

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**ÁRAMLÁSI CITOMETRIAI MARKERVIZSGÁLATOK
OPTIMALIZÁLÁSA HEMATOLÓGIAI KÓRKÉPEKBEN**

Dr. Kiss Flóra

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézet

Témavezetők:

Dr. Kappelmayer János

egyetemi docens

Dr. Hevessy Zsuzsanna

egyetemi adjunktus

Debrecen, 2007

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés.....	5
Irodalmi áttekintés	7
Metodikák.....	19
Eredmények.....	28
Megbeszélés	47
Összefoglalás	57
Irodalomjegyzék	58
Tárgyszavak	74
Köszönetnyilvánítás	75
Függelék	77

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC	antibody binding capacity
ACT	antibody competition test
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
ALL	akut limfoblasztos leukémia
AML	akut mieloid leukémia
APC	allo-fikocianin
CD	„cluster of differentiation”
CLPD	krónikus limfoproliferatív betegség
CMMoL	krónikus mielomonocitás leukémia
DMEM	„Dulbecco Modified Eagle Medium”
ECL	elektro-kemilumineszcencia
FITC	fluoreszcein izo-tiocianát
FSC	„forward scatter”
Gp	glikoprotein
GPI	glikozil-foszfatidil-inozitol
HBSS	„Hanks Balanced Salt Solution”
IgV(H)	immunglobulin-nehézláncgén variábilis régiója
Kalcein-AM	kalcein-acetoximetilészter
LAIP	leukémia asszociált immunfenotípus
LIBS	„ligand induced binding site”
MAF	multidrog rezisztencia aktivitási faktor
MDR	multidrog rezisztencia

MESF	„molecules of equivalent soluble fluorochrome”
MFI	„mean fluorescence intensity”
MPO	mieloperoxidáz
MRD	„minimal residual disease”
PBS	„phosphate buffered saline”
PE	fikoeritrin
PE-Cy5	fikoeritrin-cianin5
PerCP	peridin klorofill protein
PFA	paraformaldehid
Pgp	P-glikoprotein
PI	propidium jodid
PNH	paroxizmális nokturnális hemoglobinuria
PV	perifériás vér
QIFI	kvantitatív indirekt immunofluoreszcencia
RFI	relatív lineáris fluoreszcencia intenzitás
SSC	„side scatter”
TBS	„tris buffered saline”
TdT	terminális dezoxiribonukleozil transzferáz
TTBS	„tris buffered saline, tween”
Vp	verapamil
vvt	vörösvértest
Zap-70	zeta-asszociált protein

BEVEZETÉS

A laboratóriumi vizsgálat 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-specifititás meghatározását, valamint a sejtek érettségi fokának, a sejtpopuláció heterogenitásának és a normál sejtektől való fenotípusbeli eltérésének megítélését. A kórismezésben betöltött szerepén túl a patológias sejtek immunológiai és genetikai tulajdonságainak ismeretében válik lehetővé a remisszió azonosítása, valamint a minimális reziduális betegség („minimal residual disease”: 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.

Értekezésemben 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. Az új megfigyelések és alkalmazások ismertetése mellett rövid irodalmi áttekintést adok a sejtfelszíni és intracelluláris antigénekről és azok jelentőségéről néhány hematológiai kórképben.

Céлом ezen sejtfelszíni és intracelluláris markerek vizsgálatának optimalizálása, valamint az áramlási citometriai vizsgálat objektivitásának növelése az eredmények kvantitatív megjelenítése által. Majd ezen technikák alkalmazása klinikai mintákon, illetve diagnosztikailag felhasználható vagy prognosztikai szempontból jelentős új markerek keresése leukémiában. Törekedtem a módszertől függő lehető legideálisabb szenzitivitás és specificitás elérésére munkám során.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Sejtfelszíni fehérjék

A sejthártya fő szerkezeti és funkcionális részei a lipid kettős réteg és az abban elhelyezkedő változatos fehérjék amelyek jól strukturált, dinamikus rendszert alkotnak (1,2). A membránfehérjék aminosav összetétele és térszerkezete heterogén, melyek alapján öt nagy csoportba sorolhatók. Az I-es típusú transzmembrán fehérjék karboxi-terminális része az intracelluláris kompartment felé irányul és általában sejtfelszíni receptor és/vagy ligand funkciót töltenek be. A II-es típusú transzmembrán fehérjék fordított orientációjúak, ugyanis az amino-terminális vég néz az intracitoplazmatikus rész felé. A III-as típusú transzmembrán fehérjék a lipid kettősréteget többszörösen ívelik át, aminek következtében csatornákat képezhetnek ionok és kis molekulák transzportálására a sejtmembránon át. Ebbe a csoportba tartoznak a multidrog rezisztencia (MDR) fehérjék (3,4). Ugyancsak ezen család tagjai a membránt 4 alkalommal átívelő „tetraspan” fehérjék, melyeknek intracellulárisan található a karboxi- és az amino-terminális vége is (5). A IV-es típusú transzmembrán fehérjék hidrofil transzmembrán csatornákat tartalmaznak. Az V-ös típusú membrán fehérjék lipidek által kötődnek a plazmamembrán külső részéhez, esetenként glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) közvetítésével (6) (1. ábra). Ilyen GPI-horgonyzott fehérje a CD14, CD55 és a CD59. Ezen fehérjék GPI rögzítésének bioszintézise károsodott paroxizmális nokturnális hemoglobinuriában (PNH).

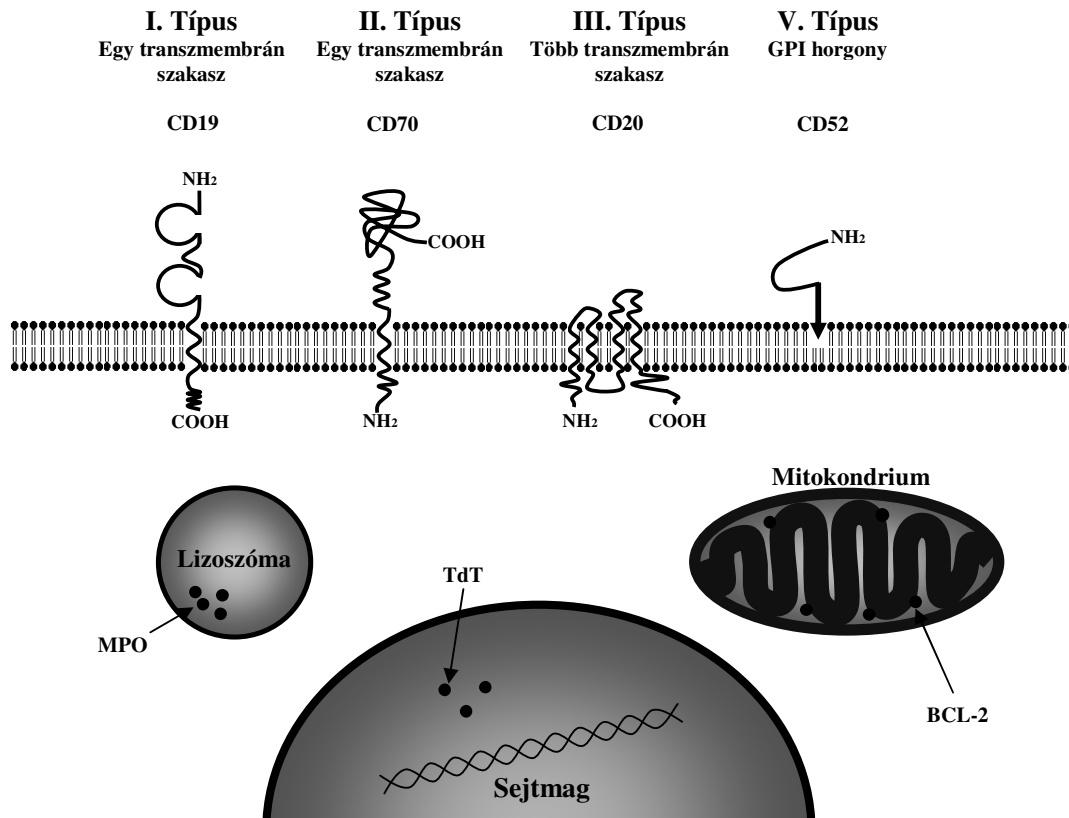
A membrán antigének az úgynevezett „cluster of differentiation” (CD) beosztás alapján kerültek a mindennapi gyakorlat számára is jól átlátható, rendszerezett formába (7-9). Ekkor látták el egységes számozással az addig véletlenszerűen elnevezett

membránstruktúrákat. Ezen CD besorolás az elmúlt évtizedekben teljes mértékben elfogadottá vált és egyes intracelluláris fehérjékre is kiterjed. Négy fő csoportba sorolhatjuk a ma ismert több mint 330 CD markert (10). A CD markerek legnagyobb része az I-es típusú transzmembrán fehérjék csoportjába, kevesebb a II-es és III-as típusúhoz tartozik, valamint van néhány, ami GPI horgonyzott (1. ábra).

Intracelluláris antigének

A sejten belüli antigének in situ detektálása általában immunfluoreszcens technikákkal morfológiai alapon, különféle mikroszkópos vizsgálatok segítségével történik, melynek során antigén feltárás elvégzése is történhet, amikor a mintaelőkészítés során károsodott vagy maszkírozottá vált epitópok regenerálása történik (11). A sejten belül a diagnosztikai szempontból lényeges intracelluláris markerek lokalizációja változatos. Megtalálhatók a sejtmagban mint pl. a terminális dezoxiribonukleozil transzferáz (TdT), a mitokondriumban (bcl-2), a granulociták primer granulumaiban (mieloperoxidáz: MPO) (1. ábra), a trombociták alfa-granulumaiban (P-szelektin), vagy lehetnek citoplazmatikus elhelyezkedésűek mint pl. a CD3 a T limfocitákban vagy a véralvadás XIII-as faktorának "A" alegysége a trombocitákban és a monocitákban. A hemopoetikus sejtek antigénjeinek döntő többsége intracellulárisan található, mégis a legtöbb rutin vizsgálat során kizárólag a sejtfelszíni markerek analízise történik meg, pedig az intracelluláris antigének vizsgálata malignus hematológiai betegségek, különösen akut leukémia kapcsán kiemelkedően fontos. A kóros sejtvonal ("lineage") legmegbízhatóbb meghatározására az intracitoplazmatikus markerek szolgálnak, amelyek általában már a felszíni markerek megjelenése előtt kimutathatóak (12,13). Különösen fontos a sejtvonal meghatározás a morfológiailag differenciálatlan és a kevert immunfenotípusú leukémia esetében. Az utóbbiban a leukémia sejtek egyszerre több sejtvonalra

karakterisztikus markert exprimálnak. A valódi bifenotípusos leukémia jól definiált pontrendszer alapján határozható meg (14).



1. ábra: A sejtfelszíni és intracelluláris fehérjék fajtái és változatos elhelyezkedésük. Az ábra felső része az extracelluláris teret, az alsó része az intracelluláris teret mutatja.

Celluláris antigének vizsgálata antitesttel történő jelöléssel áramlási citometriával

Az antitestekkel való jelölés lehet direkt, amikor a fluoreszkáló festékmolekula kovalensen kötött az immunglobulinhoz úgy, hogy annak antigénkötő részének specifikitását és kapcsolódási képességét nem befolyásolja. Indirekt jelölés esetén a vizsgált antigén ellen irányuló immunglobulin (első antitest) jelöletlen és a rendszerhez egy következő lépésben adjuk az előbb említett, első antitest ellen irányuló fluorofórral jelzett második antitestet. A mérések eredményeit megjeleníthetjük úgynevezett felhőképek („dot plot”) vagy hisztogramok segítségével. A vizsgált antigének ellen

gyakran többféle antitest klón áll rendelkezésre, melyek specificitása és szenzitivitása eltérő. Az alkalmazott fluoreszcens festékek is befolyásolhatják a jelölés érzékenységét, hiszen kémiai és fizikai tulajdonságaik igen változatosak. Az intracelluláris markerek meghatározásához áramlási citometriai analízis esetén a sejtek permeabilizálása szükséges, amely befolyásolhatja a vizsgálat szenzitivitását és specificitását is (15,16). A permeabilizáló szer leginkább szaponin alapú detergens. Alkalmazásához először fixálni kell a sejtuszpenziót, mely célra általában paraformaldehidet használunk (17). Újabban másféle, fizikai elven működő permeabilizálási eljárásokra, így mikrohullámmal történő kezelésre is van lehetőség (18), melynek során szintén paraformaldehidben fixált sejteket használunk. A pozitív és negatív sejtek elkülönítése történhet autofluoreszcens minta vagy izotípus kontroll segítségével. Az utóbbi technika során a jelölő antitesttel azonos immunglobulin családba tartozó, ám releváns antigén-specificitással nem rendelkező anti-humán antitestet használunk, amely a jelölő antitesttel azonos fajból származik. Az intracelluláris markerek meghatározásánál nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a fixálás és permeabilizálás során, a membrán átjárhatóságának növelésével megváltozhatnak a sejtek fényszórási tulajdonságai és autofluoreszcenciájuk (19).

További lehetőséget kínál az antitestekkel történő vizsgálatra a konformáció változáson alapuló antigén meghatározás. Erre alkalmas az úgynevezett „ligand-induced binding-site” (LIBS) detektálása áramlási citometriával. A sejtek aktivációja bizonyos receptorokban konformáció változást indukál, ily módon az eredetileg rejtett antigén hozzáférhetővé válik az antitest számára. Az egyik leggyakrabban LIBS módszerrel analizált molekula az integrinek családjába tartozó trombocita glikoprotein IIb/IIIa, amelynek esetében az említett eljárás nem csupán diagnosztikus szempontból fontos (20,21). Az antitest kompetíciós teszt (antibody competition test: ACT) során

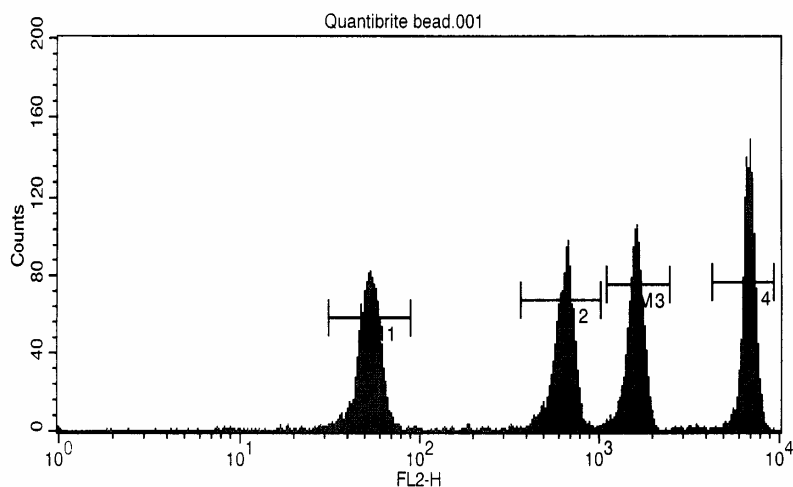
különböző monoklonális ellenanyagok megváltoztatják egymás kötődését ugyanazon antigénhez. Erre bizonyos sejtfelszíni receptorok, pl. a P-glikoprotein (Pgp) szubsztrátjai/modulátorai által okozott konformációs változások szolgáltatnak példát (22).

