

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

ÁRAMLÁSI CITOMETRIAI MARKERVIZSGÁLATOK
OPTIMALIZÁLÁSA HEMATOLÓGIAI KÓRKÉPEKBEN

Dr. Kiss Flóra

Témavezetők:

Dr. Kappelmayer János

egyetemi docens

Dr. Hevessy Zsuzsanna

egyetemi adjunktus

DEBRECENI EGYETEM

ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM

KLINIKAI BIODÉMIKAI ÉS MOLEKULÁRIS PATOLÓGIAI INTÉZET

Debrecen, 2007.

BEVEZETÉS

A laboratóriumi analízis nélkülözhetetlen a hematológiai kórképek kórismézése, valamint a betegek monitorozása során. Ezen betegségek gyógyulási esélyének javításában, a kezelés sikerességének növelésében perdöntő szerepet játszik a korrekt diagnózis megállapítása, a kóros sejtek típusának pontos meghatározása, amely a megfelelő terápiás protokoll megválasztásához is szükséges. A morfológiai és citokémiai vizsgálatokon túlmenően napjainkban elengedhetetlen a monoklonális antitestekkel végzett immunfenotipizálás áramlási citometriával, mely lehetővé teszi a sejtvonal-specifitás meghatározását, valamint a sejtek érettségi fokának, a sejtpopuláció heterogenitásának és a normál sejtektől való fenotípusbeli eltérésének megítélését. A kórismzésben betöltött szerepén túl a patológiás sejtek immunológiai és genetikai tulajdonságainak ismeretében válik lehetővé a remisszió azonosítása, valamint a minimális reziduális betegség (MRD) detektálása és a relapszusok korai felismerése. Ehhez a neoplasztikus sejtek minél sokoldalúbb karakterizálása, úgynevezett multiparametrikus analízise szükséges, amely során egyszerre több adatot nyerhetünk a sejtek strukturális és funkcionális jellemzőiről.

Téziseimben az elmúlt 6 év során a Debreceni Egyetemen végzett kísérletes munkáimon keresztül bemutatom a celluláris markerek analízisének fontosságát elsősorban a hematológiai kórképek diagnosztikájában, a betegség nyomon követésének lehetőségét is érintve, döntően áramlási citometriai technikákat alkalmazva. A fent említett eljárás mellett állításaim igazolására számos egyéb sejtbiológiai, mikroszkópos és fehérje biokémiai módszert is alkalmaztam. A munkában bemutatásra kerülő eredmények új adatokat szolgáltatnak, amelyek a kórfolyamat mélyebb megismerése mellett a mindennapi diagnosztikus tevékenységben nyújthatnak segítséget, és a betegek követése során is hasznosíthatók.

Sejtfelszíni és intracelluláris fehérjék

A sejthártya fő szerkezeti és funkcionális részei a lipid kettős réteg és az abban elhelyezkedő változatos fehérjék amelyek jól strukturált, dinamikus rendszert alkotnak. A membrán antigének az úgynevezett „cluster of differentiation” (CD) beosztás alapján kerültek a mindennapi gyakorlat számára is jól átlátható, rendszerezett formába. A hemopoetikus sejtek antigénjeinek döntő többsége intracellulárisan található. A kóros sejtvonal legmegbízhatóbb meghatározására az intracitoplazmatikus markerek szolgálnak, amelyek általában már a felszíni markerek megjelenése előtt kimutathatóak.

Celluláris fehérjék vizsgálata áramlási citometriával

Az antitestekkel való jelölés történhet direkt (egylépéses) vagy indirekt (kétlépéses) módszerrel. A mérések eredményeit megjeleníthetjük úgynevezett felhőképek („dot plot”) vagy hisztogramok segítségével. Az intracelluláris markerek meghatározásához áramlási citometriai analízis esetén a sejtek permeabilizálása szükséges, amely befolyásolhatja a vizsgálat szenzitivitását és specificitását is. Ha a protein jelenléténél lényegesebb annak aktivitása funkcionális teszt alkalmazása célszerű. Az áramlási citometria kvantitatív meghatározások elvégzésére is alkalmas módszer. Egzakt antigénszám megadása is lehetséges sejtenként kalibrációs gyöngyök segítségével. Paroxizmális nokturnális hemoglobinuriában (PNH) nem-hemolizáló betegeknél jelenlévő kis PNH klónok is kimutathatók és megadható a III-as típusú (komplett deficiencia), II-es típusú (részleges deficiencia) és I-es típusú (normál) sejtek aránya az analizált mintában.

Malígnus hematológiai kórképek immunfenotípus vizsgálata áramlási citometriával

A leukémia különböző csoportjainak többes jelöléssel történő immunfenotípus vizsgálata a diagnosztikai fejlődésben kulcsfontosságú volt, mivel a korábban kizárólagosan alkalmazott morfológiai és citokémiai vizsgálatok értékelése függött a vizsgáló gyakorlatától és gyakran szubjektív volt. Ezen kívül a morfológiailag vizsgálható sejtszám legfeljebb néhány száz

lehet, míg az áramlási citometriai vizsgálatok során a de novo esetek vizsgálatakor rutinszerűen 10-50 000 sejt analízise történik, de MRD keresésekor akár 0,5-1 millió sejt vizsgálatára is sor kerülhet.

Célom volt ezen sejt felszíni és intracelluláris markerek vizsgálatának optimalizálása, valamint az áramlási citometriai vizsgálat objektivitásának növelése az eredmények kvantitatív megjelenítése révén. Ezeket a módszereket leukémiában, klinikai mintákon is alkalmaztam, diagnosztikailag felhasználható vagy prognosztikai szempontból jelentős új markerek keresése céljából.

METODIKÁK

A kísérletek során felhasznált vegyszerek:

Anti-CD3 PerCP, anti-CD5 PE, anti-CD14 FITC, anti-CD19 PerCP, anti-CD19 APC, anti-CD20 FITC, anti-CD33 PE, anti-CD34 PE, anti-CD34 PerCP, anti-CD41 PE, anti-CD42a FITC, anti-CD45 FITC, anti-CD45 PerCP, Calibrite, FACS Lysing Solution, Quantibrite (Becton Dickinson, San Jose, CA), anti-CD5 PE-Cy5 (Immunotech, Marseille, France), anti-CD10 PE, anti-CD13 FITC, anti-CD56 PE-Cy5, anti-CD79 α PE, anti-IgM PE, anti-MPO PE, anti-TdT FITC, anti-egér FITC, Intrastain kit (Dako, Glostrup, Denmark), anti-CD55 PE, anti-CD59 PE (Pharmingen, San Diego, CA), anti-Zap-70 (clone 2F.3) (Upstate, Lake Placid, NY), anti-FXIIIa nyúl szérum (CenteonPharma, ZLB Behring, Marburg, Germany), BSA, Ficoll Histopaque 1007, FITC-jelölő kit, Glicerol, HBSS, HEPES, Paraformaldehid, Propidium jodid, Verapamil (Sigma, St. Louis, MO), Calcein-AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), ECL Kit (Amersham, Buckinghamshire, UK), EDTA, NaCl (Spektrum-3D, Debrecen, Hungary), Fix&Perm kit (Caltag, Burlingame, USA), Heparibene (Na-heparin) (Ratiopharm, Merckle, Germany), KCl (Scharlau Chemie, Barcelona, Spain), MOWIOL 4-88

