban nem vizsgálták a preanalitikai faktorok hatását. Ezek közül talán a legfontosabb a CD117 expressziójának változása a késői mintafeldolgozás során, mely mindkét típusú alvadásgátló esetén előfordult. A CD117, a CD34 és CD45 mellett, az egyik legfontosabb marker, amelynek segítségével a myeloblastokat azonosítani lehet. A myeloblastok százalékának megállapítására az áramlási citometria vizsgálat a WHO által ajánlott módszerek között szerepel. Ezért megnéztük, hogy a myeloblastok százalékát befolyásolta-e a CD117 markáns változása. Az MB% egy nap eltelte után stabil maradt és csak a második napra változott szignifikánsan a K₃-EDTA-val alvadásgátolt mintában.

Jelen tanulmánynak több korlátja van. Noha homogén betegcsoportot szerettünk volna megvizsgálni, az MDS heterogenitásából adódóan az MDS/MPN gyanúval küldött betegeknek a végső diagnózis több esetben sem MDS volt. Ugyanakkor a dysplastikus jelek detektálása nemcsak az MDS-es betegeknek kardinális - akiknek a diagnózis felállítása mellett a prognosztikai besorolást is befolyásolják - hanem a normál, MPN vagy AML esetén is kulcskérdés. MDS-ből transzformálódott AML a WHO ajánlásban külön entitásként szerepel, és rossz prognózissal társul. Így a preanalitikai hibából adódó elváltozások helytelen értelmezése nemcsak téves diagnózishoz, hanem helytelen prognosztikai megítéléshez, ezáltal nem megfelelő kezelési stratégia meghatározásához is vezethetnek. Végezetül tanulmányunkba csak korlátozott számban tudtunk betegeket beválogatni, így az eredményeink igazolására egy nagyobb esetszámú tanulmány szükséges.

Összefoglalva elmondható, hogy összesen 37 paramétert vizsgáltunk meg a myeloid, erythroid és lymphoid sejtvonalakon, érett és éretlen sejteken egyaránt. Az alvadásgátló típusától függően, már a kiindulási immunfenotípusnál eltéréseket detektáltunk. Mivel áramlási citometria vizsgálat során dysplastikus jelként értékelünk mindent, ami a normál mintázattól eltér, ezért minden esetben figyelembe kell venni a vizsgálatra küldött minta alvadásgátlójának típusát, amikor a normál mintázathoz hasonlítunk. Ezt legegyszerűbben úgy lehet kivitelezni, ha egy laboratórium csak egyféle alvadásgátolt mintát fogad el vizsgálatra. Tekintettel arra, hogy a preanalitikai hibák, mint megkésett mintafeldolgozás, jelentős immunfenotípus eltérést tudnak okozni, és ezáltal postanalitikai hibához, vagyis az eredmények helytelen interpretálásához vezethetnek, így az ajánlások szigorú betartását javasoljuk. Amennyiben a regionális ellátó helyekről a minta szállítása elkerülhetetlen, úgy egyrészt a Na-heparinnal alvadásgátolt mintát szükséges előnyben részesíteni, másrészt az általunk végzett vizsgálat alapján stabilnak bizonyult markerek változását kell jobban figyelembe venni az áramlási citometria eredmény értékelése során.