Funkcionális tesztek

A membránfehérjék egy részénél az immunológiai kimutatás nem mindig célravezető, mert azok vagy túl alacsony kópiaszámban vannak jelen vagy nem rendelkezünk megfelelő antitesttel a vizsgált molekula extracelluláris doménjével szemben. Előfordul olyan helyzet is, hogy a protein jelenléténél sokkal lényegesebb annak funkcionális aktivitása. Ide tartoznak bizonyos membrán transzporterek, amelyek számos molekulát távolítanak el a sejtől aktív pumpafunkcióval (23), így a malignus hematológiai kórképek kezelésében alkalmazott többféle citosztatikumot, miáltal a sejt – illetve a beteg - ezekkel szemben rezisztensé válik. Ez a hatás felelős az MDR kialakulásáért (24,25). A marker vizsgálatok diagnosztikus szerepével szemben az MDR jelenség detektálása főleg terápiás és prognosztikai szempontból fontos. A fehérjék tényleges működésével, ezáltal a várható klinikai kimenetellel az úgynevezett funkcionális tesztek korrelálnak leginkább, hiszen ennek során a fehérjék által kifejtett transzport aktivitás mérhető (26). Ilyen módszer esetén fluoreszcens szubsztrátokat alkalmazunk és vagy a kiáramlást (effluxot), azaz az intra-és extracelluláris tér között megoszló fluoreszcenciát mérjük a disztribúciós típusú esszéiben, vagy az úgynevezett akkumulációs típusú tesztekben a sejten belül felhalmozódó fluoreszcenciát detektáljuk.

Kvantitatív áramlási citometria

Az áramlási citometria kvantitatív meghatározások elvégzésére is alkalmas módszer. Régóta használt a jelölődési intenzitás különbségeire a „dim” (gyenge) illetve „bright” (intenzív) kifejezés. Később egzakt antigénszám megadása is lehetővé vált kalibrációs gyöngyök (bead) segítségével (2. ábra).



2. ábra: Kvantitatív áramlási citometriai vizsgálatra alkalmas gyári kit (Quantibrite, BD) kalibrációs gyöngyeinek az FL-2 csatornán mért fluoreszcencia intenzitása. Az analizált sejtek fluoreszcencia intenzitását ugyanazon beállítások mellett meghatározva a vizsgált sejtfelszíni antigének száma kiszámítható.

Meghatározhatjuk a vizsgálandó sejtpopuláció sejtein adott antigén kifejeződésének mértékét, azaz az exprimált molekula pontos számát (molekula/sejt egységben), valamint egy adott mintában adott sejtpopuláció sejteinek pontos számát (sejt/ μ L egységben) is. Több metodikát írtak le az irodalomban antigén kvantitálásra, így a relatív lineáris fluoreszcencia intenzitást (RFI) (27), amely mesterséges egységként több fluoreszcens mérés összehasonlítására is alkalmas ha belső standardot használunk, vagy ha minden mérés ugyanazon a citométeren történt azonos beállításokkal („setting”).

Másik lehetőség a kvantitatív analízisre a MESF (molecules of equivalent soluble fluorochrome) használata (28). Ez egy abszolút érték, amelyben gravimetriailag meghatározott tömegű fluorokróm fluoreszcencia intenzitásához hasonlítjuk a vizsgált sejtek fluoreszcencia intenzitását. A MESF használható ha különböző készülékek közötti fluoreszcenciát akarunk összehasonlítani, de fontos, hogy ugyanazon konjugátumokat alkalmazzuk. Az antitest kötő kapacitás (antibody binding capacity: ABC) a kötődő antitestek számát határozza meg (29). Indirekt módszer a kvantitatív indirekt immunofluoreszcencia (QIFI) (30), amely során ismert mennyiségű antitesttel fedett és azonos második antitesttel jelölt kalibrációs gyöngyöket kell használnunk. Kereskedelmi forgalomban számos olyan kit kapható, amely a fent említett elvek egyikén alapulva alkalmas különböző antigének pontos számának sejteken történő meghatározására.

A kvantitatív áramlási citometria legfőbb alkalmazási területei napjainkban: CD4+ abszolút sejtszám meghatározás AIDS-es betegek mintáiban (31), CD34 abszolút sejtszám meghatározás hemopoetikus őssejt transzplantáció során (32,33), reziduális blasztok abszolút számának megadása MRD vizsgálat során (34). A sejtfelszíni antigének kvantitatív meghatározására lehet szükség trombocitopátiák, így Glanzmann trombaszténia (35,36) és Bernard-Soulier szindróma (37) diagnosztikájában, ahol a trombocita felszíni glikoproteinek hiánya vagy csökkent expressziója áll a háttérben. PNH-ban a GPI-horgonyzott fehérjék kifejeződésének teljes vagy részleges hiánya áll fenn (38,39). A PNH a pluripotens őssejt szerzett megbetegedése, a háttérében a PIG-A gén szomatikus mutációja áll. Ez a gén felelős a GPI horgony szintéziséért, melynek több felszíni receptor rögzítésében van szerepe. A PNH kialakulásához két tényező együttes meglétére van szükség, az egyik a mutált őssejt, a másik a hipoplasztikus csontvelői környezet. Régebben a PNH-t a Ham-teszt vagy a szukróz hemolízis teszt

segítségével diagnosztizálták. Ezen tesztek alapja a PNH-s vvt-k hemolízissel szembeni fokozott érzékenysége komplement aktivációt követően. Az utóbbi időben az áramlási citometria lépett elő a PNH standard vizsgálati módszerévé (40-42). A módszer előnye, hogy nem-hemolizáló betegekben 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. A felszíni receptorok pontos mennyiségének ismeretében a deficiencia súlyossági foka megadható, ami a kezelés illetve a betegség prognózisa szempontjából fontos lehet.

Normál és leukémia sejtek közt szintén igazoltak kvantitatív eltéréseket több marker kifejeződésében (43-45). Legújabban a szepszis laboratóriumi diagnosztikájában kezdték jó eredményekkel alkalmazni a neutrofil leukociták CD64 kifejeződésének kvantitatív meghatározását (46).

Malignus hematológiai kórképek immunfenotípus vizsgálata áramlási citometriával

A leukémia különböző csoportjainak immunfenotípus vizsgálata, a „leukémia tipizálás” a diagnosztikai fejlődésben kulcsfontosságú volt, mivel a korábban kizárólagosan alkalmazott morfológiai és citokémiai vizsgálatok értékelése jelentős mértékben függ a vizsgáló gyakorlatától és gyakran meglehetősen szubjektív. 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 reziduális betegség keresésekor akár 0,5-1 millió sejt analízisére is sor kerülhet (34). További felbecsülhetetlen előny, hogy az immunfenotípus meghatározása során a leukémiás populáció olyan molekuláinak minőségi, szükség esetén mennyiségi vizsgálatára kerül sor, amelyre a hagyományos panoptikus festés, illetőleg citokémiai reakciók nem nyújtanak lehetőséget.

A fenotípus vizsgálatokat kezdetben indirekt, majd direkt immunfluoreszcencia módszerrel végezték. Az alkalmazott antitest először poliklonális volt, később a monoklonális antitestekkel végzett jelölés terjedt el egyetlen fluorofor fluoreszcencia intenzitását vizsgálva. Ezt az eljárást igen hamar felváltotta a 2- színű (FITC és PE) konjugált antitestekkel történő analízis, mely sokáig "gold-standard"-ként működött. Később az újabb fluoroforok és áramlási citométerek kifejlesztésével a „multikolor” analízis vált elfogadott módszerré a leukémiák fenotípus vizsgálatában (47,48). Az újabb nemzetközi protokollok általában 4 színű analízist és a felszíni antigének mellett intracelluláris (cy) markerek vizsgálatát ajánlják akut leukémiában (48). Erre a sejtvonal meghatározása miatt van szükség (így az MPO a mieloid leukémia, a cyCD79a a B-sejtvonal, a cyCD3 a T-sejtvonal ALL „konszenzus” markere), de a módszer lehetővé teszi a sejtek érettségi állapotának pontosabb jellemzését is (így a TdT intranukleáris kifejeződése a korai B-sejt progenitor ALL jellegzetessége). Jelenleg akár 10 szín egyidejű analízise is kivihető benchtop áramlási citométereken. Ilyen adatmennyiség feldolgozása azonban már nem lehetséges a hagyományos 2 dimenziós dot-plot megjelenítés mellett, hanem újabb szoftveres megoldásokat igényel.

A leukémiák immunfenotípus vizsgálatának több célja van. A diagnózis felállításakor a fő elvárás a sejtvonal identifikálása (49). Az áramlási citometriás módszer alkalmazásának különösen differenciálatlan leukémiák esetén van igen fontos, a kezelést is meghatározó szerepe. Ezen túlmenően fontos a kóros koexpressziós mintázat, a leukémia-asszociált immunfenotípus (LAIP) azonosítása, (50-54), valamint a patológiás sejtek érettségi fokának megítélése. A LAIP azonosításának MRD vizsgálat kapcsán kiemelkedő jelentősége van, hiszen a diagnóziskor észlelt kóros fenotípusú populáció kimutatására törekszünk a beteg későbbi mintáiból. Az aberráns fenotípus gyakran sejtvonal promiszkuitás vagy más néven „cross-lineage” antigén expresszió

formájában nyilvánul meg. Ekkor a leukémia sejtekben az egészséges hemopoetikus sejtek sejtvonalspecifikus markereitől eltérő differenciálódási antigének fejeződnek ki pl. CD13 vagy CD33 mieloid antigén expresszió prekursor B-sejtes ALL-ben (55), vagy CD7 T-sejt marker pozitivitás mieloblasztokban (56). Aszinkron differenciáció esetén ugyanazon sejtvonalon különböző érési stádiumaira jellemző markerek együttes kifejeződése figyelhető meg a kóros sejtekben, így CD10 és CD20 antigének koexpressziója érett B-sejtes ALL-ben (57), vagy CD117/CD15 koexpresszió AML-ben (58). Az antigén overexpresszió egy fiziológiásan is megjelenő marker kóros mértékű, intenzív kifejeződése, amelyre az egyik legszembetűnőbb példa a CD10 overexpressziója prekursor B-sejtes ALL-ben.

Gyermekekori akut limfoblasztos leukémiában az indukciós és a konszolidációs kezelési fázisok különböző időpontjaiban vett csontvelői mintából végzett vizsgálatok az MRD kimutatására, valamint az abszolút blaszt szám meghatározására irányulnak (34). Az MRD meghatározásnak napjainkban már nem csupán diagnosztikai értéke van, hiszen ezeket az adatokat több munkacsoport figyelembe veszi a klasszikus prognosztikai besorolási kritériumok mellett, amelyek alkalmazásával igen heterogén rizikócsoporthoz hozhatók létre. Az MRD meghatározásra alkalmas módszerek közül az igen szenzitív beteg specifikus genetikai eltéréseket vizsgáló PCR és szekvenálás eljárásokat használják a gyakorlatban (59,60), de néhány nemzetközi munkacsoport ajánlása szerint az áramlási citometriával gyorsabban, olcsóbban és ugyancsak megbízhatóan azonosított reziduális blaszt arány is erőteljes és független prognosztikai információt szolgáltat ALL-ben (34,61). Többben a két módszer együttes alkalmazását javasolják (62) a fals negatív eredmények elkerülése érdekében, melynek oka lehet pl. fenotípus „shift” (63).

Nemcsak akut, hanem krónikus leukémiák esetén is vannak áramlási citometriai technikával meghatározható, prognosztikai szempontból jelentős markerek, mint pl. a sejtfelszíni CD38 vagy az intracelluláris Zap-70 expresszió (64). A B-sejtes krónikus limfoid leukémia (B-CLL) heterogén betegség, a nyugati világban a leggyakoribb felnőttkori malignus hematológiai kórkép. Lefolyása igen változatos, az indolensztől a rapidan progrediáló formáig a betegség széles spektrumával találkozhatunk. A betegek nagy része kezelés nélkül évtizedekig túlél, mások az agresszív kemoterápia ellenére néhány éven belül meghalnak. Emiatt fontos olyan markerek keresése, amelyek segítségével a kedvezőtlen prognózisú betegek a betegség korai fázisában azonosíthatók és korai kezelésnek alávetethetők.

Számos prognosztikai markert leírtak már B-CLL-ben, a legfontosabb az immunglobulin-nehézláncgén variábilis régiójának (IgV(H)) mutációs státusza, amely erős korrelációt mutatott a betegség kimenetelével (65,66). A mutált IgV(H) jelenléte kedvezőbb, míg a nem mutált IgV(H) gén megléte kedvezőtlenebb prognózist jelez. A rutin laboratóriumi diagnosztika számára az IgV(H) gén szekvenálása nem elérhető, mivel igen időigényes és drága. Az elmúlt években számos könnyebben meghatározható eltérés kórjósító szerepe vált ismertté. A legfontosabbak a citogenetikai abnormalitások (17p és 11q deléció, 12-es triszómia, 13q-) és a leukémia sejtek CD38 expressziója. Ezen eltérések számos nemzetközi tanulmány alapján összefüggésbe hozhatók a kórlefeljával és a várható túléléssel (64,66,67). Expressziós profil vizsgálatokkal több munkacsoport eredményei szerint a zéta-asszociált protein (Zap-70), egy 70 kDa molekulatömegű tirozin kináz, és az IgV(H) gén mutációs státusza között erős korreláció mutatható ki (67,68). A Zap-70 fiziológiásan megtalálható a T- és NK-sejtekben, és jelátviteli folyamatokban, főként a T-sejt receptor szignalizációban játszik fontos szerepet (69,70). Ezzel szemben a normál érett B-sejtek nem mutatnak Zap-70

pozitivitást. Irodalmi adatok szerint a magas Zap-70 expresszió B-CLL-ben nem mutált IgV(H) gén mellett fordul elő és kedvezőtlen prognózissal társul, míg a mutált IgV(H) gént tartalmazó csoportban a Zap-70 expresszió alacsony vagy hiányzik (67).

METODIKÁK

Az értekezés összeállításában felhasznált valamennyi módszer a Debreceni Egyetemen került kivitelezésre, illetve szintén itt született és innen került közlésre valamennyi eredmény és publikáció.

