

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Dr. Rejtő László

Témavezető: Prof. Dr. Udvardy Miklós

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

BEVEZETÉS

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

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

A nagy thrombocyta-számmal járó állapotok vizsgálatára az irodalomból különféle laboratóriumi módszerek ismeretesek, amelyek megkönnyíthetik a primer és szekunder thrombocytosisok elkülönítését. Kellően megbízható és szűrővizsgálati tesztként is alkalmazható módszer azonban nem szerepel az ajánlások között. Újabb lehetőség e két, alapvetően különböző állapot elkülönítésére a „shear”-indukálta thrombocyta-aggregatio (PFA-val, vagy O'Brien-féle filterométerrel való) vizsgálata. E PhD értekezésben az O'Brien - féle filterométer lehetséges szerepét és diagnosztikai előnyét elemeztem a korábban alkalmazható laboratóriumi vizsgálatokkal szemben. Lehetőségeink később kiegészültek egyéb, a haemostasis-működése szempontjából fontos további paraméterek (NO-termelés, újabban F XIII) vizsgálatával is. Más, szintén kóros thrombocyta-működéssel járó állapotok közül diabetes mellitusban és veseátültetést követően az immunszuppressziós kezelés szövődményeként kialakuló poszttranszplantációs diabetesben vizsgáltuk az in vivo thrombocyta-aktivációt jelző β -thromboglobulin és más, fontos haemostasis-paraméterek (pl. a solubilis thrombomodulin) plazma-szintjét. Vizsgáltuk az egyes laboratóriumi értékek közötti, valamint a releváns labor-és klinikai adatok közötti

összefüggéseket. Végül, hazánkban talán az elsők között szerezhettem tapasztalatokat bizonyos molekuláris biológiai (pl. FISH) vizsgálatok gyakorlati alkalmazhatóságáról krónikus myeloproliferatív betegségekben, elsősorban a CML-ben. E vizsgálatokat természetes módon más malignus haematológiai kórképekben is alkalmaztuk. Ez utóbbi vizsgálataim azon törekvésekhez kívánnak kiegészítő adatokat szolgáltatni, amelyek a rosszindulatú vérképzőszervi-betegségek hatékonyabb kezelését és jobb követését szolgálják.

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

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során a következő kérdésekre kerestem választ:

1. Nagy thrombocyta-számmal járó állapotokban (O'Brien-féle filterométert alkalmazva) mekkora a shear-indukálta thrombocyta-aggregációs vizsgálatok diagnosztikai értéke, haszna? Használható-e mint egyszerű és gyors screening teszt a primer és szekunder thrombocytosisok elkülönítésére? A kapott eredmények alapján merülhetnek-e fel olyan kérdések, amelyek további vizsgálatokat tesznek szükségessé?
2. Az 1990-es évek közepén vált ismertté, hogy a thrombocyták is rendelkeznek az EDRF-NO (NO) termeléshez szükséges NO szintáz enzimmel. A vérlemezékben képződött kis mennyiségű NO csökkenti az aggregálódó thrombocyták számát. A thrombocyta NO generáció zavara elméletileg szerepet játszhat a nagy thrombocyta-számmal járó krónikus myeloproliferatív betegségek thrombotikus szövődményeiben, erre utaló kísérletes adat azonban nem ismeretes. Következő célunk tehát a thrombocytákban képződő NO kvantitatív meghatározása volt.

3. Feltételezhető, hogy a haemostasis rendellenességeknek poszttranszplantációs diabetesben is fontos szerepük lehet a gyakoribb cardiovascularis morbiditásban és mortalitásban. Érdeemesnek láttuk ezért megvizsgálni, hogy sikeres veseátültetésben részesült, s az immunszuppressziós kezelés következményeként diabetesessé vált betegekben kimutatható-e a thrombocyták túlműködése és a vascularis endothelium károsodása. Az irodalmi adatok alapján fontos lehet a PAI-I aktivitás, ill. az intravascularis EDRF-NO képződés vizsgálata is.

4. A klasszikus tumor citogenetika értékes módszer a rosszindulatú betegségekben kialakuló kromoszóma-anomáliák felderítésében. A sejttenyészetben azonban a malignus sejteknek olyan szubpopulációja szelektálódhat, amely nem szükségszerűen jellegzetes magára a tumorra, hanem az adott körülmények között speciális proliferatív előnye van. Limitált a vizsgálható metafázisok száma is. Az utóbbi években előtérbe kerülő fluoreszcencia in situ hibridizációval (FISH) és összehasonlító genomiális hibridizációval (CGH) kívántuk vizsgálni:

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

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

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

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

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

1. A primer és szekunder thrombocytosisok elkülönítése céljából a hazánkban még kevésbé ismert *O'Brien-féle filterométer* segítségével vizsgáltuk a „shear-dependens” thrombocyta-aggregatiót. 53 krónikus myeloproliferatív betegségben (KMB) szenvedő beteget vizsgáltunk. A betegcsoportot 27 férfi és 26 nő alkotta. Átlagos életkoruk 56 (range: 21 - 89) év volt. Reaktív thrombocytosist 21 betegnél (kilenc férfi és 12 nő) észleltünk. Átlagos életkoruk 52 (range 18 - 88) év volt.

