

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**A csontvelői stroma aktivációja különböző  
onkohematológiai kórképekben**

**Dr. Bedekovics Judit**

**Témavezető: Dr. Méhes Gábor**



**DEBRECENI EGYETEM**

**KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2014**

# A CSONTVELŐI STROMA AKTIVÁCIÓJA KÜLÖNBÖZŐ ONKOHEMATOLÓGIAI KÓRKÉPEKBEN

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

**Írta: Dr. Bedekovics Judit okleveles általános orvos**

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai orvostudományok doktori iskolája

(Klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Dr. Méhes Gábor, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Hernádi Zoltán, az MTA doktora

tagok: Dr. Antal-Szalmás Péter, PhD

Dr. Kovács Ilona, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

DE ÁOK, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika könyvtára

2014. december 15. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Bagdi Enikő, PhD

Dr. Gergely Lajos, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Hernádi Zoltán, az MTA doktora

tagok: Dr. Antal-Szalmás Péter, PhD

Dr. Bagdi Enikő, PhD

Dr. Gergely Lajos, PhD

Dr. Kovács Ilona, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

2014. december 15. 13:00 óra

# 1 BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A csontvelői homeosztázis fenntartásáért felelős stromalis mikroökönyezet a növekedési faktorok, citokinek, extracelluláris mátrix, ionok olyan összetételét és gradiensét alakítja ki, amely szabályozza a hemopoeticus őssejtek osztódási aktivitását, differenciálódási készségét.

A myelofibrosis során a csontvelői stroma aktiváció jön létre, melynek során rostsaporulat jelenik meg. A rostsaporulat összetétele alapján beszélhetünk reticulín fibrosisról és kollagén fibrosisról.

A rutin diagnosztikában a neoplasiákhoz társuló fibrosissal találkozunk a leggyakrabban. A malignus folyamatok lehetnek primer vérképző rendszeri kiindulású neoplasiák úgy, mint akut illetve krónikus myeloid leukemia, akut illetve krónikus lymphoid leukemia, myelodysplasiás szindróma, egyéb myeloproliferatív kórképek, plasmasejtes, histiocytás illetve hízósejtes folyamatok. Rostszaporulattal számolhatunk azonban akkor is, amikor a csontvelő másodlagosan infiltrált a neoplastikus sejtek által.

A rostsaporulat jelenléte eltérő megítélés alatt áll a különböző kórképekben. Egyes folyamatokban a rostsaporulat dominálja a képet, és prognosztikai szereppel rendelkezik. Primer myelofibrosisban a reticulín és kollagén fibrosis fontos eleme a kórképnek, és független prognosztikai faktora az általános túlélésnek. Krónikus myeloid leukémiában a fibrosis jelenléte a diagnózis időpontjában szintén negatív prognosztikai szereppel bír, megjósolva az elégtelen terápiás választ. Primer myelodysplasiás szindrómában szintén gyakori elváltozás a rostsaporulat, amely amennyiben kifejezett, egy önálló klinikopathológiai entitást jelöl (MDS-F), amely agresszív kórlefolyással jár. Myelodysplasiás szindrómában a fibrosis jelenléte negatív prognosztikai faktora az általános túlélésnek. A csontvelőt érintő betegségek egy másik – nagyobb – csoportjában a

mesenchymalis sejtek expansziója és a következményes myelofibrosis hatása a prognózisra nem világos.

A rotszaporulat kimutatása dekalcinált, fixált, paraffinba ágyazott biopsziás mintákból történik, melyek jellemzően a crista iliacából származnak. Ahhoz, hogy a klinikai tanulmányokban a fibrosis mértéke összehasonlítható legyen, régóta kialakult a törekvés egy egységes szemi-quantitatív értékelési rendszer kidolgozására. A jelenleg leghatékonyabb eljárás a Gömöri-féle ezüst impregnáció, amely a rostokat övező glycoprotein mátrixot tünteti fel. Ezen festéssel a reticulín rostozat fekete vékony szálcsák formájában tűnik fel, míg a kollagén rostok világosbarna illetve sárgásbarna kötegek formájában jelennek meg. A csontvelőben az erek adventitialis rétegében, a zsírsejtek körül normál esetben is láthatunk reticulín rostokat, míg kollagén rostokból álló kötegek illetve csontújdonképződés normál esetben nem figyelhetők meg. Összesen tíz szemi-quantitatív rendszer ismert, amelyek közül a leghatékonyabb a Bauermeister scale (1971), illetve az Európai Konszenzus rendszere (2005). Ezen rendszerek kidolgozása primer myelofibrosisban szenvedő betegek csontvelői biopsziás mintáinak vizsgálatával valósultak meg.

Számos fibrosissal járó kórképben igazolták, hogy a rost termeléséért felelős stroma sejtek proliferációja és maga a rost termelése különböző növekedési faktorok kontrollja alatt állnak. Ezek közül kiemelendő a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF, platelet derived growth factor), amely a fibroblastok proliferációjában játszik szerepet.

A vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor a tirozin kináz receptorok közé tartozik. A PDGFR-nek két altípusa ismert, melyek a PDGFR $\alpha$  és a PDGFR $\beta$ , ezek szintén homo-és heterodimer kialakítására képesek. A különböző receptor dimerek átfedő jelátviteli útvonalak beindítására képesek, melyek közül kiemelt a mitogén szerep,

az aktin reorganizáció, és a kemotaxis, továbbá a PDGFR aktivációja az embriogenesisben és az organogenesisben is szerepet játszik.

