

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Automatizált képalkotó-citometria alkalmazási  
lehetőségei húgyhólyagrak ürített vizeletből történő  
molekuláris citogenetikai vizsgálatánál**

Pajor Gábor

*Doktori iskola: Interdiszciplináris Orvostudományok*

*Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegei Balázs*

*Program: Humán molekuláris genetika*

*Program és témavezető: Prof. Dr. Melegh Béla*

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,  
Orvosi Genetikai Intézet**

**Pécs, 2012.**

## Rövidítések jegyzéke

---

Asu	tetszőleges festődési érték (arbitrary staining unit)
BAC	mesterséges bakteriális kromoszóma (bacterial arteficial chromosome)
CGH	összehasonlító genomiális hibridizáció (comparative genomic hybridization)
CEP	centromer specifikus szonda (chromosome enumeration probe)
CCD	töltés csatolt eszköz (charge-coupled device)
CK	citokeratin
CTC	keringő tumorsejt (circulating tumor cell)
CIN	kromoszómális instabilitás
COBRA	kombinált bináris arány jelölés (COmbined Binary RAtio)
DOF	Mélységélesség (Depth of Field)
Del	deléción
DAPI	4,6-diamidine, 2-phenylindole dihydrochloride
ELISA	enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálatok (enzyme-linked immunosorbent assay)
FISH	fluoreszcencia in situ hibridizáció
FP	álpozitivitás (false positivity)
FN	álnegativitás (false negativity)
HMWCK	magas mólsúlyú citokeratin (high molecular weight cytokeratin)
ICC	immuncitokémia
LSI	lókusz specifikus szonda (locus specific identifier)
LMWCK	alacsony mólsúlyú citokeratin (low molecular weight cytokeratin)
Mic	kontúrterületen belüli átlagos festődési erősség (mean intensity contour)
MRD	minimális reziduális betegség (minimal residual disease)
NA	numerikus apertúra
PULMP	alacsony malignitású papilláris neoplázia (papillary urothelial neoplasm of low malignant potential)
PAC	P1 fág genomból készített mesterséges kromoszóma (P1-derived artificial chromosome)
PFM	pásztázó fénymikroszkópia
SKY	spektrális kariotipizálás
SD	szórás (standard deviáció)
SNP	egyedi nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)
Tic	kontúrterületen belüli teljes festődési intenzitás (total intensity contour)
YAC	Élesztő mesterséges kromoszóma (yeast arteficial chromosome)

## Bevezetés

---

### Hólyagdaganatok epidemiológiája, klasszifikációja

---

A húgyhólyagrak heterogén entitás, melynek lefolyása és végső kimenetele széles skálán mozog. A spektrum egyik végén megtalálható jól differenciált, korai stádiumú elváltozások, melyek alacsony progresszivitási hajlamot mutatnak, kezdeti endoszkópos kezelés, majd utánkövetés mellett csak ritkán veszélyeztetik a páciens életét. A skála másik végén található differenciálatlan, magas grádusú, előrehaladott patológiás stádiumú tumorok ezzel szemben nehezen kezelhetők és nagy százalékban végződnek halállal.

Előfordulását tekintve a húgyhólyagrak a nyugati világban a férfiak negyedik, a nők hetedik leggyakoribb rákos megbetegedése. Előfordulási gyakorisága nők körében lényegesen ritkább - harmada, negyede - a férfiaknál tapasztalt mértéknél; terhességen átesett nőknél a gyakoriság tovább csökken. 2008-ban világszerte több mint 385 000 új beteget regisztráltak, s ugyanebben az évben több mint 150 000 beteg vesztette életét húgyhólyagrak következtében. A területi eloszlás nem egyenletes, nemzetközi összehasonlításban a gyakoriság akár tizennégyszeres különbsége is tapasztalható. Leggyakrabban Európában és Észak-Amerikában fordul elő. Az átlagos halálozási ráta 2-10 halálozeset / 100 000 fő / év. A diagnózis időpontjában az átlag életkor 65-70 év.

A hólyagtumoroknak jól ismert és jelentős környezeti kockázati tényezői vannak, melyek között elsősorban a dohányzás említendő. E káros szenvedély kóroki szerepe bizonyított, 2-4x-es mértékben növeli a betegség kialakulásának valószínűségét; a húgyhólyagrakos betegek 30-50%-a dohányos. A második legfontosabb kockázati tényezőt a foglalkozásköri hatások jelentik, melyek – egyes számvetések szerint – az összes hólyagrak mintegy 20%-ért felelősek. A gumi-, illetve festékiparban használatos aromás aminok (pl. benzidin, 2-naftilamin, 4-aminobifenil, o-toluidin, 4-kloro-o-toluidin), valamint az alumínium- és, a széniparban használt policiklikus aromás szénhidrogén vegyületek mind bizonyítottan növelik a hólyagrak kialakulásának valószínűségét. Egyéb környezeti kockázati tényezőnek tekinthető az idült húgyúti fertőzés, valamint egyes tanulmányok szerint a dűlmirigy tumorok kezelésénél alkalmazott sugárterápia. Külön környezeti tényezőként említhető a vérmétely (*Schistosoma haematobium*) fertőzés, vagy schistosomiasis (más néven bilharziózis), mely elsősorban Észak-Afrika és a Közel-Kelet öntözéses területeit érinti. A vérmétely által okozott gyulladás gyakran vezet nem-átmeneti sejtes típusú (NTCC) húgyhólyagrakhoz. A familiáris típusú hólyagtumor viszonylag ritka, azonban az egyenesági rokonságban némileg emelkedett kockázati tényező figyelhető meg.

Az összes húgyhólyagrak több mint 90%-a ún. átmeneti sejtes karcinóma (Transitional Cell Carcinoma – TCC), 5% laphám rák és 1%-a adenokarcinóma. A TCC-k hisztopatológiai gradálása az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 1973 óta elfogadott klasszifikációs rendszere szerint grade 1-3. Ezt a rendszert változtatta meg a WHO és az International Society of Urological Pathology (ISUP) 1998-ban elfogadott klasszifikációja, melyet végül 2004-ben kismértékben újból változtattak. A legfrissebb klasszifikációt azonban számos kritika érte, mi több, nemrégén a Nemzetközi Húgyhólyagrak Csoport (IBCG) hivatalos ajánlásában előírányozta, hogy mind az 1973 mind az 1998 klasszifikáció maradjon érvényben, amíg a későbbi besorolással kapcsolatban nem készülnek nagy kiterjedésű klinikai hatékonyság hitelesítő (validációs) vizsgálatok. Mindezen körülményeket figyelembe véve vizsgálataink során az eredeti (és a mai napig legelterjedtebb) G1-3 grádus beosztást

alkalmaztuk. A hólyagtumorerő kórszöveti stádiumbeosztása továbbra is a TNM (Tumor-Node-Metastasis system) beosztást követi.

Az összes átmeneti sejtes karcinóma ~70%-a felületen nem izom invazív rák (Ta, T1 ill. Tis stádiumok), mely tumorok 50-70%-a azonban idővel kiújul és ezek körülbelül 10-20%-a később izominvazív betegséggé fejlődik. Azt elörevetíteni, hogy mely betegeknél fog a felületen daganat a hólyag izmos falába, vagy azon túl fejlődni, továbbra is nagy diagnosztikai kihívás, a tumor grádusa azonban komoly befolyásoló tényező. A jól differenciált és egyben Ta stádiumú tumorokkal bíró betegek 15 éves progresszió-mentes túlélés esélye eléri a 95%-ot, míg tumor specifikus halálozással gyakorlatilag nem kell számolni. A differenciálatlan, Ta stádiumú hólyagdaganatok esetében progresszió-mentes túlélés esélye 61% míg a tumor specifikus túlélés valószínűsége 74%; azonban ugyanezen értékek T1 betegeknél 44% ill. 62%.

Klinikai megjelenés és tünet tekintetében a hólyagrák elsődleges - a betegek ~ 85%-át érintő - tünete a makro-, vagy mikroszkópos vizeletelés, mely azonban általában fájdalommentes és gyakran csupán időszakosan jelentkezik. Fontos azonban megjegyezni, hogy a vizeletelés okaként az esetek csupán alig több mint 10%-ában állapítható meg húgyhólyagrák. További – kevésbé gyakori – tünetek a fájdalmas, gyakori nehéz vizeletelés, vesetáji fájdalom, láz vagy vizelethiány (anúria).