A kontroll csoportot húsz egészséges önként jelentkező (kilenc férfi és 11 nő) alkotta. Átlagos életkoruk 31 (range: 20 - 50) év volt.

A „shear-dependens” thrombocyta-aggregatio vizsgálatára az O'Brien-féle filterométer segítségével került sor. Heparinnal és citráttal alvadásgátolt teljes vért áramoltatunk át egy filteren 40 Hgmm nyomással. Az ilyen körülmények között áramló vérben a thrombocyták aktivációja és aggregációja következik be. A képződő aggregátumok a filter pórusait elzárják. Az eszköz 5 másodpercenként méri a filteren áthaladó cseppek számát. A mérés előtt, a mérés 0 - 5. másodperce között és a mérés 20 - 40. másodperce közötti cseppeket összegyűjtve thrombocyta-számlálást végeztünk.

Jellemző paraméterek:

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

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

Minden esetben megmértük a vérzés-időt és a Willebrand-fehérje (vWF:Ag) plazmaszintjét ELISA módszerrel. A thrombocyta-aggregatiót öt aggregáló-szer (adrenalin, adenozin-difoszfát, kollagén, ristomycin és arachidonsav) alkalmazásával vizsgáltuk.

2. A vérlemezék NO termelésének vizsgálatát egészségesek és nagy thrombocyta-számmal járó krónikus myeloproliferatív betegségben szenvedők mosott thrombocytáinak felhasználásával végeztük. 15 krónikus myeloproliferatív betegségben szenvedő beteget vizsgáltunk. A betegcsoportot 10 férfi és 5 nő alkotta. Átlagos életkoruk 65.4 (range: 38 -

80) év volt. A thrombocyta-szám minden beteg esetében kórosan nagy ($500 \times 10^9/L$ feletti) volt.

A kontroll csoportot húsz egészséges önként jelentkező (7 férfi és 13 nő) alkotta. Átlagos életkoruk 39.8 (range: 29 - 54) év volt. Egyik csoport tagja sem kapott nitrit-tartalmú gyógyszert.

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

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

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

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

3. Poszttranszplantációs diabetes mellitusban végzett laboratóriumi vizsgálatok:

53 (a SOTE Transzplantációs Klinikán) sikeres veseátültetésen átesett, s az immunsuppressziós kezelés (steroid + cyclosporin A $\pm$ azathioprin $\pm$ mofetilium mycophenolicum) miatt diabetes mellitusossá vált betegben vizsgáltuk az atherosclerosis és a coronaria-betegség rizikófaktorainak tekinthető szérum plasminogen-aktivátor inhibitor-1 (PAI-1) aktivitást és a szöveti típusú plasminogen aktivátor (tPA) szintet (enzimatis

kromogén reakcióval, 47 betegnél), a thrombocyta aktivációt tükröző béta-thromboglobulint (β -TG) (ELISA módszerrel, 53 esetben), az endothelium-károsodás során felszabaduló solubilis thrombomodulin (sTM) szintet (ELISA technikával, 47 esetben), valamint az endotheliális NO-termelést és a teljes antioxidáns statuszt. A betegcsoportot 34 férfi és 19 nő alkotta. Átlagos életkoruk 47.6 (range: 14 - 68) év volt. A transzplantáció óta átlagosan 54.8 (range: 2 - 151) hónap telt el.

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

Az endothelium NO-termelése:

Az NO rendkívül rövid (3-5 sec.) féléletidejű molekula, hamar NO_2 -vé, ill. NO_3 -má alakul. Az endotheliális NO-produkció mérése közvetlenül ugyan nehezen végezhető el, a szérum/vizelet nitrit-nitrát tartalma azonban már könnyebben mérhető, s annak mennyisége az endothelium NO termelését tükrözi. (A szérumban és vizeletben lévő nitrát nitrát reduktazzal nitritté redukálható. A nitrát redukciójával keletkezett és a redukció előtt jelenlévő nitrit Griess reakcióval meghatározható). Ily módon viszonylag egyszerű, non-invazív módszert alkalmazva vizsgálhatjuk az intravascularis EDRF-NO termelést.

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

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

4a. Összehasonlító genomiális hibridizáció (CGH)

Öt betegünknel (3 CLL; 1 CML és 1 ALL) végeztünk sikeres CGH vizsgálatot.

A CGH analízist Kallioneimi és mtsai által kidolgozott módszerrel, korábbi leírások alapján végeztük. A hibridizációhoz szükséges DNS-t leukaemiás sejtekből, ill. normális perifériás lymphocytákból Promega „Genomic DNA Purification Kit”-tel preparáltuk, a kit leírásának megfelelően. A leukaemiás sejtekből származó DNS-t nick-translatioval (zölden fluoreszkáló) Spectrum Green-12-dUTP-vel, a normális DNS-t (vörösén fluoreszkáló) Spectrum Red-5-dUTP-vel jelöltük meg a gyártó (Vysis, Inc. Downers Grove, IL USA) protokolljának megfelelően. A nick translatiohoz „Vysis, CGH Nick translation kit”-et használtunk. A hibridizációs keverék a leukaemiás és a normális (jelzett) DNS-t egyenlő arányban tartalmazta. A DNS-t denaturáltuk (73 C-on, öt percig). A tárgylemezeken lévő (egészséges férfiből származó) target (metafázisban lévő) kromoszómákat (Vysis Inc.) szintén (3-5 percig 73 C-on) denaturáltuk, majd a hibridizációs elegyet a tárgylemezre

cseppentettük és légmentesen lezártuk. A hibridizáció időtartama 72 óra volt. Ez alatt a készítményeket 37 C-os nedves kamrában tartottuk. A hibridizációt követően a nem hibridizálódott DNS-t a hibridizációs lemezekről eltávolítottuk. A sejtmagokat anti-fade oldatban (Vysis Inc.) oldott (kék színű) DAPI-val festettük.