A fibroticus kórképekről általánosságban elmondható, hogy fibroblastok proliferációja és extracelluláris mátrix termelése jelenik meg. A PDGFR útvonal aktivációja leginkább az első lépésben játszik szerepet. A fibroticus folyamatok esetében a PDGF termelése leginkább a gyulladáshoz, macrophagokhoz köthető, amelyek egyúttal olyan citokineket is termelnek, amely a PDGFR fokozott expressziójához vezet.

A PDGFR-hoz köthető jelátviteli útvonal gátlására több módszert is kidolgoztak, melyek közül a legoptimálisabbnak a tirozin kináz aktivitás gátlása bizonyult. Jelenleg az imatinib mezilát (imatinib, ST1571, Gleevec) a legelterjedtebb tirozin kináz gátló, amely egyaránt blokkolja a PDGFR $\alpha$ , a PDGFR $\beta$ , a bcr-abl fúziós fehérje, a c-kit és az Flt3 aktivitását. Az imatinib a klinikumban is használatos Philadelphia-kromoszóma pozitív krónikus myeloid leukémia, gastrointestinalis stroma tumor esetében, valamint PDGFR gén transzlokációt hordozó kórképekben.

A stroma sejtek vizsgálata a rostsaporulat mértékének meghatározásával szemben több lehetséges előnyt rejt, melyek vizsgálatára eddig nem került sor. A PDGFR kimutatására szolgáló immunhisztokémiai eljárás standard jelölődést mutat, a kémiai reakción alapuló ezüst-impregnációval szemben. A normál csontvelői stroma PDGFR expressziójának vizsgálatával negatív és pozitív belső kontrollok határozhatók meg, melyek növelik a kiértékelés megbízhatóságát. A már megtermelt rostozattal ellentétben a rosttermelő stroma sejtek száma egy dinamikusabb, a környező faktorokra gyorsabb változást mutató paraméter lehet. A rostsaporulat pathogenesisének ismeretéből arra következtethetünk, hogy a stromasejtek proliferációja a myelofibrosis megjelenésének prediktív mutatója lehet azokban a kórképekben, amelyekben az irodalmi adatok

alapján a rostsaporulat prognosztikai szereppel bír. Az immunhisztokémia módszerrel járó festődési sajátosságok lehetővé teszik a pozitív és negatív jelölődést mutató területek éles elkülönítését, amely digitális képanalízisen alapuló objektív vizsgálómódszerhez ad lehetőséget. A szubjektív sajátosságokkal is rendelkező, szemi-kvantitatív grádus rendszerrel szemben a digitális képanalízis használatával megadott numerikus paraméterek követéses esetek precíz összehasonlítására adnak lehetőséget, amely elsősorban az anti-fibrotikus terápiás eljárások hatásának mérésére lehetne alkalmas. A PDGFR expresszió kimutatása egyben terápiás célpont azonosítását is jelöli a tirozin-kináz gátló szerek érájában.

## 2 CÉLKITŰZÉSEK

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

## 3 METODIKÁK

### 3.1 *Betegcsoport*

#### 3.1.1 A PDGFR mintázat meghatározása és az MF grádussal mutatott kapcsolat vizsgálata

A PDGFR $\alpha$  és PDGFR $\beta$  expresszió meghatározásához a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Belgyógyászati Klinika Hematológiai Osztályán illetve a Gyermekgyógyászati Klinika Gyermekonkológiai és Hematológiai nem önálló Tanszéken kezelt betegek crista biopsziás mintáinak feldolgozására került sor. A vizsgálatok 60 csontvelői mintán történtek retrospektív módon, az életkor 2-90 év között változott (35 nő és 25 férfi). A 60 mintából 47 pathológiás csoportba tartozott, ahol olyan alapbetegség volt azonosítható, amely potenciálisan csontvelői rostsaporulathoz vezet. A vizsgálatba bevontunk további 13 esetet, melyekben fibrosis kizárható volt.

#### 3.1.2 A PDGFR $\beta$ expresszió myelofibrosis progresszióra gyakorolt prediktív értéke

A PDGFR $\beta$  expresszió myelofibrosis progresszióra gyakorolt prediktív értékének meghatározásához a European Bone Marrow Working Group (EBMWG) bevonásával, összesen öt európai hematopathológiai centrum közreműködésével, 84 myeloproliferatív neoplasiában szenvedő beteg, 193 crista biopsziás mintájának retrospektív feldolgozására került sor. Az egyes esetekből általában két minta állt rendelkezésre, azonban néhol több mintavétel is történt. Az MPN alcsoporton belül az 55 primer myelofibrosissal diagnosztizált



eset képezte a legnagyobb csoportot, így ezen betegcsoport értékelésére külön is sor került. A tanulmány során 84 esetből 193 minta kiértékelésre került sor, az átlagos követési idő 34,43 hónap (2-151 hónap) volt. A PMF alcsoportba tartozó 55 esetből 126 minta állt rendelkezésre, itt az átlagos követési idő 30,17 hónap volt (2-143 hónap).