5.2. A hat paraméterből álló áramlási citometria pontozó rendszer alkalmazási területei

Az általunk kialakított és vizsgált áramlási citometria pontozó rendszer használatának legnagyobb előnye, hogy mindössze hat, célzottan kiválasztott paraméter segítségével képes differenciálni a normál, reaktív és az akár csak egy sejtvonalat érintő, alacsony rizikójú MDS-es betegek között. Információt kapunk nemcsak a myeloid, hanem a lymphoid és erythroid sejtvonalról is. A négyszínű jelölési technikával kapott eredmények jól reprodukálhatóak a nyolcszínű jelölési technika használatakor is, tehát az eredményeket a fluoreszcens festék típusa, az áramlási citométer beállításai nem befolyásolták. A kialakított pontozó rendszer nemcsak a diagnosztikában, hanem a prognosztikában is alkalmazható. Minél több pontot értek el a betegek, annál előrehaladottabbnak bizonyult a betegségük. A hat paraméterből álló áramlási citometria pontozó rendszer és az R-IPSS közötti korreláció a korábbi tanulmányokban összehasonlított áramlási citometria pontozó rendszerek és R-IPSS korrelációjának megfelelően alakult. Az áramlási citometria pontozó rendszerek és az R-IPSS közötti különbségek összevetésekor két dolgot azonban fontos figyelembe venni: Egyrészt azt, hogy az R-IPSS esetén a myeloblastok százalékának meghatározása morfológia vizsgálat alapján történik, mely a dysplastikus csontvelő bizonyos eseteinél, ahol a myeloblastok, monocyták morfológiája és immunfenotípusa jelentősen atípusos, az áramlási citometria

vizsgálattal objektívebb módon lehetséges. Másrészt az R-IPSS egyik kardinális paramétere a sejtiszegénység mértéke. Ugyanakkor jelen tanulmányunkban és általában a rutin diagnosztikába is sokszor érkezik olyan betegektől minta áramlási citometria vizsgálatra, akik korábban, akár a vizsgálatot megelőző hetekben, transzfúzióban részesültek. Ez hatással lehet a terápia megkezdése után számított R-IPSS pontszámra, míg az áramlási citometria pontozó rendszer eredményére nincs hatással.

Az elmúlt évtizedekben számos MDS-re jellegzetes immunfenotípus eltérést írtak le, azonban az MDS heterogenitásából adódóan nincs egy olyan eltérés sem, amely önmagában egyértelműen MDS-re utalna. Emiatt különböző marker kombinációkból felépülő pontozórendszereket dolgoztak ki. Ezek a pontozórendszerek több szempontból is eltértek egymástól. A pontozórendszereknél különbözött a vizsgált sejtpopuláció. Általában a myeloid populációra fókuszáltak, míg egy-egy tanulmány kifejezetten az erythroid prekursorokat vette górcső alá, ugyanakkor csak elvétve volt olyan vizsgálat, amely a megakariocita vonalat elemezte. A paraméterek számának tekintetében is nagy különbségeket láthatunk, vannak olyan rendszerek, melyek mindössze 3-4 paraméterből állnak, míg mások az áramlási citometria nyújtotta lehetőségeket felhasználva 83 paraméter alapján alakították ki pontozó rendszerüket. Eltérő a rendszerek kialakítását szolgáló betegcsoport számossága és összetétele is. A rendszerek specificitása általában magas (90-100%), míg a szenzitivitása 50-100% között mozog. Az ELN IMDSFlow irányelve az áramlási citometria pontozó rendszerek közül az Ogata és munkatársai által kialakított „mini-panel”-t emeli ki, mely jól alkalmazható a költségek csökkentése érdekében MDS szűrésére. Ha részletesebben megnézzük az Ogata és munkatársai által kialakított pontozórendszer elemeit, megfigyelhetjük, hogy miben rejlik ennek a rendszernek az egyedisége, hogy mi alapján emelkedik ki ez a pontozó rendszer a többi közül. Ogata és munkatársai számos paraméter vizsgálata után választotta ki azt a négyet, amely alapján a „mini-panel” felépül. Amikor tíz csontvelői mintát három részre osztottak és azokat különböző laboratóriumokban, ezáltal különböző minta-feldolgozási körülmények és áramlási citometria beállítások alkalmazásával, megvizsgálták, azt találták, hogy a „mini-panel” négy paraméterénél nem volt számottevő különbség a laboratóriumok által mért eredmények között. Ha alaposabban megvizsgáljuk a négy paramétert, abból egy, a myeloblast százalék az, melynek meghatározását a WHO ajánlásban is áramlási citometriával javasolják. Két paraméter esetében pedig (granulocytá és lymphocyták oldalra szórt fényének aránya, lymphocyták és a myeloblastok CD45 expressziójának MFI hányadosa) a mintán belüli belső kontrollként lymphocytákat használtak, mellyel csökkenthető az eltérő körülmények hatása. A negyedik paraméter (LB aránya a CD34 pozitív sejteken belül) a