Felhasznált anyagok

Vegyszerek

A kísérletek során az alábbi vegyszereket használtam fel.

anti-CD3 PerCP	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
anti-CD5 PE	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
anti-CD5 PE-Cy5	(Immunotech, Marseille, France)
anti-CD10 PE	(Dako, Glostrup, Denmark)
anti-CD13 FITC	(Dako, Glostrup, Denmark)
anti-CD14 FITC	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
anti-CD19 PerCP	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
anti-CD19 APC	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
anti-CD20 FITC	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
anti-CD33 PE	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
anti-CD34 PE	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
anti-CD34 PerCP	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
anti-CD41 PE	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
anti-CD42a FITC	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
anti-CD45 FITC	(Becton Dickinson, San Jose, CA)

anti-CD45 PerCP	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
anti-CD55 PE	(Pharmingen, San Diego, CA)
anti-CD56 PE-Cy5	(Dako, Glostrup, Denmark)
anti-CD59 PE	(Pharmingen, San Diego, CA)
anti-CD79 α PE	(Dako, Glostrup, Denmark)
anti-IgM PE	(Dako, Glostrup, Denmark)
anti-MPO PE	(Dako, Glostrup, Denmark)
anti-TdT FITC	(Dako, Glostrup, Denmark)
anti-Zap-70 (clone 2F.3)	(Upstate, Lake Placid, NY)
anti-egér FITC	(Dako, Glostrup, Denmark)
anti-FXIIIa nyúl szérum	(CenteonPharma, ZLB Behring, Marburg, Germany)
BSA	(Sigma, St. Louis, MO)
Calcein-AM	(MolecularProbes, Eugene, OR,USA)
Calibrite	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
ECL Kit	(Amersham, Buckinghamshire, UK)
EDTA	(Spektrum-3D, Debrecen, Hungary)
FacsLysing Solution	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
Ficoll Histopaque 1007	(Sigma, St.Louis, MO)
FITC-jelölő kit	(Sigma, St.Louis, MO)
Fix&Perm kit	(Caltag, Burlingame, USA)
Glicerol	(Sigma, St. Louis, MO)
HBSS	(Sigma, St.Louis, MO)
Heparibene (Na-heparin)	(Ratiopharm, Merckle, Germany)
HEPES	(Sigma, St. Louis, MO)
Intrastain kit	(Dako, Glostrup, Denmark)

KCl	(ScharlauChemie, Barcelona, Spain)
MOWIOL 4-88	(Hoechst Pharmaceuticals, Frankfurt, Germany)
NaCl	(Spektrum-3D, Debrecen, Hungary)
Paraformaldehid	(Sigma, St. Louis, MO)
Propidium jodid	(Sigma, St. Louis, MO)
Quantibrite	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
SDS	(Bio-Rad, Hercules, CA)
TRIS	(Bio-Rad, Hercules, CA)
Triton-X 100	(Reanal, Budapest, Hungary)
Vectastain ABC Kit	(Vector Laboratories, Burlingame, CA)
Verapamil	(Sigma, St. Louis, MO)

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+ sejtvonal) 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, heparinnal vagy EDTA-val alvadásgátolt csontvelői mintát vagy EDTA-val antikoagulált perifériás vérmintát

használtam. A de novo eseteknél a mintavétel a betegség felfedezésekor, bármiféle 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 (Jouan C3/CR3, St. Herblain, France) centrifuga 1200rpm, 5 perc). 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, pl. FXIII-A kimutatásakor szigorúan követtem az alkalmazott kit gyártói utasításait. A többi – kereskedelmi forgalomban kapható – direkt jelölt monoklonális antitesttel ellentétben az FXIII-A különböző epitópjai ellen termelt monoklonális antitesteket korábban intézetünkben fejlesztették ki (71). Az FXIII-A ellenes antitestet FITC-jelölő (Sigma, St. Louis, MO) kit segítségével konjugáltuk, az így jelölt antitesteket 0,1% Na-azid hozzáadása után tároltuk. Minden új preparálású antitest esetén perifériás vér permeabilizált leukocitáin állítottuk be a vizsgálatokban használt optimális koncentrációt. Az FXIII-A FITC-vel jelölt monoklonális antitestet 2µg/mL végkoncentrációban alkalmaztam. Direkt jelölő eljárások mellett, indirekt intracitoplazmatikus jelölést használtam B-CLL-es betegek 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, 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 20

percig 50x hígítású, kecskében termeltetett anti-egér-FITC antitesttel inkubáltam. Ezt követte a korábban már részletezett sejtfelszíni direkt jelölés, majd ugyancsak 1%-os paraformaldehidben való fixálás és tárolás 4°C-on a mérés elvégzéséig. A mintákat Becton Dickinson FacScan és FacsCalibur áramlási citométerrel mértem. Az analízis döntően CellQuest (BD) program segítségével, valamint néhány esetben Pait A Gate szoftverrel 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 eredményekben a jelölődött (pozitív) sejtek százalékos arányát, az átlagos fluoreszcencia intenzitást (MFI), vagy az antitest kötő kapacitást (ABC) adtam meg, illetve abszolút sejtszám/μL (MRD vizsgálatok) egységben fejeztem ki az eredményeket.

2. Antigének kvantitatív meghatározása

A kvantitatív áramlási citometriai méréseket kalibráló gyöngyök segítségével végeztem. A Quantibrite (BD, San Jose, CA) kalibráló gyöngyökhöz gyárilag adott számú PE fluorofort konjugáltak. Ez alapján a méréskor 4 eltérő fluoreszcencia intenzitású csúcsot kaptam (2. ábra). Az átlagos fluoreszcencia intenzitást (MFI) és a gyöngyökhöz kötött ismert fluorofor (PE) számot log-log skálán ábrázolva kalibrációs egyenest kapunk. A PE a jelölő antitesttel 1:1 arányban kapcsolódik, amely ideális esetben 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 alkalmazott antitest monovalens volt.

3. Kalcein esszé (funkcionális tesz)

A mononukleáris sejteket Ficoll (Ficoll Histopaque 1007) 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 sejtszuspenzióhoz (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 kiolvasztottam és 4%-os PFA-ban fixáltam 10 percig, majd 3x mostam PBS-ben. A FITC-vel konjugált anti-FXIII monoklonális antitesteket 15 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 mostam és 10 μL Mowiol-al (0,1 M Tris-HCl, pH 8,5, 250 g/L glicerol és 10% Mowiol 4-88) fedtem be.

A szuszpendált sejtek jelölése hasonló protokoll szerint történt kivéve, hogy a jelölés során 0,05% Tritont, míg a mosáshoz 0,01% Tritont alkalmaztam. A mosásokhoz 3 mL puffert használtam és 300 g-n 5 percig történő centrifugálást végeztem. Az utolsó üledéket 10 μL Mowiol-al kevertem össze és tiszta tárgylemezre vittem fel a sejteket.

A mikroszkópos analízist Zeiss (Göttingen, Germany) LSM 510 rendszerrel végeztem C-Apochromat 63 $\times$ /1,25 NA vízimmerziós objektívvel. A fluoreszcenciát 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 μm 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 („spillover”) kiküszöbölte.

6. FXIII-A ELISA vizsgálat

A XIII-as faktor "A" alegységének sejtlizátumból történő meghatározását az intézetünk munkacsoportja által közölt módszer alapján kis módosítással végeztem (71). 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 (Branson, Danbury, CT, 4°C, 3x30 másodperc) előtt, hogy pontosan kalkulálható legyen az FXIII-A/sejt tartalom. Ezt követően streptavidinnel fedett ELISA lemezeken 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 μ L 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 gélre.

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.

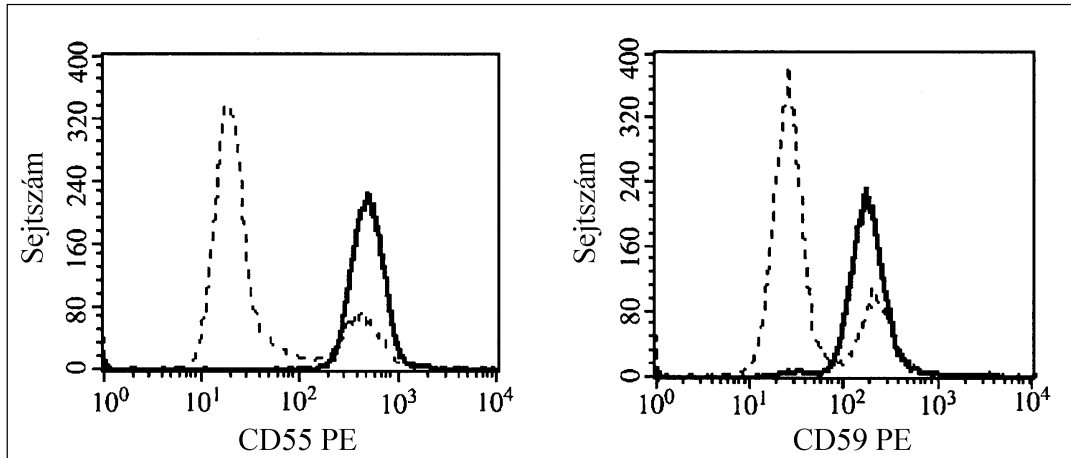
EREDMÉNYEK

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 sejttípus 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. Egy PNH-s beteg granulocitáinak reprezentatív hisztogramján (3. ábra) két sejtpopuláció különíthető el a CD55 és CD59 expresszió alapján, ugyanis a sejtek egy részén nem mutatható ki GPI-horgonyzott fehérje, a másik szubpopuláció normál expresszióval jellemezhető.

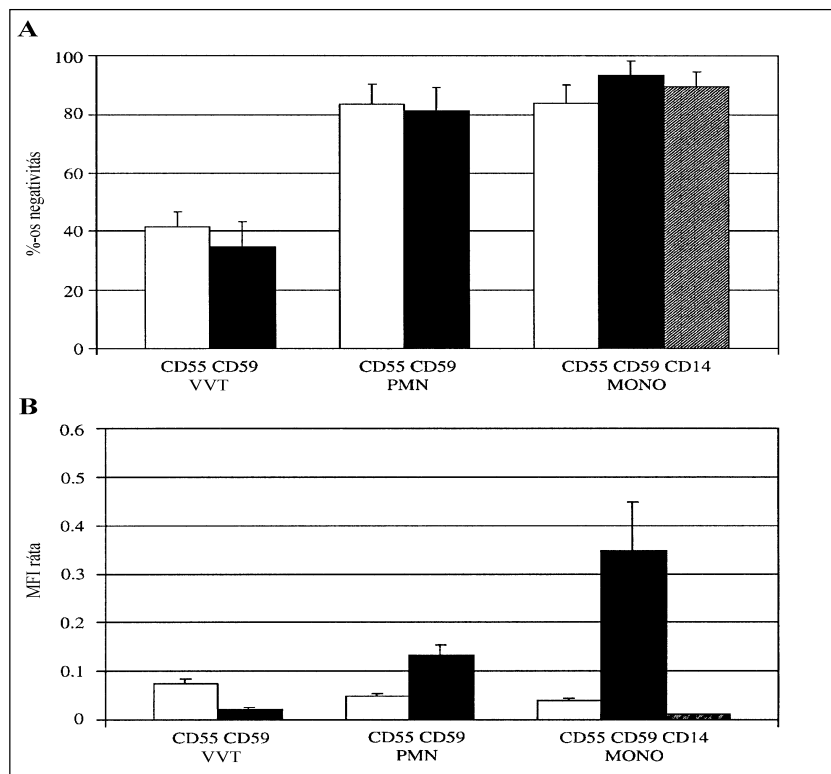
A vvt-k esetében az adott markerre negatív sejtek aránya a granulociták és a monociták mintegy 40%-a volt. A jelenség a PNH-s vvt-k szeletív destrukciójával magyarázható. A PNH-s klón aránya jobban megítélhető a granulociták és a monociták vizsgálatával.



3. ábra: A CD55 és CD59 kifejeződése granulocitákon. Folytonos vonal: normál minta, szaggatott vonal: PNH-s minta.

A vizsgálatok során bevezettem az MFI ráta használatát, ami a II-es és III-as típusú PNH sejtek, valamint az ezekhez rendelhető normál populáció MFI értékek hányadosa. A PNH-s és a normál sejtek annál pontosabban különböztethetők meg a GPI-horgonyzott fehérje kifejeződése alapján, minél kisebb az MFI ráta. Régebbi megfigyelés, hogy az anti-CD55 nem képes olyan mértékben a kóros vvt populáció azonosítására, mint az anti-CD59 (42). Ez számszerűen is igazolható volt az MFI ráta használatával, ugyanis az anti-CD59 esetén alacsonyabb MFI rátákat kapunk (0,011-0,031) mint az anti-CD55 esetében (0,049-0,096).

Mindhárom sejtpopulációban meghatároztam a százalékos negativitás értékeket -ami a nem jelölődött “negatív” sejtek százalékos előfordulása a vizsgált sejtpopulációban - és az MFI rátákat (4. ábra). Az eredmények szerint a monocita a legmegfelelőbb sejtípus a PNH-s klón méretének meghatározására, hiszen ezen populációnál voltak a legalacsonyabbak az MFI ráták (0,007-0,015). Ezért az ajánlható, hogy a PNH klón méretének meghatározásárákor a CD14 negatív monociták %-os értéket adjuk meg az MFI rátával együtt.

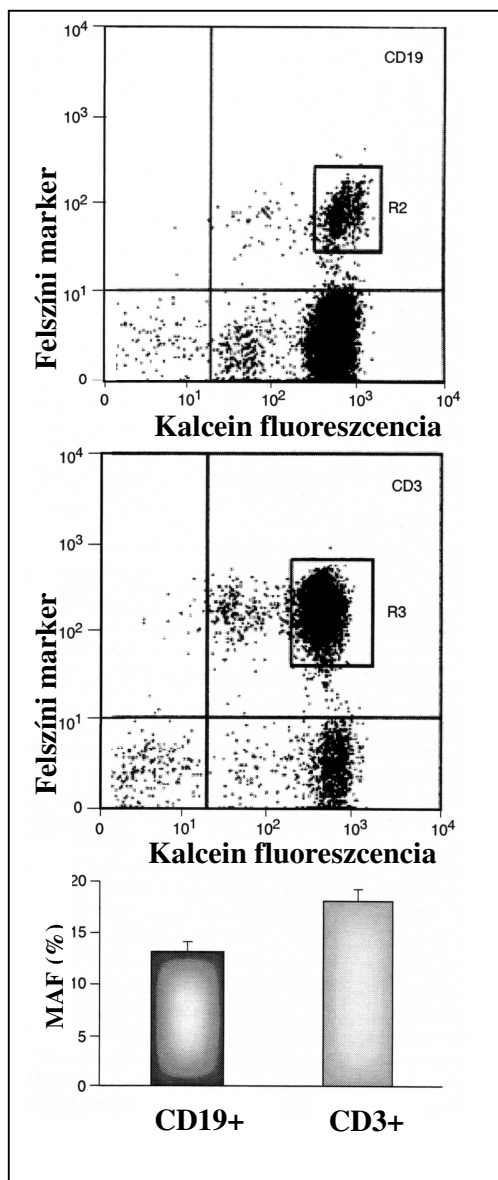


4. ábra: A CD55 és CD59 valamint a CD14 kifejeződés vizsgálata a vvt, granulocita (PMN) és monocita (MONO) populációkban. Az "A" ábrarész az eredményeket mint %-os negativitás (az adott markerre negatív sejtek %-os aránya), a "B" mint MFI rátát adja meg.

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

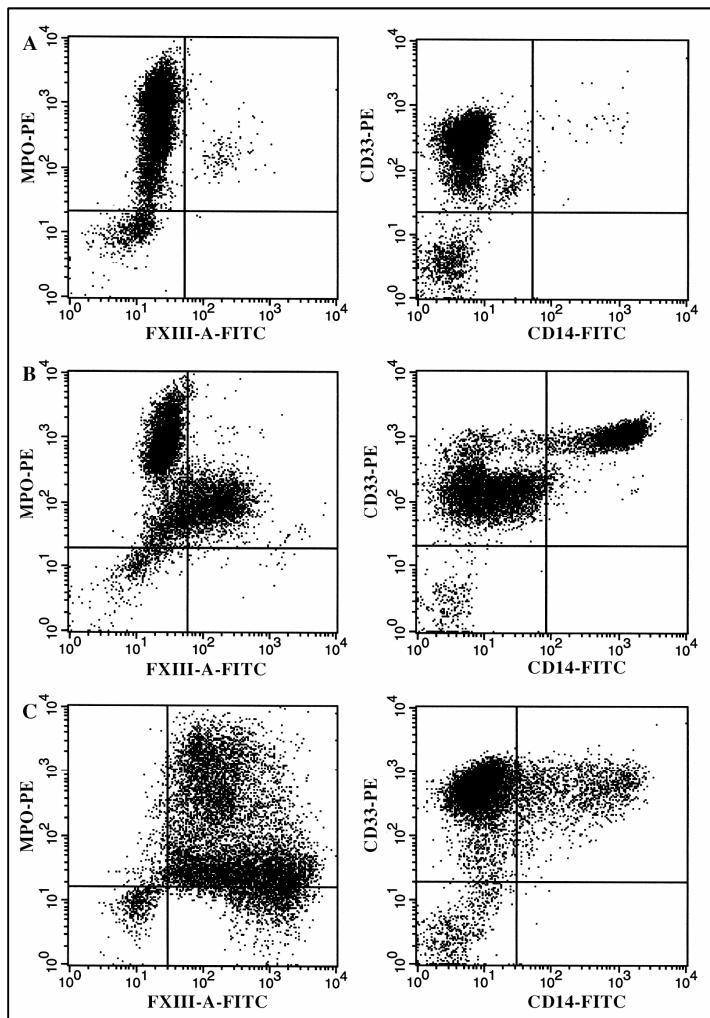
FL1 (kalcein jel)-FL3 (PE-Cy5 jel) „dot plot” ábrák alkalmazásával elemeztem. Azt találtam, hogy a normál limfociták MDR aktivitását tekintve a T-sejteké magasabb volt mint a B-sejteké (5. ábra).