## Hólyagdaganatok Diagnosztikája

---

Húgyhólyagrák gyanúja esetén a rutin kivizsgálás napjainkban még mindig az ürített vizelet citológia, cisztoszkópia, valamint a felső húgyutak radiológiai vizsgálatát jelenti. Mind a cisztoszkópos klinikai vizsgálat, mind a citológia számos előnnyel bír, azonban e módszerek hátrányai szintén gyakran hangsúlyozottak. A cisztoszkópia magas specificitású eljárás mellyel a legtöbb tumor ugyancsak magas érzékenységgel észlelhető, azonban bizonyos kisméretű lapos tumorok, mint pl. egyes in situ karcinómák rejtve maradhatnak. Ezen túlmenően a módszer továbbra is invazív beavatkozásnak számít, mely egyes esetekben helyi traumák okozta szövődeményekkel, valamint akár fertőzésekkel is járhat. Az eljárás továbbá költséges; figyelembe véve azt is, hogy a húgyhólyagrák a magas kiújulási ráta miatt gyakorlatilag egész életen át tartó utánkövetést igényel, nem meglepő, hogy egyes mérvadó számítások szerint a legtöbb pénzt felemészítő malignus tumor.

A vizeletcitológia nagy előnye, hogy a beteg szemszögéből a vizsgálat különösebb előkészületet nem igényel, továbbá nincs szükség különleges eszközökre. A specificitás összességében magas (nemegyszer 100%), így álpozitív diagnózis csak ritkán fordul elő. A módszer érzékenysége azonban átlagosan 35-65%, továbbá ez az érték nagyban függ a tumor differenciáltságától: míg a magas grádusú, differenciálatlan tumorok esetében a szenzitivitás elérheti a 80-90% is, alacsonyabb grádusú jól differenciált tumorokban ez az érték nem ritkán mindössze 20%. További gyakran emlegetett hátránya a módszernek, hogy a diagnózis pontossága nagyban függ a citopatológus képességeitől, tapasztalatától.

A cisztoszkópia valamint a vizeletcitológia fent említett árnyoldalai miatt nagy az igény egy nem invazív, magas pontosságú, reprodukálható diagnosztikai teszt kialakítására. Ennek következtében az elmúlt években számos daganat marker kimutatására alkalmas módszer került kifejlesztésre, melyeket 2 fő csoportba lehet osztani: szolubilis ill. sejt alapú markerek. Előbbiek közé sorolandók a (i) vizeletelésen alapuló vizsgálatok, (ii) BTA stat, BTA-TRAK tesztek, (iii) nukleáris matrix protein (NMP-22), (iv) mitotikus fehérjéket kimutató vizsgálatok, (v) antiapoptotikus fehérjéket kimutató vizsgálatok, (vi) transzkripciós faktor vizsgálatok, (vii) citokeratinok valamint hialuronsav és

hialuronidáz kimutatására szolgáló metodikák. Utóbbiak közé tartozik a (i) mikroszatellita analízis, (ii) telomeráz teszt, (iii) quanticyt nukleáris kariometria, és végül, de nem legutolsósorban a (iv) molekuláris citogenetika (FISH).

## Hólyagdaganatok citogenetikája

---

Az irodalomban fellelhető, hólyag daganatokkal kapcsolatban tapasztalt kariotípusok az igen egyszerűtől a rendkívül összetettig terjednek, egységesen elfogadott specifikus eltérést pedig a mai napig nem közöltek. A 9-es kromoszóma monoszómiája, valamint ugyanezen kromoszóma p illetve q karjainak vesztese gyakran jelentkezik (~50%). A 9-es kromoszómához kapcsolódó veszteségek gyakorisága arra enged következtetni, hogy ezek az eltérések a patogenezis korai eseményei, azonban egységes álláspont e tekintetben sincs. A 9p deléció gyakran érinti a *CDKN2A/ARF* (P16) tumorszupresszor kódoló régiót, sőt ez a rendellenesség (del9p21) tekinthető a leggyakoribbnak a hólyag tumoroknál. Érdekesség azonban, hogy a *CDKN2A* gént érintő 9p21 deléció egyes esetekben normál uroteliumban is előfordul. További ismert jelentősebb deléció a 10q, mely a *PTEN/MMAC1* tumorszupresszor útvonalat érintheti, valamint a del (17p), mely TP53 fehérje funkcióvesztést eredményezhet. Utóbbi összefügghet a tumor differenciáltságával valamint a stádiumbeosztással is. A hólyagtumor citogenetikai heterogenitását mutatja az az ellentmondás is, miszerint, míg egyes tanulmányok az Y kromoszóma veszteséről – ráadásul, mint önálló patogénomikus abnormalitás –, addig mások ugyanezen kromoszóma poliszómiájáról számolnak be, mi több, utóbbi emelkedett grádussal és stádiummal asszociált mivoltát is bizonyítottnak látják. Számos további számbeli kromoszómális rendellenesség ismert, melyek jelentős része nyereség, azaz valamilyen mértékű poliszómia. Ilyen természetellenes mintázatot mutathatnak többek között az 1, 3, 7, 9, 11, 15, 17, 18 kromoszómák.

## A molekuláris citogenetika szerepe a hólyagdaganatok diagnosztizálásában

---

Mivel a hagyományos citogenetikai, CGH valamint DNS poliploiditás vizsgálata nyomán régóta ismeretes a hólyagtumorok kromoszómális instabilitása, kézenfekvőnek tűnt, hogy a hólyagdaganatok nem-invazív vizsgálata iránt régóta fennálló igényt a hólyag faláról exfoliálódó (lesodródó), az ürített vizeletben megjelenő sejtek citogenetikai vizsgálatával lehetne kielégíteni. Rutin diagnosztizálásra azonban a hagyományos kariotipizálás alkalmatlan, mivel a hólyag sejtek tenyésztése, azok mitotikus állapotba hozatala rendkívül körülményes és csak viszonylag kis arányban sikeres. Mindezek ismeretében számos kísérlet indult interfázis molekuláris citogenetikai módszerek kidolgozására, és mivel nincsen egy egyedülálló, jól meghatározható, diagnosztikus értékű citogenetikai elváltozás, Meloni és társai már a '90 évek elején javasolták a több kromoszóma eltérés egyidejű analízisét. Számos próbálkozást követően végül is közel 2 évtized múlva 2000-ben Sokolova és mtsi kifejlesztettek egy 4 szondából álló készletet mely valamivel később Urovysion (Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL) néven került kereskedelmi forgalomba. A végső szonda készletet a kromoszómális instabilitások 10 gyakran érintett kromoszómájából választották ki. A 9 CEP szondát (3,7,8,9,11,15,17,18,Y) és az egy LSI-t (9p21) 3 csoportban vizsgálták, azonban szenzitivitásukat külön-külön értékelték. A végső készlet a 4 leghatékonyabb DNS szondát tartalmazza; három pericentromerikus direkt jelölt szonda a 3, 7 és 17 kromoszómák vizualizálását szolgálja, piros, zöld és

vízkék (aqua) színekkel, míg a negyedik, lókuszos specifikus azonosító a 9 kromoszóma rövid karjának 21 régiójához hibridizál. A régió arany ('gold') színben vizualizálódik és a fent említett p16 gént tartalmazza, mely - alternatív splicingtól függően - több (minimum 3) tumorsuppressorként funkcionáló fehérjét kódol. A teszt kiértékelésére vonatkozó gyártói ajánlás szerint a vizsgálónak minimum 25 sejtet kell levizsgálnia. A minta pozitív, ha tartalmaz  $\geq 4$  sejtet, melyekre igaz, hogy  $\geq 2$  CEP szonda poliszómiát mutat és/vagy  $\geq 12$  sejtet melyben megvalósul a 9p21 biallelikus vesztese. Amennyiben 25 sejt értékelése után nincs elégséges pozitív sejt, a vizsgálat mindaddig folytatódik, míg a fent említett határértékeket el nem érjük; szükség esetén egészen addig, míg a teljes preparátumot nem pásztáztuk végig. A vizsgálati folyamat lényeges körülménye a célsejtek kiválasztása. Pásztázás során a célsejtek DAPI (4,6-diamidine, 2-phenylindol dihydrochloride) megjelenésük alapján kerülnek kiválasztásra. Definíció szerint az egyenetlen megjelenésű, felhősen, foltosan festődő alakok FISH mintázata kerül kiértékelésre, rögzítésre. Az eljárás 2001-ben megkapta az Egyesült Államokbeli Élelmiszer és Gyógyszer Engedélyezési Hivatal (FDA) engedélyét ismert hólyag tumoros betegek utánkövetésére, majd 2005-ben újból, ismert hólyag tumoros múlttal nem rendelkező, makro-, vagy mikro-hematúriával jelentkező betegek vizsgálatára. A teszt számos tanulmány eredménye alapján minden stádiumban és grade-ben érzékenyebbnek mutatkozott, mint a vizelet citológia. Az egyik leggyakrabban hivatkozott, 12 jelentősebb tanulmány eredményeit összefoglaló közlemény alapján a citológia versus (vs.) FISH átlagolt szenzitivitása G1-2-3 tumorok esetében 18 vs. 50%, 45 vs. 75% és 69 vs. 90%. Ugyanezen, tanulmány alapján a citológia vs. FISH Ta-Tis-T1 ill. T2-4 tumorok esetében 28 vs. 67%, 73 vs. 97%, 67 vs. 90%, 74 vs. 92%. Ugyanezen források alapján a citológia specificitása némileg magasabbnak mutatkozott, mint a FISH-é (93 vs. 85%). Fontos azonban megjegyezni, hogy a teljes irodalmat vizsgálva kiderül, mind a szenzitivitás, mind a specificitás rendkívül széles tartományban mozog. Míg a szenzitivitás 8-89% között változik a specificitás szélső értékei 29 és 90%; e variabilitások hátrányos megítélés alá vonják a módszert.