(Hoechst Pharmaceuticals, Frankfurt, Germany), SDS, TRIS (Bio-Rad, Hercules, CA), Triton-X 100 (Reanal, Budapest, Hungary), Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Humán minták, sejtvonalak:

A vizsgálatok során az alábbi humán eredetű minták kerültek alkalmazásra: rutin diagnosztikai vizsgálatokra a laboratóriumba érkezett heparinnal vagy EDTA-val alvadásgátolt csontvelő aspirátum, EDTA-val antikoagulált teljes vér (DE OEC-KEB 1034-2001), valamint humán epidermoid karcinóma sejtvonalak, KBV-1 (human MDR1+ sejtvonalak) és KB3-1 (human MDR1- sejtvonal).

Módszerek

1. Antigének jelölése direkt és indirekt módszerrel

A leukémia immunfenotípus vizsgálatokhoz mind a de novo, mind reziduális betegség keresésére szobahőn tárolt 24 óránál nem régebbi, alvadásgátolt csontvelői vagy perifériás vérmintát használtam. A de novo eseteknél a mintavétel a betegség felfedezésekor kezelés megkezdése előtt rutin klinikai eljárásokkal történt. A direkt jelöléshez a teljes vér és csontvelői mintákat megfelelő izotípus kontroll mellett, telítő koncentrációban alkalmazott FITC-vel, PE-vel, PerCP-vel, Pe-Cy5-val, APC-vel direkt konjugált monoklonális antitestekkel 20 percig szobahőn sötétben inkubáltam. Ezután a vörösvérsejteket (vvt) FacsLysing oldattal 10 percig lizáltam, majd a leukocitákat centrifugálással üleptettem. Ezt követően a mintát 2x mostam PBS-ben, majd 1%-os paraformaldehidben (PFA) fixáltam és 4°C-on tárolva a jelölt sejteket, 24 órán belül elvégeztem a mérést. Direkt intracitoplazmatikus jelölés esetén szigorúan követtem az alkalmazott kit gyártói utasításait. A FXIII-A FITC-vel jelölt monoklonális antitestet 2µg/mL végkoncentrációban alkalmaztam. Direkt jelölő eljárások mellett, indirekt intracitoplazmatikus jelölést alkalmaztam B-CLL-es

beteg mintáiban a Zap-70 kifejeződés meghatározására 3- illetve 4-színű jelöléssel. Az indirekt intracitoplazmatikus jelölés során a mintavételt követő 24 órán belül $1,5 \times 10^5$ sejthez 100 μL fixálót (Caltag, Fix&Perm kit) adtam (15 perc, 25°C), majd a sejteket PBS-ben mostam. Ezután 1,5 μg jelöletlen antitesttel (anti-Zap-70, Upstate, Lake Placid, NY, klón 2F3.2 egér IgG2a) inkubáltam a mintát a permeabilizáló reagens (Caltag Fix&Perm kit) jelenlétében, amely a vvt-k lízisét is biztosította. Újabb mosást (PBS) követően 20percig 50x hígítású, kecskében termeltetett anti-egér-FITC antitesttel inkubáltam. Ezt követte a korábban már részletezett sejtfelszíni direkt jelölés, majd ugyancsak 1%-os PFA-ban való fixálás és tárolás 4°C -on a mérés elvégzéséig. A mintákat Becton Dickinson FacScan és FacsCalibur áramlási citométerrel mértem. Az analízis CellQuest vagy Paint A Gate program segítségével történt. A mérések során az adott kísérlettől függően 10 000 (de novo leukémia immunfenotipizálás), vagy 100 000 sejt adatait (Zap-70 analízis, MRD vizsgálat) gyűjtöttem be „list mode file”-okban. A 3-as, illetve 4-es jelölés előtt a készülékek beállításához és a kalibrációhoz Calibrite gyöngyök (bead) használata mellett a standard előírások szerinti protokollokat alkalmaztam. A blasztok azonosítása a normál sejtekhez viszonyított alacsonyabb CD45/SSC szignálok alapján, a B-CLL sejtek detektálása az FSC/SSC alapján felállított limfocita kapuból a patológiás CD5/CD20 koexpresszió alapján történt. Az eredményeket az adott markerre pozitív sejtek százalékos arányában, az átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) formájában, vagy az antitest kötő kapacitás (ABC) feltüntetésével, illetve abszolút sejtszám/ μL (MRD vizsgálatok) egységben adtam meg.

2. Antigének kvantitatív meghatározása

A kvantitatív áramlási citometriai méréseket kalibráló gyöngyök segítségével végeztem. A Quantibrite kalibráló gyöngyökhöz gyárilag adott számú PE fluorofórt konjugáltak. Ez alapján a méréskor 4 eltérő fluoreszcencia intenzitású csúcsot kaptam. Az átlagos fluoreszcencia intenzitást (MFI) és a gyöngyöz kötött ismert fluorofor (PE) számot log-log

skálán ábrázolva kalibrációs egyenest kapunk. A PE a jelölő antitesttel 1:1 arányban kapcsolódik, amely szintén 1:1 sztöchiometriai arányban kötődik az antigénhez, így adott FL-2 erősítésnél, az antigén kifejeződés mértéke az antitest kötő kapacitás (ABC) alapján megadható. Valamennyi antitest monovalens volt.

3. Kalcein esszé (funkcionális teszt)

A mononukleáris sejteket Ficoll (Ficoll Histopaque 1007, Sigma, St. Louis, MO) grádiensen szeparáltam standard módszer szerint, majd 1 mL Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) oldatban reszuszpendáltam. Ezt követően a sejteket verapamillal (75 μ M) illetve anélkül inkubáltam 37°C-on 5 percig, majd a sejteket kalcein-AM-el telítettem 200 μ M végkoncentrációban (10 perc, 37°C). A reakciót centrifugálással állítottam le, majd a sejtek életképességének vizsgálatára propidium-jodidot (PI) adtam a sejtszuszpenzióhoz (0,01 mg/mL végkoncentráció). A mérést legfeljebb 24 óra 4°C-on történő tárolás után végeztem el Becton Dickinson FACSCalibur illetve FACScan áramlási citométereken 10 000 esemény adatait begyűjtve. A teszt minőségi kontrolljaként KBV-1 és KB3-1 humán epidermoid carcinoma sejtvonalakat használtam, amelyeket korábban vinblastin jelenlétében vagy annak hiányában tenyésztettem. A KBV-1 sejteket (humán MDR1-pozitív sejtvonal) 10%-os főtális bovin szérummal szupplementált DMEM-ben tenyésztettem 0,2 μ g/mL vinblastin jelenlétében 5% széndioxid tartalmú atmoszférát biztosító, párasított termosztátban. A KB3-1 sejteket (humán MDR1-negatív sejtvonal) vinblastin nélkül tenyésztettem.