5. ábra: Kalcein esszé és sejtfelszíni jelölés kombinációja. A dot plot képeken a vízszintes tengelyen a kalcein jel, az FL-3 csatornán a felszíni jelölés (marker fluoreszcencia) látható, amelynek segítségével külön megadható a CD19+ B-sejtek (R2) és a CD3+ T-sejtek (R3) MDR aktivitása. Az ábra alsó részén a B- (CD19+) és T-sejtek (CD3+) MAF értékeinek átlagát mutatja 20 mérés alapján, az oszlopok tetején a szórással.

XIII-as faktor kimutatása AML-ben

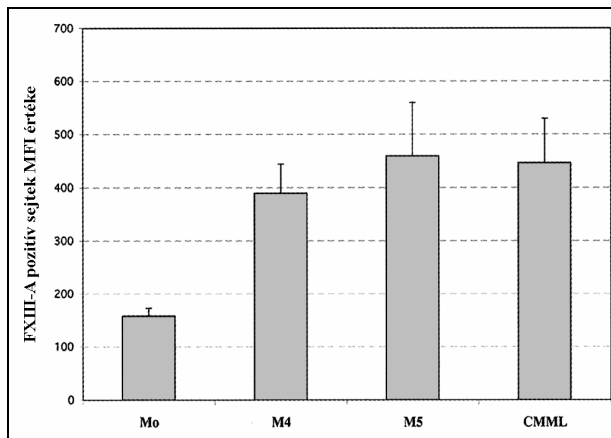
Munkacsoportunk előzetes adatai szerint az FXIII-A a monocita sejtvonal egyik igen korai markerének tartható, amely egészséges és leukémiásan transzformált sejtekben egyaránt megjelenik (72). Különös értékét szelektív expressziója adja, ugyanis a granulocita sejtvonalban nem fejeződik ki. Munkatársaimmal közösen folytatott vizsgálatok szerint akut monocitás és mielomonocitás leukémiában az FXIII-A a CD14-nél érzékenyebben azonosította a blaszt sejteket (6. ábra).



6. ábra: FXIII-A jelölődési mintázat AML M1 (A) és M5 (B, C) esetén csontvelői mintákban 3-színű áramlási citometriával. A jobb oldali panelek a felszíni CD33 és CD14 expressziót, a bal oldali panelek a citoplazmatikus MPO és FXIII-A jelölődést ábrázolják. Az M1-es mintában az MPO pozitivitás CD14 és FXIII-A negativitással társul. M5 esetekben az MPO-ra gyengén jelölődő FXIII-A pozitív sejtek aránya vagy megegyezik a sejtfelszíni CD14 expresszióval (B), vagy az FXIII-A pozitivitás alapján több kóros sejt azonosítható mint a CD14 jelölődés alapján (C).

Az M4 és M5 esetekkel ellentétben a krónikus mielomonocitás leukémia (CMML) mintákban a CD14 és az FXIII-A egyforma százalékos pozitvitást adott, mely arra utalt,

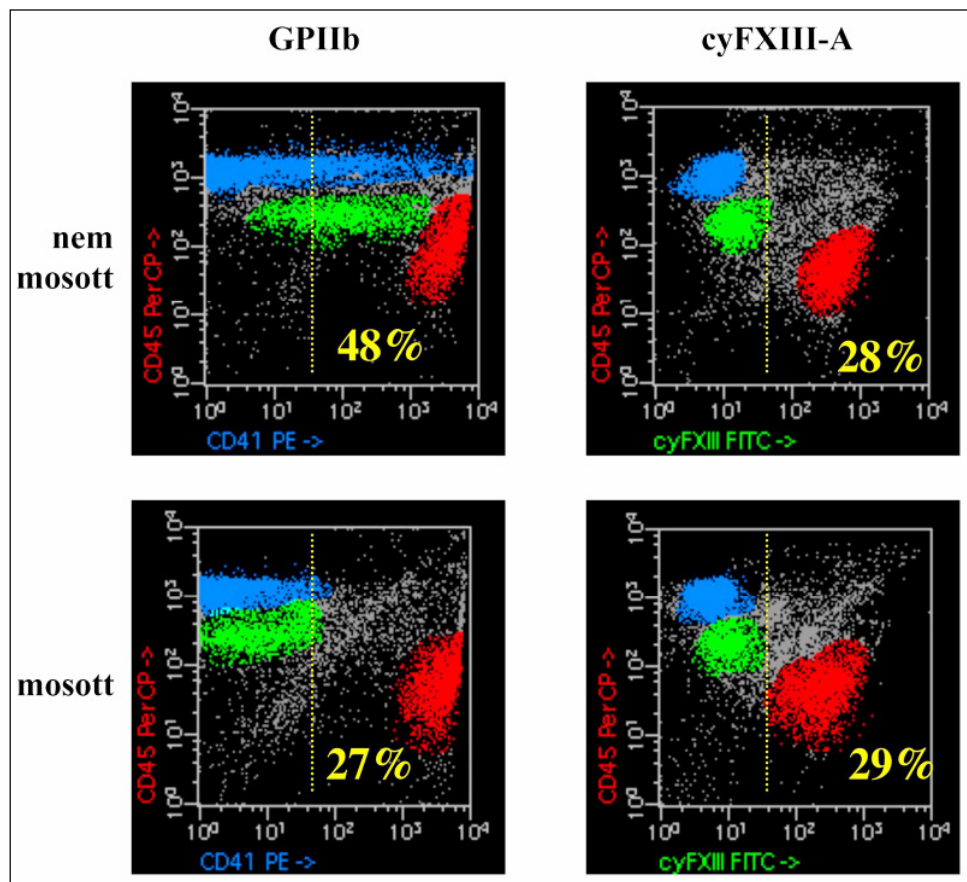
hogy érettebb sejtek esetén a két reakció azonos populációt jelölt. A mieloblasztos és monoblasztos leukémiákat összehasonlítva az FXIII-A reakció szenzitivitása 100% volt, a specificitása 95% volt. Az FXIII-A expresszióknak, más citoplazmatikus markerektől eltérően különleges jellegzetessége AML M4, M5 és CMML esetén az, hogy a jelölődés intenzitása nagyobb mint a normális perifériás vér monocitái esetén (7. ábra).



7. ábra: Normál és leukémiás monociták FXIII-A jelölődése. A jelölődés intenzitása (MFI) szignifikánsan ($p < 0.05$) nagyobb volt a leukémiás sejteken mint a normál monocitákon. (AML M4 $n=25$, AML M5

A megakariocita sejtvonalat tekintve, AML M7 esetében az FXIII-A jelölődés specifikusabb a hagyományosan alkalmazott trombocita/megakariocita markereknél, ugyanis ezen markerek analízise alapján a valódi megakarioblaszt arány megállapítása nem mindig egyszerű. AML M1-M6 FAB csoportokban, sőt normál mieloid sejteken is gyakran igen jelentős CD42a (GPIX), CD42b (GPIb) és CD41 (GPIIb) jelölődés mutatható ki. Erre korábban morfológiai eredmények alapján más szerzők is felhívták a figyelmet (73). 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 (74). A vizsgálati minta EDTA-s mosással való előkezelésével ez a fals-pozitív reakció kiküszöbölhető. Ilyenkor

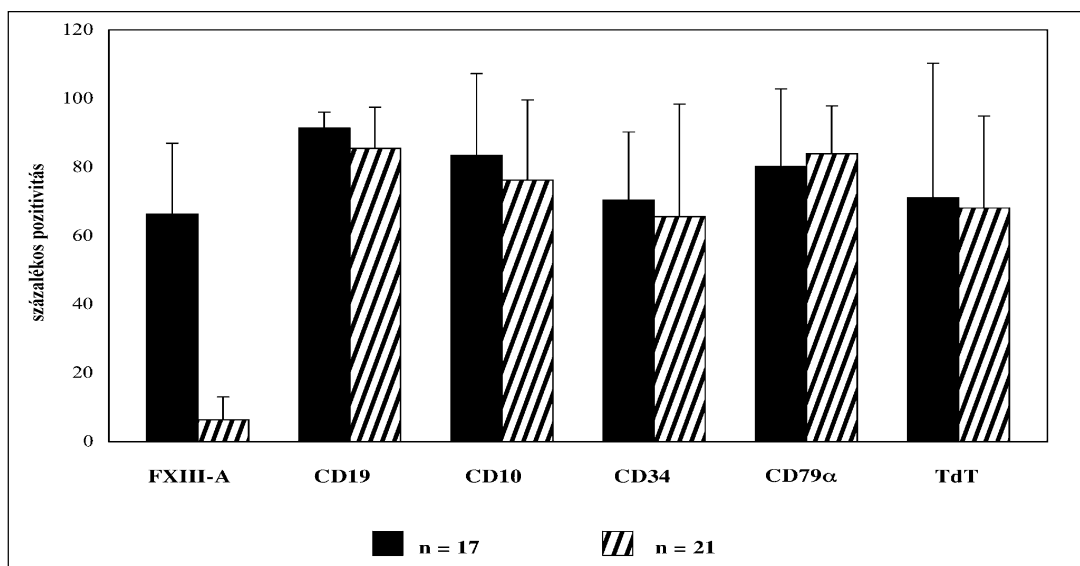
a trombocita glikoprotein analízis eredménye az FXIII-A jelölődéssel megegyező eredményt mutat, amelynek eredményeként a valós megakariocita arány adható meg (8. ábra).



8. ábra: A CD41 (GPIIb) és a cyFXIII-A jelölődési mintázat vizsgálata akut megakarioblasztos leukémiás betegben (AML M7). (A „Paint a gate” szoftver alkalmazásával általunk kiválasztott színben jeleníthetők meg adott sejtpopulációk. Jelen esetben az alábbi színek kódokat használtam: piros: megakarioblasztok, zöld: mieloid sejtek, kék: limfoid sejtek).

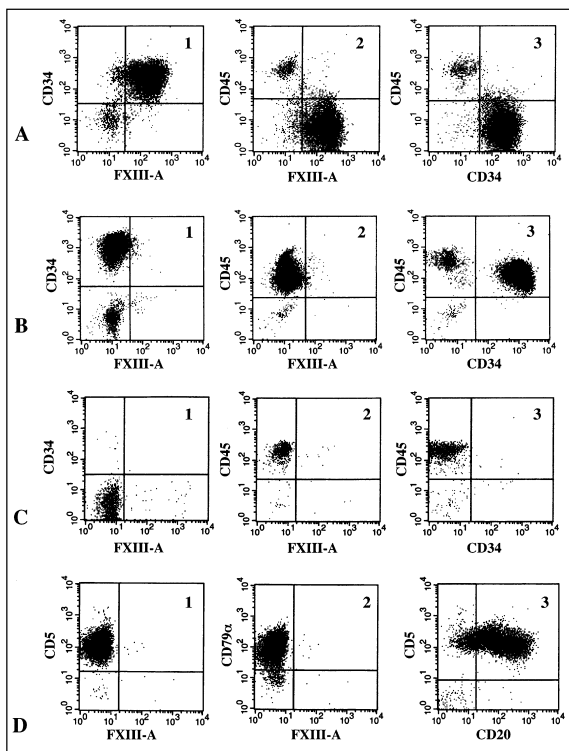
XIII-as faktor kimutatása ALL-ben

Az akut limfoblasztos leukémiák (ALL) immunfenotípusukat tekintve áramlási citometriával igen jól karakterizált csoportokba oszthatók. 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 (12). 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) expresszálnak 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 pozitivitás mutatható ki hasonlóan a korábban részletezett AML esetekhez. Az FXIII-A jelölődés koexpressziót mutatott a limfoblasztok markereivel (CD79 α , CD19, CD34, CD10, TdT) (9. ábra). Négy év alatt 47 de novo B-sejtes ALL esetet szisztematikusan vizsgáltam. Azt találtam, hogy az esetek 40%-ában volt detektálható az intracitoplazmatikus FXIII-A pozitivitás. A pozitivitás határértéket a sejtek 30%-ának jelölődése esetén definiálva azt az eredményt kaptam, hogy az FXIII-A-pozitív (FXIII-A+) esetekben a jelölődés mértéke 66% volt, míg az FXIII-A-negatív (FXIII-A-) esetekben 6,5% (9. ábra).

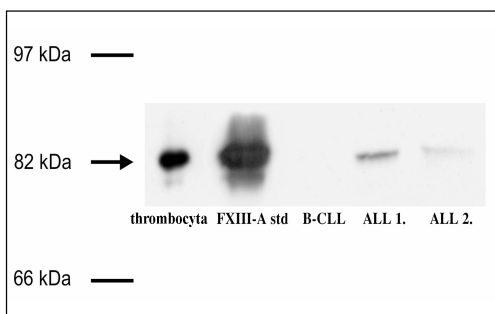


9. ábra: A felszíni és intracelluláris antigének expressziója cALL FXIII-A+ (sötét oszlopok) és FXIII-A- (sávozott oszlopok) csoportjában (pozitivitási „cut-off” 30%). Az oszlopok tetején az SD-eket is feltüntettük. Az FXIII-A jelölődés kivételével nem voltak lényeges eltérések a két csoport expressziós mintázata között.

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 pozitivitást mutattak. Az érett B-sejtek, mint amilyenek B-sejtes CLL-ben detektálhatók az áramlási citometriai vizsgálat során valamennyi esetben negatívak voltak az FXIII-A jelölődésre (10. ábra). A limfoblasztok FXIII-A expressziója váratlan eredmény volt, így az FXIII-A jelenlétét a kóros sejtekben egyéb módszerekkel is verifikáltam (11. ábra).