### 3.1.3 PDGFR $\beta$ expresszió objektív megítélése digitális képanalízis segítségével

A PDGFR $\beta$  expresszió objektív megítélésére szolgáló algoritmus kifejlesztéséhez és teszteléséhez összesen 79 crista biopsziás minta retrospektív vizsgálatára került sor, melyek a Debreceni Egyetem, Belgyógyászati Klinika, Hematológiai Osztályán kezelt betegektől származtak. A vizsgálat két részből állt. Az első részben az algoritmus kifejlesztéséhez 10 kontroll és 32 kóros minta kiértékelése történt meg, míg a vizsgálat második részében az algoritmus tesztelése során további 37 kóros minta vizsgálatára került sor.

## 3.2 *A crista biopsziás minták feldolgozása*

A Debreceni Egyetemen vételezett és a Pathológiai Intézetbe eljuttatott crista biopsziás minták feldolgozásának első lépései a formalin fixálás, dekalcinálás, melyet paraffinba ágyazás követ.

### 3.3 *Az MF grádus meghatározására használt eljárás*

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

### Gömöri-féle ezüst impregnáció

A Gömöri-festés standard protokoll alapján készült. Az eljárás során a metszetek 0,5%-os kálium-permanganát (60458 Sigma-Aldrich) oldatba kerülnek 5 percre, melyet 3 desztillált vizes öblítés követ. Ezután a metszeteket 1 percre 1%-os kálium-metabiszulfít (31268 Sigma-Aldrich) oldatba tesszük, melyet 3 csapvizes mosás és 4 desztillált vizes öblítés követ. Ezt követően a metszetek 2%-os vas-ammónium-szulfát (221260 Sigma-Aldrich) oldatba kerülnek 3 percre, amit ismét 3 desztillált vizes öblítés követ. Az impregnációhoz frissen készített 2% kálium-hidroxidot (P5958 Sigma-Aldrich) tartalmazó 10%-os ezüst-nitrát (21572.188 VWR AnalaR Normapur) használatos 1 percig, melyet 1 desztillált vizes öblítés és 5 perces csapvízben hígított 10%-os formalinfixálás (03300, Formaldehyd Molar Chemicals) követ. Mosás után a metszeteket 0,2%-os arany-klorid (520918, Sigma-Aldrich) oldatba helyezzük 30 másodpercre, melyet desztillált vizes mosás követ. Végül a metszetek 1%-os nátrium-tioszulfát (S7026 Sigma-Aldrich) oldatba kerülnek, melyet 2 kör desztillált vizes öblítés, dehidráció és a metszetek fedése követ.

### 3.4 *Immunhisztokémiai vizsgálatok*

A disszertációban részletezett valamennyi vizsgálatban sor került PDGFR $\beta$  immunhisztokémiai festésre, és ez alapján a PDGFR $\beta$  score meghatározására. Az általunk bevezetett szemi-kvantitatív score rendszer – az MF grádushoz hasonlóan – négy fokozatot különít el (PDGFR $\beta$ -0, -1, -2, -3).

A PDGFR csontvelői expressziós mintázatának meghatározása során a PDGFR $\beta$  immunhisztokémiai vizsgálat mellett PDGFR $\alpha$  immunhisztokémiai vizsgálat, valamint nestin, CD34 illetve SMA jelöléseket is tartalmazó kettős immunhisztokémiai vizsgálatok is készültek.

### PDGFR és kettős immunhisztokémiai festések menete

Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a mintákat peroxidázgátló reagensben inkubáltuk. Az antigén feltárást követően a metszeteket az anti-PDGFR $\beta$ , illetve az anti-PDGFR $\alpha$  primer monoklonális antitestekkel inkubáltuk. Az antitest-antigén kötődés detektálásához DAB oldatot használtunk, melyet hematoxylin magfestés követett.

Az immunhisztokémiai festések intenzitásának és eloszlásának értékelése, valamint a dokumentációhoz felvételek készítése fénymikroszkóppal és a hozzá csatlakozó digitális kamerával történt.

Kettős immunhisztokémiai festéseket az En Vision FLEX/HRP rendszerrel végeztük szekvenciálisan. Miután az első primer antitest kötődését az EnVision™ FLEX/HRP oldattal megállítottuk, a második elsődleges antitestet is hozzáadtuk a mintához. A kettős immunhisztokémiai vizsgálatok az alábbi primer antitestek kombinációival készültek: Anti-PDGFR $\alpha$ , anti-PDGFR $\beta$ , anti-SMA, anti-CD34 és anti-nestin. A DAB chromogén mellett a második színreakcióhoz VIP chromogén volt használatos. A kettős

immunhisztokémiai vizsgálatok során metil-zöld magfestést alkalmaztunk.

### 3.5 *Képalkotás és digitális képfeldolgozás a PDGFR $\beta$ expresszió mértékének objektív megítéléséhez*

A PDGFR $\beta$  IHC festett metszetek digitalizálására a Panoramic metszet szkennert (3DHitech, Budapest, Magyarország) használatával került sor, melyhez egy multicolor digitális kamera tartozik (Stingray F146C IRF Medical, Allied Vision Technologies, Stadroda, Germany). A digitalizált metszeteket 768x768 nagyságú csempékre osztottuk, melyeket a további elemzéshez használtunk. A PDGFR $\beta$  expresszió mértékének objektív megítélését szolgáló algoritmus kifejlesztéséhez 42 digitalizált crista biopsziás mintából összesen 1437 digitális kép részletet, azaz csempét nyertünk.