4. A kalcein teszt és felszíni antigénjelölés kombinációja

A minta előkészítésének menete a Ficoll-os szeparálást követő verapamillal és kalcein-AM-el történő inkubáció lépéséig hasonló a fent leírtakhoz. Ezt követően a sejteket propidium jodid nélkül reszuszpendáltam és mostam HBSS-ben, majd centrifugálást követően a sejteket 50 μ L HBSS-ben vettem fel, melyben 10 μ g/mL végkoncentrációjú PerCP-konjugált antitestekkel

(így CD45-, CD3-, CD19-ellenes), kontrollként megfelelő izotípus antitestekkel inkubáltam 20 percig. A jelölés után a sejteket FacScan áramlási citométeren vizsgáltam.

5. Konfokális mikroszkópia

Körülbelül 10^6 , primer betegmintából származó sejtet centrifugálást követően 100 μ L PBS-ben reszuszpendáltam és citocentrifugában (Wescor, Logan, UT, 1000 rpm, 5 perc) tárgylemezre ülepítettem. A preparátumokat alufóliába csomagolva felhasználásig -20 °C-on tároltam. A citospin készítményeket kiolvastottam és 4%-os PFA-ban fixáltam 10 percig, majd 3x mostam PBS-ben (300g, 5 perc). A FITC-vel konjugált anti-FXIII monoklonális antitesteket 15 μ g/mL koncentrációban vettem fel 1 mg/mL BSA-t tartalmazó PBS-ben, majd 30 percen át 0,1% Triton X-100-ban szobahőn permeabilizáltam a sejteket. Az inkubáció utolsó 5 percében 0,5 μ g/mL végkoncentrációban propidium jodidot adtam az oldathoz. Ezután a készítményeket 3x mostam 1 mg/mL BSA-t és 0,05% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben. Végül a mintákat újra PBS-ben mostuk és 10 μ L Mowiol-al (0,1 M Tris-HCl, pH 8,5, 250 g/L glicerol és 10% Mowiol 4-88) fedtük be. A szuszpendált sejtek jelölése hasonló protokoll szerint történt kivéve, hogy a jelölés során 0,05% Tritont míg a mosáshoz 0,01% Tritont alkalmaztam. Az utolsó üledéket 10 μ L Mowiol-al kevertem össze és tiszta tárgylemezre vittem fel a sejteket. A mikroszkópos analízist Zeiss (Göttingen, Németország) LSM 510 rendszerrel végeztem C-Apochromat 63 \times /1.25 NA vízimmerziós objektívvel. A fluoreszcéint 488 nm-es Argon ion lézerrel, a propidium jodidot 543 nm HeNe lézerrel gerjesztettem és a jeleket 505-550 nm-es sávszűrőn, illetve 560 nm-es long pass filtert használva gyűjtöttem be. A detektáláshoz 1 μ m optikai szeleteket és 512 \times 512 pixel-es képeket készítettem. A pixel idő 6.4 μ s volt. Valamennyi felvétel olyan módon történt, amely a csatornák közötti átszennyezést kiküszöbölte.

6. FXIII-A ELISA vizsgálat

Az XIII-as faktor "A" alegységének sejtlizátumból történő meghatározását az intézetünk munkacsoportja által közölt módszer alapján kis módosítással végeztem. Röviden, a trombocita kontamináció elkerülése érdekében a limfoid sejteket, illetve a mágnes gyöngyökkel CD14 pozitivitás alapján szeparált monocitákat 3x mostam 20 mM EDTA-t tartalmazó PBS-ben (2200g, 4 percig). Majd sejtszámot mértem az ultrahangos szonikálás (4°C, 3x30 másodperc) előtt, hogy pontosan kalkulálható legyen a FXIII-A/sejt tartalom. Ezt követően streptavidinnel fedett ELISA lemezekben együtt inkubáltam biotinált FXIII-A ellenes befogó monoklonális antitestet, a hígított sejtlizátumot valamint egy másik FXIII-A epitóp ellenes peroxidázzal jelölt monoklonális antitestet. Az 1 órás inkubációt követően a lemezeket PBS-sel mostam majd a reakciót előhívtam és kénsavval leállítottam. Az abszorbanciákat minden esetben Labsystem Multiscan microplate leolvasóval olvastam le 450 nm-en.

7. Western-blot (FXIII-A)

A FXIII-A kimutatáshoz az ALL-es, illetve a negatív kontrollként használt B-CLL eredetű csontvelői- illetve perifériás vérminták vvt tartalmát BD FACS lizálóval lizáltam, majd a sejteket 3x mostam 20 mM EDTA-t tartalmazó PBS-ben (2200g, 4 percig). Az utolsó mosást követően a sejteket 100 µL SDS PAGE minta pufferben vettem fel (62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glicerol, 0,1% brómfenol kék, 4,5% merkaptotanol), majd a keveréket 5 percig forraltam. A mintákból minden esetben egyforma sejtszámnak megfelelő lizátumot vittem fel. A mintát 7,5%-os SDS poliakrilamid gélre vittem fel, és 40 mA-en redukáló közegben elektroforetizáltam (BioRad, Hercules, CA), majd Immobilon P membránra (Millipore, Bedford, MA) blottoltam (Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell készülék, Bio-Rad). A nem specifikus kötések blokkolására 1 órán át rázógépen szobahőn 3%-os zselatin tartalmú oldatban (0,5 M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH: 7,5; TBS) inkubáltam a membránt és éjszakára 4°C-on TBS-ben tartottam. Az első antitest FXIII-A ellenes poliklonális nyúl szérum 5000x

hígítása volt 1%-os zselatinos TBS-ben. Majd rázógépen 1 óra inkubációt követően 3x5 percig TTBS-ben mostam a membránt. Második antitestként biotinált anti-nyúl immunglobulin 4000x hígítását használtam. Újabb 30 perc inkubáció következett a rázógépen sötétben, majd mosás TTBS-ben 3x5 percig és ezt követően Vectastain-kittel történt az előhívás. A szubsztrát oldat elektro-kemilumineszcencia (ECL) elve alapján detektálta a sávokat, melyeket röntgenfilmen rögzítettem.