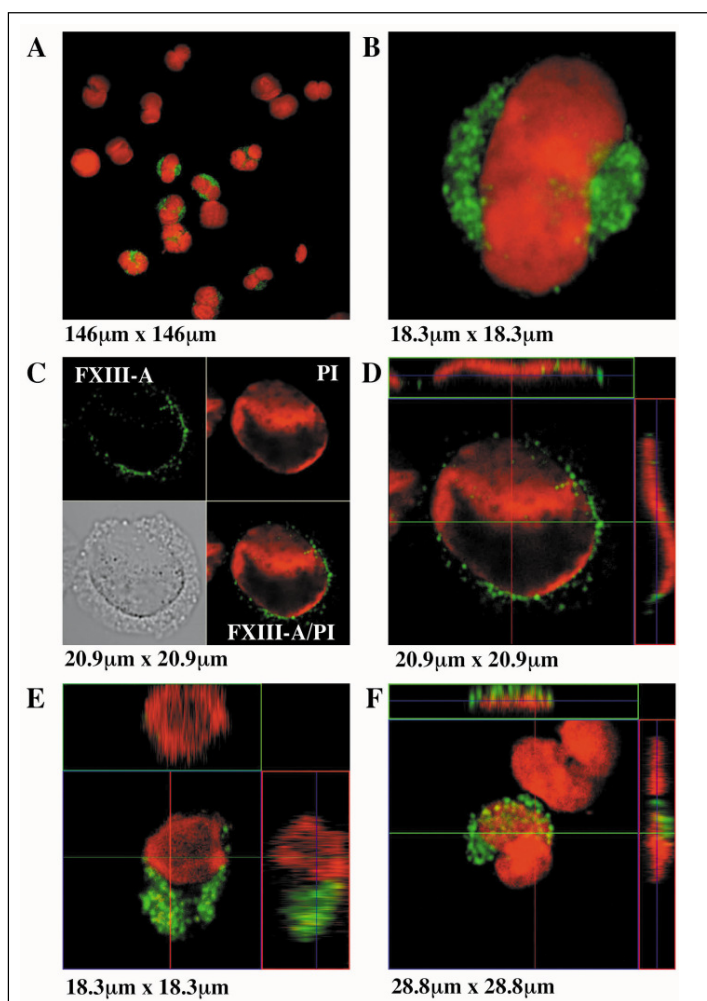
10. ábra: Reprezentatív áramlási citometriai dot plot-ok FXIII-A pozitív (A), FXIII-A negatív (B), normál (C) és B-CLL-es (D) mintákból. CLL-ben és a normál B-limfociták között az FXIII-A jelölés mindig negatív volt. FXIII-A(FITC)/CD34(PE)/CD45(PerCP), FXIII-A(FITC)/CD79α(PE)/CD5(PECy-5) és CD20(FITC)/CD5(PE) jelölések.



11. ábra: Az FXIII-A antigén kimutatása Western-blottal. Két pozitív kontroll (trombocita és az FXIII-A standard) mellett kimutatható az antigén FXIII-A+ ALL-es mintákban, de B-CLL-ben nem (negatív kontroll).

Azért, hogy a vérlemezékben 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

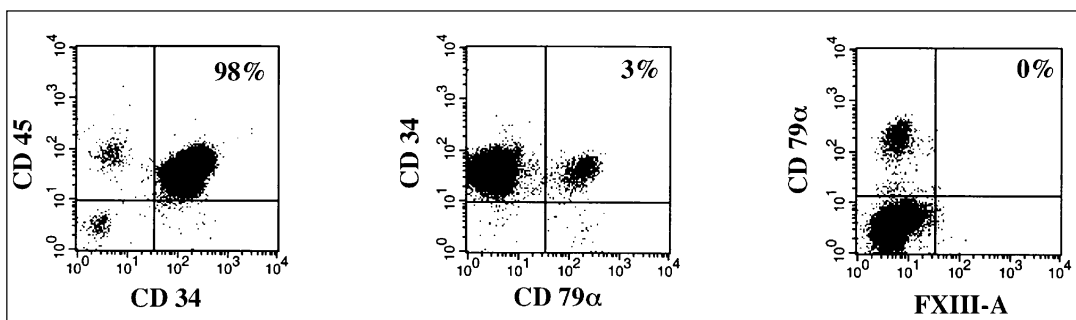
fg/blaszt átlagos mennyiségben tartalmaznak FXIII-A-t, amely ugyan jelentősen kevesebb a monocitákban kimutatott 37 fg/sejt átlagértéktől, de a sejtek térfogatbeli különbségeit figyelembe véve ez a mennyiség nem elhanyagolható. Konfokális lézer szkennelés mikroszkópia segítségével különböző síkokban vizsgáltam az FXIII-A elhelyezkedését. Azt találtam a kísérletek során, hogy a lokalizáció valamennyi esetben intracitoplazmatikus volt (12. ábra).



12. ábra: FXIII-A kimutatása konfokális mikroszkópiával. A sejtmagok PI jelöléssel pirosra festődnek. A limfoblasztokban (A-E) az FXIII-A FITC-jelöléssel (zöld) intracitoplazmatikusan volt kimutatható, hasonlóan a normál monocitákhoz (F). A C ábrarész bal alsó kvadránsában a fáziskontraszt kép látható. Az FXIII-A mind a citospin (D), mind a sejtszuszpenzióból készült (E) preparátumokban a sejtek citoplazmájában volt kimutatható.

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 prekurzorokban az FXIII-A jelölődés nem volt kimutatható (13. ábra).



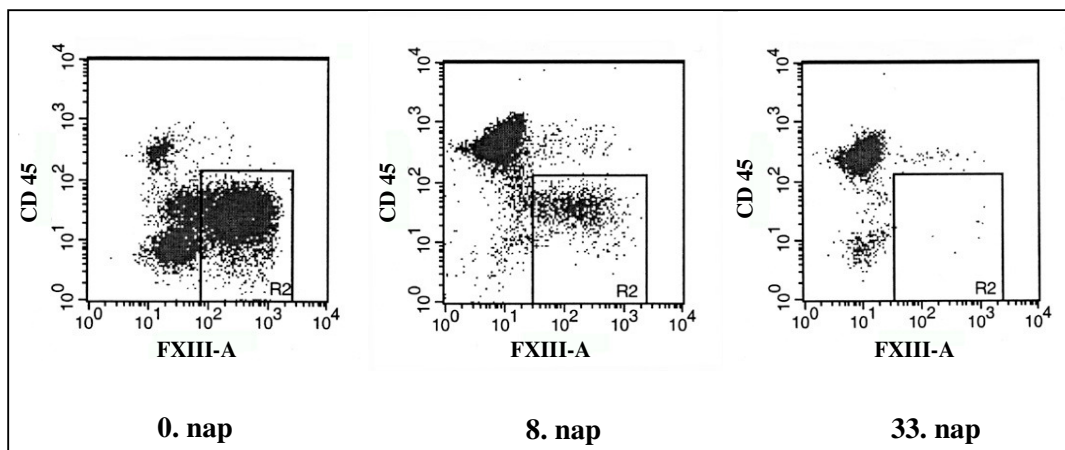
13. ábra. Normál B-sejt prekurzorokban FXIII-A nem volt kimutatható, amint az a mágnesesen szeparált CD34+ sejtekben látható. A B-sejteket jelölő cyCD79α+ sejtek nem mutatnak FXIII-A expressziót.

Jelölés: FXIII-A(FITC)/CD79α(PE)/CD34PerCP és CD45(FITC)/CD79αPE/CD34PerCP.

Az FXIII-A jelenlétét a monocita/makrofág és a megakariocita/trombocita sejtvonalakon kívül a csontvelőben és a vérben nem mutatták ki más eredetű sejtekben, miközben – amint azt saját vizsgálataim is megerősítették - a normál csontvelői és perifériás vér limfociták és prekurzoraik nem tartalmaznak XIII-as faktort (72,75). A legelső esetben mellékjelenségként észleltem az FXIII-A megjelenését B-sejt eredetű ALL-es mintában. Ezt az új észlelést szisztematikus vizsgálatsorozat követte, amely során számos FXIII-A+ ALL esetet azonosítottam és az FXIII-A expressziót a limfoblasztokban több más módszerrel (ELISA technika, Western-blot és konfokális mikroszkópia) igazoltam. Az esetleges trombocita szatellitózis által okozott álpozitív reakciót áramlási citometriai, mikroszkópos technikák, valamint ELISA alkalmazásával kizártam. Az FXIII-A+ limfoblasztok MFI értéke alacsonyabb volt mint az AML M4 vagy M5 alcsoportú leukémiás sejteké. ELISA vizsgálatokkal azt találtam, hogy az áramlási citometriával FXIII-A+ leukémiás limfoblasztok tartalmaznak FXIII-A-t, bár egy nagyságrenddel kisebb mennyiségben mint a normál monociták. ALL-ben gyakori az aberráns immunfenotípus jelenléte, sokszor detektálható mieloid antigének

expressziója a patológiás sejteken. Ezért fontos kiemelni, hogy az FXIII-A+ ALL-ek nagy részében, nevezetesen a 19 betegből 15-ben nem volt kimutatható mieloid marker expresszió: 3 betegnél CD13 pozitivitást, egy esetben CD33 expressziót észleltem.

Alapvetően újonnan felismert ALL eseteket használtam az FXIII-A vizsgálatokra, de néhány esetben a betegek követésénél is elvégeztem hármas jelöléssel 100 000 sejt analízisével az FXIII-A vizsgálatot áramlási citometriával, amely korrelációt mutatott a klinikai képpel (az FXIII-A-pozitív blasztok eltűnésével párhuzamosan klinikai remisszió alakult ki) (14. ábra). Ezek alapján felvetődik annak a lehetősége, hogy az FXIII-A követésre is alkalmas lehet a jövőben. Ilyen irányú vizsgálatok folyamatban vannak.

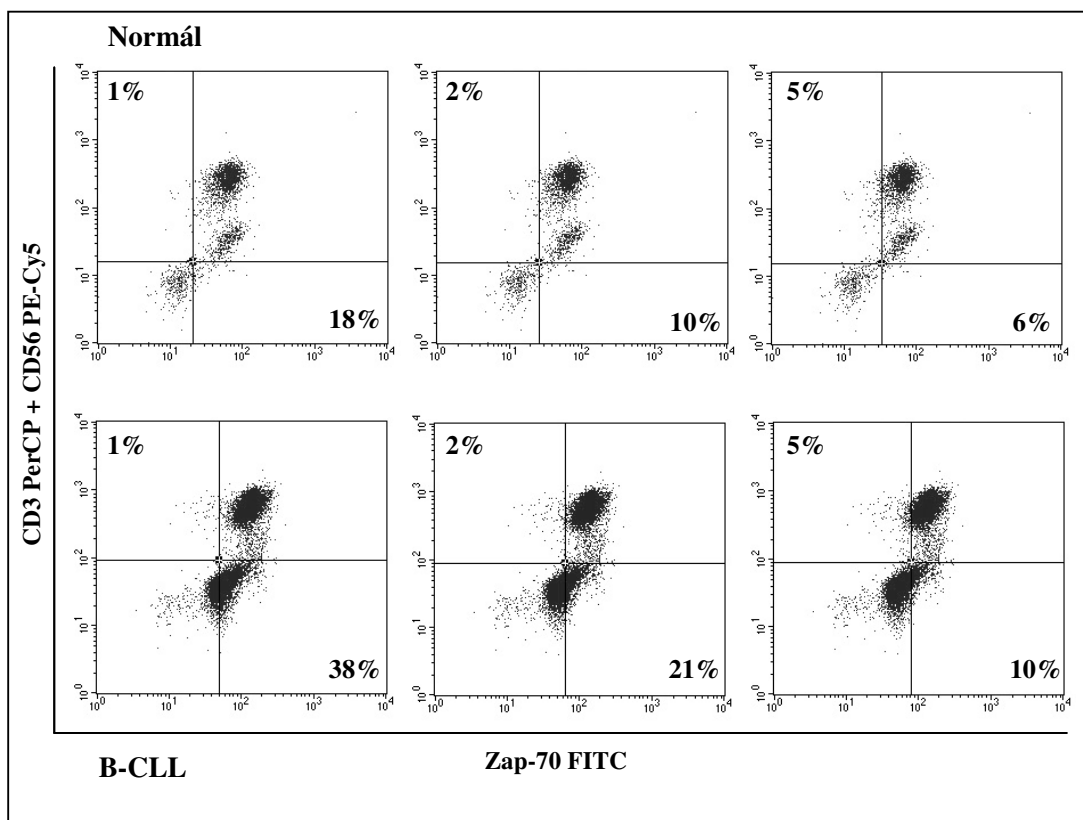


14. ábra. FXIII-A-pozitív ALL követése áramlási citometriával. A CD45dim/FXIII-A + blasztokat bekeretozve tüntettem fel. A diagnóziskor észlelt blaszt populáció a 8. napra jelentősen csökkent, a 33. napon a jel a detektálási limit alá esett.

Zap-70 analízis optimalizálása B-CLL-ben

A Zap-70 áramlási citometriával kimutatható marker, melynek 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 sejtpерmeabilizációs kiték használata, az analízis módszerek, lehetőségek terén is nagy a variabilitás (76). 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 (77). Negatív kontrollként egyes szerzők semleges izotípus antitestet alkalmaztak (78), más centrumokban a biztosan Zap-70-negatív normál B-sejtekhez viszonyítottak (79,80). Több munkacsoport végzett kvantitatív áramlási citometriát, az eredményt (81) például MFI rátában (T+NK vs. B-sejt populáció MFI) fejezték ki, vagy MESF értékeket hasonlítottak össze a hagyományos százalékos eredményekkel (82). 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-, illetve 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%) (77). 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 (15. ábra).

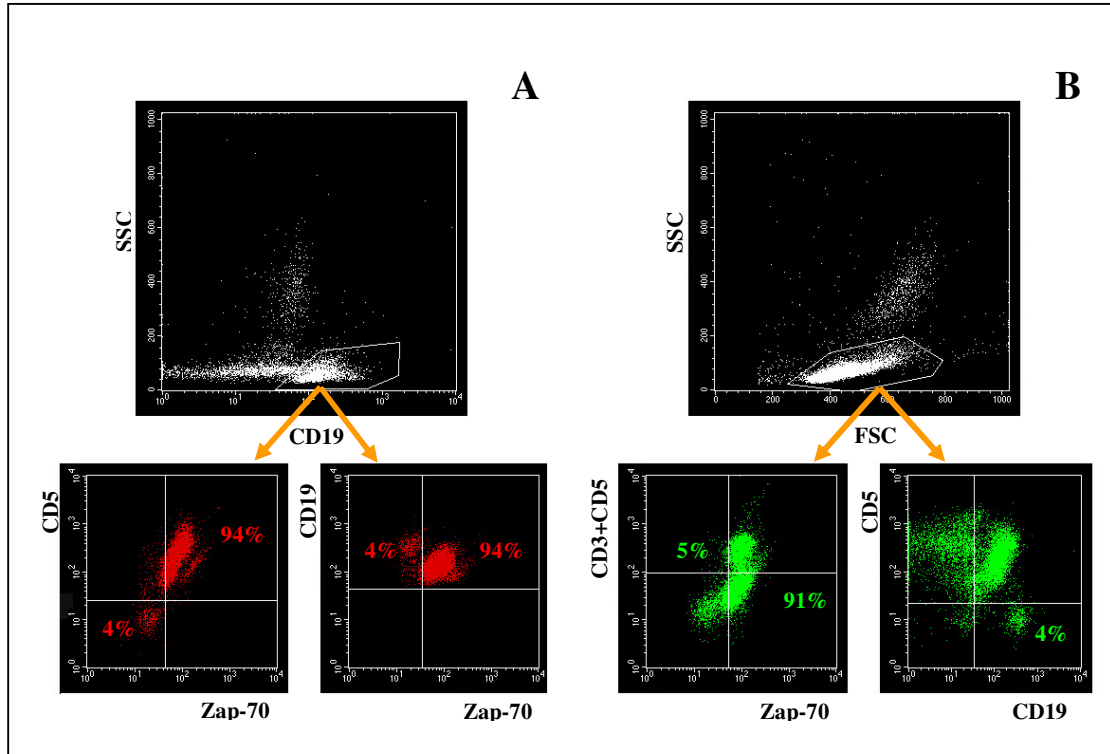


15. ábra: A vertikális kurzor helyzetének hatása a normál és B-CLL-es limfociták Zap-70-pozitivitására. Minél magasabb a Zap-70-negatív T/NK-sejt arány, annál alacsonyabb a Zap-70-pozitív B-sejtek aránya.

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 (80), ugyanis a legtöbb betegben az összes B-sejt kóros (CD5/CD20/CD23-pozitív) fenotípusú.

Egészséges egyéntől mononukleáris sejteket szeparáltam, majd a sejtszuspenziót ismert B-CLL-es betegek vérmintáihoz kevertem. A vizsgálatba bevont betegek limfoid sejtei 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 emített módon (5% Zap-70-negatív T/NK-sejt) a kurzort (16. ábra).