A teszttel kapcsolatban léteznek gyakran hangoztatott további negatívumok, bizonytalansági tényezők is, melyek következtében nehéz összevetni az egyes tanulmányok eredményeit, megítélni azok valódi értékét. A gyakran emlegetett hátrányok között tartozik, hogy (i) nincs egy általánosságban elfogadott pozitivitást mutató jelmintázat, (ii) nincs arany standard szabály a kiértékelési eredmények értelmezésére, (iii) nincs mindenki által elfogadott diagnosztikus határérték vagy legalább annak megállapítására vonatkozó általános protokoll, (iv) nem egyértelmű az analizálandó alakok definíciója, azaz, hogy pontosan mely sejtek fluoreszcens jelmintázata rögzítendő, értékelendő.

## Célkitűzés

---

A vizeletcitológiai preparátumokon végzett sokszondás fluoreszcencia in situ hibridizációval kapcsolatban tehát számos kritika merül fel az irodalomban. Ezek közül az egyik az analizálandó sejtek objektív definíciójának hiánya. A jelenlegi célsejt ('target') meghatározás DAPI asszociált magmorfológiára hagyatkozik, azonban az ürített vizeletre gyakran jellemző, hogy degeneratív elváltozásokkal terhelt, az uroteliális sejteken kívül nagy mennyiségben tartalmaz egyéb alakokat (pl. gyulladásosejtek, laphám), továbbá, egy tumoros sejtmag alaki megjelenésében (főleg korai szakaszokban) nem feltétlenül nyilvánul meg a már jelen levő genotípusos elváltozás.

Következésképpen a minták pásztázása fluoreszcens fénynél a vizeletcitológiához hasonló tévedésekre adhat lehetőséget, ezen túl időigényes és fáradtságos.

Mindezzért célul tűztük ki egy olyan módszer kidolgozását, mely során a genotípezálás az uroepiteliális sejtek fenotípezálását követően, azt figyelembe véve, célirányosan valósul meg.

1. Elsődleges vizsgálataink során célunk volt a lehető leghatékonyabb konszekutív fenotípezálás kidolgozása kontroll körülmények között, ezen belül:

- *a fenotípezikus szelekció a lehető legmagasabb magasabb mértékű automatizációjának kidolgozása*

- *a fenotípezálás valamint a konszekutív manuális genotípezálás analitikai hatékonyságának megállapítása*

- *a kombinált módszer, tehát az egymást követő fenotípezálás és genotípezálás együttes analitikai hatékonyságának megállapítása.*

2/A. A célzott-FISH módszerének kidolgozása után további célként tűztük ki az eljárás összehasonlító klinikai tesztelését beteganyagokon, valamint a diagnosztikus hatékonyság (szenzitivitás, specifitás) megállapítását

2/B. A teszt másik hátránya, hogy nincs arany standard eljárás a kiértékelési eredmények értelmezésére, továbbá nincs egyértelmű, könnyen alkalmazható diagnosztikus határérték. A jelen protokoll bináris (pozitív/negatív) tájékoztatást nyújt, melyhez biztosított határérték egy előre meghatározott abszolút érték, továbbá semmilyen javaslatot nem ad a FISH pozitív sejtek arányának értelmezésére. Egyes munkacsoportok már korábban is rámutattak, hogy egy új, a pozitívítás százalékos arányát is figyelembe vevő kiértékelési séma bevezetésének klasszifikációs jelentősége lehet. Ezek értelmében vizsgálataink során kiegészítő célunk volt egy, a gyári ajánlástól eltérő, más FISH módszereknél elterjedten használt protokoll tesztelése. A vizsgálódást szintén összehasonlító jelleggel kívántuk végezni, valamint célul tűztük ki felfedni, hogy milyen összefüggésben van a tumor grádusa, ill. stádiuma a pozitívítással konvencionális (önálló) valamint a célzott-FISH kiértékelésénél.

3. A rutin manuális FISH analízis, minden előnye mellett, számos ismert hátráltató tényezővel terhelt: (i) statisztikai okokból gyakran szükség van több száz (akár sok ezer) sejt vizsgálatára (ii) kiemelkedően alacsony vagy éppen magas pozitívításonál a vizsgálódó elfogulttá válhat, mely végső soron a pozitívítás alul vagy felül becslését okozhatja (iii) személyek, ill. laboratóriumok közötti variabilitás komolyan akadályozhatja az eredmények összevethetőségét. Mivel az általunk alkalmazott készlet 4 DNS szondát tartalmaz, sejtenként összesen 5 döntést kell meghozni, tehát a fent említett hátrányok ez esetben még inkább fennállnak. Összességében tehát a teszt kiértékelése rendkívül fáradtságos lehet, különös tekintettel, ha figyelembe vesszük a manuális pásztázás korábban említett körülményes, hibára hajlamosító jellegét.

Mindezek értelmében munkacsoportunk - az első laborok egyikeként

- célul tűzte ki ennek a sokszondás - lókuszt és centromer specifikus szignálokat egyaránt létrehozó
- FISH jelmintázat kiértékelésének teljes automatizációját. Ezen túlmenően, a módszer beállítása mellett szerettük volna kimerítő kontroll kísérletekkel megállapítani az analitikai hatékonyságot.
- klinikai előtanulmányokra támaszkodva, további célul tűztük ki a módszer diagnosztikus hatékonyságának megállapítását, valamint az esetleges korlátozó tényezők, ill. fejlődési pontok feltérképezését.

## Anyagok és Módszerek

---

### Minták

---

Kísérleteink során kontroll és betegektől származó mintákat is vizsgáltunk. Negatív kontrollként egészséges humán perifériás vért valamint vizeletet, pozitív kontrollként pedig hólyagtumor sejtvonalat alkalmaztunk (HT-1376). Tanulmányunkba összesen 73 beteg mintáját vezettük be, melyből végül 10 mintát technikai okokból ki kellett zárni. A minták a PTE Urológiai Klinikán végzett cisztoszkópos vizsgálat szerinti alapos klinikai tumor gyanú alapján érkeztek a PTE Patológiai Intézetébe. A hisztológiai valamint citológiai diagnózist tapasztalt patológus állította fel; a pontos szövettani körmeghatározás a fent vázolt okok miatt elsősorban az 1973 WHO osztályozásnak megfelelően történt; a vizelet sejttani vizsgálatát nemzetközileg elfogadott citopatológiai irányvonalak mentén végeztük. A mintákból minden esetben citológiai preparátum készült.

Az egyes módszerek *analitikai hatékonyságát* (szenzitivitás; specificitás) valamint a diagnosztikus határértékeket a kontroll sejtpopulációkon határoztuk meg. Az analitikai pontosságot a 'valós pozitív események + valós negatív események / összes vizsgált esemény' képlettel számoltuk, valamint tapasztalati úton is meghatároztuk, kontrollokból készített hígítási sorok segítségével.

### Kettős üzemmódú pásztázó fénymikroszkópia (PFM)

---

Sejtanalitikai vizsgálódásaink során minden esetben egy kettős üzemmódú, számos bővítmény által meg támogatott, így automatizálható fénymikroszkópot használtunk, mely mind hagyományos transzmissziós, mind fluoreszcencia üzemmódban használható. A mikroszkóp egy Zeiss Axioplan-MOT II. (Zeiss, Germany) típusú készülék, mely bővítményként tartalmaz még egy Märzhauer típusú nyolc tárgylemez befogására alkalmas motorizált tárgyasztalt, továbbá egy szintén motorizált revolver szűrőfoglatot mely nyolc szűrő befogására képes. A mikroszkóphoz tartozik még egy hagyományos 100 W higanygőz lámpa, valamint egy fekete-fehér CCD kamera. A rendszer teljes mértékben irányítható a hozzá kapcsolódó számítógépen futó különböző vezérlők által (Metacyte-Metafer4, Isis – Metasystems, Germany). Utóbbiak segítségével a kezelő képes digitális kép-rögzítésre és –feldolgozásra, valamint összetett sejtanalitikai mérésekre is; a rendszer további előnyös tulajdonsága, hogy rögzíti a vizsgált terület, illetve annak egyes elemeinek xyz koordinátáit, melyek ezáltal később, a tárgylemez elmozdítása majd visszahelyezése után is mikrométer pontossággal visszakereshetők.