myeloblastok vizsgálatához hasonlóan, szintén egy progenitor százalékanak meghatározása. Ennek köszönhetően a pontozó rendszerhez felállított határértékeket minden laboratóriumban biztonsággal lehet használni, az eredmények függetlenek a vizsgálati körülményektől. Tanulmányunkban ezt a jól reprodukálható rendszert egészítettük ki mindössze két paraméterrel, mely a szenzitivitást jelentősen megnövelte. Mindkét paraméter további információt nyújt a csontvelő működésének eltéréséről, melyek segítségével a heterogén betegcsoport tagjainak nagyobb része válik azonosíthatóvá.

Ha csak azt vesszük figyelembe, hogy a refrakter anémia az MDS definiálása óta klasszikus és népes alcsoportját alkotta az MDS-nek, belátható, hogy az erythroid vonal gyakran érintett az MDS esetében. Így az erythroid prekursorok rCD71 CV% értéke kiválóan alkalmas ezen betegek szűrésére, még olyan áron is, hogy ennél a paraméternél nem lehet állandó határértéket felállítani, hanem minden laboratóriumnak külön szükséges ezt meghatározni. Ez egyben a tanulmányunk egyik korlátja is, mivel nem lehet az általunk használt határértéket előzetes vizsgálat nélkül bárhol használni, hiszen a négy- és nyolcszínű jelölési technikánál láthattuk, hogy ennek módosítására volt szükség (négszínű analízis: 85,8%, nyolcszínű analízis: 115,5%). A másik új paraméterünknek, a mastocyták százalékanak, korábbi áramlási citometriai pontozó rendszerek nem tulajdonítottak különösebb jelentőséget, annak ellenére nem, hogy az emelkedett mastocytá arányt MDS-ben más metodikákkal is bizonyították, és hasznos diagnosztikai paraméternek tartották. A mastocyták százalékanak áramlási citometriai vizsgálata nem igényel a „mini panel”-nél használt markereken kívül egyéb CD markert, tehát nem jelent plusz vizsgálati költséget, és a vizsgálati körülmények, eltérő beállítások sem befolyásolták az általunk beállított határértéket sem.

Összefoglalva tehát elmondható, hogy a mindössze egyetlen csővel, néhány markerrel vizsgálható hat paraméterből álló áramlási citometriai vizsgálat hasznos segítséget nyújthat az MDS diagnosztikájában és prognosztikai megítélésben. Alkalmas az MDS-es betegek szűrésére azáltal, hogy információt nyújt nemcsak a myeloid, de a lymphoid és erythroid vonalról is, sőt a mastocyták által közvetett módon információhoz juthatunk a csontvelőben történő pathológiás folyamatokról is.

5.3. A preanalitikai faktorok hatása az áramlási citometriai pontozó rendszer hat paraméterére

Az alvadásgátló típusa szignifikánsan befolyásolta a granulocyták oldalra szórt fény karakterét, az erythroid prekursorok CD71rCV% értékét és a mastocyták százalékát. Ezen paraméterek közül az alvadásgátló típusának leginkább a mastocyták százalékának megítélésénél van jelentősége. Az K₃-EDTA-val alvadásgátolt mintánál szignifikánsan magasabb értéket mértünk.

A mastocyták százalékát, az erythroid prekursorok CD71 rCV% értékét és a lymphoblastok százalékát nem befolyásolta a késleltetett mintafeldolgozás.

Összességében tehát megállapítható, hogy a hat paraméterből álló áramlási citometriai vizsgálatra a K₃-EDTA-val alvadásgátolt minta a legalkalmasabb és az egy nappal később történt mintafeldolgozás még nem befolyásolja ezen paraméterek megítélését.