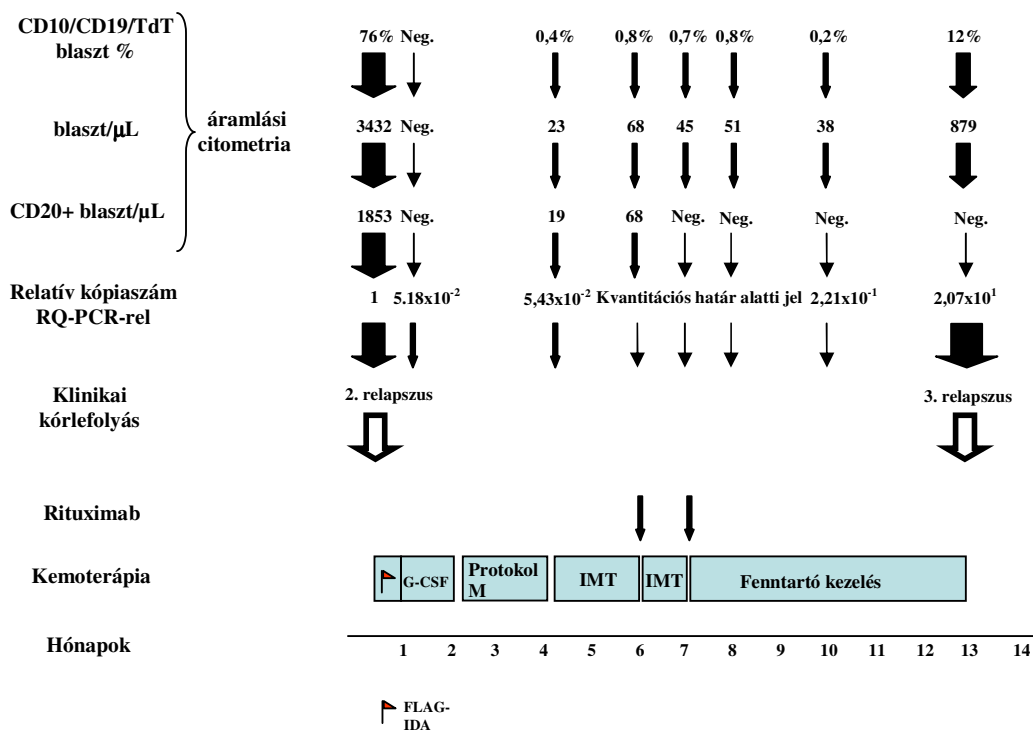


16. ábra: Normál és CLL B-sejtek 4-színű, keveréses áramlási citometriás vizsgálata.

B-CLL-es beteg perifériás véréhez szeparált egészséges mononukleáris sejteket kevertem és 4-színrel jelöltem: Zap-70-FITC(FL-1)/CD5-PE(FL-2)/CD3-PerCP,CD56-PE-Cy5(FL-3)/CD19-APC(FL-4). Az „A” dot ploton a B-limfocitákat kapuztam be, a piros dot plotok ebből a kapuból származnak. Az „B” dot ploton a limfocitákra kapuztam, a zöld felhőképek erre a sejtpopulációra vonatkoznak. A normál (CD19⁺/CD5⁻) B-sejtek aránya 4%, a Zap-70 expresszió a B-CLL sejteken 91%, a vertikális kurzort a T/NK-sejtekre (5%-uk negatív) állítva. A vertikális kurzort a normál B-sejtekre (5%-uk pozitív) állítva a Zap-70 expresszió hasonló: 94%.

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

Egy 15 éves nőbetegét klinikus kollaborációs partnereim cALL miatt az ALL-BFM 95 (83) protokoll szerint kezelték. A beteg a diagnózis után 48 hónappal visszaesett. Ekkor ALL R-87 (84) 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 (85) indukciós kezelés harmadik, komplett remissziót eredményezett, detektálási határ alatti szignálokkal mind morfológiai, mind áramlási citometriai technikákkal vizsgálva. A „Protokol M” konszolidációs kezelés után a blasztok 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 (17. ábra).



17. ábra: cALL 3. relapszus kórlefolyása, különös tekintettel a beteg MRD státuszára. MRD nyomon követése áramlási citometriával. Rituximab terápia: 375 mg/m², IMT: „interim” fenntartó kezelés (egyezik a fenntartó kezeléssel: 6-merkaptopurin 50mg/m² naponta, metotrexát 20 mg/m² hetente, per os). G-CSF: granulocita kolónia-stimuláló faktor, Neg: detektálási limit alatt.

Az MRD vizsgálatokat számos időpontban, 100 000 sejt analízisével 3-színű direkt jelölési technikával végeztem. A rituximab kezelés a CD10/CD19/TdT pozitív szubpopuláció csökkenését eredményezte, bár a blasztok 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/μL) a csontvelőben (17. ábra). 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 teszteknel fontos a szenzitivitás, specifitás és a prediktív érték ismerete. A sejteket jellemző markerek detektálásánál lényeges kérdés a minta-előkészítés, ugyanis nem megfelelő metodikák alkalmazása álpozitív és álnegatív eredményekhez vezethet. Meghatározó szempont, hogy a jelölés kizárólag azon sejteket azonosítsa, amelyek valódi pozitivitást mutatnak az adott markerre és ne adjon nem-specifikus reakciót. Az eredmények értékelésénél az alábbi szempontokat vettem figyelembe: a jel specifitásának 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 egy 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. Ilyen egyébeken mellett a malignus sejtek citosztatikum rezisztenciája, hiszen ennek ismerete meghatározhatja a választott kemoterápiás kezelést. Az ezen betegségben szenvedőknél a követés ugyancsak nélkülözhetetlen. Vizsgálataimat ezen témakörök (i) diagnosztika aberráns fenotípusok azonosításával, (ii) prognosztika MDR kimutatással és Zap-70 expresszió vizsgálattal és (iii) követés MRD meghatározásával - köré csoportosítottam. Törekedtem az ezekre alkalmas áramlási citometriai markervizsgálatok optimalizálására, valamint a módszertől függő lehető legideálisabb szenzitivitás és

specificitás elérésére. Az áramlási citometriai vizsgálat objektivitásának növelését próbáltam elérni munkám során. Ehhez szükséges számos alapvető módszertani ismeret, mint a detektálhatósági limit, amely a vizsgálat szenzitivitását alapvetően meghatározza. Ez a paraméter ritka események azonosításánál leginkább a begyűjtött események számától függ, ezért szükséges az, hogy reziduális betegség keresésekor jóval több sejtet (100 000-1 000 000) gyűjtsünk be mint a diagnózis megállapításakor. A sejtek saját fényszórásából eredő autofluoreszcenciás jelet sem hagyhatjuk figyelmen kívül az analízis során. Ez a jelenség kizárólag a kék (argon) lézer gerjesztésnél jelenthet komoly problémát, míg az egyéb lézer fényforrásoknál (pl. vörös lézer) gyakorlatilag elhanyagolható. A fluoroforok kvantumhatásfokának ismerete, amely az általam alkalmazott festékmolekulák esetén a fikoeritrinnél a legmagasabb, a fluoreszcencia intenzitáson alapuló kiértékelések alkalmazásakor - így az MFI-alapú eredményközlés esetén PNH-ban - nélkülözhetetlen. Igen fontos a megfelelő kontrollok használata a vizsgálatok során, amely 2- és 3-színű analízis esetén lehet például rutin immunfenotipizáláskor izotípus kontroll (ugyanolyan eredetű, megegyező izotípusú ugyanazon fluoroforral jelölt, az emberben biztosan nem előforduló fehérje epitóp ellen termeltetett antitest) vagy valamely ismert, biztosan pozitív illetve negatív kontroll használata, mint például a Zap-70 meghatározásnál a jelölt normál B- vagy T/NK-sejtek. Ha a vizsgálandó molekula funkcionális aktivitása lényegesebb a pusztán jelenléténél, célszerű funkcionális tesztet alkalmazni, mint a Pgp esetén a kalcein esszét, ami tovább kombinálható felszíni jelöléssel, amely lehetővé teszi a leukémia sejtek MDR aktivitásának mérését és a normál sejtek kizárását a vizsgálatból.

Bizonyos kórképekben a kvantitatív meghatározás lényegibb információt szolgáltat, ennek segítségével különíthetők el például a PNH I-es, II-es, illetve III-as típusú sejtek egymástól. 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 sejteiben 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 (42). Ezt az észrevételt számszerűen is tudtam igazolni az MFI ráta alapján, mivel az anti-CD59 esetén jóval alacsonyabb MFI rátákat kapunk, mint az anti-CD55 esetében. Meghatároztam a százalékos negativitás értékeket és az MFI rátákat a vvt, granulocita és monocita sejtpopulációkban. Korábbi vizsgálatok utaltak arra, hogy PNH esetén a monociták rendelkeznek a legkevesebb GPI-horgonyzott fehérje mennyiséggel (86). Eredményeim alapján is elmondható, hogy a monocita az ideális sejtípus a PNH-s klón méretének meghatározására, mivel az MFI ráták itt a legalacsonyabbak. Ezért ajánlható az, hogy a PNH klón méretének meghatározásakor a CD14-negatív monociták %-os értékét adjuk meg a munkacsoportunk által bevezetett MFI rátával együtt.

A prognosztikai faktorok közé sorolt citosztatikum rezisztencia detektálására igen sok módszer létezik. A Pgp-t, bár nem az egyetlen fehérje a multidrog rezisztencia (MDR) mechanizmus kialakulásában, az egyik legfontosabbnak tartják. A Pgp analízis alapvetően három különböző módszerrel történhet: a Pgp mRNS kimutatásával, a Pgp

antigén meghatározásával és a Pgp aktivitás vizsgálatával. Az MDR detektálása esetén konszenzus protokoll ajánlásának megfelelően két különböző módszer használata helyes (87), például funkcionális teszt és monoklonális antitesttel végzett felszíni jelölés együttes alkalmazása. A kalcein teszt egy funkcionális esszé, amelynek alapja, hogy a kalcein-acetoximetilészter (kalcein-AM), hidrofób molekulaként a sejtbe diffundál, a vegyületet nem-specifikus intracitoplazmatikus eszterázok hasítják, majd a MDR-ért felelős transzporterek - közülük a legfontosabb a Pgp - a fluoreszkáló kalceint kipumpálják. Az előbb említett proteinek hiányában a hidrofil kalcein csapdába esik. Így áramlási citométerrel jól mérhető jelintenzitása jellemzi az MDR aktivitást. A tesztben a fehérjék aktivitásának gátlására úgynevezett revertáló ágensek, modulátor vegyületek használhatók. Ezek közül a kísérletek során a verapamil (Vp) alkalmaztam (88). Az intracelluláris fluoreszcencia intenzitást 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), amelyet 3-3 párhuzamos mérés fluoreszcencia intenzitás értékeinek átlagából számoltam. Ezen értékkel a MDR meglete érzékenyebben mutatható ki mint direkt jelölési technikával. A kalcein teszt felszíni jelöléssel együtt is elvégezhető, ezáltal a specificitás növelésére van lehetőség, amely lehetővé teszi a malignus sejtek MDR aktivitásának mérését és a normál sejtek kizárását a vizsgálatból. Irodalmi adatok alapján a leukémia sejtek azonosítására leginkább a CD34 jelölés használható (89), de vizsgálhatjuk a CD45 dimblaszt populáció MDR aktivitását is (90). Normál limfociták MDR aktivitását megvizsgálva a T-sejteké magasabbnak mutatkozott a B-sejtekénél. Azonban az MDR aktivitás PE-jelölt antitestekkel kombinálva problematikus, mivel a kalcein rendkívül

intenzíven világít az FL-1 csatornán, így az FL-2 csatornán megjelenő fluoreszcencia átszennyezés miatt az itt jelet adó PE-jelölt antitesttel nem alkalmazható. Megfelelő kompenzációval PerCP-konjugált antitestekkel az FL3 csatornán (>650 nm) az MDR aktivitás és a felszíni jelölés mégis kombinálható. Ez azért bírhat jelentőséggel, mivel a különböző laboratóriumok eredményeinek összevetése, az eltérő fluoroforok és az eltérő kompenzáció következtében nem minden esetben lehetséges (91).

A XIII-as véralvadási faktor A alegységének (FXIII-A) citoplazmatikus jelenléte régóta ismert a monocita/makrofág, illetve a megakariocita/trombocita sejtvonalban (75, 92-95). Kezdetben immunmorfológiai módszerek segítségével az FXIII-A-t ezen sejtvonalak malignusan elfajult alakjaiban is kimutatták (96). Az FXIII-A expressziót munkacsoportunk tagjai, korábbi munkájuk során meghatározták monocita és granulocita sejtvonalakban. Méréseik kapcsán azt találták, hogy a monoblaszt sejtvonalban konstitutíve jelen van az FXIII-A és expressziója nem fokozódik tovább az éréssel. Ezzel szemben a mieloblasztokban a differenciálódás során nem mutatható ki FXIII-A. Tehát az FXIII-A igen korai markernek tartható a monocita sejtvonalban, szemben a granulocita sejtvonallal. Ezek alapján, munkatársaimmal AML blasztok FXIII-A expresszióját tanulmányoztam. Az eredmények szerint az FXIII-A akut monocitás és mielomonocitás leukémiákban, 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, ismertén FXIII-A pozitív (megakariociter) sejtpopuláció kóros alakjait vizsgálva azt találtam, hogy az FXIII-A jelölődés specifikusabb a konvencionálisan alkalmazott trombocita/megakariocita markereknél.

Ezen markerek analízise alapján ugyanis nem minden esetben egyszerű a trombocita szatellitózis miatt a valódi megakariocita/megakarioblaszt arány megállapítása. Vizsgálataimban ezért egy speciális trombocita-mentesítő EDTA-s mosási technikát használtam és azt találtam, hogy megfelelő körülmények között, a minta ilyen előkezelésével a trombocita adhézio a fehérvérsejt felszínekhez jelentősen csökkenthető, így ez a fals-pozitív reakció kiküszöbölhető. Ekkor a trombocita glikoprotein analízis eredménye az FXIII-A jelöléssel megegyezővé válik, amelynek eredményeként a valós megakariocita arány adható meg.