## Fél-automatizált fenotípezálás (célsejtek meghatározása, targeting)

---

Az uroteliális eredetű sejtek fenotípezálásához citokeratin-7 (CK-7) ellen termeltetett monoklonális antitestet használtunk. Azért döntöttünk CK-7 alkalmazása mellett, mert ez az alacsony molsúlyú keratin az urotelium összes rétegében jól expresszálódik, csakúgy, mint az ezekből a sejtekből kialakuló neopláziákban; ezzel ellentétben, laphám sejtekben valamint gyulladásozó sejtekben nem vált ki vizualizálható reakciót. A preparátumokon standard immuncitokémiai reakciót végeztünk; az antitestet végül dextrans gerincen elhelyezkedő másodlagos antitestek segítségével 3-Amino-9-Ethylcarbazole-al vizualizáltuk.

A CK-7 és hematoxin jelölt mintákat normál fénymikroszkópos üzemmódban, automatizált pásztázással fényképeztük ('szkenneltük', pásztáztuk), 20x tárgylencse segítségével, egy, a tárgylemezen előzetesen manuálisan definiált területen. A rendszer előre meghatározott alaktani paraméterek alapján azonosította a sejteket: háttérfestéshez társított szürke-szint küszöbölési érték (12%), legkisebb magterület ( $20 \mu\text{m}^2$ ), legnagyobb magterület ( $1000 \mu\text{m}^2$ ), legnagyobb konkavitás mélység (1,00) és legrövidebb-leghosszabb átló legnagyobb aránya (maximum aspect ratio) (2,905). A CK-7 pozitív sejtek elkülönítése immunfestődés asszociált pixel erősségek alapján történt. A folyamat két, a vizsgálati elemek átlagos, illetve összesített festődési erősségét megjelenítő (sejtkontúron belüli teljes jelerősség [Tic], valamint sejtkontúron belüli átlagos jelerősség [Mic]) oszlopdiagram segítségével zajlott. A szelekciós határértékeket 28 000 negatív valamint 71 000 pozitív sejten végzett kontroll kísérletek alapján állapítottuk meg. A folyamat során megmértük a negatív, valamint a pozitív sejtek pixel 'festődési-erősségét', majd megvizsgáltuk, hogy a sejtek hány százaléka kerülne észlelésre adott határértékeknél. Az értékeket koordináta rendszerben ábrázoltuk, ahol az abszcissa tengelyen felvett ún. tetszőleges festődési érték (arbitrary staining unit, *asu*) függvényében jelenítettük meg az egyes – kontroll típustól függő – hamis (ál/fals) eseményeket.

Mivel kettő tulajdonság alapján próbáltuk elkülöníteni a sejteket (Mic, Tic), végeredményben kettő darab, két-két görbét ábrázoló függvényábrát kaptunk. Miután meghatároztuk a vizsgálat szempontjából biológiai (tehát nem csak algebrai) értelemben optimális határértéket, a további vizsgálatok során az analizálandó sejtpopulációt e két oszlopdiagramon szelektáltuk, szimultán 'kapuzással'.

## Előszelektált sejtek FISH vizsgálata; összehasonlító tanulmány

---

Csakúgy, mint az önálló-genotípezáláshoz használt natív vizsgálati anyagot tartalmazó citopreparátumok esetében, az immuncitokémia után is alapos PBS mosást (3x'5) alkalmaztunk, mely után a lemezeket éjszakára Carnoy fixálóba (metanol:jégecet = 3:1, -20 °C) helyeztük. Légszárítást követően a FISH (Urovysion) eljárást a gyári leírás szerint hajtottuk végre.

### Manuális kiértékelés

---

Összehasonlító manuális vizsgálataink során az célzott-FISH-t (egymást követő fenó- és genotípezálás) hasonlítottuk össze az önálló-Urovysion vizsgálattal. A minták kiértékelése mindkét esetben alapvetően 3 fő részre osztható.

(1) A célsejtek meghatározása: a) amikor önálló-FISH-t alkalmaztunk, a célsejtek meghatározását a gyártó ajánlásának megfelelően „gyanús” DAPI magmorfológia alapján végeztük b) ezzel szemben,

amikor célzott-FISH-t alkalmaztunk, kizárólag azokat a sejteket vizsgáltuk melyekről korábban bebizonyosodott, hogy citokeratin-7 pozitívak.

(2) A mintázat értékelése: a célsejtek meghatározásának módjától függetlenül a pozitív-sejt definíció mindig ugyanaz volt és a legelfogadottabb ajánlásnak felelt meg: pozitív az a sejt melynél legalább kettő centromerikus szondából többlet ( $\geq 3$ ) mutatkozott és/vagy mindkét 9p21 asszociálta szignál hiányzott, biallelikus deléciót jelezve ezzel.

(3) A diagnosztikus határérték megállapítását valamint a FISH eredményének értelmezését, kétféleképpen végeztük: a) az ún. *hagyományos értelmezés* a gyári ajánlást követte, mely értelmében egy minta akkor tekinthető pozitívnek, ha a vizsgáló talál legalább 4 sejtet, melyekre igaz a fent említett CEP szondákra vonatkozó pozitív-sejt meghatározás és/vagy 12 olyan sejtet melyekre igaz, hogy biallelikusan 9p21 vesztés. Az előírás szerint ezek az értékek 25 sejt vizsgálata során tapasztalandók, azonban amennyiben e határértékeket nem éri el a minta, a keresés folytatódik, végső esetben akár a teljes minta vizsgálatáig. A végső diagnózis ez esetben bináris, azaz pozitív/negatív jellegű, a pozitív sejtek arányának semmilyen jelentősége nincs b) a *statisztikai megfontolásokon* alapuló értelmezés esetében egy mintánként lokálisan meghatározott feltételnek kellett megfelelnie, ahhoz, hogy a vizsgáló pozitívnek tekintse. A diagnosztikus határértéket a nemzetközileg talán leginkább elterjedt, *átlag analitikai álpozitivitás + szórás kétszerese (FP+2SD)* szabállyal határoztuk meg. Az így számított értékek az önálló-FISH illetve a célzott-FISH tekintetében 10,3% és 1% voltak.

Mivel feltételeztük, hogy a lesodródott sejtek, vagyis a vizsgált/vizsgálható sejtek száma diagnosztikus jelentőségű lehet, meghatároztuk az adott FISH pozitív sejt arány függvényében azt a legkisebb mintaszámot, amelynél még megfelelő statisztikai biztonsággal voltunk képesek a kisebbségi csoportot (azaz 50% pozitivitásig a pozitív sejtek arányát, felette pedig a negatívokét) számszerűen elkülöníteni a többségi csoporttól. Az alkalmazott algoritmus a binomiális eloszlás egyoldalú hipotézis vizsgálatán alapult és az analitikai szenzitivitás függvényében határozta meg azt a legkisebb mintaszámot, amelynél a kiértékelés során kapott FISH pozitivitás minimum 95% megbízhatósággal adható meg. Egy mintát akkor tekintettünk pozitívnek, ha mindkét feltételnek megfelelt, tehát elérte, vagy meghaladta a diagnosztikus határértéket és ezzel egy időben a vizsgált sejtszám elérte a minimum cellularitást (vizsgálandó objektum értéket). Utóbbi feltétel valójában az adott minta vizsgálatból való kizárására adna lehetőséget, azonban mivel feltételezhető volt az uroteliális sejtek számarányának bizonyos mértékű klinikai jelentősége, ezt a statisztikai jellemzőt is diagnosztikai feltételként kívántuk meghatározni; amely mintákról nem tudtuk 95% biztonsággal eldönteni, hogy pozitív, azt negatívnak tekintettük.