### 3.6 *Statisztikai feldolgozás*

A statisztikai feldolgozás és a diagramok elkészítése a GraphPad Prism 5.03 és a Microsoft Excel 2007 szoftver használatával történtek. A szemi-quantitatív értékelésből származó diszkontinuos eredményeket tartalmazó vizsgálatok esetén nem-paraméteres statisztikai próbákat használtunk úgy, mint Spearman korrelációs és Wilcoxon párosított próbák. Az eredményeket szignifikánsnak tartottuk, amennyiben a p érték <0,05 volt.

## 4 EREDMÉNYEK

### 4.1 *A PDGFR expressziós mintázat normál csontvelői mintákon*

A PDGFR $\alpha$  és  $\beta$  receptorok expressziós mintázatának meghatározása reticulín szaporulatot nem mutató crista biopsziás mintákon történt. A két tirozín kináz receptor eltérő mintázatot mutatott.

A stroma sejteken belül PDGFR $\alpha$  expresszió volt megfigyelhető az endothel sejteken illetve a csont trabeculákat övező endosteális sejtrétegen. PDGFR $\beta$  expresszió volt megfigyelhető perisinusoidalisan valamint pericapillarisan, azaz a pericytáknak megfelelően, illetve PDGFR $\beta$  pozitívnak bizonyultak az erek adventitialis rétegét képező sejtek. A zsírsejteken nem lehetett PDGFR expressziót azonosítani.

A kettős immunhisztokémiai vizsgálatokkal az endosteális rétegben PDGFR $\alpha/\beta$  ko-expresszió volt jelen. A nagyobb erek esetében a PDGFR $\beta$  pozitív adventitialis réteg negatív volt PDGFR $\alpha$ , SMA, CD34 reakciókkal. Ugyanakkor a perisinusoidális/pericapillaris pericyta sejtek a PDGFR $\beta$  expresszió mellett SMA pozitivitást is mutattak, míg a PDGFR $\alpha$  és a CD34 reakciókkal az általuk övezett endothel réteg mutatott pozitivitást.

Az endostealis és perivascularis stroma sejteken túl az interstitialis állományban nem vagy minimális mennyiségben lehetett PDGFR $\beta$  pozitív reticularis sejteket azonosítani.

#### 4.2 *A PDGFR expresszió mintázata myelofibrosisban*

Rostszaporulatot mutató crista biopsziás mintákban a PDGFR $\beta$  expresszió fokozódása volt megfigyelhető, azonban a PDGFR $\alpha$  expresszió változása ezt nem követte. Fokozott PDGFR $\beta$  expresszió, a myelofibrosishoz hasonlóan, számos kórképben megjelent. Tanulmányaink során leginkább myeloproliferatív neoplasiákra, illetve myelodysplasiás szindrómára fókuszáltunk, azonban stroma aktiváció volt megfigyelhető egyéb lymphoid és myeloid neoplasiákban, szolid tumor metasztázisban is.

#### 4.3 *A PDGFR $\beta$ score és az MF grádus közötti kapcsolat*

A PDGFR $\beta$  expressziót mutató sejtek mennyisége valamint a myelofibrosis grádus közötti összefüggés meghatározása céljából egy szemi-kvantitatív score rendszert dolgoztunk ki, mely az MF grádushoz hasonlóan négy fokozattal rendelkezik (PDGFR $\beta$  0-3).

A PDGFR $\beta$  score és az MF grádus között erős korreláció volt megfigyelhető 60 eset vizsgálata alapján (Spearman  $r = 0,83$ ). A nem fibrotikus kontroll csoportban nem volt szignifikáns különbség a két érték között (MF grádus átlaga 0,0 (SD=0,0) vs. PDGFR $\beta$  score átlaga 0,15 (SD=0,38);  $p=0,35$ ;  $n=13$ ). Az MF grádus a kontroll csoportban

definíció szerint MF-0 volt, a PDGFR $\beta$  score ebben a csoportban PDGFR $\beta$ -0 vagy PDGFR $\beta$ -1 volt. A kontroll csoportban ennél nagyobb stroma sejt proliferáció nem volt megfigyelhető.

A pathológiás eseteket tartalmazó csoportban (n=47) 26 esetben megegyezett az MF grádus és a PDGFR $\beta$  score, azonban 21 esetben a PDGFR $\beta$  score magasabbnak bizonyult. A pathológiás mintákban (n=47) a PDGFR $\beta$  score szignifikánsan magasabb volt, mint az MF grádus (átlag 1,21 (SD=0,98) vs. átlag 1,66 SD=0,84); p<0,0001).

A pre-fibroticus, azonban sejtes aktivációt mutató eseteknél felmerül a fokozott PDGFR $\beta$  expresszió prediktív szerepe, azonban ezen esetekből követéses minták nem álltak rendelkezésre.