EREDMÉNYEK

A normál sejtek standardként való alkalmazása PNH-ban

2001. január és 2004. december között, munkatársaimmal együtt 80 klinikailag hemolizáló beteg mintáját vizsgáltam PNH irányba, végül 4 esetben lehetett PNH-t kimutatni. Mind a 4 beteg anamnézisében hasi fájdalom, hányás, sötét vizelet és láz szerepelt. A laboratóriumi tesztek nem konjugált hiperbilirubinémiát, emelkedett LDH aktivitást és hemolízist mutattak. A vörösvérsejteket és a leukocitákat direkt immunfluoreszcens jelölést követően az átlagos fluoreszcencia intenzitásuk (MFI) alapján soroltam I-es, II-es, illetve III-as csoportba. A CD55 és CD59 jelölés kapcsán valamennyi sejtípus 10-es MFI érték alatt nevezhető III-as típusúnak. A II-es típusú sejtek esetén az MFI 34 ± 11 volt, I-es típusú sejtek esetén pedig 280 ± 150 . A CD14 marker esetén a III-as típusú sejtek MFI-je 39 ± 36 volt, II-es típusú nem fordult elő, az I-es típusú sejteké pedig 2060 ± 1000 értéket mutatott. Ezen értékek összhangban vannak a CD14 magasabb expressziójával monocitákon. A kvantitatív analízishez használt Quantibrite gyöngyökre felvitt PE molekulák fluoreszcencia intenzitását a sejtek MFI értékeihez viszonyítottam. Valamennyi felhasznált antitest monovalens volt és a PE:mAb arány minden esetben 1 volt, így az antitest kötő kapacitás (ABC) megadható volt. A vvt-k esetében az adott markerre negatív sejtek aránya a granulociták és a monociták mintegy

40%-a volt. A jelenség a PNH-s vvt-k szelektív destrukciójával magyarázható. A PNH-s klón aránya jobban megítélhető a granulociták és a monociták vizsgálatával.

A P-glikoprotein és MDR vizsgálata

A kalcein esszé sejt felszíni markerrel végzett jelöléssel kombinálható. Az MDR aktivitás PE-jelölt antitestekkel együtt vizsgálva problematikus. Ugyanis a kalcein rendkívül intenzíven világít az FL-1 csatornán, ezért az FL-2 csatornán megjelenő fluoreszcencia átvilágítás („spillover”) miatt az itt jelet adó PE-jelölt antitesttel nem alkalmazható. Megfelelő kompenzációval PerCP- vagy PE-Cy5-konjugált antitestekkel az FL3 csatornán (>650 nm) az MDR aktivitás és a felszíni jelölés mégis kombinálható. Ennek során direkt sejt felszíni jelölés történt anti-CD19- és anti-CD3-PE-Cy5 monoklonális antitestekkel az izolált mononukleáris sejtek kalceinnel történt inkubálását követően. Ennek eredményeképpen a különböző sejtek (B-, T-sejtek) MDR aktivitása meghatározható volt. A jelölődést egészséges T- és B-sejteknel 20 esetben az FL1 (kalcein jel)-FL3 (PE-Cy5 jel) „dot plot” ábrák alkalmazásával elemeztem. Azt találtam, hogy a normál limfociták MDR aktivitását tekintve a T-sejteké magasabb volt mint a B-sejteké. A funkcionális teszt kombinációja felszíni jelöléssel azért bírhat jelentőséggel, mivel a különböző laboratóriumok eredményeinek összevetése, az eltérő fluoroforok és az eltérő kompenzáció következtében nem minden esetben lehetséges.

XIII-as faktor kimutatása AML-ben

Munkatársaimmal közösen folytatott vizsgálatok szerint akut monocitás és mielomonocitás leukémiában az FXIII-A a CD14-nél érzékenyebben azonosította a blaszt sejteket. Az M4 és M5 esetekkel ellentétben a krónikus mielomonocitás leukémia (CMML) mintákban a CD14 és az FXIII-A egyforma százalékos pozitivitást adott, mely arra utalt, hogy érettebb sejtek esetén a két reakció azonos populációt jelölt. A mieloblasztos és monoblasztos leukémiákat összehasonlítva az FXIII-A reakció szenzitivitása 100% volt, a specificitása 95% volt. Az FXIII-A expresszió AML M4, M5 és CMML esetén intenzívebb mint a normális perifériás

vér monocitái esetén. A megakariocita sejtvonalat tekintve, AML M7 esetében az FXIII-A jelölődés specifikusabb volt a hagyományosan alkalmazott trombocita/megakariocita markereknél. AML M1-M6 FAB csoportokban, sőt normál mieloid sejteken is gyakran igen jelentős CD42a (GPIX), CD42b (GPIb) és CD41 (GPIIb) jelölődés mutatható ki. Ennek oka az, hogy kalcium-függő módon trombociták vagy trombocita mikropartikulák tapadnak a mieloid sejtekhez. Ez a jelenség nem csupán malignus hematológiai kórképekben fordul elő, leírták extrakorporális keringést és reperfúziót követően a koronáriákban és a perifériás vérben. A vizsgálati minta EDTA-s mosással való előkezelésével ez a fals-pozitív reakció kiküszöbölhető. Ilyenkor a trombocita glikoprotein analízis eredménye az FXIII-A jelölődéssel megegyező eredményt mutat, amelynek eredményeként a valós megakariocita arány adható meg.

XIII-as faktor kimutatása ALL-ben

Az akut limfoblasztos leukémia (ALL) immunfenotípusát tekintve áramlási citometriával igen jól karakterizált csoportokba osztható. Az ALL-ek nagyobb hányada B-sejtes, amely tovább osztható az EGIL (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias) ajánlásai alapján a következő alcsoportokra: pro-B ALL, common ALL (cALL), (late) pre-B ALL és érett-B ALL. A leggyakrabban előforduló típus a cALL. Erre a csoportra a sejtfelszíni CD10 intenzív kifejeződése, „overexpressziója”, valamint ezzel egyidejűleg az intracitoplazmatikus IgM hiánya jellemző. A limfoblasztok B-sejt markereket (CD19, CD22, CD79 α) exprimálnak és gyakran éretlenségi markerekre (CD34, TdT) is pozitívak. A fenti fenotípus jellemzőkön túlmenően a B-sejtes ALL-ek gyakorta mutatnak egyéb aberráns markerexpressziókat (LAIP). Differenciálatlan ALL-ek fenotípus vizsgálata során észleltem először, hogy az ALL-es minták egy részében intracelluláris FXIII-A pozitívitas mutatható ki, hasonlóan a korábban részletezett AML esetekhez. Az FXIII-A jelölődés koexpressziót mutatott a limfoblasztok markereivel (CD79 α , CD19, CD34, CD10, TdT). Négy év alatt 47