5.4. Az áramlási citometria felhasználásának optimalizációja az MDS diagnosztikájában és prognosztikájában

Napjainkban lehetőség van célzott kezelésre, például hipometiláló szerek alkalmazásával, melyek nemcsak az eseménymentes, hanem a teljes túlélést is javítani tudják. Az igen költséges, de hatékony hipometiláló kezelésnél két dolgot azonban érdemes figyelembe venni: Egyrészt a terápiás választ biztonsággal hat hónap eltelte után lehet megítélni, így a betegek szempontjából egy rossz terápiás válasz idővesztést okoz. Másrészt a hipometiláló szerek nem pusztítják el a betegségért felelős malignus klónt, így a terápia befejezésekor gyors relapszus várható. Ezekből az okokból kifolyólag az MDS esetében a pontos diagnózis felállítása, a kezelési stratégia alapját képező prognosztikai megítélés, és a terápiás válaszkészség előrevetítése a legfontosabb mind a beteg, mind pedig a társadalom szempontjából. Ezen három elvárás teljesítéséhez a klasszikus módszerek mellett két metodika tud hasznos információkat szolgáltatni, a szomatikus mutáció vizsgálata és az áramlási citometria. A szomatikus mutáció módszertanának dinamikus fejlődését mutatja az, hogy míg 2013-ban az ELN ajánlásban ez a módszer a javasolt, ajánlott és kötelező kategóriák közül a javasoltak között szerepelt, addig 2016-ban a WHO ajánlás már kiemelt két mutációt, melyet mindenképp érdemes vizsgálni. Továbbá 2017-ben a Nemzetközi MDS Munkacsoport irányelvében már számos szomatikus mutáció említésre került, és azok

vizsgálata szerves részét képezi az MDS-t megelőző állapotok és az MDS diagnózis felállításának. A metodika fejlődésének hátterében az áll, hogy nemcsak objektív vizsgálatról van szó, hanem egy könnyen standardizálható módszerről. Ilyen mértékű fejlődést az elmúlt években az áramlási citometria analízisnél nem láthattunk. Az áramlási citometria már 2006-ban mint MDS-t támogató kritérium szerepelt a Nemzetközi MDS munkacsoport ajánlásában, és ez a 2017-es új ajánlásban sem változott. Ha megvizsgáljuk, hogy mi áll annak hátterében, hogy az igen magas specificitással és szenzitivitással rendelkező pontozó rendszerek sem jutottak nagyobb szerephez a nemzetközi ajánlásokban, a következő megállapításokat tehetjük. Noha komoly törekvések voltak az áramlási citometria vizsgálatok standardizálására és harmonizálására, feltehetően gazdasági okokból nem született konszenzus a mintatípus, mintakezelés, jelölés, mérés és analízis szempontjából, melyet széleskörűen szerte a világban egységesen használnának. Másrészt, habár egy objektív módszerről van szó, az eredmények helyes interpretálása hosszú betanulási időt igényel, melyet mi sem bizonyít jobban, mint a jelenlegi áramlási citometria ajánlás. MDS esetében 58 immunfenotípus eltérést szükséges vizsgálni, ahol pozitív eredménynek nem egy adott marker expressziója vagy hiánya, hanem a csökkent vagy emelkedett intenzitása, vagy az atípusos mintázat számít. Ezen nehézségek áthidalására új irányvonal az analizáló szoftverek fejlesztése, melyek képesek arra, hogy több normál minta immunfenotípusát rögzítsék és azok egyesített adataihoz hasonlítani tudják egy adott beteg adatát, sőt konkrét számértékként meg tudják mondani, hogy az átlagtól hány SD-vel tér el egy marker expressziója. Ezáltal egyszerűbbé és egyértelművé válik az analízis, továbbá ha minden laboratórium a saját beállításai szerint mért normál mintákat használ referenciának, akkor még eltérő mintafeldolgozás esetén is létrejöhet egy standard interpretálási protokoll. Tanulmányainkkal az áramlási citometria széleskörű használatát szeretnénk volna segíteni, eredményeinkkel támogatni a Nemzetközi MDS Munkacsoport törekvéseit. A preanalitikai faktorok következtében kialakult immunfenotípus-eltérések részletes vizsgálatával szeretnénk volna egyrészt rávilágítani a standardizálás fontosságára, másrészt az ajánlások kialakítását segíteni. Továbbá felvetődik annak a lehetősége, hogy ha az új analizáló szoftverek tárolni tudják a normál minta adatait, akkor arra is képesek lehetnek idővel, hogy a felhasználó megválassza az analizálni kívánt minta alvadésgátlójának típusát, vagy a mintavételtől számított mintafeldolgozás időpontját.