#### *4.4 A PDGFR $\beta$ expresszió myelofibrosis progresszióra gyakorolt prediktív értéke*

##### 4.4.1 A PDGFR $\beta$ expresszió és az MF grádus közötti kapcsolat

Az aktivált stromasejteket reprezentáló PDGFR $\beta$  expresszió valamint a rotszaporulatot jellemző MF grádus között szoros korreláció volt azonosítható a 193, követéses esetből származó crista biopsziás minta kiértékelése során, Spearman  $r=0,83$ ;  $p<0,0001$  (13. Ábra). A PMF alcsoportba tartozó 126 mintát külön megvizsgálva hasonló összefüggés volt megfigyelhető, Spearman  $r=0,86$ ;  $p<0,0001$ . A diagnózis időpontjában a 84 esetből 14 volt pre-fibroticus MF-0 grádust mutatva, míg 30 eset MF-1, 21 eset MF-2 és 19 eset MF-3 grádust mutatott.

Az MF grádus tekintetében az eseteket két csoportra osztottuk. A progresszív csoportba kerültek azok az esetek, ahol az MF grádus emelkedett a kiindulási értékhez képest (n=34), a nem-progresszív csoportba pedig azok az esetek kerültek, amelyek nem mutattak változást, vagy regressziót mutattak (n=50). A progresszió

valószínűségét vizsgáltuk azokban az esetekben ahol a PDGFR $\beta$  expresszió magasabb volt az MF grádushoz viszonyítva (n=28), ahol egyenlő volt azzal (n=52), valamint ahol alacsonyabb volt annál (n=4). Log-rank analízis elvégzésével a különböző alcsoportok között nem volt szignifikáns eltérés az MF progresszió tekintetében (p=0,3028). Azoknál az eseteknél, ahol az MF grádus a diagnózis időpontjában a legsúlyosabb mértéket mutatta (MF-3, n=19), további progresszió nem volt várható. Így a statisztikai elemzést ezek kizárását követően megismételtük, amely hasonló eredményt mutatott (p=0,4547).

Feltételezhető, hogy a rosttermelő sejtek aktivációja és a rostsaporulat megjelenése gyorsan követik egymást, ezért a fenti vizsgálatokat azokban az esetekben is elvégeztük, melyek rövid ( $\leq 12$  hónap) követési idővel rendelkeztek (n=37). Log-rank analízis elvégzésével a különböző alcsoportok között nem volt szignifikáns eltérés az MF progresszió tekintetében (p=0,2084). Az MF-3 grádussal rendelkező esetek kizárása után készült elemzés hasonló eredményt mutatott (p=0,7398).

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

Az összes esetre vonatkoztatva MF-0 és MF-2 grádus között (n=65) az MF grádusnál magasabb PDGFR $\beta$  expresszió mindössze 43%-os szenzitivitással és 46%-os specificitással jelezte előre a myelofibrosis progresszió megjelenését. Rövid követési időt vizsgálva ( $\leq 12$  hónap) ugyanezen MF grádusokban (n=26) a szenzitivitás 82% volt, míg a specificitás 53%-nak bizonyult. A pre-fibrotikus eseteket



vizsgálva (n=14) a szenzitivitás elérte a 90%-ot, míg a specificitás 75% volt.

#### 4.4.2 A fokozott PDGFR $\beta$ expresszió és az MF progresszió kapcsolata a PMF alcsoportban

Mivel az 55 esetből álló PMF alcsoport bizonyult a legnagyobb betegcsoportnak a vizsgálatokat ezen beteganyagra fókuszálva megismételtük.

A progresszió valószínűségét vizsgáltuk azokban az esetekben ahol a PDGFR $\beta$  expresszió magasabb volt az MF grádushoz viszonyítva (n=14), ahol egyenlő volt azzal (n=39), valamint ahol alacsonyabb volt annál (n=2). A különböző alcsoportok között nem volt szignifikáns eltérés az MF progresszió tekintetében (p=0,3905). A rövid követési idővel rendelkező eseteket vizsgálva a magasabb (n=7), valamint egyenlő (n=13) PDGFR $\beta$  expressziót mutató alcsoportok között sem volt szignifikáns különbség az MF progresszió tekintetében (p=0,7002).

A PMF alcsoportban az MF grádusnál magasabb PDGFR $\beta$  score az MF progressziót 40%-os szenzitivitással és 53%-os specificitással jelezte az MF-3 grádust mutató esetek kizárását követően (n=37). A rövid követési idővel rendelkező eseteket vizsgálva (<12 hónap) a szenzitivitás 83% volt, azonban a specificitás továbbra is alacsony maradt, 44% volt (n=15).

#### 4.5 PDGFR $\beta$ expresszió mértékének objektív meghatározása digitális képanalízis segítségével

A képfeldolgozás során az ún. hue érték és szaturáció alapján két réteg elkülönítésére kerül sor. A barna réteg az immunpozitív areákat foglalja magában, míg valamennyi immunnegatív, de hematoxilinnel festődést mutató terület a lila rétegbe kerül. A háttérkorrekciót követően nyert letisztított barna rétegből nyert immunpozitív, barna objektumok összességét barna komponensnek neveztük (Bc), míg a tisztított immunnegatív, lila réteg a lila komponens (Vc) elnevezést kapta. Az intertrabecularis vérképző állomány tehát a korrekciók elvégzése után az immunnegatív (Vc) és az immunpozitív (Bc) komponenseket tartalmazta, melyek összegét hasznos területnek neveztük el (ROI: region of interest).