de novo B-sejtes ALL esetet - 41 csontvelői és 9 perifériás vérmintát - szisztematikusan vizsgáltam. Azt találtam, hogy az esetek 40%-ban volt detektálható az intracitoplazmatikus FXIII-A pozitívitas. A pozitívitas határértéket a sejtek 30%-ának pozitívitasa esetén definiálva azt az eredményt kaptam, hogy az FXIII-A-pozitív (FXIII-A+) esetekben a jelölődés mértéke 66% volt, míg a FXIII-A-negatív (FXIII-A-) esetekben 6,5%. A pozitív és negatív sejtek a fenotípus alapján jól elkülöníthetők voltak és az FXIII-A jelölődés minden alkalommal a limfoblaszt populációban volt kimutatható. Ezen sejtek általában CD45-dim jelölődést és CD34 pozitívítást mutatattak. Az érett B-sejtek, mint amilyenek B-sejtes CLL-ben detektálhatók, az áramlási citometriai vizsgálat során valamennyi esetben negatívak voltak az FXIII-A jelölődésre. Az AML M4 vagy M5 alcsoportú leukémia sejtekéhez viszonyítva az FXIII-A-pozitív limfoblasztok MFI értéke alacsonyabb volt. A limfoblasztok FXIII-A expressziója váratlan eredmény volt, így az FXIII-A jelenlétét a kóros sejtekben egyéb módszerekkel is verifikáltam. Azért, hogy a vérlemezkékben biztosan megtalálható jelentős mennyiségű FXIII-A ne zavarhasson a mérések során, a limfoblasztokat EDTA-s mosással trombocita mentesítettem. Ezt követően elvégeztem az FXIII-A kimutatását Western-blot technikával. A vizsgálat alátámasztotta az áramlási citometriával nyert eredményeket: a korábban FXIII-A+ esetekben - redukáló körülmények közt - egy 82 kDa protein volt kimutatható. A trombocita-mentesített limfoblasztokat lizálva meghatároztam az intracelluláris FXIII-A tartalmat egy ELISA rendszerben, amely kizárólag az A₂ alegységet detektálja. A vizsgálatok során úgy találtam, hogy a limfoblasztok 3,1 fg/blaszt átlagos mennyiségben tartalmaznak FXIII-A-t, amely ugyan jelentősen kevesebb a monocitákban kimutatott 37 fg/sejt átlagértéktől, de a sejtek térfogatbeli különbségeit figyelembe véve ez a mennyiség nem elhanyagolható. Konfokális lézer szkennig mikroszkópia segítségével különböző síkokban vizsgáltam az FXIII-A elhelyezkedését. A kísérletek során azt találtam, hogy a lokalizáció valamennyi esetben intracitoplazmatikus volt és a korábban - peritoneális

makrofágok esetén már leírt - kondenzált festődést mutatta. Az ALL-es sejtekben megjelenő, több módszerrel igazolt FXIII-A expresszió a leukémiás limfoblasztok jellegzetessége, ugyanis őssejtmobilizáció kapcsán mágneses szeparálással nyert normál CD34+ B-sejt prekursorokban az FXIII-A jelölődés nem volt kimutatható.

Zap-70 analízis optimalizálása B-CLL-ben

A Zap-70 áramlási citometriával kimutatható marker. Detektálására konjugátlan és direkt fluoroforral konjugált többféle antitest klón áll rendelkezésre, amelyek alkalmazásával 3- és 4-színű multikolor áramlási citometriai analízis is végezhető. Az eltérő jelölési eljárásokon túlmenően a különböző sejtmobilizációs kitek használata, az analízis módszerek, lehetőségek terén is nagy a variabilitás. A detektálás módszertani különbségei jelentősen befolyásolják az analízis eredményét, a Zap-70-pozitív B-sejtek arányát. Kontrollként az első vizsgálatok a biztosan Zap-70-pozitív T- és NK-sejteket használták. Negatív kontrollként egyes szerzők semleges izotípusú antitestet alkalmaztak, más centrumokban a biztosan Zap-70-negatív normál B-sejtekhez viszonyítottak. Mindez az analízis standardizálásának, optimalizálásának szükségességét jelzi, amelyre, a munkacsoportommal közösen folytatott vizsgálatokban indirekt jelölési technikát alkalmazva tettem kísérletet. Tíz normál perifériás vérmintát 24 órán belül vizsgáltam, hogy pontosan meghatározható legyen az eredmények megadásánál kulcsfontosságú vertikális kurzor helyzete az alapján, hogy ismert a normál B-, valamint T- és NK-sejtekben a Zap-70 hiánya, illetve jelenléte, rendre. A vertikális kurzort több pozícióba állítva (1%, 2%, 5% T/NK-sejt negativitás), a leghitelesebb eredményeket abban az esetben kaptam, ha a T/NK-sejtek 5%-a mutatott Zap-70 negativitást. Ekkor a normál B-sejtek átlagos jelölődése $3,36\% \pm 2,32$ volt, ami jó korrelációt mutatott korábbi irodalmi adatokkal (5-6%). Ez az érték 2%-os T/NK-sejt negativitás esetén $9,1\% \pm 7,16$ volt, míg 1%-os T/NK-sejt negativitást véve alapul $17,3\% \pm 11,45$ -nek adódott. Ahogyan a normál sejtek esetén, úgy CLL-es betegek ugyanazon módon meghatározott Zap-70 eredményeiben is

jelentős különbségekhez vezetnek a vertikális kurzor eltérő beállításai. A megbízható, standard módszer hiánya akár a prognosztikai besorolást is megváltoztathatja, a hagyományos 20%-os „cut off” értéket véve alapul. Amennyiben normál B-sejteket akarunk belső negatív kontrollként használni CLL-es betegek vizsgálata során, szükség lehet más egészséges egyéntől származó szeparált mononukleáris sejtek hozzákeverésére a beteg mintához, ugyanis a legtöbb esetben az összes B-sejt kóros (CD5/CD20/CD23-pozitív) fenotípusú. Egészséges egyéntől mononukleáris sejteket szeparáltam, majd a sejtszuszpenziót ismert B-CLL-es betegek vérmintáiához kevertem. A vizsgálatba bevont betegek limfoid sejtjei döntően B-CLL immunfenotípusúak voltak, bennük kevés T/NK-sejt mellett normál reziduális B-sejt nem volt kimutatható. Az analízis során mintegy 4%-ban megjelent a patológiás sejtpopuláció mellett egy CD5-negatív normál B-sejt csoport, amelyhez a vertikális kurzort állítva hasonló eredményt kaptam, mint amikor a mintában ugyancsak jelenlévő T/NK-sejtekhez illeszttem, a korábban említett módon (5% T/NK-sejt) a kurzort.