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

4b Fluoreszcencia in situ hibridizáció (FISH)

A FISH-vizsgálatokat a DEOEC. II. sz. Belklinikán kezelt és gondozott betegek csontvelő és/vagy perifériás vérmintáiból származó fehérvérsejtek felhasználásával végeztük. A vizsgálandó sejteket (megfelelő előkészítés után) tárgylemezre cseppentjük, s a FISH analízisig -20 C-on tároljuk. A vizsgálat során a tárgylemezen lévő preparátumot denaturáljuk (5 percig, 73 C-on, megfelelő pH-n). A kettős helikális szerkezetű DNS-molekulák ilyen körülmények között szétválaszthatóak, s az ugyancsak denaturált, fluoreszcens festékkel megjelölt, komplementer szekvenciákat tartalmazó DNS-szondát ráhibridizáljuk. (A szondák egy-egy kisebb genom-szakaszt jelenítenek meg). A hibridizációt követően, a felesleges szonda többlépcsős eltávolítása után, a sejtmagokat és a kromoszómákat kéken fluoreszkáló DAPI-val, vagyis DNS-specifikus festékkel jelöljük. A kromoszómák és a sejtmag kék színűek lesznek. A hibridizálódott, fluoreszcens festékkel jelölt DNS-szonda megfelelő mikroszkóp segítségével láthatóvá tehető.

A FISH-technika végzésekor DNS locus-és centromera-specifikus szondákat alkalmaztunk. A centromera-specifikus szondák segítségével a kromoszómák számbeli

eltérései vizsgálhatók. E szondák a kromoszómák centromera-régióihoz hibridizálódva nagyméretű fluoreszcens szignál formájában jelzik a sejtekben a vizsgált kromoszómák számát, (diploid voltát vagy pl. mono-triszomia jelenlétét). A locus-vagy szekvencia-specifikus szondák a deléciók, amplifikációk, ill. transzlokációk vizsgálatára alkalmasak. Lehetővé teszik a citogenetikai eltérések azonosítását interfázisban levő sejtekben is, s így kimutathatóak a klasszikus citogenetikával nem felderíthető aberrációk is.

Az általunk leggyakrabban vizsgált Philadelphia kromoszóma (Ph), azaz a t(9;22) (q34;q11.2) lényege, hogy a 9-es kromoszóma q34-es régiójában lokalizálódó c-ABL onkogén a 22-es kromoszóma BCR génje mellé transzlokálódik. Egy fúziós kiméra-gén keletkezik. A 22-es kromoszómán lévő BCR lókuszt zöld, míg az ABL lókuszt piros színnel fluoreszkáló DNS szondával jelöljük meg. Normális sejtekben a szondák egymástól távol, különálló szignálként jelennek meg. Ph-kromoszóma jelenlétekor a sejtekben a kromoszómális szegmentek transzlokációja miatt a két fluoreszcens szignál egymás mellé kerül, a szignálok részleges átfedése utal a transzlokációra. A heveny promyelocytás leukaemiára jellemző t(15;17) vizsgálatának elve, ill. az alkalmazott szondák színe azonos a BCR/ABL transzlokáció vizsgálatához.

82 betegnél (CML, vagy annak gyanúja: 44; leukocytosis: 4, ALL: 7; AML: 6; AML M3 (vagy gyanúja): 8; CLL: 13; DMPS/AML: 1) összesen 140 hibridizációt (FISH vizsgálatot) végeztünk. Az esetek nagyobb felében CML, vagy annak gyanúja, ill. leukocytosis miatt történtek a vizsgálatok, s a bcr/abl transzlokáció jelenlétét, ill. annak kvantitatív változását vizsgáltuk. Ugyanennek a transzlokációnak a jelenlétét kerestük ALL-ben, több alkalommal AML-ben is. AML M3-ban, ill. ennek gyanúja esetén a promyelocytás leukaemiára specifikus t(15;17) jelenléte, ill. kvantitatív változása volt a kérdés. Néhány esetben (AML-ben) egyes kromoszómák (pl. 1, 7, 8, stb) számbeli anomáliáját is vizsgáltuk. CLL-ben legtöbbször a 12-es kromoszóma triszómiáját, míg egy beteg esetében, (akinek betegsége DMPS-ből AML-be transzformálódott) a 7-es kromoszóma számbeli eltérését vizsgáltuk. A transzlokációkat, ill. a kromoszómák számbeli eltérését direkt jelzett lokusz-specifikus, ill. centroméra-specifikus Vysis szondákkal végeztük. Egyes betegeknél szimultán végzett hibridizációkkal több kromoszóma-anomáliát is vizsgáltunk. Több betegnél ismételt vizsgálatokra is sor került, azaz a FISH-technikát „citogenetikai követésre” is használtuk.