## Automatizált kiértékelés

Az automatizált FISH analízis komplex folyamata a fundamentális objektum felismerési paraméterek és körülmények kiválasztásával kezdődik. Ekkor kell meghatározni – többek között - olyan alapvető körülményeket mint a fluorokrómokra specifikus szűrők, adekvát expozíciós idő és szaturációs terület, kameraerősítés, automatikus gyújtópont-beállítás, fókuszsíkok száma. Az automatizáció következő, különösen nagy súlyú lépése az ún. 'training' azaz a rendszer betanítása. Utóbbi folyamat ez esetben ürített vizeletből készített átlagos minőségű preparátum (tárgylemez) felületen pásztázásával kezdődött. Az így nyert digitális gyakorló (training) mezőkön három, egymással szorosan összefüggő lépés jelentette a rendszer „betanítását”: klasszifikáció, tesztelés és optimalizáció.

A klasszifikáció a sejtmagok DAPI csatornában történő manuális meghatározásával kezdődött; a gépi magfelismerés későbbi tesztelése során e klasszifikáció asszociálta beállítások szolgálták referenciaként. A magszegmentációs paraméterek a kromogén fenotipikus előszelekcióhoz hasonlóan következők voltak: DAPI csatornához társított szürke-szint küszöbölési érték, legkisebb és legnagyobb magterület, legnagyobb konkavitás mélység, valamint a legrövidebb és leghosszabb átló aránya. A paramétereket addig állítottuk, amíg a detektálás hatékonysága nem volt optimális. A FISH szignálok észlelését a négy jelcsatornában külön-külön optimalizáltuk. A jelfelismerés alapvető paraméterei a következők voltak: legnagyobb jelméret, legkisebb jeltávolság, legkisebb viszonylagos jelerősség.

Az automatizált tesztsorozatok során – melyeket szintén az egyes csatornában külön-külön végeztettünk – a rendszer a korábban meghatározott magokat illetve azokban manuálisan definiált szignálokat abszolút referenciaként kezelte és a 'saját teljesítményét' mintegy ahhoz hasonlította. A téves találatok elemzése után a felismerési paramétereket módosítottuk a hibák lehető leghatékonyabb kiküszöböléséért, a tesztsorozatot megismételtettük. A procedura – mely során lehetőség nyílt különböző digitális képmódosító algoritmusok felismerésre gyakorolt hatásának tesztelésére is - mindaddig ismétlődött, amíg a mag illetve a jelfelismerés el nem ért egy optimális szintet.

Miután az egyedi detektálási teljesítmény megfelelőnek bizonyult, egy átfogó, mind a mag, valamint mind a négy jelcsatorna szimultán tesztelését szolgáló pásztázást végeztünk. Ez a teszt több száz digitális 'training' mező több ezer sejtjét érintette, nagyobb statisztikai biztonságot biztosítva ezzel. Ez esetben a gép a korábbi klasszifikációt figyelmen kívül hagyta, az eredményeket manuálisan verifikáltuk a galériában megjelenített egyes sejteken. A tesztsorozat ily módon mintegy szimulációjaként szolgált a valós mintákon történő automatizált vizsgálatnak.

## **Eredmények és Következtetések**

---

### Uroepitheliális sejtek egymást követő fél-automatizált fenotípus- és genotípusjelölésének kromogén immuncitokémia és sokszondás FISH alkalmazásával

---

Az uroteliális sejtek fenotípusjelölése során a kromogén immunjelölődés kiválóan alkalmasnak bizonyult a fekete-fehér CCD kamera által készített felvételeken történő automatikus szegmentációra (azaz immunpozitív sejtek felismerése), mely elsősorban szürke-szint küszöbölésen alapult. Az immunjelölés során alkalmazott hematoxilines magfestés ugyan lehetőséget nyújtott alapvető mennyiségi mérésekre, azonban jelentős mértékben megnehezítette a későbbi differenciálást. A célsejtek automatizált szelekciója során a legnagyobb kihívást azok mind hatékonyabb, de mégis egyszerű, alapvetően festék erősségen alapuló szelekciója jelentette. Gondot jelentettek a gyűrődött, zsugorodott gyulladási sejtek, melyek egységnyi területre vonatkoztatott festési intenzitása (MIc) rendkívül magas volt, de ugyanekkora problémát okoztak egyes laphámsejtek is, melyek nagy mérete miatt különösen nagy teljes festődési intenzitást (TIc) mutattak; a megfelelő differenciáláshoz tehát szükséges volt szimultán alkalmazni mind az MIc mind a TIc jellemzőket.

Az egy időben és két alaktani paraméter alapján történő sejtszelekció nagy analitikai hatékonysággal (analitikai pontosság 97,1%) különítette el a CK-7 pozitív elemeket. Az analitikai

pontosságot (különös tekintettel a specificitásra) tovább lehetett volna ugyan növelni a magfestés elhagyásával, azonban akkor értékes mennyiségi sejtanalitikai adatokat veszítettünk volna. A módosítást tehát – az alkalmazás tükrében – mérlegelés kell, hogy megelőzze. Amennyiben a fenotípzálást genotípzálás követi, úgy a magháttérfestés elhagyása ilyen magas specificitás mellett feleslegesnek tűnik; azonban ha ritka, de diagnosztikus jelentőségű (terápia releváns) eseményeket keresünk pusztán fenotípus alapján (pl. MRD, CTC), hasznos lehet egy olyan szelekciós módszer, melynek álpozitivitása közelít a nullához. A fent vázolt több paraméteres szelekció hasznos lehet további citometriai vizsgálatoknál, azonban a módszer hátránya, hogy változó határértékeknél a szenzitivitást és a specificitást egy időben vizsgálni körülményes. Az általunk alkalmazott, két, egymást kölcsönösen nem kizáró események közötti összefüggésre vonatkozó egyszerű matematikai képlettel az egyváltozós függvényábrázolás általánosságban azonban kiválthatónak bizonyult, így a határérték szükségszerű változtatásánál (pl. igény mutatkozik a FP vagy a FN minimalizálására) is könnyedén megállapítható a pontosság. A kontrol sejtpopulációkon végzett kísérletek alapján a FISH 95,9% szenzitivitással, 95,1% specificitással valamint 95,5% analitikai pontossággal volt jellemezhető; kromogén immunfenotípzáláson alapuló elő-szelekció valamint a konszekutív FISH vizsgálat együttes szenzitivitása illetve specificitása 93,3%, és 99,8% volt, míg a kombinált analitikai pontosság 97,3% volt.

A célzott-FISH végeredményben tehát nem csupán megkönnyítette a vizsgálatot, valamint növelte annak tárgyilagosságát, hanem emelkedett analitikai pontosságot eredményezett, mely elsősorban az analitikai specificitás maximalizálásának volt köszönhető.

**1. táblázat:** A célzott-FISH-t, önálló-FISH-t valamint a hagyományos illetve statisztikai kiértékelést magába foglaló összehasonlító klinikai vizsgálatok diagnosztikus hatékonysága a különböző kórszövettani grádusoknak megfelelően.

	Citológia	FISH					
		Önálló-genotípzálás			Célzott-genotípzálás		
		Hagyományos Interpretáció (1/a)	Statisztikai megfontolásokon alapuló interpretáció (1/b)	Átlag (1/a,b)	Hagyományos Interpretáció (2/a)	Statisztikai megfontolásokon alapuló interpretáció (2/b)	Átlag (2/a,b)
<b>Specificitás</b>	86% (6/7)	71% (5/7)	100% (7/7)	86%	100% (7/7)	100% (7/7)	100%
<b>Szenzitivitás</b>	60% (21/35)	85% (28/33)	76% (25/33)	80%	97% (34/35)	89% (31/35)	93%
Szenzitivitás Grade 1	67%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Szenzitivitás Grade 2	50%	78%	61%	69%	95%	85%	90%
Szenzitivitás Grade 3	75%	92%	92%	92%	100%	92%	96%
<b>Pontosság</b>	64% (27/42)	82% (33/40)	80% 32/40)	81%	98% (41/42)	91% (38/42)	94%

Összehasonlítva a különböző FISH kiértékelések *diagnosztikus specificitásait* (1. táblázat), a hagyományos kiértékelés szerinti önálló-genotípzálásé bizonyult a legalacsonyabbnak; ez az analízis

még a citológiánál is magasabb álpozitivitást mutatott. Jellemzően azok az esetek bírtak emelkedett álpozitivitással, melyeknél a nem egyértelmű DAPI morfológia a minta kiterjedt analizisét igényelte. Eredményeink rámutatnak, hogy ez a jelenség könnyedén kiküszöbölhető olyan határérték alkalmazásával, amely – a gyári ajánlással ellentétben - eredendően figyelembe veszi a módszer helyi analitikai álpozitivitását; a célzott-genotipizálás pedig már önmagában is elegendőnek bizonyult az álpozitivitás minimalizálására. Érdekes módon mind a hagyományos mind a statisztikai megfontolásokon alapuló kiértékelésnél az alapvetően az alacsony sejtszámnak volt köszönhető, hogy a minták az előbbinél nem érték el az abszolút határértéket az utóbbinál pedig nem tudtak megfelelni a minimális cellularitás kritériumának. Figyelembe véve azt is, hogy a kórszövettanilag pozitív eseteknél csupán kisszámú mintáról volt elmondható, hogy bármilyen szempontból sejtszegények voltak, az eredmények alátámasztani látszanak azt a korábbi feltevést, miszerint a spontán ürített vizeletben található exfoliálódott uroteliális eredetű sejtek alacsony aránya önmagában nem elhanyagolható negatív prediktív értékkel bír.