Minimális reziduális betegség (MRD) vizsgálata monoklonális antitest terápiát követően áramlási citometriával ALL-ben

Egy 15 éves nőbeteget klinikus kollaborációs partnereim cALL miatt az ALL-BFM 95 protokoll szerint kezeltek, aki a diagnózis után 48 hónappal visszaesett. Ekkor ALL R-87 protokoll szerinti terápiát kapott, amelyet kortikoszteroid pszichózis és a jobb femurfej avaszkuláris nekrozisa kísért. Hatvanhét hónap múlva második csontvelői relapszus következett be. Ekkor áramlási citometriával 76%-ban CD10 bright/CD19/TdT koexpressziójú limfoblasztokat (3432 blaszt/ μ L) mutattam ki a csontvelői mintában. A relapszuskor azonosított blaszt populáció 59%-a egyidejűleg CD20-pozitív volt. A korábbi súlyos kortikoszteroid mellékhatások miatt alkalmazott FLAG-IDA indukciós kezelés harmadik, komplett remissziót eredményezett, detektálási határ alatti szignálokkal mind morfológiai, mind áramlási citometriai technikákkal vizsgálva. A „Protokol M”

konzolidációs kezelés után a blaszrok áramlási citometriával ismét kimutathatóvá váltak. Mivel a hagyományos kemoterápia intenzifikációját súlyos mielosuppresszió korlátozta, és a beteg MRD pozitív volt, két alkalommal rituximabot (monoklonális anti-CD20 antitest, MabThera®, Roche, Hertfordshire, UK) kapott az „interim” fenntartó kezelésbe illesztve, amelyet jól tolerált. Az MRD vizsgálatokat számos időpontban (25. nap, 4., 6., 7., 8., 10. és 13. hónap) 100 000 sejt analízisével, 3-színű direkt jelölési technikával végeztem. A rituximab kezelés a CD10/CD19/TdT pozitív szubpopuláció csökkenését eredményezte. Bár a blaszrok szignálja mindvégig kimutatható volt, a CD20 expresszió már az első infúziót követően teljesen eltűnt mind a csontvelői, mind a perifériás vérmintából és a későbbiekben sem tért vissza. A második relapszus után 13 hónappal egy éretlen, CD19/TdT-pozitív, ugyanakkor CD10/CD20-negatív limfoblaszt populáció volt detektálható (12%, 879 blaszt/ μ L) a csontvelőben. A beteg ekkor beleegyezett az allogén hematopoetikus őssejt transzplantációba (HSCT), újabb FLAG-IDA kezelést kapott és a HSCT elvégzése előtt fulmináns tüdő aszpergillózisban masszív pancitopénia mellett, 14 hónappal a második relapszust követően elhunyt. Az áramlási citometriai MRD meghatározás mellett Q-PCR alapú MRD monitorozás történt a DE OEC Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet Klinikai Genomika laboratóriumában, ahol a második relapszuskor azonosított páciens-specifikus monoklonális inkomplett T-sejt receptor (TCR) delta génátrendeződés volt a target szekvencia. A követések során az első napi mintához történt a továbbiak hasonlítása. A kvantitációs határ $4,75 \times 10^{-2}$ volt. Az MRD szignál fokozatosan csökkent, majd a 6. hónapra a detektálási határ alá csökkent, az első rituximab kezelés előtt, egészen a 10. hónapig. Ekkortól az RQ-PCR-ral vizsgált jel ismét detektálhatóvá vált és a 13. hónapra a kezdeti értéket is meghaladta.

MEGBESZÉLÉS

A laboratóriumi teszteknél fontos a szenzitivitás, specifitás és a prediktív érték ismerete. A sejteket jellemző markerek detektálásánál lényeges a minta-előkészítés, ugyanis nem megfelelő metodikák alkalmazása álpozitív és álnegatív eredményekhez vezethet. Meghatározó szempont, hogy a jelölés kizárólag azon sejteket azonosítsa, amelyek valódi pozitívítást mutatnak az adott markerre és ne adjon nem-specifikus reakciót. Az eredmények értékelésénél az alábbi szempontokat vettem figyelembe: a jel specificitásának értékelése (a fals pozitív jelet adó populációk azonosítása), a szenzitivitás vizsgálata és ahol értékelhető, a prediktív érték megadása. Az áramlási citometriával több színű jelöléssel végzett immunfenotípus vizsgálatok a hagyományos morfológiai módszerek mellett a malignus és premalignus hematológiai kórképek diagnosztikájában a napjainkban használatos eszköztár alapvető kellékei. A pontos diagnózishoz, mely a kezelést alapvetően meghatározza, szükséges reprodukálható és – hasonlóan más klinikai laboratóriumi vizsgálatokhoz – jól standardizált módszer alkalmazása. A korrekt diagnózis megállapítása mellett a klinikai onkológiában jelentős igény mutatkozik prognosztikai faktorok detektálására is. Az ezen betegségben szenvedőknél a követés ugyancsak nélkülözhetetlen. Vizsgálataimat ezen témakörök köré csoportosítottam: (i) diagnosztika aberráns fenotípusok azonosításával, (ii) prognosztika MDR kimutatással és Zap-70 expresszió vizsgálattal és (iii) követés MRD meghatározásával. Törekedtem az ezekre alkalmas áramlási citometriai markervizsgálatok optimalizálására, valamint a módszertől függő lehető legideálisabb szenzitivitás és specifitás elérésére. Az áramlási citometriai vizsgálat objektivitásának növelését próbáltam elérni munkám során.

PNH esetében mára az áramlási citometriai vizsgálat gyorsasága, egyszerűsége, pontossága, relatíve olcsó volta és a kvantitatív analízis lehetősége miatt kulcsfontosságú

labordiagnosztikai módszerré vált, amelynek segítségével a nem hemolizáló betegek kis PNH klónjai is detektálhatók. Így a korábban a diagnosztikában használatos teszteknel jóval szenzitívebb módszerré lépett elő. Alkalmazásával az I-es, II-es és III-as típusú sejtek aránya egzakt módon megadható. A korábbi tanulmányok a GPI-horgonyzott fehérjék expresszióját a PNH-s klón sejtjein nem vetették össze az egészséges sejtek expressziós mintázatával. Vizsgálataim alapján egy új paraméter - az MFI ráta - használatát vezettem be, amely a II-es és III-as típusú PNH sejtek és a megfelelő normál populáció MFI értékének a hányadosa. Minél kisebb az MFI ráta, annál jobban diszkriminál a GPI-horgonyzott marker a PNH-s és a normál sejtek között. Eredményeim régebbi megfigyelésekkel összhangban azt mutatták, hogy az anti-CD55 nem azonosítja olyan jól a kóros vvt populációt, mint az anti-CD59, mivel ezen esetben jóval alacsonyabb MFI rátákat kapunk. Meghatároztam a százalékos negativitás értékeket és az MFI rátákat a vvt, granulocita és monocita sejtpopulációkban. Eredményeim alapján elmondható korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan, hogy a monocita az ideális sejt típus a PNH-s klón méretének meghatározására, mivel az MFI ráták itt a legalacsonyabbak. Ezért ajánlható az, hogy a PNH klón méretének meghatározásákor a CD14-negatív monociták %-os értékét adjuk meg a munkacsoportunk által bevezetett MFI rátával együtt.