Eddigi ismereteink szerint a monocita/makrofág és a megakariocita/trombocita sejtvonal normál és leukémia sejteiben volt kimutatható FXIII-A. A korábbi vizsgálatokban - beleértve saját munkacsoportunk korábbi adatait is - azt találtuk, hogy a normál csontvelői és perifériás vér limfociták nem tartalmazzak XIII-as faktort (72,75). Az FXIII-A megjelenése a gyermek- és felnőttkori B-sejtes ALL-ek 40%-ában váratlan eredmény volt. A normál B-sejt prekurzorokat megvizsgálva, nem volt FXIII-A expresszió detektálható, ahogyan érett B-sejt eredetű leukémia (B-CLL) sejtekben sem. Természetesen ismét felmerült a trombociták által okozott, potenciálisan fals pozitív reakció lehetősége, amelyet kizártam az áramlási citometriai módszer mellett alkalmazott mikroszkópos, valamint ELISA technikákkal. Konfokális lézer szkennig mikroszkópia segítségével különböző síkokban vizsgáltam az FXIII-A elhelyezkedését, ugyanis korábban az FXIII-A-t monocita/makrofág sejtekben intranukleáris lokalizációban is megtalálták (97). A kísérletek során azt találtam, hogy a lokalizáció valamennyi esetben intracitoplazmatikus volt és a korábban - peritoneális makrofágok esetén már leírt - kondenzált festődést mutatta (95). Az AML M4 vagy M5 alcsoportú leukémia sejtekéhez viszonyítva az FXIII-A-pozitív limfoblasztok MFI értéke alacsonyabb volt. ELISA vizsgálatokkal azt találtam, hogy a kóros limfoblasztok a

normál monocitáknál meglehetősen kevesebb FXIII-A-t tartalmaznak (3,1 fg/sejt és 37 fg/sejt), rendre. Azonban az átlagos sejttérfogatok figyelembe vételével - hiszen a monociták térfogata jóval nagyobb - elmondható, hogy a limfoblasztokban az FXIII-A mennyisége nem elhanyagolható és áramlási citometriával az FXIII-A-pozitív és – negatív sejtpopuláció biztonsággal elkülöníthető. Mivel ALL-ben gyakran mutathatók ki mieloid antigének, fontos megjegyezni, hogy az FXIII-A pozitív ALL-ek nagy részében nem volt egyéb mieloid marker koexpresszió, így sem CD13-, sem CD33-pozitivitás. Így elmondható, hogy az FXIII-A pozitivitás ALL-ben egy különleges, leukémia-specifikus alcsoportot képvisel. Az aberráns, leukemia asszociált fenotípus 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 (98), a makrofágok alternatív aktivációjában (99), de leírták már proangiogén hatását is (100). További vizsgálatok zajlanak annak kiderítése érdekében, hogy az FXIII-A pozitív betegek prognosztikailag külön csoportot jelentenek-e a negatívakhoz képest.

A krónikus limfoproliferatív betegségek (CLPD) közé sorolt B-sejtes krónikus limfocitás leukémia felnőttekben a leggyakoribb leukémia-forma, melynek lefolyása rendkívül változatos. Prognosztikai csoportok létrehozása igen fontos, ugyanis a betegek egy részében a várható túlélés nem tér el jelentősen a hasonló korú egészségesekétől, míg másokat a betegség gyors progressziója és rövid túlélés jellemez (64). 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 és a Zap-70 expressziót összefüggésbe hozták a betegség klinikai viselkedésével (67,68), 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 (64).

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 (76), melyek eredményeként a Zap-70 pozitív B-sejtek aránya megadható.

Vizsgálataimban a Zap-70 áramlási citometriával történő kimutatásának optimalizálására törekedtem. A mintavételt követő 24 órán belül elvégeztem normál B- és T/NK-sejtek, valamint klinikai B-CLL-es vérminták Zap-70 expressziós vizsgálatát és analízisét indirekt intracitoplazmatikus jelöléssel, 100 000 sejt begyűjtésével, így a detektálási limit változtatásával a szenzitivitást igyekeztem növelni. Fontos megjegyezni, hogy vizsgálataimban az irodalomban legelfogadottabban használt 20%-os „cut off” értéket tekintettem a pozitivitás 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-sejtek 1%, 2% és 5%-át negatívnak véve (77). A másik lehetőség az, hogy a normál B-sejtek 5%-át vesszük Zap-70 pozitívnak és ehhez állítjuk be a vertikális kurzort (79). 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, mintha a nehezebben kivitelezhető módszerrel, szeparált egészséges mononukleáris sejtek B-CLL-es mintához való keverésével a normál-B sejteket használjuk belső negatív kontrollként.

Az áramlási citometria a diagnosztikai és prognosztikai vizsgálatokon túl malignus hematológiai kórképek követésére is alkalmas módszer. Ilyenkor a cél a

kezelést követően esetlegesen a szervezetben még jelenlévő kóros sejtek, azaz a minimális reziduális betegség (MRD) kimutatása. Ezért ezeknél a vizsgálatoknál nagyobb számú esemény begyűjtése szükséges, hiszen ezáltal csökkenthetjük a detektálási limitet és megfelelő biztonsággal, szenzitíven azonosítható akár 1 kóros sejt is 100 000 normál mellett. Kulcsfontosságú az MRD vizsgálatokat megelőzően a kezdeti aberráns, leukémia asszociált immunfenotípusok (LAIP) detektálása, hiszen legtöbbször ezen kóros fenotípusok azonosítására törekszünk a beteg későbbi mintáiból. Ez biztosítja a megfelelő specificitást, az álpozitív jelet adó sejtpopulációk értékelésével, a normál hematogónok kizárásával. Prekurzor B- és T-sejtes ALL-ben az esetek több mint 95%-ban jellemezhetők aberráns fenotípussal (54). Vizsgálataink során követtünk egy gyermekkori CD20-pozitív prekurzor-B ALL esetet (a blasztok 59%-án volt CD20 expresszió detektálható), ahol a többszöri relapszus és korábbi súlyos gyógyszer mellékhatás miatt különleges terápia bevetéséhez folyamodtak a kezelő orvos munkatársak, amelyet gyermekkori ALL-ben ezelőtt ritkán adtak (101,102). Az alkalmazott rituximab CD20-ellenes monoklonális antitest, melyet B-sejtes CLPD kezelésében használnak leginkább, de felnőttkori ALL-ben is kipróbálták már (101). Az MRD vizsgálatokat 100 000 sejt analízisével 3-színű direkt jelölési technikával több időpontban (25. nap, 4., 6., 7., 8., 10. és 13. hónap) elvégeztem és kerestem a relapszuskor identifikált aberráns fenotípusú sejteket. A rituximab ugyan a CD20-pozitív szubpopuláció teljes eliminációját eredményezte, de az éretlenebb fenotípusú CD20-negatív limfoblasztokét nem. Az áramlási citometriai módszer a beteg követésében ugyancsak alkalmazott kvantitatív PCR technika mellett, megbízhatónak és hasznosnak bizonyult, a betegség kimenetelére nézve prediktív volt. A párhuzamosan folytatott Q-PCR módszerrel történő MRD analízis az áramlási citometriai módszerrel meghatározott 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 szolgáltatják 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.

ÖSSZEFOGLALÁS

A hematológiai kórképekben az áramlási citometriai vizsgálatoknak jelentős szerepe van. A celluláris markervizsgálataim eredményeit az alábbiakban összegzem.

- A paroxizmális nokturnális hemoglobinuria (PNH) esetén a PNH klón nagysága nem a vvt felszíni markerexpressziója, hanem leginkább a leukociták alapján ítéltető meg. Kimutattam, hogy a monociták CD14 expressziójának vizsgálata a legszenzitívebb marker. Bevezettem egy új áramlási citometriai paramétert a PNH-s klón méretének megítélésére.

- AML-ben a multidrog rezisztencia (MDR) kimutatási lehetőségeit elemezve arra jutottam, hogy a funkcionális tesztet felszíni markerexpresszióval kombinálva lehetővé válik a malignus sejtek MDR aktivitásának mérése a normál sejtek kizárása mellett. Így különböző centrumok eredményei jobban összevethetők.

- A véralvadás XIII-as faktora intracelluláris formájának vizsgálatát alkalmaztam AML-ek áramlási citometriai méréseken alapuló differenciáldiagnosztikájában és segítségével, valamint egy speciális mosási technika használatával az AML-ben nem ritkán előforduló trombocita szatellitózisból eredő fals-pozitív reakciókat csökkentettem.

- Akut limfoblasztos leukémiák jelentős hányadában - aberráns markerexpresszióként – számos módszerrel kimutattam az FXIII-A intracelluláris megjelenését.

- A Zap-70 expresszióval kapcsolatos sok technikai ismeret ellenére standard analízis protokollok kidolgozása szükséges lenne. B-CLL-ben önálló prognosztikai faktorként nem ajánljuk használni.

- Áramlási citometriával ALL-es beteget speciális, az immunfenotípusra is kiható terápia alkalmazása után minimális reziduális betegség meghatározása céljából követve a módszert megbízhatónak és hasznosnak találtam.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Singer SJ and Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972;175:720-31.
2. Vereb G, Szollosi J, Matko J, Nagy P, Farkas T, Vigh L, Matyus L, Waldmann TA and Damjanovich S. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:8053-8.
3. Klein I, Sarkadi B and Varadi A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999;1461:237-62.
4. Pitlik E and Holló Z. A multidrog rezisztencia jelentősége a rosszindulatú daganatok terápiájában. *Orv Hetil* 1996;137:257-63.
5. Maecker HT, Todd SC and Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *Faseb J* 1997;11:428-442.
6. Yeh ET, Kamitani T and Chang HM. Biosynthesis and processing of the glycosylphosphatidylinositol anchor in mammalian cells. *Semin Immunol* 1994;6:73-80.
7. Caligaris-Cappio F. How immunology is reshaping clinical disciplines: the example of haematology. *Lancet* 2001;358:49-55.
8. Chan JK, Ng CS and Hui PK. A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies. *Histopathology* 1988;12:461-80.
9. Chorvath B and Sedlak J. Hematopoietic cell differentiation antigens (CD system 1997). Cancer research relevance. *Neoplasma* 1998;45:273-6.
10. Kipps TJ. The cluster of differentiation antigens. In: L Beutler, Collier, Kipps, Seligshon., ed. *Hematology: McGraw-Hill*; 2001:141-5.

11. Myers J. Antigen retrieval: a review of commonly used methods and devices. *MLO Med Lab Obs* 2006;38:10, 12-15; quiz 16-17.
12. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological characterization of leukemias. *Leukemia* 1995;9:1783 – 6.
13. Drach D, Drach J, Glassl H, Gattringer C, Huber H. Flow cytometric detection of cytoplasmic antigens in acute leukemias: implications for lineage assignment. *Leuk Res* 1993;17: 455 – 6.
14. Buccheri V, Matutes E, Dyer MJS, Catovsky D. Lineage commitment in biphenotypic acute leukemia. *Leukemia* 1993; 7: 919-7.
15. Lanza F, Latorraca A, Moretti S, Castagnari B, Ferrari L, Castoldi G. Comparative analysis of different permeabilization methods for the flow cytometry measurement of cytoplasmic myeloperoxidase and lysozyme in normal and leukemic cells. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 1997;30: 134-44.
16. Groeneveld K, Te Marvelde JG, Van den Beemd, MW, Hooijkaas H, van Dongen JJ. Flow cytometric detection of intracellular antigens for immunophenotyping of normal and malignant leukocytes. *Leukemia* 1996;10: 1383-9.
17. Jacobberger JW. Flow cytometric analysis of intracellular epitopes. In: NJ Stewart CC, ed. *Immunophenotyping*: Wiley-Liss; 2000.
18. Lan HY, Hutchinson P, Tesch GH, Mu W and Atkins RC. A novel method of microwave treatment for detection of cytoplasmic and nuclear antigens by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1996;190:1-10.
19. Kappelmayer J, Gratama JW, Karászi É, Menéndez P, Ciudad J, Rivas R, Orfao A. Flow cytometric detection of intracellular myeloperoxidase, CD3 and CD79a .

- Interaction between monoclonal antibody clones, fluorochromes and sample preparation protocols. *J Immunol Methods* 2000;242:53-65.
20. Lanza F, Stierlé A, Fournier D, Morales M, André G, Nurden AT, Cazenave JP. A new variant of Glanzmann's thrombasthenia (Strasbourg I). *J Clin Invest* 1992;89:1995-2004.
21. Schwarz M, Meade G, Stoll P, Ylanne J, Bassler N, Chen YC, Hagenmeyer CE, Ahrens I, Moran N, Kenny D, Fitzgerald D, Bode C, Peter K. Conformation-specific blockade of the integrin GpIIb/IIIa. A novel antiplatelet strategy that selectively targets activated platelets. *Circ Res* 2006;99:25-33.
22. Nagy H, Goda K, Fenyvesi F, Bacsó Z, Szilasi M, Kappelmayer J, Lustyik G, Cianfriglia M, Szabó G Jr. Distinct groups of multidrug resistance modulating agents are distinguished by competition of P-glycoprotein-specific antibodies. *BBRC* 2004;315:942-9.
23. Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of the multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Ann Rev Biochem* 1993;62:385-427.
24. Dalton WS. Mechanism of drug resistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol* 1997;34:3-8.
25. Bradshaw DM, Arceci RJ. Clinical relevance of transmembrane drug efflux as mechanism of multidrug resistance. *J Clin Oncol* 1998;16:3674-90.
26. Kappelmayer J, Karászi É, Telek B, Jakab K: "Pros and cons" on how to measure multidrug resistance in leukemias *Leuk Lmyphoma* 2002;43:711-17.
27. Schmid I, Schmid P, Giorgi JV. Conversion of logarithmic channel numbers into relative fluorescence intensity. *Cytometry* 1988;9:533-8.

28. Schwartz A, Marti GE, Poon R, Gratama JW, Fernández-Repollet E. Standardizing flow cytometry: a classification system of fluorescence standards used for flow cytometry. *Cytometry* 1998;33:106-14.
29. Davis KA, Abrams B, Hoffman RA, Bishop JE. Quantitation and valence of antibodies bound to cells. *Cytometry Suppl* 1996;8:125.
30. Poncelet P, Carayon P. Quantification of cell-surface antigens by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1985;85:65-75.
31. Böhler T, von Au M, Klose N, Müller K, Coulibaly B, Nauwelaers F, Spengler HP, Kynast-Wolf G, Krausslich HG. Evaluation of a simplified dual-platform flow cytometric method for measurement of lymphocyte subsets and T-cell maturation phenotypes in the population of Nouna, Burkina Faso. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:775-81.
32. Guttridge MG, Belfield H, Hollyman D, Lankester A, Watt SM. An internal positive control for the enumeration of CD45(+) and CD34(+) cells by flow cytometry allows monitoring of reagent and operator performance. *Cytotherapy* 2007;9:275-82.
33. Levering WH, Preijers FW, van Wieringen WN, Kraan J, van Beers WA, Sintnicolaas K, van Rhenen DJ, Gratama JW. Flow cytometric CD34+ stem cell enumeration: lessons from nine years' external quality assessment within the Benelux countries. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72:178-88.
34. Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Mann G, Pötschger U, Mühlegger N, Fritsch G, Gadner H; Austrian Berlin-Frankfurt-Münster Study Group. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99:1952-8.

35. Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J Rare Dis* 2006;6:1-10.
36. Losonczy G, Rosenberg N, Kiss C, Kappelmayer J, Vereb G, Kerényi A, Balogh I, Muszbek L. A novel homozygous mutation (1619delC) in GpIIb gene associated with Glanzmann thrombasthenia, the decay of GpIIb-mRNA and the synthesis of a truncated GpIIb unable to form complex with GpIIIa. *Thromb Haemost* 2005;93:904-9.
37. Afrasiabi A, Lecchi A, Artoni A, Karimi M, Ashouri E, Peyvandi F, Mannucci PM. Genetic characterization of patients with Bernard-Soulier syndrome and their relatives from Southern Iran. *Platelets* 2007;18:409-13.
38. Alfinito F, Del Vecchio L, Rocco S, Boccuni P, Musto P and Rotoli B. Blood cell flow cytometry in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a tool for measuring the extent of the PNH clone. *Leukemia* 1996;10:1326-30.
39. Richards SJ, Barnett D. The role of flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the clinical laboratory. *Clin Lab Med* 2007;27:577-90.
40. Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996;87:5332-40.
41. Piedras J, López-Karpovitch X. Flow cytometric analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to assess paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone size. *Cytometry (Comm Clin Cytometry)* 2000;42:234-8.
42. Schubert J, Alvarado M, Uciechowski P, Zielinska-Skowronek M, Freund M, Vogt H, Schmidt RE. Diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using immunophenotyping of peripheral blood cells. *Br J Haematol* 1991;79:487-92.