A hasznos területből (ROI) és barna komponensből (Bc) az alábbi paraméterek kerültek leírásra. A barna objektumok száma (number of objects): az intertrabecularis barna (immunpozitív) objektumok számának összege, amely megfelel a PDGFR $\beta$  pozitív sejtek és sejtcsoportok számának. Az összesített terület (SumArea): a barna objektumok területeinek összege (pixelek száma). Az összesített kerület (SumPerimeter): a barna objektumok kerületeinek összege. Az összesített vázhossz (SumSkeleton): a barna objektumok vázhosszainak összege. További paraméter a súlyozott kerület (wPerimeter): ahol a súlyozás az objektum vázához tartozó kereszteződések és végpontok számával történik. Minden csempén, illetve az egyes metszeteken is meghatároztuk a Top50 paramétereket úgy, mint Top50Area, Top50Perimeter, Top50Skeleton. Ahhoz, hogy a barna objektumok méretének és komplexitásának értékelésekor a minta cellularitását is figyelembe vegyünk, a paramétereket normalizáltuk a hasznos területtel (/ROI).

Összességében 13 paramétert definiáltunk, melyek a következők voltak: SumArea, SumPerimeter, SumSkeleton, Number of objects, SumArea/ROI, SumPerimeter/ROI, SumSkeleton/ROI, Number of

objects/ROI, Top50Area, Top50Perimeter, Top50Skeleton, Number of objects/Bc, wPerimeter/ROI.

#### *4.6 A PDGFR $\beta$ expresszió mértékét tükröző numerikus paraméterek és az MF grádus kapcsolata*

##### 4.6.1 A PDGFR $\beta$ expresszió azonosításának validálása

A 13 paraméterből nyolc erős korrelációt mutatott mind az MF grádussal, mind pedig a PDGFR $\beta$  score-ral ( $>0,75$ ). A továbbiakban ezen nyolc paraméter részletes vizsgálatára került sor. A módszer kidolgozásához használt 42 crista biopsziás mintán túl az elfogadott beállításokkal méréseinket és számításainkat 37 további crista biopsziás mintán ismételtük meg validálás céljából. A kiválasztott nyolc paraméter továbbra is szignifikáns korrelációt mutatott mind az MF grádussal (Spearman  $r$ : 0,72-0,81), mind pedig a PDGFR $\beta$  score-ral (Spearman  $r$ : 0,70-0,85).

##### 4.6.2 A digitális képfeldolgozáson alapuló, PDGFR $\beta$ expresszióhoz kapcsolódó paraméterek és az MF grádus kapcsolata

Nem volt szignifikáns különbség egyetlen paraméter tekintetében sem az MF-0 kontroll és az MF-0 pathológiás esetek között. Ugyanakkor MF-0 és MF-3 között fokozatos emelkedés volt látható az értékekben. Az MF-0 és MF-1 esetek között mind a nyolc kiválasztott paraméter szignifikáns különbséget mutatott (a  $p$ -érték 0,012 és 0,047 között változott). Az MF-0 és MF-2 valamint az MF-0 és MF-3 alcsoportok között szintén szignifikáns különbség volt azonosítható, a  $p$ -érték  $<0,0001$  volt. Szintén mind a nyolc paraméter

szignifikáns különbséget jelzett az enyhe (MF-1) és közepes fokú (MF-2) fibrosis között. A közepes (MF-2) és a súlyos (MF-3) fokú rotszaporulat között ugyanakkor egyik paraméter esetében sem volt látható szignifikáns különbség, a p-érték 0,2914 és 0,9957 között mozgott. ROC-analízis hasonló eredményt mutatott a különböző MF grádussal járó esetek elkülönítésében.

#### 4.6.3 A digitális képanalízis használata követéses esetek vizsgálatában

A mikroszkóppal meghatározott MF grádus egy szemi-quantitatív érték, amely az egész crista biopsziás minta áttekintését követően egyetlen diszkontinuous számértékben fejezi ki az elváltozás mértékét. A mintán belül azonban igen nagy heterogenitás figyelhető meg. A rotszaporulat, azaz az MF grádus mellett a stroma sejt szaporulat, azaz a PDGFR $\beta$  score is hasonló heterogenitást mutat. Ez a heterogenitás jól érzékelhető a PDGFR $\beta$  immunhisztokémiai vizsgálat digitális képanalízise során.

A mikroszkópos értékelés során nem lehetséges ezen heterogenitás érzékeltetése, finomabb különbségek kimutatása, így a szemi-quantitatív grádus rendszer a követéses vizsgálatok elemzése során korlátokkal rendelkezik. A tanulmány során követéses esetek objektív tanulmányozására került sor, ahol válogatott paraméterek használatával szignifikáns különbség volt detektálható a heterogén stroma aktivációt mutató minták között.

## 5 MEGBESZÉLÉS

Myelofibrosis során stroma aktiváció figyelhető meg a csontvelőben, amely reticulin és kollagén rostszaporulathoz vezet. PMF-ben a rostszaporulat negatív prognosztikai tényező, a jelenleg is folyó klinikai tanulmányokban már szerepel a rostszaporulat mértékének meghatározása a diagnózis időpontjában, illetve a kezelés eredményességének tesztelésékor. MDS-ben szintén bizonyították a súlyos rostszaporulat negatív prognosztikai szerepét, azonban a rostszaporulat mértékének szemi-quantitatív meghatározása jelenleg nem része a prognózisbecslő protokolloknak.