6. Összefoglalás

Az MDS egy heterogén megbetegedés, mely természetéből adódóan változatos klinikai kimenetellel társul. Az áramlási citometriai vizsgálat hasznos segítséget tud nyújtani a diagnózis felállításában, a prognózis megítélésben, sőt a terápiára adott válasz előrejelzésében is. Munkánk célja egyrészt az volt, hogy a preanalitikai faktorok immunfenotípusra gyakorolt hatását felmérjük, másrészt javítsuk az MDS szűrésére kialakított „mini-panel” érzékenységet.

A preanalitikai faktorok közül vizsgáltuk az alvadásgátló típusától függő immunfenotípus eltéréseket a kiindulási és késleltetett mintafeldolgozás során. Az analíziskor a markerek széles spektrumát felhasználva nemcsak a myeloid, hanem a lymphoid, erythroid sejtvonalat, sőt a ritka eseményeket is vizsgáltuk. Az ELN ajánlásnak megfelelően a Na-heparinnal alvadásgátolt mintáknál kevesebb immunfenotípus eltérés adódott a késleltetett mintafeldolgozás következtében. Emellett kimutattuk, hogy az antitest klónja is befolyásolhatja az immunfenotípust és annak változását.

A „mini-panel”-t két további paraméterrel kiegészítve (CD71 rCV%, mastocyták százaléka) egy érzékenyebb áramlási citometriai pontozó rendszert kapunk, melynek segítségével az alacsony rizikójú MDS-es betegek is hatékonyan azonosíthatóak. A rendszer paramétereinek négy- vagy nyolcszínű jelölési technikával történő vizsgálata nem befolyásolja a rendszer használhatóságát. Továbbá a paraméterek detektálása egy nappal később történt mintafeldolgozás során is megbízhatóak függetlenül az alvadásgátló típusától. Ugyanakkor, mivel a mastocyták detektálására a K₃-EDTA-val alvadásgátolt vér az optimálisabb, így a hat paraméterből álló „mini-panel” használatakor a K₃-EDTA alvadásgátló választása javasolt. A kialakított rendszer nemcsak a diagnózis felállításához, hanem a prognózis megítéléshez is hozzájárulhat.

Munkánkkal szerettünk volna támogatni a Nemzetközi Áramlási Citometriai Munkacsoport áramlási citometriai vizsgálat standardizálására és széleskörű használhatóságára vonatkozó törekvéseit.