EREDMÉNYEK

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

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

A reaktív thrombocytosisos csoportban 21 heparinos, 18 citrátos vizsgálat volt. Heparin alkalmazásakor a záró cseppszám és az R-I minden esetben a normális tartományba esett, míg az R-II 3 alkalommal volt ál-pozitív. A 18 citrátos vizsgálat közül a záró cseppszám és az R-I egy esetben sem, míg az R-II egy esetben bizonyult ál-pozitívnek.

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

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

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

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

csak reaktív thrombocytosisokban volt szignifikáns ($p=0,017$ vs. $0,64$). Nem találtunk összefüggést az R-II és az antigén-szintek között egyik csoportban sem, akár a heparinos, akár a citrátos módszert alkalmaztuk.

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

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

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

KMB-ben a thrombocyták NO-termelése statisztikailag is szignifikáns mértékben csökkentnek bizonyult a kontrollcsoporthoz képest. Az NO-képződés mértéke aktivátor-dependens, s jól gátolható NO-szintézis inhibitorokkal.

3. Poszttranszplantációs diabetes mellitusban végzett vizsgálatok:

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

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

4a. A CGH vizsgálatok eredményei:

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

4b. A FISH-vizsgálatok eredményei:

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

INF-kezelés megkezdése előtt 28 beteg FISH-vizsgálatára került sor. A klinikai adatok CML-re utaltak. 24 esetben a FISH-vizsgálat eredménye is alátámasztotta a CML feltételezett diagnózisát. A négy BCR/ABL negatív beteg közül (a citogenetikai vizsgálat sem jelzett Ph-kromoszómát) a végső diagnózis myelofibrosis, Ph-negatív CML, neutrofil-leukaemia, ill. pontosan nem definiálható krónikus myeloproliferatív betegség lett.

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

További négy, FISH-sel BCR/ABL pozitívnak bizonyuló betegben a citogenetikai vizsgálat nem jelezte a Ph-kromoszóma jelenlétét.

A FISH-analíziseket részben csontvelői, részben perifériás vérből származó sejteken végeztük. Hat alkalommal egy időben nyert csontvelői és perifériás vérmintákon párhuzamos vizsgálatokat is végeztünk, hasonló eredménnyel. A sejtek 100%-át érintő génátrendeződést egyetlen esetben sem láttunk. A 28 beteg közül hat esetben észleltünk (kis százalékban) dupla Ph-pozitivitást. E kis számok óvatosan kezelendők, azonban a hat beteg közül négy esetben gyors accelerációt, ill. blastos fázis kialakulását észleltük, azaz a

betegség felismerésekor (akár kis százalékban) kimutatható dupla Ph-pozitivitás rossz prognózist sejtet, s intenzívebb kezelés szükségességét vetheti fel.

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

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

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

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

A klinikai paramétereken alapuló (Sokal-score-rendszerhez hasonló információ-tartalmat hordozó) Kantarjian és munkatársai által javasolt score rendszer (amely segítségével a betegek jó, intermediér és rossz prognózisú csoportokba sorolhatók) és a FISH-vizsgálatok eredményei között ellentmondás lehetséges. A FISH-vizsgálat több beteg esetében rossz prognózist sugallt, a klinikai score-rendszer alapján azonban a „jó” és „intermediér” csoportban kaptak helyet. A betegség lefolyása a feltételezhető „rossz prognózist” igazolta. A klinikai paramétereken alapuló score-rendszer fontos eleme a

frissen felismert CML-es betegek jellemzésének, információ tartalma mindazonáltal nem éri el a genetikai vizsgálatokét. Adott esetben a genetikai vizsgálatok eredménye nagyobb súllyal értékelendő.

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

Egy 44 éves nőbeteg (10 a tbl. első betege) érdekessége, hogy csak kisdózisú (2x5 ME/hét) INF kezelést tolerált. Gyorsan (4 hónap alatt) kialakuló komplett haematologiai remisszió után bő hat év elteltével tudtunk FISH-vizsgálattal komplett citogenetikai remissziót bizonyítani. A következő (58 éves férfi betegnél) a dupla Ph-pozitivitás rossz prognózist sejtetett. Annak ellenére, hogy 3 hónap alatt komplett haematologiai remisszió alakult ki, ennek fenntartása a későbbiekben a megszokottnál intenzívebb kombinált (INF + HU + folyamatos, kisdózisú, s.c. Ara-C) kezelést tett szükségessé. A következő (3. és 4. betegnél) a citogenetikai romlás, ill. a dupla Ph-kromoszóma megjelenése előre jelezte alapbetegségük progrediálását, az accelerációt, ill. a blastos fázis kialakulását. Egy allogén csontvelő-átültetésen átesett betegünknel (bár klinikailag panaszmentes volt), a FISH-vizsgálat jelezte a Ph-pozitív sejtek perzisztálását, ill. a későbbiekben arányuk fokozódását. A jó klinikai állapot fenntartásában, a Ph-pozitív klón háttérbe szorításában feltehetően fontos szerepe volt a transzplantációt követően folyamatosan alkalmazott INF-kezelésnek. Több betegnél a FISH-vizsgálat citogenetikai romlást jelzett, s indokolta a Glivec-kezelés elkezdését.