A myelofibrosis kimutatására használt „gold standard” eljárás jelenleg a Gömöri-féle ezüst impregnáció, amely mind a reticulin, mind pedig a kollagén szaporulat feltüntetésére alkalmas. A rostozat mennyiségi meghatározása pedig egy szemi-quantitatív, négy fokozatú (0-3) grádus rendszer segítségével történik.

Az MF-grádus jól jelzi a csontvelőben található rostozat mennyiségét, azonban nem adnak információt a stroma aktiváció sejtes komponenséről. Számos fibrotikus kórképben bizonyították már a

stroma sejtek proliferációját a kóros szövetben, valamint leírták bizonyos növekedési faktorok szerepét is. Ezen növekedési faktorok közül kiemelendő a TGF- $\beta$ , valamint a PDGF AA és PDGF BB növekedési faktorok. A PDGF ligandok receptorja a PDGFR, melynek két altípusa ismert, a PDGFR $\alpha$  és PDGFR $\beta$ . A PDGF receptorok a tirozin-kináz receptor családba tartoznak, így aktivitásuk tirozin kináz gátlókkal blokkolható.

A PDGFR-ok fibrotikus kórképekben betöltött szerepének ismerete a tirozin kináz gátlók fibrotikus kórképekben való teszteléséhez vezetett. Számos *in vitro* kísérlet alátámasztotta, a tirozin kináz gátlók proliferációt gátló hatását fibroblastokban. Állatmodelleken a tirozin kináz gátlók kórlefolyásra gyakorolt pozitív hatását írták le tüdő fibrosisban, máj cirrhosisban, nephrosclerosisban, azonban klinikai tanulmányok egyelőre ellentmondásosak, vagy még nem készültek el.

Myelofibrosisban is ismeretes a növekedési faktorok termelésének fokozódása, azonban a stroma sejtek szaporulatának kimutatására ezidáig nem került sor. A tirozin-kináz receptorok gátlása myelofibrosis kezelésében is egy potenciális terápiás célpont, azonban ezt csupán közvetett eredmények támogatják.

A doktori munka egyik célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljuk a normál és fibrotikus csontvelői stroma sejtek PDGFR $\alpha$  és PDGFR $\beta$  expresszióját, illetve meghatározzuk a PDGFR segítségével kimutatható stroma sejtek száma és a rostsaporulat mértéke közötti korrelációt.

A normál csontvelői mintákban PDGFR $\alpha$  expresszió az endothel sejteken, az endostealis rétegben, illetve az interstitialis fibroblastokon elszórtan volt megfigyelhető. PDGFR $\beta$  expresszió a pericapillaris és perisinusoidalis pericytákon, a nagyobb erek adventitialis rétegében, az endostealis rétegben illetve az interstitialis fibroblastokon volt megfigyelhető.

A fibrosissal járó minták vizsgálata során a PDGFR $\beta$  expresszió fokozódása volt megfigyelhető.

Ahhoz, hogy a rosttermelő fibroblastok mennyiségét tükröző PDGFR $\beta$  expresszió, és a felszaporodott rostozat mennyiségét tükröző MF grádus közötti összefüggést pontosabban megvizsgáljuk, létrehoztunk egy, az MF grádus mintáját követő, négy-fokozatú, szemikvantitatív grádus rendszert. 60 eset alapján erős korreláció volt megfigyelhető az MF grádus és a PDGFR $\beta$  score között (Spearman  $r = 0,83$ ). Vizsgálatunkban nem volt olyan eset, amelyben a rostsziporulat a stroma sejtek számának emelkedése nélkül jelent volna meg. A pathológiás eseteket tartalmazó csoportban ( $n=47$ ) 21 esetben a PDGFR $\beta$  score magasabbnak bizonyult az MF grádusnál.

Mivel a stroma sejtes proliferáció hypothesisünk alapján megelőzi a rosttermelés beindulását, a doktori munka során megvizsgáltuk a PDGFR $\beta$  expresszió myelofibrosis progresszióra vonatkozó prediktív értékét myeloproliferatív neoplasiákban, ahol a rostsziporulat megjelenése bizonyítottan prognosztikai szereppel bír, így annak korai kimutatása terápiás szempontból is fontos lehet.

Vizsgálataink során 84 myeloproliferatív neoplasiában szenvedő betegől összesen 193 követéses csontvelő biopsziás minta retrospektív kiértékelésére került sor. A PDGFR $\beta$  score az MF grádushoz viszonyítva magasabb, alacsonyabb, vagy azzal megegyező értéket mutathatott. A fibrosis alakulása alapján progresszív és nem-progresszív eseteket különítettünk el.

Az MF grádusnál magasabb PDGFR $\beta$  score-t mutató esetekben a myelofibrosis progresszió valószínűsége nem tért el szignifikánsan az egyéb alcsoportoktól. A rövid követési idővel rendelkező, illetve a pre-fibroticus esetek vizsgálata hasonló eredményt mutatott. Az MF grádusnál magasabb PDGFR $\beta$  score a myelofibrosis progresszióját alacsony szenzitivitással és specificitással határozta meg az összes esetet vizsgálva. A szenzitivitás már magasabbnak bizonyult (82%)

akkor, amikor a rövid követési idővel rendelkező esetekre fókuszáltunk. A legmagasabb szenzitivitás (90%) és specificitás (75%) a pre-fibroticus esetekkel járó alcsoportban volt megfigyelhető.

