

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Hemopoetikus tumorokra jellemző transzlokációk
automatizált i-FISH analízise**

Alpár Donát

Doktori iskola: Klinikai Orvostudományok

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Nagy Judit

Program: Molekuláris pathomorfológia

Program és témavezető: Prof. Dr. Pajor László

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Pathológiai Intézet

Pécs, 2009

Rövidítések jegyzéke

2D	kétdimenziós
3D	háromdimenziós
ABL	Abelson murine leukemia gén
afu	önkéntes fluoreszcencia egység
BCL-2	B-cell leukemia/lymphoma 2 gén
BCR	breakpoint cluster region gén
CCND1	cyclin D1 gén
CIF	kombinált immunfenotipizálás és i-FISH
CML	krónikus mieloid leukémia
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil indol
DF	dupla-fúziós szonda
DI	disszociációs szonda
ETV6	ETS variant 6 gén (korábban <i>TEL</i>)
ES	extraszignálos szonda
F	fúziós i-FISH szignál
FISH	fluoreszcencia <i>in situ</i> hibridizáció
FITC	fluoreszcein izotiocianát
FP	formalin-fixált, paraffinba ágyazott
G	zöld i-FISH szignál
i-FISH	FISH interfázis sejtmagon
IGH	immunglobulin nehézlánc gén
ISH	<i>in situ</i> hibridizáció
kb	kilobázis
LSI	lókuszs-specifikus szonda
Mb	megabázis
MRD	minimális reziduális betegség
pALL	gyermekkori akut limfoblasztos leukémia
Ph	Philadelphia-kromoszóma
R	piros i-FISH szignál
RUNX1	runt-related transcription factor 1 gén (korábban <i>AML1</i>)
SD	standard deviáció
SF	egyszerű-fúziós szonda
SFM	pásztázó fluoreszcencia mikroszkópia

1. Bevezetés

Az *in situ* hibridizáció (ISH) során a minta meghatározott nukleinsav (DNS vagy RNS) szakaszához azzal komplementer, ugyanakkor jelölt, így láthatóvá tehető szekvenciát (szonda) kapcsolnak, mely ISH szignálként azonosítható. A különböző ISH technikák képezik a molekuláris citogenetika alapját, melynek előnye a konvencionális citogenetikával szemben, hogy (i) nem igényel feltétlenül sejtenyésztest; (ii) érzékenységének köszönhetően rejtett (kriptikus) aberrációk kimutatására is alkalmas; (iii) megfelelő preparálási technika és műszeres felkészültség mellett a genetikai adatok morfológiai-, fenotípusos-, illetve topográfiai paraméterekkel is társíthatók, egyedi sejt szinten.