Az előző csoporthoz hasonlóan a FISH-vizsgálat a Ph-negatív betegekben is jelezte a BCR/ABL átrendeződés jelenlétét.

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

Az INF-fel kezelt betegek között egy alkalommal merült fel a teljes citogenetikai remisszió lehetősége (negatívvá váló citogenetikai lelet, valamint a hibahatárhoz közel álló FISH vizsgálati eredmény alapján). Egy, csontvelő-átültetés után relabáló, majd INF-kezelésben részesített, valamint négy, 6-24 hónapja INF-fel kezelt betegnél részleges

citogenetikai válasz igazolódott. Tíz betegnél észleltünk enyhe választ, négy betegnél nem volt citogenetikai javulás, míg egy betegnél citogenetikai progressziót észleltünk. Egy esetben (10b. tbl. 9. betege) az INF-kezelést követően adott Glivec hatására átmeneti citogenetikai javulást láttunk. Az INF-fel kezelt beteg közül tehát hat esetében volt major, tíznél pedig enyhe (minor) citogenetikai válasz. 18 beteg került tartósan CHR-be, s ketten PHR-be. Kiemelendő, hogy egy, betegsége felismerésekor rossz prognózisú betegnél is CHR és major citogenetikai remisszió alakult ki. Az INF hatékonysága jelentős egyéni különbségeket mutathat: A 10.a. tbl. első betegénél kisdózisú (heti 2x5 ME) INF-kezelés is lényegében teljes citogenetikai remissziót, míg az ötödik esetében napi 10 ME is csak enyhe citogenetikai választ eredményezett.

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

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

AML-ben 32 hibridizációt végeztünk, s összesen 14 beteget vizsgáltunk (részben lokus-specifikus, részben centromera-specifikus szondákkal). Az első, terápia refrakter férfi betegnél a 18. kromoszóma monosomiáját észleltük. A második betegnél a 7. kromoszóma monosomiája igazolódott, míg a következő betegnél a 7-es monosomia gyanúja volt csak felvethető. Egy esetben (a 13. tbl. hatodik betege) az alapbetegség CLL volt. A későbbiekben második betegségként AML igazolódott, amely BCR/ABL pozitívnak és terápia refrakternek bizonyult. A jelzett eltéréseket hagyományos citogenetikai vizsgálatokkal nem lehetett kimutathatni. A következő nyolc betegnél (14. tbl) heveny promyelocyta leukaemia lehetősége miatt végeztünk FISH-vizsgálatokat, s az AML M3-ra

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

CLL-ben 13 beteget vizsgáltunk (15. tbl.). Elsősorban a 12-es kromoszóma trisomiáját vizsgáltuk, amely az egyik leggyakoribb genetikai anomália CLL-ben. 12-es kromoszóma számbeli eltérést nem találtunk. Kromoszóma-aberrációt mindössze egy beteg esetében észleltünk: korábban végzett CGH vizsgálat a 7-es kromoszóma trisomiáját jelezte. A hagyományos citogenetikai vizsgálat (a kromoszómák hasonlósága miatt) 8-as trisomiára utalt. A 7-es kromoszóma centromera-régiójára specifikus szonda felhasználásával egyértelműen igazolódott a 7-es kromoszóma számbeli rendellenessége.

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

FONTOSABB MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. Ismert, hogy myeloproliferatív betegségekben a thrombocyták mennyiségi zavara mellett sok esetben szerzett thrombocyta-működészavar is megfigyelhető, melynek felismerése adott esetben segítséget jelenthet a helyes diagnózis felállításában.

Az irodalomból különféle laboratóriumi vizsgálatok ismeretesek, amelyek megkönnyíthetik a primer és secunder thrombocytosisok elkülönítését. Kellően megbízható, screening-tesztként is alkalmazható módszer azonban nem szerepel az ajánlások között. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy myeloproliferatív thrombocythaemiában a thrombocyta-retenció csökkent, a filter későn, vagy nem záródik.

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

Eredményeink szerint elsősorban a citrátos minták R-II értéke alkalmazható screening tesztként. A záró cseppszám és az R-I kevésbé szenzitív.

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

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

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

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

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

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

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

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

Feltételezésünkkel összhangban, irodalmi adatok szerint is valószínűsíthető „sajátos” quantitativ és qualitativ thrombocytá-anomália myeloproliferatív betegségekben.

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

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

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

Ismert módon a cyclosporin A önmagában alig diabetogén, steroiddal együtt adva azonban kifejezetten azzá válik. Kombinált (steroid + CyA) kezelés estén potenciózzák egymás diabetogén, endothel- és fibrinolysis károsító hatását. PTDM-ben nagy PAI-1 értékeket mértünk, amely hypofibrinolysist jelez. A transzplantációtól eltelt idő és az

endothel-károsodás, ill. a fibrinolysis csökkenése közötti korreláció a tartósan steroidot is tartalmazó immunsuppressziós kezelés toxicitására, a hosszan tartó steroid-kiegészítésnek a szövődmények kialakulására és progressziójára gyakorolt jelentős hatására hívja fel a figyelmet. A hypofibrinolysis az allograft működésének romlásához, krónikus graft-elégtelenség kialakulásához, vascularis rejectióhoz, valamint fokozódó atherosclerosishoz vezethet.