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

Mind a rostszaporulatot tükröző MF grádus, mind pedig a stroma aktiváció sejtes komponensét jelző PDGFR $\beta$  score, szubjektív vizsgálaton alapuló, szemi-kvantitatív rendszerek. Ismeretes ugyanakkor, hogy a stroma aktiváció a csontvelőben heterogén megjelenést mutat. Az újabb, anti-fibrotikus terápiák eredményességének megítéléséhez szükség lehet objektív, és pontosabb vizsgálómódszerekre. A doktori munka során kidolgozásra került egy digitális képfeldolgozáson alapuló algoritmus, amely a stroma aktiváció objektív megítélését, és így különböző minták finom összevetését teszi lehetővé.

A digitális képfeldolgozáson alapuló algoritmus DAB kromogén reakciót használó immunhisztokémiai módszerrel jelölt crista biopsziás minták automatizált feldolgozására alkalmas. Az immunpozitív (Bc) és immunnegatív (Vc), valamint a hasznos terület (ROI) azonosítását követően összesen 13 paramétert definiáltunk, melyből nyolc erős korrelációt ( $r > 0,75$ ) mutatott mind az MF grádussal, mind pedig a PDGFR $\beta$  score-ral. Az erős korreláció alapján tovább vizsgált nyolc paraméter a következő volt: SumArea/ROI, SumPerimeter/ROI, SumSkeleton/ROI, Top50Area, Top50Perimeter, Top50Skeleton, Number of objects/Bc, wPerimeter/ROI.

A jelzett paraméterek közül valamennyi szignifikáns különbséget jelzett a nem-fibrotikus (MF-0) valamint az enyhe (MF-1),



közepes (MF-2) és súlyos (MF-3) fibrosist mutató esetek között. Szintén szignifikáns különbség volt látható az enyhe és közepes fibrosist mutató esetek között. A felsorolt paraméterek közül a skeletont és a terület hasonlóan változnak a különböző mértékű stroma aktiváció során, köztük statisztikailag nincs különbség. Figyelembe véve ezt az eredményt, a PDGFR $\beta$  expresszió, illetve a hasonló mintázatot mutató immunfestések (pl. tenascin) digitális képfeldolgozáson alapuló kiértékelésére 5 paraméter kombinációjának használata javasolható, melyek a következők: SumArea/ROI, SumPerimeter/ROI, Top50Area, Top50Perimeter, Number of objects/Bc.

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

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

1. A csontvelői stroma sejtek normál körülmények között eltérő mintázattal mutatnak PDGFR $\alpha$  és PDGFR $\beta$  expressziót, melyek elsősorban az erekhez és a csontgerendákhoz asszociáltnak jelennek meg.
2. Csontvelői rostsaporulattal járó kórképekben fokozott PDGFR $\beta$  expresszió figyelhető meg.
3. Az aktivált stromasejtek számát tükröző PDGFR $\beta$  score rendszer szoros korrelációt mutat a rostsaporulat mértékét tükröző MF grádussal.
4. A fokozott PDGFR $\beta$  expresszió MF progresszióra gyakorolt potenciális prediktív szerepe volt megállapítható pre-fibrotikus, myeloproliferatív neoplasiák esetén, ennek bizonyításához további minták vizsgálata szükséges.

5. Az általunk kifejlesztett, digitális képfeldolgozáson alapuló algoritmus nagy specificitással képes a vérképző állomány és az immunpozitív areák automatizált azonosítására.

6. A digitális képfeldolgozáson alapuló, a PDGFR $\beta$  expressziót mutató stromasejtek által alkotott hálózat méretét és komplexitását tükröző paraméterek erős korrelációt mutatnak a mikroszkópos módszerrel meghatározott grádus értékekkel és megbízhatóan alkalmazhatókkövetéses minták összehasonlító elemzésére.

## 6 ÖSSZEFOGLALÁS

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

A doktori munka célja volt a PDGFR expressziós profiljának meghatározása normál csontvelői állományban, valamint a PDGFR

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

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

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

## 7 TÁMOGATÁSOK

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

befolyásolhatóságuk az alapkutatás szintjén” című pályázat által biztosított forrásból valósul meg.



Iktatószám: DEENKÉTK/180/2014.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

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

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bedekovics, J., Szeghalmy, S., Beke, L., Fazekas, A., Méhes, G.:** Image analysis of platelet derived growth factor receptor-beta (PDGFR $\beta$ ) expression to determine the grade and dynamics of myelofibrosis in bone marrow biopsy samples.  
*Cytom. Part B-Clin. Cytom.* 86 (4), 31 p., 2014.  
IF:2.231 (2012)
2. **Bedekovics, J., Kiss, A., Beke, L., Károlyi, K., Méhes, G.:** Platelet derived growth factor receptor-beta (PDGFR $\beta$ ) expression is limited to activated stromal cells in the bone marrow and shows a strong correlation with the grade of myelofibrosis.  
*Virchows Arch.* 463 (1), 57-65, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-013-1434-0>  
IF:2.076 (2012)

### További Közlemények

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





DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
PUBLIKÁCIÓK



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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 7.223

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

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

Debrecen, 2014.07.11.

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