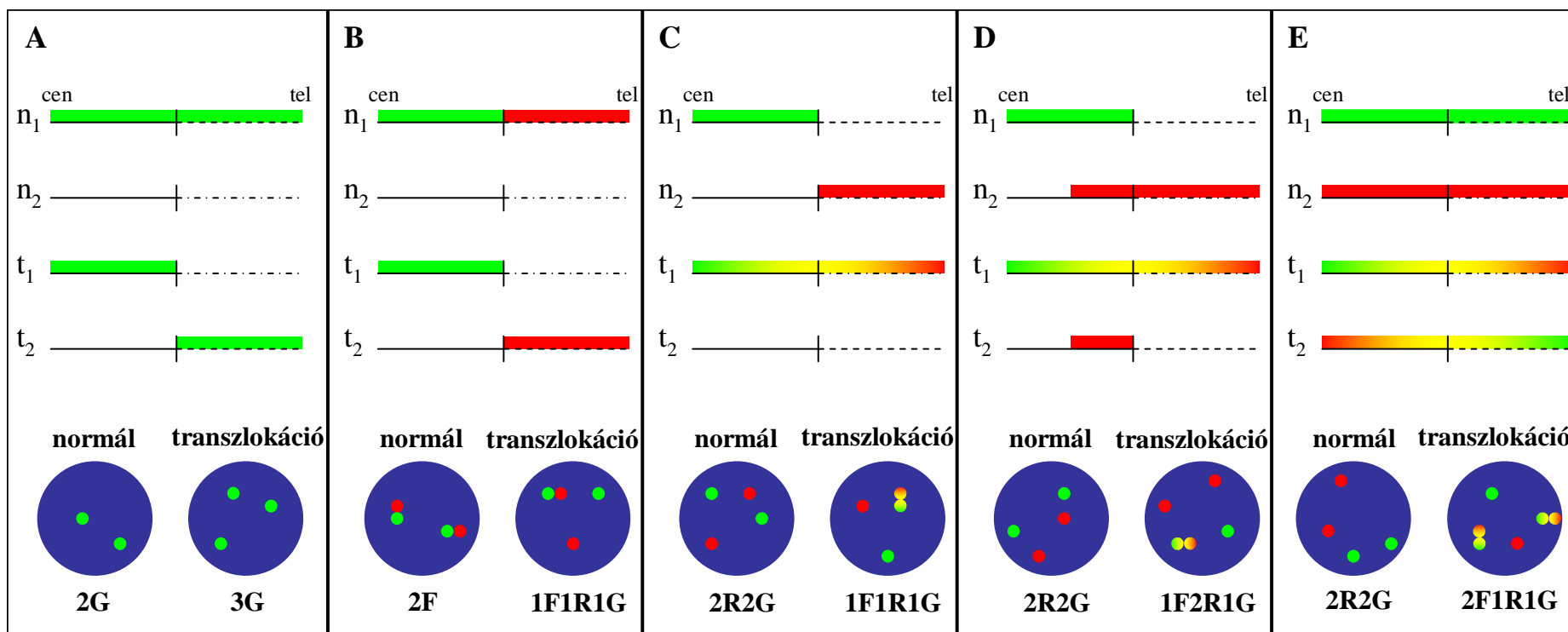
Az összes módszer közül legelterjedtebbé a fluoreszcencia *in situ* hibridizáció (FISH) vált, mely lehetővé teszi a nagy feloldású, többszínű, gyors és biztonságos jelölést. Az interfázisban lévő sejtek magjain végzett FISH (i-FISH) adekvát módszer numerikus- és strukturális kromoszóma anomáliák, valamint - digitális képi technikákkal történő együttes alkalmazás esetén - sejtvonalspecifikus genetikai eltérések vizsgálatához. A patológiai vizsgálatok szempontjából különös jelentőséggel bír, hogy az i-FISH bármely citológiai-, vagy hisztológiai preparátumon elvégezhető, alkalmazásának nem szab határt a formalinos fixálás és a paraffinba történő beágyazás sem.

A jelenleg humán daganatokban ismert kiegyensúlyozott genetikai aberrációk több mint felét különböző hemopoetikus betegségekben azonosították. A limfómákban és leukémiákban előforduló eltérések közül leggyakoribbak a nem-random reciprok transzlokációk. Transzlokációk i-FISH technikával történő vizsgálatok a szignáloknak nem csak a száma, hanem térbeli elrendeződése is rendkívül fontos információ (1. ábra). Az eltérő színű jelek random kolokalizációja itt komoly probléma, mely fúziós szondánál 1 - 18 %-os álpozitivitáshoz, disszociációs szondánál hasonló mértékű álnegativitáshoz vezet. Minden egyes i-FISH vizsgálat vonatkozásában meg kell határozni azt a pozitívitás értéket (diagnosztikai határérték), mely felett a minta egyértelműen kórosnak tekinthető. A határérték számolásának leginkább elterjedt módja során a negatív kontroll minták átlagos álpozitivitását megnövelik a standard deviáció (SD) kétszeresével, vagy háromszorosával.

A manuális i-FISH analízis kapcsán - mely a hematopatológiai rutin diagnosztikában általában 200 db sejtmag értékelését jelenti - nem elhanyagolható korlátokkal kell számolni: (i) alacsony pozitívitás esetén a statisztikai megbízhatóság érdekében nagyszámú sejtmag vizsgálatára van szükség, mely azonban időigényes folyamat; (ii) az értékelő elfogultsága a pozitívitás alul- vagy felülbecsléséhez vezethet, különösen akkor, ha a pozitív sejtek aránya nagyon alacsony, vagy kiemelkedően magas; (iii) transzlokációk vizsgálatok döntő jelentőséggel bír a fúziós (kolokalizált) szignál jelenléte vagy hiánya, melynek azonban nincsen egyértelmű, objektív definíciója.