A prognosztikai faktorok közé sorolt citosztatikum rezisztencia detektálására több módszer létezik. A Pgp-t, bár nem az egyetlen fehérje a multidrog rezisztencia (MDR) mechanizmus kialakulásában, az egyik legfontosabbnak tartjuk. A Pgp analízis alapvetően három különböző módszerrel történhet: a Pgp mRNS kimutatásával, a Pgp antigén meghatározásával és a Pgp aktivitás vizsgálatával. A kalcein teszt egy funkcionális esszé, amelynek alapja, hogy a kalcein-acetoximetilészter (kalcein-AM), hidrofób molekulaként a sejtbe diffundál, majd nem-specifikus intracitoplazmatikus eszterázok hasítják és az MDR-ért felelős transzporterek - közülük a legfontosabb a Pgp - a fluoreszkáló kalceint kipumpálják. Az előbb említett proteinek hiányában a hidrofil kalcein csapdába esik és áramlási citométerrel jól mérhető

jelintenzitása jellemzi az MDR aktivitást. A tesztben a fehérjék aktivitásának gátlására úgynevezett revertáló ágensek, modulátorok használhatók. Ezek közül a kísérletek során a verapamil (Vp) alkalmaztam. Az MFI-t a revertáló ágens jelenlétében (Vp+) és hiányában (Vp-) detektálva a transzporterek aktivitásának mértékére következtethetünk. Kvantitatív eredményt a fluoreszcencia intenzitások különbségéből nyerhetünk a $[MFI(Vp+) - MFI(Vp-)]/MFI(Vp+) \times 100$ képlet alapján. A kapott eredmény egy dimenzió nélküli szám, a multidrog rezisztencia aktivitás faktor (MAF). A kalcein teszt felszíni jelöléssel együtt is elvégezhető, ezáltal a specificitás növelésére van lehetőség. Azonban a csatornák közötti átvilágítás lehetőségét nem hagyhatjuk figyelmen kívül.

A krónikus limfoproliferatív betegségekben (mint a CLL) prognosztikai csoportok létrehozása igen fontos, ugyanis a betegek egy részében a várható túlélés nem tér el jelentősen a hasonló korú egészségesektől, míg másokat a betegség gyors progressziója és rövid túlélés jellemez. Az utóbbi időben számos nemzetközi tanulmány alapján az immunglobulin-nehézlánc gén variábilis régiójának (IgV(H)) mutációs státusza és a Zap-70 intracelluláris expressziója között korrelációt találtak. A Zap-70 expressziót összefüggésbe hozták a betegség klinikai viselkedésével, így a Zap-70 kifejeződés meghatározása B-CLL-ben prediktív értékű lehet. Fontos azt is megjegyezni, hogy a Zap-70 expresszió és a prognózis közötti összefüggés nem egyértelmű, sokszor ellentmondásos. A Zap-70 áramlási citometriával kimutatható marker, amelynek detektálása több módszerrel lehetséges a sejtek permeabilizálását követően. Az ebből eredő különbségeken túlmenően az analízis terén is nagy a variabilitás, melyek eredményeként a Zap-70 pozitív B-sejtek aránya megadható. A 100 000 sejt begyűjtésével a szenzitivitást igyekeztem növelni. Fontos megjegyezni, hogy vizsgálataimban az irodalomban legelfogadottabban használt 20%-os „cut off” értéket tekintettem a pozitívítás határának. Az analízis során a specificitás kérdése is létfontosságú, amelyet a vertikális kurzor pozíciója határoz meg és ez a Zap-70 pozitív kóros B-sejtek kalkulációjának az alapja. A mérés

optimalizálása során a vertikális kurzort számos pozícióba állítottam, a belső pozitív kontrollként használt T- és NK-sejtekhez, illetve a belső negatív kontrollként egyes munkacsoportok által ajánlott normál B-sejtekhez. Tapasztalataim alapján a Zap-70 analíziskor hasonló eredményt kapunk ha a normál T/NK-sejteket belső pozitív kontrollként használva úgy állítjuk a vertikális kurzort, hogy ezen sejtek 5%-a essen a Zap-70 negatív kvadránsba, mint amikor szeparált egészséges mononukleáris sejteket keverünk B-CLL-es mintához és az abban jelenlévő normál-B sejteket használjuk belső negatív kontrollként.

A XIII-as véralvadási faktor A alegységének (FXIII-A) citoplazmatikus jelenléte régóta ismert a monocita/makrofág, illetve a megakariocita/trombocita sejtvonalban. Az FXIII-A expressziót munkacsoportunk tagjai, korábbi munkájuk során meghatározták monocita és granulocita sejtvonalakban. AML blasztok FXIII-A expresszióját tanulmányoztam. Az eredmények szerint az FXIII-A akut monocitás és mielomonocitás leukémiában, a hagyományos CD14 monocita markernél szenzitívebbnek bizonyult a blasztok identifikálásában. A patológiás sejtek FXIII-A jelölődését a normál perifériás vér monocitáinak expressziójával összevetve azt találtam, hogy más intracelluláris markerektől eltérően a jelölődés intenzívebb AML M4, M5 és CMML esetén, ami az FXIII-A expresszióinak egy különleges jellegzetessége. A másik csontvelői eredetű, ismert FXIII-A pozitív (megakariociter) sejtpopuláció kóros alakjait vizsgálva azt találtam, hogy az FXIII-A jelölődés specifikusabb a konvencionálisan alkalmazott trombocita/megakariocita markereknél. A trombocita szatellitózis kiküszöbölésére vizsgálataimban speciális trombocita mentesítő EDTA-s mosási technikát használtam, amelynek segítségével a fals pozitív reakció kiküszöbölhető volt és a valódi megakariocita arány megadhatóvá vált.