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

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

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

Az allogén csontvelő-átültetés és az INF-kezelés megváltoztatta és perspektivikusabbá tette a CML kezelését. Reálissá vált a háttérben álló genetikai anomália befolyásolása, a betegek túlélése hosszabb lett. A citogenetikai válasz minősége fontos, független, túlélést befolyásoló prognosztikai tényezőnek bizonyult. A citogenetikai válasz korrelál a

túléléssel: jobb citogenetikai válasz esetén hosszabb túlélés várható. Az újabban alkalmazott Glivec kezelés mellett a túlélés várhatóan tovább javul, ennek pontos megítélése azonban (az idő rövidsége miatt) még nem lehetséges. Ugyanígy, az imatinib-kezelés eredményeként kialakuló citogenetikai válasz prediktív értékét sem lehet még pontosan megítélni. A fentiek logikus következményeként a bcr/abl transzlokáció pontos kimutatása (a betegség felismerésekor és követése során egyaránt) rendkívül fontossá vált. Vizsgálataink alapján a bcr/abl átrendeződés FISH-vizsgálatának gyakorlati jelentősége a következőkben foglalható össze:

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

CML-hez hasonlóan a FISH-technika AML-ben és ALL-ben is jól alkalmazható a bcr/abl átrendeződés vizsgálatára, valamint AML M3-ban a diagnosztikus t(15;17)

kimutatására és ennek (azaz a betegek citogenetikai) követésére. Ugyanígy fontos szerepe lehet heveny leukaemiákban a numerikus (és struktúrális) kromoszóma anomáliák feltérképezésében. Annak ellenére, hogy CLL-es betegeink között csak egy esetben észleltünk kromoszóma-eltérést (raritásként a hetedik kromoszóma triszómiáját), a későbbiekben a FISH-vizsgálatok folytatását tervezzük CLL-ben is, amelytől a betegek kezelését befolyásoló, egyben prognosztikai jelentőségű genetikai eltérések pontosabb kimutathatóságát várjuk.

Összességében tehát a már alkalmazott (és terveink szerint a későbbiekben matrix-CGH-val is kiegészítendő) molekuláris biológiai vizsgálatokat a rosszindulatú vérképző szervi betegségekben szenvedő betegeink ellátásának javítására kívánjuk felhasználni. A fentieken túlmenően választ keresünk arra az újabb feltételezésre, hogy a Glivec valóban eredményezhet-e genetikai instabilitást, s ez hogy viszonyul bizonyos kedvezőtlen citogenetikai prognosztikai faktorok (pl. 9q del) jelenlétéhez. A genetikai instabilitás vizsgálatára a FISH-technika is jól alkalmazható: az accelerációra utaló citogenetikai eltérések (pl. +8, +19, +21, i(17q), dupla Ph-kromoszóma) megfelelő (pl. centroméra-specifikus, locus-specifikus) szondákkal pontosan vizsgálhatóak és követhetőek. A matrix-CGH hatékonyabbá teheti a terápia (pl. Glivec) refrakteritásra predisponáló genotípus felismerését, ill. a klonális evolúció követését. A CML-en túlmenően myeloma multiplexben, CLL-ben, ill. heveny leukaemiákban is a genetikai prognosztikai faktorok teljesebb és pontosabb felismerését várjuk, amely a kezelés árnyaltabbá tételét, a rizikó-adaptált kezelés teljesebbé tételét vonja maga után.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. A myeloproliferatív betegségekben észlelhető thrombocytosisok elkülönítése a reaktív thrombocytosisoktól időnként komoly differenciális diagnosztikai gondot okoz. A primer és szekunder thrombocytosisok elkülönítésére magunk a hazánkban még kevésbé ismert O'Brien-féle filter-tesztet vizsgáltuk. Antikoagulánsként citrátot használva az O'Brien-féle filter-teszt (R-II értékének) szenzitivitása 77.1%-nak, specificitása 94.4%-nak

bizonyult. Eddigi vizsgálataink alapján az O'Brien-féle filter-teszt hasznos a nagy thrombocyta-számmal járó állapotok elkülönítő diagnosztikájában. Normális eredmények esetén elsősorban a reaktív thrombocytosisok ismert okait célszerű keresni, míg kóros eredmények esetén a beteg haematologiai kivizsgálása is indokolt. A filter-teszt alkalmazását (PFA-val együtt) a terápia megtervezéséhez, (a megfelelő gyógyszer, vagy gyógyszer-kombináció kiválasztáshoz) is tervezzük.