43. Bikoue A, George F, Poncelet P, Mutin M, Janossy G, Sampol J. Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression: normal adult values. *Cytometry* 1996;26:137-47.
44. Lavabre-Bertrand T, Janossy G, Ivory K, Peters R, Secker-Walker L, Porwit-MacDonald A. Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry: I. CD10 expression. *Cytometry* 1994;18:209-17.
45. Porwit-MacDonald A, Janossy G, Ivory K, Swirsky D, Peters R, Wheatley K, Walker H, Turker A, Goldstone AH, Burnett A. Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. IV. CD34 overexpression in acute myelogenous leukemia M2 with t(8;21). *Blood* 1996;87:1162-9.
46. Davis BH, Olsen SH, Ahmad E, Bigelow NC. Neutrophil CD64 is an improved indicator of sepsis in emergency department patients. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:654-61.
47. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis. *Leukemia* 1996;10:877-95.
48. Sanchez ML, Almeida J, Vidriales B, Lopez-Berges MC, Garcia-Marcos MA, Moro MJ, Corrales A, Calmuntia MJ, San Miguel JF, Orfao A. Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia* 2002;16:1460-9.
49. Qadir M, Barcos M, Stewart CC, Sait SN, Ford LA, Baer MR. Routine immunophenotyping in acute leukemia: Role in lineage assignment and reassignment. *Cytometry B Clin Cytom* 2006;70:329-34.

50. Griesinger F, Piro-Noack M, Kaib N, Falk M, Renziehausen A, Troff C, Grove D, Schnittger S, Buchner T, Ritter J, Hiddemann W, Wormann B. Leukaemia-associated immunophenotypes (LAIP) are observed in 90% of adult and childhood acute lymphoblastic leukaemia: detection in remission marrow predicts outcome. *Br J Haematol* 1999;105:241-55.
51. Voskova D, Schoch C, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. Stability of leukemia-associated aberrant immunophenotypes in patients with acute myeloid leukemia between diagnosis and relapse: comparison with cytomorphologic, cytogenetic, and molecular genetic findings. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;62:25-38.
52. Campana D, Coustand-Smith E. Minimal residual disease studies by flow cytometry in acute leukemia. *Acta Haematol* 2004;12:8-15.
53. Garcia Vela JA, Monteserin MC, Delgado I, Benito L, Ona F. Aberrant immunophenotypes detected by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2000;36:275-84.
54. Orfao A, Ortuno F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry A* 2004;58A:62-71.
55. Drexler HG, Thiel E, Ludwig WD. Review of the incidence and clinical relevance of myeloid antigen-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1991;5:637-45.
56. Del Vecchio L, Finizio O, Pardo C, Pane N, Schianove EM, Vacca C, Ferrara F. Coordinate expression of T-cell antigens on acute myelogenous leukemia and of myeloid antigens on T-acute lymphoblastic leukemia. Speculation on a highly balanced bilinearity. *Leukemia* 1991;5:815-18.
57. Hurwitz CA, Loken MR, Graham ML, Karp JE, Borowitz MJ, Pullen DJ, Civin CI. Asynchronous antigen expression in B lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1988;72:299-307.

58. Macedo A, Orfao A, Vidriales MB, Lopez-Berges MC, Valverde B, Gonzalez M, Caballero MD, Ramos F, Martinez M, Fernandez-Calvo J, Martinez A, San Miguel JF. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann Haematol* 1995;70:189-94.
59. Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, Gonzalez M, Bartram CR, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, San Miguel JF, van Dongen JJ. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13:110-8.
60. Brüggemann M, Raff T, Flohr T, Gökbuget N, Nakao M, Droese J, Lüschen S, Pott C, Ritgen M, Scheuring U, Horst HA, Thiel E, Hoelzer D, Bartram CR, Kneba M; German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006;107:1116-23.
61. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, Sandlund JT, Rivera GK, Rubnitz JE, Ribeiro RC, Pui CH, Campana D. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96:2691-6.
62. Neale GA, Coustan-Smith E, Stow P, Pan O, Chen X, Pui CH, Campana D. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18:934-8.
63. Kerst G, Kreyenberg H, Roth C, Well C, Dietz K, Coustan-Smith E, Campana D,

- Koscielniak E, Niemeyer C, Schlegel PG, Müller I, Niethammer D, Bader P.
Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry and real-time PCR. *Br J Haematol* 2005;128:774-82.
64. Kajtár B, Jáksó P, Kereskai L, Lacza Á, Méhes G, Bodnár MA, Dombi J. P, Gasztonyi Z, Egyed M, Iványi JL, Kovács G, Marton É, Palaczki A, Petz S, Tóth P, Sziládi E, Losonczy H, Pajor L. Prognosztikai faktorok komplex vizsgálata krónikus lymphocytás leukémiában. *Orv Hetil* 2007;148:737-43.
65. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-54.
66. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840-7.
67. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001;194:1639-47.
68. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, Zhao H, Ibbotson RE, Orchard JA, Davis Z, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Arthur DC, Marti GE, Wilson WH, Hamblin TJ, Oscier DG, Staudt LM. Zap-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin

- genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003;101:4944-51.
69. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. Zap-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 1992;71:649-62.
 70. Vivier E, da Silva AJ, Ackerly M, Levine H, Rudd CE, Anderson P. Association of a 70-kDa tyrosine phosphoprotein with the CD16: zeta: gamma complex expressed in human natural killer cells. *Eur J Immunol* 1993;23:1872-6.
 71. Katona E, Ajzner E, Tóth K, Kárpáti L, Muszbek L. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J Immunol Methods* 2001;258:127-35.
 72. Kappelmayer J, Simon A, Katona E, Szanto A, Nagy L, Kiss A, Kiss C, Muszbek L. Coagulation factor XIII-A. A flow cytometric intracellular marker in the classification of acute myeloid leukemias. *Thromb Haemost* 2005;94:454-9.
 73. Betz SA, Foucar K, Head DR, Chen IM, Willman CL. False-positive flow cytometric platelet glycoprotein IIb/IIIa expression in myeloid leukemias secondary to platelet adherence to blasts. *Blood* 1992;79:2399-403.
 74. Sbrana S, Buffa M, Bevilacqua S, Spiller D, Parri MS, Gianetti J, De Filippis R, Clerico A. Granulocyte- and monocyte-platelet adhesion index in coronary and peripheral blood after extracorporeal circulation and reperfusion. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72:215-22.
 75. Muszbek L, Ádány R, Szegedi G, Polgár J, Kávai M. Factor XIII of blood coagulation in human monocytes. *Thromb Res* 1985;37:401-10.
 76. Titus K. Zigs and zags on the Zap-70 highway. College of American Pathologists, CAP Today 2004;p 1-4.

77. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marce S, Lopez-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003;348(18):1764-75.
78. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, Hamblin TJ, Staudt LM, Oscier DG. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet* 2004;363(9403):105-11.
79. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberg DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004;351(9):893-901.
80. Chen YH, Peterson LC, Dittman D, Evens A, Rosen S, Khoong A, Shankey TV, Forman M, Gupta R, Goolsby CL. Comparative analysis of flow cytometric techniques in assessment of Zap-70 expression in relation to IgVH mutational status in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 2007;127:182-91.
81. Bakke AC, Purtzer Z, Leis J, Huang J. A robust ratio metric method for analysis of Zap-70 expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Cytometry B Clin Cytom* 2006;70:227-34.
82. Kay S, Herishanu Y, Pick M, Rogowski O, Baron S, Naparstek E, Polliack A, Deutsch VR. Quantitative flow cytometry of Zap-70 levels in chronic lymphocytic leukemia using molecules of equivalent soluble fluorochrome. *Cytometry Part B Clin Cytom* 2006;70B:218-26.
83. Muller J, Kovacs G, Jakab Z, Rényi I, Galántai I, Békési A, Kiss C, Nagy K, Kajtár P, Bartyik K, Masát P, Magyarosy E. [Treatment results with ALL-BFM-95 protocol in

- children with acute lymphoblastic leukemia in Hungary]. [Article in Hungarian]. *Orv Hetil* 2005;146:75-80.
84. Testi AM, Moleti ML, Giona F, Iori AP, Meloni G, Miniero R, Pigna M, Amadori S, Mandelli F. Treatment of primary refractory or relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL) in children. *Ann Oncol* 1992;3:765-7.
 85. McCarthy AJ, Pitcher LA, Hann IM, Oakhill A. FLAG (fludarabine, high-dose cytarabine, and G-CSF) for refractory and high-risk relapsed acute leukemia in children. *Med Pediatr Oncol* 1999;32:411-5.
 86. Maciejewski JP, Young NS, Yu M, Anderson SM, Sloan EM. Analysis of the expression of glycosylphosphatidylinositol anchored proteins on platelets from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Thromb Res* 1996;83:433-47.
 87. Beck WT, Grogan TM, Willman CL, Cordon-cardo C, Parham DM, Kuttish JF, Andreff M, Bates SE, Berard CW, Boyett JM, Brophy NA, Broxterman HJ, Chan HSL, Dalton WS, Dietel M, Fojo AT, Gascoyne RD, Head D, Houghton PJ, Srivastava DK, Lehnert M, Leith CP, Paietta E, Pavelic ZP, Rimsza L, Roninson IB, Sikic BI, Twentyman PR, Warnke R, Weinstein R. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations. *Cancer Res* 1996;56:3010-20.
 88. Holló Zs, Homolya L, Davis CW, Sarkadi B. Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochim Biophys Acta* 1994;1191:384-8.
 89. Sonneveld P, Wiemer E. Assays for the analysis of P-glycoprotein in acute myeloid leukemia and CD34 subsets of AML blasts. *Leukemia* 1997;11:1160-5.
 90. Tsimberidou AM, Paterakis G, Androutsos G, Anagnostopoulos N, Galanopoulos A, Kalmantis T, Meletis J, Rombos Y, Sagriotis A, Symeonidis A, Tiniakou M, Zoumbos

- N, Yataganas X. Evaluation of the clinical relevance of the expression and function of P-glycoprotein, multidrug resistance protein and lung resistance protein in patients with primary acute myelogenous leukemia. *Leuk Res* 2002;26:143-54.
91. De Moerloose B, Dhooge C, Philippe J. Discordance of P-glycoprotein expression and function in acute leukemia. *Adv Exp Med Biol* 1999;457:107-18.
 92. Buluk K. An unknown function of blood platelets. *Polski Tygod Lekar* 1955;10:191-97.
 93. Henriksson P, Becker S, Lynch G, McDonagh J. Identification of intracellular factor XIII in human monocytes and macrophages. *J Clin Invest* 1985;76:528-34.
 94. Kappelmayer J, Bacsko G, Birinyi L, Zakany R, Kelemen E, Adany R. Consecutive appearance of coagulation factor XIII subunit A in macrophages, megakaryocytes, and liver cells during early human development. *Blood* 1995;86:2191-7.
 95. Ádány R, Belkin A, Vasilevskaya T, Muszbek L. Identification of blood coagulation factor XIII in human peritoneal macrophages. *Eur J Cell Biol* 1985;38:171-3.
 96. Invernizzi R, De Fazio P, Iannone AM, Zambelli LM, Rastaldi MP, Ippoliti G, Ascari E. Immunocytochemical detection of factor XIII A-subunit in acute leukemia. *Leukemia Research* 1992;16:829-36.
 97. Ádány R, Bardos H, Antal M, Modis L, Sarvary A, Szucs S, Balogh I. Factor XIII of blood coagulation as a nuclear crosslinking enzyme. *Thromb Haemost* 2001;85:845-51.
 98. Sarvary A, Szucs S, Balogh I, Becsky A, Bardos H, Kawai M, Seligsohn U, Egbring R, Lopaciuk S, Muszbek L, Adany R. Possible role of factor XIII subunit A in Fcγ and complement receptor-mediated phagocytosis. *Cell Immunol* 2004;228:81-90.

99. Törőcsik D, Bárdos H, Nagy L, Ádany R. Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2132-9.
100. Dardik R, Loscalzo J, Eskaraev R, Inbal A. Molecular mechanisms underlying the proangiogenic effect of factor XIII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:526-32.
101. Gökbuget N, Hoelzer D. Novel antibody-based therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006;19:701-13.
102. Claviez A, Eckert C, Seeger K, Schrauder A, Schrappe M, Henze G, von Stackelberg A. Rituximab plus chemotherapy in children with relapsed or refractory CD20-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2006;91:272-3.

AZ ÉRTKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

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**

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

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

AZ ÉRTEKEZÉSBEN NEM SZEREPLŐ EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

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.*)

TÁRGYSZAVAK – KEY WORDS

áramlási citometria – flow cytometry

immunfenotípus – immunophenotype

akut limfoblasztos leukémia – acute lymphoblastic leukemia

akut mieloid leukémia – acute myeloid leukemia

B-sejtes krónikus limfocitás leukémia – B-cell chronic lymphocytic leukemia

paroxizmális nokturnális hemoglobinúria – paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

multidrog rezisztencia – multidrug resistance

minimális reziduális betegség – minimal residual disease

XIII-as véralvadási faktor A alegység – blood coagulation factor XIII subunit A

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Muszbek László Professzor úrnak, hogy a Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézetben elkezdett TDK munkámra lehetőséget adott, majd az intézetbe nappali tagozatos MD-PhD hallgatóként felvett. Ezen felül köszönöm folyamatos figyelmét és biztatását, mellyel munkámat támogatta.

Köszönöm témavezetőminek, Dr. Kappelmayer Jánosnak, és Dr. Hevessy Zsuzsának, hogy felkeltették érdeklődésemet a hematológia iránt, hogy közös munkáink során a leukémia diagnosztikában használt immunfenotipizásást és számos más egyéb módszert megismerhettem és elsajátíthattam. Köszönöm, hogy folyamatos fejlődésre ösztönöztek és támogattak, mind szakmailag mind emberileg, nem csupán az itt töltött évek alatt, hanem azt követően is, valamint azt is, hogy kutatómunkára, problémamegoldásra és nem utolsósorban önállóságra készítettek. Külön köszönöm a kísérletek végzésében és értékelésében nyújtott szakmai segítséget.

Köszönöm a klinikus munkatársaknak Prof. Dr. Kiss Attilának, Dr. Szegedi Istvánnak, Dr. Szász Róbertnek és elméleti kollégáknak, Dr. Vereb Györgynek, Dr. Katona Évának, Dr. Balogh Istvánnak, Dr. Scholtz Beátának, Dr. Nagy Bélának, Buslig Júliának, hogy mellettük szakmailag hasznos és jó hangulatú együttműködésben lehetett részem úgy a rutin hematológiai diagnosztika, mint az együtt végzett kutatómunka során.

Köszönettel tartozom Kissné Sziráki Valéria, Győrfiné Veszprémi Anikó, Trefán Ildikó, Bekéné Debreceni Ildikó szakasszisztenseknek, és Bálint Réka, Dzudzsák Erika asszisztenseknek, akik gyakorlati tanácsaikkal, türelmükkel és segítőkészségükkel támogatták kísérletes munkáimat.

Köszönöm Kópis Ildikónak és Nagy Csillának, valamint Antal Csabának a közlemények és a tézisek írása közben nyújtott technikai segítségüket és tanácsaikat.

Köszönöm az Intézet valamennyi dolgozójának, hogy megértésükkel, segítségükkel támogatták munkámat és kellemes hangulatot biztosítottak a munkavégzéshez.

Végül, de elsősorban köszönöm családomnak, hogy türelmükkel, a nyugodt légkör megteremtésével, és megértésükkel biztosították számomra a munkához szükséges feltételeket, és hogy biztatásukkal végig kísérték munkámat. Külön köszönöm családomból édesapámnak, Dr. Kiss Csongornak és páromnak, Dr. Csáthy Lászlónak, akik szakmailag és technikailag is rengeteget segítettek.

FÜGGELÉK