Az FXIII-A megjelenése a gyermek- és felnőttkori B-sejtes ALL-ek 40%-ában váratlan eredmény volt. Munkacsoportunk korábbi és jelenlegi vizsgálatait azt mutatták, hogy a normál csontvelői és perifériás vér limfociták, illetve előalakjaik nem tartalmazzak XIII-as faktort,

ahogyan B-CLL sejtek sem. Természetesen ismét felmerült a trombociták által okozott, potenciálisan fals pozitív reakció lehetősége, amelyet több módszerrel (ELISA, konfokális mikroszkópia) kizártam. ELISA vizsgálatokkal azt találtam, hogy a limfoblasztok a normál monocitáknál kevesebb FXIII-A-t tartalmaznak. Mivel ALL-ben gyakran mutathatók ki mieloid antigének, megjegyzendő, hogy az FXIII-A pozitív ALL-ek nagy részében nem volt egyéb mieloid marker koexpresszió. Így elmondható, hogy az FXIII-A pozitivitás ALL-ben egy különleges, leukémia-specifikus alcsoportot képvisel. Az aberráns, leukemia asszociált immunfenotípus (LAIP) gyakori eltérés ALL-ben, de egyéb sejtvonalból származó intracitoplazmatikus marker leírására eddigi ismereteink szerint még nem került sor. Nem ismert a XIII-as faktor szerepe intracellulárisan. Feltételezik szerepét a fagocitózisban, a makrofágok alternatív aktivációjában, de leírták már proangiogén hatását is. További vizsgálatok zajlanak annak kiderítése érdekében, hogy az FXIII-A pozitív betegek prognosztikailag külön csoportot jelentenek-e a negatívakhoz képest.

Az áramlási citometria a malignus hematológiai kórképek követésére is alkalmas módszer. Ilyenkor a cél a kezelést követően esetlegesen a szervezetben még jelenlévő kóros sejtek, azaz az MRD kimutatása. Ezért ezeknél a vizsgálatoknál nagyobb számú esemény begyűjtése szükséges, hiszen ezáltal megfelelő biztonsággal, szenzitíven azonosíthatunk akár 1 kóros sejtet is 100 000 normál mellett. Kulcsfontosságú az MRD vizsgálatokat megelőzően a kezdeti LAIP detektálása, amely prekursor B- és T-sejtes ALL-ben az esetek több mint 95%-ban van jelen. Ezek azonosítására törekszünk a beteg későbbi mintáiból a normál hematogónok kizárása mellett. Vizsgálataink során követtünk egy gyermekkori CD20-pozitív prekursor-B ALL esetet, ahol a többszöri relapszus és korábbi súlyos gyógyszer mellékhatás miatt különleges terápia bevetéséhez folyamodtak a kezelő orvos munkatársak, amelyet gyermekkori ALL-ben ezt megelőzően ritkán adtak. Az alkalmazott rituximab CD20-ellenes monoklonális antitest, melyet B-sejtes CLPD kezelésében használnak leginkább, de

felnőttkori ALL-ben is kipróbálták már. A rituximab a követett betegnél a CD20-pozitív szubpopuláció teljes eliminációját eredményezte, de ezzel ellentétben, az éretlenebb fenotípusú CD20-negatív limfoblasztokét nem. A párhuzamosan folytatott Q-PCR módszerrel történő MRD analízis az áramlási citometriai módszerrel meghatározható MRD klóntól eltérő sejtpopulációt detektált. Ezért a két módszer klinikai prediktív értékének pontos tisztázásáig együttes alkalmazásuk javasolható a minimális reziduális leukémiás klón(ok) kimutatására.

A hematológiai diagnosztikában és a betegek nyomon követése során az áramlási citometriai módszerek adják az egyik legobjektívebb és leginkább kvantitálható metodikát az eredmények kifejezésére. Ez a begyűjtött események számának növelésével, az egyidejűleg vizsgált fluoreszcens jelölések alkalmazásával és a kapott fluoreszcencia eredmények különböző numerikus formában való megjelenítésével érhető el.

AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI JELENTŐSÉGE

A kvantitatív formában kifejezett áramlási citometriai eredmények, különösen ha multiparametrikus analízissel kombináljuk, rendkívül hasznosnak bizonyultak a vérképzőszervi kórképek diagnosztikájában és a malignus hematológiai betegségek alcsoportjainak elkülönítésében. A prognosztikai markerek közül az áramlási citometriai módszerekkel kivitelezhető vizsgálatok az immunfenotípus vizsgálatokkal egyszerre állnak rendelkezésre a klinikus számára.

A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE:

Kiss F, Hevessy Z, Veszprémi A, Katona É, Vereb G, Kiss C, Muszbek L, Kappelmayer J. Leukemic lymphoblasts: a novel expression site for coagulation factor XIII subunit A.

Thrombosis and Haemostasis 2006;96:176-82. **IF: 2.803**

Kiss F, Buslig J, Szegedi I, Scholtz B, Kappelmayer J, Kiss C. Early relapse after rituximab chemoimmunotherapy. *Pediatric Blood and Cancer* (2007.10.31. epub ahead of print DOI: 10.1002/pbc.21388) 2007. **IF: 1.882**

Kiss F, Simon A, Csathy L, Hevessy Z, Katona E, Kiss C, Kappelmayer J. A coagulation factor becomes useful in the study of acute leukemias: studies with blood coagulation factor XIII. *Cytometry Part A* (2007.11.13. epub ahead of print, DOI: 10.1002/cyto.a.20485) 2007.

IF:3.293

Kappelmayer J, Simon A, **Kiss F**, Hevessy Z. Progress in defining multidrug resistance in leukemia. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2004;2:209-17. **IF: 2.438**

Hevessy Z, Nagy B Jr, **Kiss F**, Kiss A, Kappelmayer J. Mean fluorescence intensity rate is a useful marker in the detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2005;43:919-23. **IF: 1.725**

**A TÉZISEKBEN FEL NEM HASZNÁLT EGYÉB TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK
JEGYZÉKE:**

Nagy B Jr, Veszprémi A, **Kiss F**, Miszti-Blasius K, Kappelmayer J. Thrombocytá aktivációs markerek összehasonlító elemzése áramlási citometriával in vitro aktivált mintákon. *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina* 2003;30:46-54.

Mejstriková E, Fronková E, Kalina T, Omelka M, Batinic D, Dubavcic K, Pospisilová K, Várková M, Luria D, Hang Cheng AS, Ng M, Leung Y, Kappelmayer J, **Kiss F**, Izraeli S, Stark B, Schrappe M, Trka J, Sary J, Hrusák O. Flow cytometric residual disease detection based on exact background knowledge: a predictive tool at early time points of B precursor leukemia treatment. *(Közlésre elküldve.)*

Az impakt faktorok (IF) a 2006 évi számítások alapján vannak feltüntetve.

Összesített IF: 12.141 (a 2006-os SCI alapján)