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

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

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

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

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

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

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

A TÉZISEKHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Rejtő L., Schlammadinger Á., László P., Kiss A., Telek B., Boda Z.: A nagy thrombocyta-számmal járó kórképek elkülönítése az O'Brien-féle filter-teszt segítségével. Orv. Hetil., 139: 1961-1964, 1998.
2. Rejtő L., Schlammadinger Á., László P., Kiss A., Telek B., Boda Z.: Use of a platelet filter test in patients with thrombocytosis. Platelets, 11: 64-68. 2000. Impakt factor: 0.882
3. Rejtő L., Balázs M., Ádány R., Rák K., Telek B., Kiss A., Ujj Gy., Mezei G., Balogh E., Udvardy M.: Fluoreszcencia in situ hibridizációval szerzett tapasztalataink a krónikus myeloid leukaemia diagnosztikájában és követésében. Orv. Hetil. 141: 2133-2137, 2000.
4. Rejtő L., Huszka M., Káplár M., Udvardy M.: Effects of in vitro platelet activation on platelet derived nitric oxide production in healthy humans and in chronic myeloproliferative diseases with elevated platelet counts. Platelets, 14: 283-286, 2003. Impakt factor: 1.477

EGYÉB, A TÉZISEKHEZ SZOROSAN NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Rejtő L., Telek B.: Akut leukaemiák kiegészítő (szupportív) kezelése. Magy. Belorv. Arch. 44: 241-245, 1991.
2. Kiss J., Telek B., D. Tóth F., Rejtő L., Surányi P., Rák K.: HTLV-related markers in a hungarian patient with adult T-cell leukemia. Leuk. Res., 16: 1125-1131, 1992. Impaktfaktor: 1.479. Citáció: 1
3. Telek B., Kiss J., D. Tóth F., Krasznai G., Ujj Gy., Rejtő L., Kiss A., Rák K.: Eosinophil leukaemia: Philadelphia chromosoma negatív krónikus myeloid leukaemia ritka formája? Orv. Hetil., 135: 1087-1089, 1994. Citáció: 1.
4. Rejtő L., Kiss A., Telek B., Rák K.: Az akut promyelocytás leukaemia tretinoin kezelése. Magy. Belorv. Arch. 47: 491-493, 1994.
5. Telek B., Kiss A., Ujj Gy., Rejtő L., Batár P.: A myeloma multiplex klinikuma és diagnosztikája. Magy. Belorv. Arch. 50: 45-50, 1997.
6. Ujj Gy., Telek B., Rejtő L., Batár P., Kiss A.: A myeloma multiplex szövődményei. Magy. Belorv. Arch. 50: 50-56, 1997.

7. Boda Z., László P., **Rejtő L.**, Tornai I., Pfliegler Gy., Rák K.: Thromboembolia prophylaxis kis molekulatömegű heparin alkalmazásával thrombophiliás terhesekben. Orv. Hetil., 137: 183-185, 1996.
8. Boda Z., László P., **Rejtő L.**, Tornai I., Pfliegler Gy., Rák K.: Low molecular weight heparin as thromboprophylaxis in familial thrombophilia during the whole period of pregnancy. Thromb. Haemost., 76: 124-128, 1996. Impaktfaktor: 4.267. Citáció: 2.
9. Huszka M., Káplár M., **Rejtő L.**, Tornai I., Palatka K., László P., Udvardy M.: The association of reduced endothelium derived relaxing factor-NO production with endothelial damage and increased in vivo platelet activation in patients with diabetes mellitus. Thromb. Res., 86: 173-180, 1997. Impaktfaktor: 1.461. Citáció: 19.
10. **Rejtő L.**, Kiss A., Telek B., Ujj Gy., Udvardy M., Vitális Zs., Rák K.: Az essentialis thrombocythaemia kezelésével szerzett tapasztalataink. Magy. Belorv. Arch., 51: 112- 116, 1998.
11. Udvardy M., **Rejtő L.**, Káplár M., Pfliegler Gy., Altorjay I.: A gliplizid serkenti az in vitro plazminogengenerációt és az alvadékképződést. Magy. Belorv. Arch., 51: 117-121, 1998.
12. **Rejtő L.**: Az interferon- α szerepe a polycythaemia vera és az esszenciális thrombocythaemia kezelésében. Magy. Belorv. Arch., 51: 409-415, 1998
13. Boda Z., László P., Pfliegler Gy., Tornai I., **Rejtő L.**, Schlammadinger Á.: Thrombophilia, antikoaguláns terápia és terhesség. Orv. Hetil., 139: 3113-3116, 1998.
14. Altorjay I., Palatka K., Vitális Zs., **Rejtő L.**, Györffy Á., Udvardy M.: Felső tápcsatornai vérzések korszerű ellátása erre specializált gastrointestinális részlegen. Orv. Hetil., 139: 2121-2126, 1998.
15. Telek B., Kiss A., Ujj Gy., **Rejtő L.**, Kappelmayer J., Batár P., Nemes Z., Rák K.: A "hajás" sejtes leukaemiáról: saját tapasztalatok (1977-1998). Orv. Hetil., 140: 987-991, 1999.
16. Udvardy M., Káplár M., **Rejtő L.**, Tornai I., Palatka K., László P., Huszka M.: Increased in vivo platelet activation and reduced intravascular endothelium-derived relaxing factor and nitrate/nitrite production in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. Platelets. 9: 257-260, 1998. Impaktfaktor: 0.736. Citáció: 2.
17. Huszka M., Káplár M., **Rejtő L.**, Palatka K., Udvardy M.: Csökkent intravascularis endotheleredetű NO (nitrát/nitrit)-termelés összefüggése az endothelkárosodással és a fokozott thrombocyta-aktivációval diabetes mellitusos betegekben. Diab. Hung. 7: 31-36, 1999.
18. Boda Z., László P., Pfliegler Gy., Tornai I., **Rejtő L.**, Schlammadinger Á.: Low molecular weight heparin as thromboprophylaxis throughout pregnancy in heritable thrombophilic women. Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis, 5: 198-199, 1999. Impaktfaktor: 0.659.