**2. táblázat:** A célzott-FISH-t, önálló-FISH-t valamint a hagyományos illetve statisztikai kiértékelést magába foglaló összehasonlító klinikai vizsgálatok diagnosztikus szenzitivitása a különböző kórszövetani stádiumoknak megfelelően

	Citológia	FISH			
		Önálló-genotipizálás		Célzott-genotipizálás	
		Hagyományos interpretáció (1/a)	Statisztikai megfontolásokon alapuló interpretáció (1/b)	Hagyományos interpretáció (1/a)	Statisztikai megfontolásokon alapuló interpretáció (1/b)
<b>pTa</b>	27% (4/15)	71% (10/14)	57% (8/14)	93% (14/15)	87% (13/15)
<b>T1</b>	71% (10/14)	85% (11/13)	77% (10/13)	100% (14/14)	86% (12/14)
<b>átlag (pTa, T1)</b>	48%	72%		91%	
<b>T2</b>	83% (5/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)

Az összesített *diagnosztikus szenzitivitás* tekintetében a citológia valamennyi FISH vizsgálatnál gyengébbnek bizonyult. Utóbbiakról általánosságban elmondható, hogy a célzott-genotipizálás érzékenyebbnek bizonyult az önálló-FISH –nél; különös tekintettel az alacsony grádusú és stádiumú tumorok esetében. Mi több, mivel a Ta stádiumú tumorok az egyik legnehezebben diagnosztizálható csoport a konvencionális Urovysion kiértékeléssel, a jelentős érzékenységbeli növekedés ebben a korai kategóriában jöllehet a célzott-genotipizálás egyik legnagyobb előnye (2. táblázat). Az önálló-genotipizálás statisztikai megfontolásokon alapuló kiértékelésénél tapasztalt álnegatív esetek elsősorban abból fakadtak, hogy a pozitívitas nem érte el a diagnosztikus határértéket. Ez annak köszönhető, hogy az önálló-genotipizálás alacsonyabb analitikai specificitása (tehát magasabb analitikai álpozitivitása) az alkalmazott képlet szerint magasabb diagnosztikus határértéket determinál; továbbá a nem egyértelmű DAPI morfológia könnyedén eredményezheti a minta pozitívitasának alulbecslését.

Amennyiben a tárgyilagos célsejt-kiválasztás minden következményét figyelembe vesszük, jól látszik, hogy a megnövekedett analitikai pontosság szintén emelkedett diagnosztikus pontosságban manifesztálódik. Ezen túl a módszer lényegesen kevesebb citopatológiai ismeretet valamint időráfordítást igényel, hiszen a vizsgáló tárgyilagosan végigpásztázhatja az egész mintát, anélkül, hogy fenotipikus vagy genotipikus véleményt alkotna minden egyes sejtmagról. Mindezek mellett amennyiben felmerül a húgyhólyagtumoron kívül egyéb neoplázia jelenléte is, egyedül a fenotípizálás tisztázhatja egy rendellenes genotípust mutató mag eredetét. Természetesen a megfelelő antitest(ek) kiválasztása a feltételezett neoplázia fenotipikus jellemzőitől függ, ez azonban a módszer csak kismértékű változtatását igényli. Szintén a FISH-t megelőző fenotípizálás lehet a módja, hogy megállapítsuk, a hólyag falának mely részéről eredeztethető az aberráns genotípussal bíró mag (pl. azonosítani különböző magas molekuláris tömegű citokeratinokkal [HMWCK] a bazális vagy átmeneti rétegeket, vagy a CK-7-n kívüli egyéb könnyű molekuláris tömegű citokeratinokkal [LMWCK] a felszíni esernyősejteket, s ily módon specifikusan meghatározni ezen sejtek genotípusát).

Összehasonlítva a *diagnosztikus pontosságot* a kiértékelés szempontjából, azt tapasztaltuk, hogy a konvencionális, abszolút határértékre épülő értékelés összességében valamivel pontosabbnak bizonyult, mint amelyik a lokálisan meghatározott határértékre támaszkodott; a jelenség az utóbbi szenzitivitásában tapasztalt csökkenésnek köszönhető. Mindez arra enged következtetni, hogy az általunk alkalmazott kettős feltételrendszer statisztikailag túl szigorú, és bár 100% specificitást eredményez, a szenzitivitás növelése érdekében további finomítást igényel, jelenlegi ismereteink szerint a szufficiens cellularitás tekintetében. A kérdés tisztázásához további biometriai modellek megvizsgálására, validálásukhoz pedig nagyszámú, több egymástól független laboratórium összehangolt vizsgálataira van szükség.

Ugyan az általunk alkalmazott kettős feltételrendszer statisztikailag némileg szigorúnak bizonyult (növelve a fals negativitást), a pozitivitás százalékos meghatározása - szemben a bináris diagnózist eredményező hagyományos kiértékeléssel - hasznos kvantitatív információkat szolgáltatott. Mind az önálló-, mind a célzott-FISH analízis esetében ugyanis lineáris összefüggés mutatkozott a FISH pozitív sejtek aránya és tumor kórszövettani osztályozás (grádus, stádium) között. Az önálló-FISH átlagos pozitivitása (%) a G 1-2-3 mintáknál 12,9%, 28,7% valamint 33,7% volt; az egyes csoportok Kruskal-Wallis teszt alapján nem különböztek el egymástól szignifikánsan ( $p=0,1097$ ). Ugyanezen értékek a célzott-FISH módszerével (30,8%, 42,5% és 84,4%) szignifikánsan elkülönültek ( $p=0,0019$ ). Mindez ismét bizonyítja, hogy a nem uroteliális sejtek kizárásával pontosabb mennyiségi ismeret nyerhető a valós tumortömeget illetően.

A százalékos kiértékelés lehetséges hasznát már korábban is hangsúlyozták, egyes tanulmányok bemutatták, hogy a rendellenes sejtek aránya prognosztikai jelentőségű lehet mind a recidíva, mind a progressió szempontjából. Összességében valóban megfontolandó, hogy egy alapvetően kvantitatív citogenetikai teszttel felállított kvalitatív (bináris; pozitív vagy negatív) diagnózis nem fosztja-e meg az adott módszert a további osztályozási lehetőségektől, valamint terápia releváns információ biztosításától. Egy másik jelentős szempont, melyet érdemes figyelembe venni, az a FISH analízis ismerten jelentős labor-közi variabilitása. A jelenség lehetséges okai az egyes laborok eltérő analitikai pontosságában, valamint hibridizációs hatékonyságban keresendők. E tényezők - hozzáértéstől függően - viszonylag nagymértékben okozhatnak eltéréseket a minta pozitivitásának (%) meghatározásakor. Következésképpen egy ugyanazon, előre meghatározott, abszolút értéken vett határérték alkalmazása (jelenlegi ajánlás) a különböző diagnosztikai laboratóriumokban valószínűleg nem alkalmas arra, hogy hosszútávon konzisztens, összehasonlítható eredményeket produkáljon; azaz

éppen a rögzített, így látszólag egységesített diagnosztikus határérték az, amely valójában akadályozza az egységesített kiértékelés létrejöttét, s így módon az egyes tanulmányok valódi jelentőségének összehasonlíthatóságát.