7. A disszertáció új eredményei, megállapításai, klinikai jelentősége

1. Legjobb tudásunk szerint most először történt a preanalitikai faktorok hatásának vizsgálata a markerek széles spektrumán (37 paraméter), különböző sejttípusokon, nyolcszínű jelölési technika alkalmazásával. Azt találtuk, hogy az alvadásgátló típusa jelentősen befolyásolja a késői mintafeldolgozás következtében kialakult immunfenotípus-eltérések számát és azok mértékét. Azonosítottuk a stabil és érzékeny markereket.
2. Az alvadásgátló típusa már a kiindulási antigén expressziós mintázatra is hatással van, amikor még nincs, vagy csak minimális mennyiségben van jelen apoptotizáló sejt.
3. Tisztáztuk a sejtek elhalása során bekövetkező CD11b expressziójának változásáról a nemzetközi irodalomban talált eltérő információk okát: Eredményeink alátámasztják azt, hogy az alvadásgátló típusa, a minta származási helye (perifériás, csontvelői minta) és a vizsgálathoz használt antitest klónja megszabja a CD11b expressziójának viselkedését késői mintafeldolgozás során.
4. Hipotézisünknek megfelelően azt találtuk, hogy ha a „mini-panel”-t további két paraméterrel kiegészítettük - a CD71 expressziójának variációs koefficiensével (rCD71CV%) és a mastocyták százalékaival (MC%) – egy szenzitívebb pontozórendszert tudtunk kialakítani, miközben a specificitás magas maradt.
5. A négy színű jelölési technikával meghatározott hat paraméterből álló „mini-panel” eredményei jól reprodukálhatóak a nyolcszínű jelölési technika használatakor is, tehát az eredményeket a fluoreszcens festék típusa, az áramlási citométer beállításai nem befolyásolták.
6. Bizonyítani tudtuk, hogy a kialakított pontozó rendszer nemcsak az MDS diagnosztikáját, de a prognosztikai besorolást is segíteni tudta.
7. A négy paraméterből álló „mini-panel” elemeit az antikoaguláns típusa és az egy nappal később történt mintafeldolgozás nem befolyásolta.
8. Eredményeink rávilágítottak arra, hogy a mastocyták áramlási citometriával történő meghatározására a K₃-EDTA-val alvadásgátolt csontvelői minta a legalkalmasabb. Így a hat paraméterből álló „mini-panel” vizsgálatára a K₃-EDTA-val alvadásgátolt csontvelői minta a legmegfelelőbb, melynek paraméterei egy napig stabilak.

8. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/278/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kárai Bettina
Neptun kód: Y6ALN3
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kárai, B.**, Miltényi, Z., Gergely, L., Széles, M., Kappelmayer, J., Hevessy, Z.: The impact of delayed sample handling and type of anticoagulant on the interpretation of dysplastic signs detected by flow cytometry.
Biochem Med (Zagreb). 28 (2), 1-13, 2018.
IF: 3.653 (2017)
2. **Kárai, B.**, Bedekovics, J., Miltényi, Z., Gergely, L., Szerafin, L., Ujfalusi, A., Kappelmayer, J., Hevessy, Z.: A single-tube flow cytometric procedure for enhancing the diagnosis and prognostic classification of patients with myelodysplastic syndromes.
Int. J. Lab. Hematol. 39 (6), 577-584, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/ijlh.12700>
IF: 1.919
3. **Kárai, B.**, Szánthó, E., Kappelmayer, J., Hevessy, Z.: Flow cytometry in the diagnosis of myelodysplastic syndromes.
E-JIFCC. 23 (4), [1-8], 2012.





További közlemények

4. Szánthó, E., **Kárai, B.**, Ivády, G., Bedekovics, J., Szegedi, I., Petrás, M., Ujj, G., Ujfalusi, A., Kiss, C., Kappelmayer, J., Hevessy, Z.: Comparative Analysis of Multicolor Flow Cytometry and Immunohistochemistry for the Detection of Disseminated Tumor Cells.
Appl. Immunohistochem. 26 (5), 305-315, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/PAI.0000000000000519>
IF: 2.042 (2017)
5. **Kárai, B.**, Hevessy, Z., Szánthó, E., Csáthy, L., Ujfalusi, A., Gyurina, K., Szegedi, I., Kappelmayer, J., Kiss, C.: Expression of Coagulation Factor XIII Subunit A Correlates with Outcome in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia.
Pathol. Oncol. Res. 24 (2), 345-352, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-017-0236-0>
IF: 1.935 (2017)
6. **Kárai, B.**, Jakó, J., Szánthó, E., Kappelmayer, J., Hevessy, Z.: A myelodysplasiás szindróma diagnosztikája, a prognózis megítélése.
Hematol. Transzfuziol. 46 (2), 93-102, 2013.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,549

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,572**

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

Debrecen, 2018.08.13.