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

Összesített impakt faktor: 18.264

Összesített citáció: 63

A TÉZISEKHEZ KAPCSOLÓDÓ, ELSŐ SZERZŐKÉNT BEMUTATOTT KONGRESSZUSI ANYAGOK

1. Rejtő L., Káplár M., Tornai I., Boda Z., Rák K., Udvardy M.: A solubilis thrombomodulin az ér-szövődmények markere diabetes mellitusban. Északkelet Magyarországi Belgyógyász Szakcsoport Ülés, Eger, 1995.
2. Rejtő L., Káplár M., Tornai I., Boda Z., Rák K., Udvardy M.: Soluble thrombomodulin as a marker of diabetic vascular complications. Krakko, 1995. Okt.
3. Rejtő L., Schlamadinger Á., László P., Kiss A., Telek B., Boda Z.: A nagy thrombocyta-számmal járó állapotok jellemzése az O'Brien-féle filter-teszt segítségével. Magyar Thrombosis és Haemostasis Társaság IV. Kongresszusa, Szeged, 1997. Okt.
4. Rejtő L., Káplár M., Huszka M., Szabó K., Udvardy M.: Komplex endothelium-funkció vizsgálatok a vasculáris eredetű diabeteses szövődményekben. Magyar Diabetes Társaság XIV. Kongresszusa, Eger, 1998. Ápr.
5. Rejtő L.: A citogenetika, a komparatív genom és egyéb hibridizációs technikák jelentősége a klinikai haematológiában. Magyar Belgyógyász Társaság XXXVII. Nagygyűlése, 1998. Nov. Budapest. (referátum)
6. Rejtő L., Huszka M., Gerő L., Földes K., Udvardy M.: A szérum plasminogén aktivátor inhibitor 1 (PAI-1), szöveti plasminogén aktivátor (tPA), béta-thromboglobulin (β -TG) és thrombomodulin szintek változása a vesetranszplantáció után tartós immunszuppresszív kezelésben részesülő cukorbetegekben. Országos Haemostasis Konferencia, Alsópáhok, 1999. nov.
7. Rejtő L., Balázs M., Rák K., Telek B., Kiss A., Ujj Gy., Mezei G., Udvardy M.: A fluorescentia in situ hibridizáció (FISH) jelentősége a krónikus granulocytás leukaemia (CGL) diagnosztikájában, követésében - saját tapasztalatok. XVII. Magyar Haematologiai Kongresszus, 1999, Budapest. (poszter)
8. Rejtő L., Balázs M., Rák K., Telek B., Kiss A., Ujj Gy., Mezei G., Udvardy M.: Fluorescentia in situ hibridizációval (FISH) szerzett tapasztalataink krónikus myeloid leukaemia (CML) diagnosztikájában és követésében. Északkelet-Magyarországi Belgyógyász Szakcsoport Ülés, Miskolc, 1999.
9. Rejtő L.: Idült myeloid leukaemia. Debrecen DAB, 2000. márc. 27.
10. Rejtő L., Balázs M., Telek B., Kiss A., Udvardy M.: Fluoreszcencia in situ hibridizációval szerzett tapasztalataink a krónikus myeloid leukaemia diagnosztikájában és követésében. Szeged, Fiala Haematologusok Fóruma, 2000. Ápr.
11. Rejtő L., Balázs M., Telek B., Kiss A., Szász R., Mezei G., Udvardy M.: Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the diagnosis and follow-up of chronic myeloid leukemia (CML). 5. EHA Kongresszus, 2000. Jun., Birmingham. (poszter).

12. **Rejtő L., Huszka M., Jenei E., Káplár M., Udvardy M.:** Az in vitro thrombocyt-aktiváció hatása a thrombocyt-eredetű NO termelésre egészséges emberekben és nagy thrombocyt-számmal járó krónikus myeloproliferatív betegségekben. Északkelet-Magyarországi Belgyógyász Szakcsoport Ülész, 2000. Okt., Debrecen.

13. **Rejtő L., Huszka M., Káplár M., Udvardy M.:** Az in vitro thrombocyt-aktiváció hatása a thrombocyt-eredetű NO termelésre egészséges emberekben és nagy thrombocyt-számmal járó krónikus myeloproliferatív betegségekben. 2001. ápr., Debrecen. (TDK és PhD konferencia).

14. **Rejtő L.:** CGH. („Innovatív haematologia” szimpózium, DAB, 2002. Nov.7, Debrecen).

NEMZETKÖZI FOLYÓIRATBAN MEGJELENT IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK

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

Eiben Gy., Huszka M., Rejtő L., Káplár M., Palatka K., Tornai I., Udvardy M.: Monitoring the antioxidant status in liver diseases and patients with diabetes mellitus Zeischrift fürGastroenterologie, German Jurnal of Gastroenterology Band, XXXV 1997, 35: 374. Impact Faktor : 1.021

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

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