## Sokszondás, lókuszos és centromer specifikus FISH jelmintázatok teljes-automatizált kiértékelése PFM segítségével

A magfelismerés során a fő célunk a magas analitikai pontosság volt, melyet elsősorban a magas szenzitivitás által kívántunk elérni. Ez azért fontos mert az álpozitív elemek (mint például a különböző nem sejtes elemek) természetesen kizárásra kerülnek a konszekutív jelmintázat analízis során, azaz nem befolyásolják majd a végső pontosságot; ezzel szemben a szegmentáció során az analízisből kihagyott (tehát álnegatív) sejtes elemek nyilvánvalóan csökkenteni fogják az analitikai, végeredményben pedig a diagnosztikus szenzitivitást. Az automatizált sejtmagfelismerést a rendszer 7,3% álpozitivitás mellett végezte, míg az álnegativitás 3,4% volt. A rendszer szignál-felismerési teljesítményének beállítása során a fentihez hasonló preferenciánk a specificitás valamint a szenzitivitás tekintetében ugyan nem volt, azonban a szondák által létrehozott szignálok közötti morfológiai és intenzitásbeli különbség eltérő beállításokat igényelt. A CEP szondákhoz használt paraméter-beállítások lényegében megegyeztek, míg a lókuszos specifikus azonosító (9p21) detektálásához eltérő paraméter értékek voltak szükségesek. Ennek oka, hogy ez a szonda kisebb és halványabb szignált eredményez a centromerikus szondákhoz képest, viszont legalább olyan fontos, hogy pontosan detektáljuk, mivel ez az egyetlen szonda melyhez asszociált szignál biallelikus deléciót jelző teljes hiánya - definíció szerint – már önmagában patognómikus. Mivel az aranyszínű szignálok tehát gyengék voltak, a szükséges expozíció 2-3x hosszabb integrációs időt foglalt magába, mely azonban erős jelet, ugyanakkor inhomogén háttérintenzitást eredményezett. Mivel ezek az inhomogenitások egyes esetekben pont- azaz szignálszerűen jelentek meg, magasabb viszonylagos (relatív) intenzitást valamint kisebb jel méretet kellett meghatározni a paraméter-beállítások során, hogy a specifikus szignálok kitűnjenek a háttérből, optimális detektálási pontosságot eredményezve ezzel. A jelfelismerés pontossága a 3, 7 és 17 centromerikus szondák esetében 77,3, 82,6 és 81,0% volt, míg a 9p21 LSI esetében 87,1%; ezzel szemben az összesített jelmintázat felismerési pontossága ~54% volt. Ez valamivel ugyan magasabb volt, mint amit matematikailag vártunk volna (~45%), mégis alátámasztja, hogy az egyes csatornában történő hibák többnyire egymástól függetlenül következnek be és csak viszonylag kis arányban vezethetők vissza átfogó, a sejt egészét érintő minőségi hibákra. Szemben e rendkívül alacsony összesített mintázatfelismerési pontossággal az egyes magok klasszifikációjának (azaz rendellenes státusza megállapításának) analitikai pontossága kifejezetten magasnak mutatkozott, hiszen mind az analitikai-szenzitivitás, mind a specificitás több mint 90% volt. A jelenség a szondakészletre jellemző, pozitív sejtekre vonatkozó összetett definícióval magyarázható, ugyanis egy sejt diagnosztikus szintű klasszifikációja szempontjából nem feltétlenül jelent determináló tényezőt egy bizonyos csatornában bekövetkező detektálási tévedés. A számszerű tévesztések mértéke ugyanakkor befolyásolhatja a diagnosztikus értelemben vett klasszifikációt. Az esetek többségében a centromerikus szondák tévesztése mérsékelt volt, tehát a valós szignál-számtól csak kis mértékben ( $\pm 1$  jel) tért el. A jelenség tükrében várható volt, hogy a tévesztés klasszifikációra gyakorolt hatása a poliszómia mértékével egyenes arányban csökkeni fog, mivel jelenlegi ismeretek szerint nincs lényegi diagnosztikus különbség pl. 5 vagy 6 jel között, ugyanis mindkettő tumorra utaló

poliszómiát jelez. Az analitikai szenzitivitásban (97,6%) és specificitásban (92,2%) tapasztalt különbségek alátámasztani látszanak ezt a feltevést: automatizált vizsgálat klasszifikációs pontossága csökkent a tisztán negatív azaz diploid (kontroll-) sejtpopulációk esetében, míg a pozitív, erősen aneuploid (elsősorban poliszóm) pozitív sejtpopuláción magasabb volt. Ugyancsak ez a jelenség volt az oka, hogy a pozitív sejtekhez képest több mint kétszer annyi negatív sejtet kellett kizárni a vizsgálatból amiért egy vagy több CEP asszociált szignálból nulla szignált produkáltak ( $5,21\% \pm 1,78\%$  vs.  $12,07\% \pm 2,94\%$ ). Amikor a tényleges körülményeket hígítási sorok segítségével modelleztük az automatizált eredmények szoros lineáris összefüggést mutattak a várt értékekkel ( $r^2=0,98$ ).

Érdekesség viszont, hogy a fent említett 'zéró centromerikus szignál' diszkvalifikációs szabály miatt a negatív populációknak ugyan kismértékű, mégis következetes alulbecslését tapasztaltuk. Ez elsősorban ismét a korábban megtárgyalt poliszómia függő tévesztésnek volt betudható, azonban – kisebb mértékben – a negatív sejteknél tapasztalt gyengébb jelerősségnek is következménye lehetett.

Az előzetes klinikai tanulmányaink szerint a diagnosztikus szenzitivitás nőtt a neopláziák kórszövettani besorolásának (stádium, grádus) emelkedésével, mind a manuális, mind az automatizált analízissel. A szövettannal történő lineáris összefüggést már korábban is leírták, azonban eredményeink alapján ez a kapcsolat szorosabb volt az automatizált analízis során, mely jelenség valószínűleg két okra vezethető vissza.

Egyrészt mind a poliszómia mértékében, mind a poliszómiás sejtek arányában tapasztalt növekedéssel párhuzamosan csökkent a rendszer moderált tévesztéseinek klasszifikációra gyakorolt hatása; tovább erősítve az automatizáció poliszómia dependens tévesztésének gondolatát. Ezek alapján feltételezhető, hogy olyan, minden lépésre kiterjedő automatizációt alkalmazni, mely során az emberi tényezőket teljesen kizárjuk, lényegesen könnyebb lesz nagy hatékonysággal kivitelezni magas poliszómiás eseteknél (magas grádus/stádium).

Másodrészt bizonyos esetekben a nem uroteliális elemek negatív mintázata növelte az álnegativitást akár oly mértékig, hogy a minta pozitivitása végeredményben emiatt nem érte el a korábban megállapított diagnosztikus határértéket. Ugyan utóbbi tényező hatása kevésbé volt szoros kapcsolatban a kórszövettani besorolással, a jelenség mégis fontos a kiértékelés szempontjából. Mivel egy automatizált rendszer nyilvánvalóan csak jól meghatározott alaktani jellemzők alapján képes bizonyos vizsgálati elemeket azonosítani, könnyen belátható, hogy egy ilyen szubjektív döntéshozatali folyamatban mindenképpen korlátozottabb teljesítményt nyújt, mint a humán vizsgálódás. Korábbi vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a fél-automatizált, tárgyilagos (immunofenotípezáláson alapuló) célsejt kiválasztás növeli a konszekutív manuális FISH analízis pontosságát. A fentiek értelmében a módszer ötvözése az automatizált jelfelismeréssel növelné utóbbi analitikai és diagnosztikus pontosságát. Továbbá egy átfogóan és teljes mértékben automatizált kiértékelést tenne lehetővé, minimalizálva ezzel az emberi tényezőt.

Összességében elmondható, hogy a Urovysion szondakészlet kiértékelése a felhasználó által modulálható rendszer segítségével nagy hatékonysággal automatizálható. A diagnosztikus pontosság általánosságban a manuális eredménnyel összevethető, azonban a sejtszintű fals klasszifikáció poliszómia függése miatt feltételezhetően inkább a kevésbé differenciált tumoroknál lesz megbízható; a jelenség kiküszöbölése minden bizonnyal a jövőben is kihívást fog jelenteni.

Korábbi eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a fél-automatizált tárgyilagos célsejt meghatározás alkalmazása ez esetben is növelné a diagnosztikus szenzitivitást. Egyéb tényezők is növelhetik a diagnosztikus pontosságot, vagy csökkenthetik az analízishez szükséges időt, azonban az



ilyen jellegű változtatások óvatos mérlegelést igényelnek, ugyanis e két jellemző (pontosság, sebesség) az egyes módosítások során általában egymáshoz képest ellentétes irányba változik.

## Összefoglalás

---

Munkánk során elsőként dolgoztunk ki olyan automatizált képalkotó-sejtanalitikai módszert, mellyel képesek voltunk a vizeletben található uroepiteliális sejtek egymást követő fenotípus- illetve genotípusjelölésére; a módszer során a gyakoribb fluoreszcens jelölés helyett kromogén immuncitokémiát alkalmaztunk. Munkánk során,

- meghatároztuk a fél-automatizált kromogén fenotípusos előszelekció részletes specifikációit, mely alapul szolgálhat bármely hasonló kromogén immunfestődésen alapuló automatizált szelekciós módszer kidolgozásánál.
- megállapítottuk, hogy a kombinált módszer egyszerűsíti a vizeleten végzett FISH vizsgálatot, továbbá tárgyilagossá teszi a kezdeti célsejt meghatározást, mely ily módon nem igényel kiemelt citológiai ismereteket.
- megállapítottuk továbbá, hogy a kombinált módszer emelkedett analitikai pontossággal jellemezhető az önálló-genotípusjelöléshez (FISH) képest.

Összehasonlító módon megállapítottuk a módszer diagnosztikus hatékonyságát, mely során az önálló-genotípusjelölés és a célzott-genotípusjelölés összehasonlítás mellett szintén párhuzamot vontunk az előre meghatározott valamint a lokálisan, statisztikailag számított diagnosztikus határértékek alkalmazása között; továbbá rögzítettük a FISH pozitivitás arányát valamint vizsgáltuk annak diagnosztikus jelentőségét. Eredményeink alapján,

- megállapítható, hogy a vizeleten végzett célzott-FISH vizsgálat emelkedett analitikai hatékonysága emelkedett diagnosztikai hatékonyságban is megnyilvánul.
- megállapítható, hogy a célzott vizsgálat egyik legfőbb előnye, hogy nagyobb szenzitivitással detektálja a diagnosztikai nehézséget okozó korai, alacsony gradusú és stádiumú tumorokat. A jelenség az egész mintára kiterjedő vizsgálódásnak, valamint a magas analitikai specificitás által eredményezett alacsony diagnosztikus határértéknek köszönhető. A módszer további előnyt jelenthet hólyagtumoros betegek monitorizálásánál.
- megerősítettük azt a korábbi feltevést, miszerint a FISH pozitív sejtek aránya összefüggésbe hozható a tumorok kórszöveti besorolásával (grádus, stádium), azonban megállapítottuk, hogy statisztikailag is szignifikáns eredményeket a célzott-genotípusjelölés eredményezhet, mely így pontosabb képet adhat a valós tumortömegről; irodalmi adatok alapján utóbbinak komoly prediktív jelentősége lehet.

Elsőként automatizáltunk ürített vizeleten végzett FISH vizsgálat jelmintázat kiértékelését valódi moduláris munkaállomás segítségével. Meghatároztuk a módszer analitikai hatékonyságát valamint elsőként részletesen közöltük az automatizációhoz szükséges paramétereket. Utóbbi alapjául

szolgálhat más, összetett számbeli kromoszóma eltérések észlelését megcélzó sokszondás FISH vizsgálat automatizációjához. Eredményeink alapján továbbá

- Alátámasztottuk azt a korábbi feltevést, miszerint a különböző csatornában tapasztalt jelfelismerési hatékonyságok egymástól szinte teljesen függetlenek, továbbá hogy éppen ebből kifolyólag a komplex, sokszondás készletek automatizált jelfelismerési hatékonysága legalább annyira függ a pozitív-sejt definíció összetettségétől, mint az egyes jelcsatornában tapasztalt analitikai hatékonyságtól. Mivel a pozitív sejt meghatározás összetettségét legfőképpen az adott entitás genetikai instabilitása határozza meg, megállapítható, hogy a genetikailag instabil tumorokat vizsgáló sokszondás rendszerek automatizációjánál kevésbé meghatározó az egyéni, szondánkénti jelfelismerés, mint azokban az esetekben ahol egy (esetleg kettő) szonda asszociálta mintázat önmagában patognómikus.
- Megállapítottuk, hogy amennyiben az egyes csatornában tapasztalt jelszám tévesztések kismértékűek, azaz a valós jelszámtól csak korlátozott mértékben térnek el, a számbeli kromoszóma eltérések észlelésére szolgáló szondakészletek automatizált jelfelismeréssel történő klasszifikációjának hatékonysága a poliszómia mértékével arányosan nő.

## **Köszönetnyilvánítás**

---

Köszönettel tartozom program- és témavezetőmnek Professzor Melegh Bélának, aki szakmai iránymutatásával 2008 óta támogatta munkámat. Köszönettel tartozom édesapámnak, Professzor Pajor Lászlónak, aki a természettudományos érdeklődésem alapvető ösztönzője volt, s akit a későbbiekben kialakuló kutatói szemléletem egyik fő megformálójaként említhetek. Köszönöm Dr. Süle Norbert munkásságát, aki hasznos útmutatásaival segítette munkámat, s mint patológus mindvégig figyelmem középpontjában tartotta az orvos-diagnosztikai szemléletet.

Köszönettel tartozom Dr. Alpár Donátnak és Dr. Kajtár Bélának a magas színvonalú közös munkáért valamint a számos tartalmas, gondolatébresztő szakmai párbeszédért. Hálás vagyok Kneif Máriának, aki nem csupán bevezetett a laboratóriumi munkába, hanem mindvégig segítette is azt.

A fent említettek mellett köszönettel tartozom még Kalász Veronikának a sejtenyésztés terén nyújtott segítő, tanító tevékenységéért, Dr. Somogyi László Tanár Úrnak és Professzor Farkas Lászlónak, akik nélkül a klinikai tanulmány nem valósulhatott volna meg, Dr. Jáksó Pálnak a közlemények képi anyagainak előkészítése során nyújtott segítségéért valamint a Patológiai Intézet minden olyan munkatársának, aki munkájával segítette e dolgozat megalkotását.

Végül, de semmi esetre sem utolsó sorban, köszönettel tartozom családomnak a sok támogatásért; feleségemnek külön köszönöm türelmét, valamint különleges hálával tartozom gyermekeimnek is, Grétának és Bercinek, akik sokszor akaratlanul is segítettek átlendülni a nehéz percekben, miközben azokat a „színes pöttyöket nézegettem...”.

## Közlemények gyűjteménye

---

### Az értekezés alapját képező közlemények

---

#### Eredeti közlemények

---

**Pajor G**, Alpar D, Kajtar B, Melegh B, Somogyi L, Kneif M, Bollmann D, Pajor L, Sule N. Automated signal pattern evaluation of a bladder cancer specific multiprobe-FISH assay applying a user-trainable workstation. *Microscopy Research and Technique*, Accepted for publication (2011.11.07.). *IF.*: 1,712

**Pajor G**, Somogyi L, Melegh B, Alpar D, Kajtar B, Farkas L, Kneif M, Bollmann D, Pajor L, Sule N. Urovysion: Considerations on modifying current evaluation scheme, including immunophenotypic targeting and locally set, statistically derived diagnostic criteria. *Cytometry Part A* 2011;79(5):375-82. *IF.*: 3,753

**Pajor G**, Süle N, Alpár D, Kajtár B, Kneif M, Bollmann D, Somogyi L, Pajor L. Increased efficiency of detecting genetically aberrant cells by UroVysion test on voided urine specimens using automated immunophenotypical pre-selection of uroepithelial cells. *Cytometry Part A* 2008;73(3):259-65. *IF.*: 3,259

#### Idézhető absztrakt

---

**Pajor G**, Kneif M, Csala J, Farkas L, Pajor L, Süle N. Detection of primary urothelial carcinoma in voided urine specimen using four probe FISH assay combined with automated microscopic system, a prospective study. *Virchows Archiv* 2005;447(2). *IF.*: 2,227

---

***Impakt faktor: 10,951***

#### Egyéb eredeti közlemények

---

**Pajor G**, Kajtár B, Pajor L, Alpár D. State-of-the-art FISHing: automated analysis of cytogenetic aberrations in interphase nuclei. REVIEW. *Cytometry Part A*, *accepted for publication* 2012.05.22. *IF.*: 3,753

Bollmann D, Bollmann M, Bankfalvi A, Heller H, Bollmann R, **Pajor G**, Hildenbrand R. Quantitative molecular grading of bladder tumours: a tool for objective assessment of the biological potential of urothelial neoplasias. *Oncol Rep* 2009;(1):39-47. *IF.*: 1,588

Alpar D, Hermes J, Poto L, Laszlo R, Kereskai L, Jakso P, **Pajor G**, Pajor L, Kajtar B. Automated FISH Analysis Using Dual-Fusion and Break-Apart Probes on Paraffin-Embedded Tissue Sections. Cytometry Part A 2008;73A:651-657. *IF.*: 3,259

Buzogány I, Bagheri F, Süle N, Magyarlaki T, Kalmár-Nagy K, Farkas L and **Pajor G**. Association between Carcinoma and the Transplanted Kidney. Anticancer Research 2006;26: 751-754. *IF.*: 1,479

---

***Impakt faktor: 10,079***

---

***Impakt faktor összesen: 21,030***