A számítástechnika és a digitális képanalízis fejlődésének köszönhetően az i-FISH mintázat automatizált jellemzése mára már elérhető lehetőséggé vált, mellyel a manuális értékelés hátrányai kiküszöbölhetők. Objektív kritériumrendszer bevezetésével a vizsgálat az értékelő koncentrációs szintjétől, elfogultságától mentessé válik, a detektált sejtmagok száma pedig jelentős manuális munkatöbblet nélkül növelhető.

A legtöbb automatizált analízisről szóló közlemény génamplifikációk, vagy nagyméretű szignált kialakító centromer szondák értékeléséről számol be. Lókus-specifikus transzlokációs szondákkal vizsgálatunk időpontjáig jóval kevesebb munkacsoport foglalkozott. Ennek lehetséges oka, hogy (i) ezek a szondák kis méretű jeleket alakítanak ki, így automatizált detektálásuk nagyobb kihívást jelent és (ii) ellentétben az összes többi szonda által létrehozott i-FISH mintázattal, értékelésükhöz nem elég csupán a jel detektálás, a szignálok közötti térbeli távolságok precíz meghatározása is szükséges.



1. ábra Transzlokációk i-FISH technikával történő detektálásának gyakorlati lehetőségei. A. Különösen hosszú töréspont régió esetén alkalmazhatók az egy Mb nagyságrendet képviselő, a töréspont régiót átfedő szondák. A kromoszóma törése esetén az egy kromoszómát reprezentáló egyetlen szignál kettőre hasad. B. Disszociációs (DI) szonda kombináció használatakor a piros- és a zöld szondák a transzlokációban résztvevő két kromoszóma egyikén, a töréspont régió két oldalán elhelyezkedő szakaszokkal hibridizálnak. 200 kb-nál hosszabb törésponti régió esetén - a szignálok térbeli orientációjának függvényében - vagy fúziós (sárga) szignál, vagy szeparált, de kolokalizált szignálok jelzik a normális kromoszómát. A szignálok térbeli eltávolodása a kromoszóma törésére utal. C. Egyszerű-fúziós (SF) szonda kombináció alkalmazásakor a piros- és zöld színű szondák a transzlokáció eredményeképpen egymás mellé kerülő régiókkal hibridizálnak. Ha a törésponti régió 200 kb-nál nem hosszabb, akkor a transzlokáció következtében fúziós (sárga) szignál keletkezik az optikai feloldás határa miatt. D. A fúziós extraszignálos (ES) szonda kombináció működési mechanizmusa hasonló az SF szonda kombinációnál látottakkal, de itt a transzlokációban résztvevő egyik kromoszóma töréspontját átfedi a szonda, így a fúziós (sárga) szignál mellett egy kisebb méretű extraszignál is keletkezik. E. Dupla-fúziós (DF) szonda kombináció esetén az átrendeződésben résztvevő mindkét kromoszóma törésponti régiót átfedő szondával van jelölve. A transzlokáció eredményeképpen két fúziós szignál jelenik meg a sejtmagban a folyamatban részt nem vett allélokat jelző piros- és zöld jelek mellett. n_1 , n_2 : normál kromoszómák; t_1 , t_2 : transzlokációban részt vett, átrendeződött kromoszómák. A kék körök a sejtmagokat, a bennük lévő kisebb piros- és zöld körök pedig az i-FISH szignálokat szimbolizálják. Alul az adott szondára jellemző, tipikus jelmintázat látható, többszörös átrendeződés esetén azonban ettől eltérő mintázat is tapasztalható. F,R,G: fúziós-, piros- és zöld jelek száma.

2. Célkitűzés

Módszertani jellegű vizsgálataink során célként tűztük ki különböző, a patológiai diagnosztika szempontjából jelentőséggel bíró, automatizált transzlokációs i-FISH mintázat értékelési eljárások kidolgozását-standardizálását, illetve az ezekkel kapcsolatos lehetőségek és korlátok feltérképezését. Vizsgálatainkhoz egy kereskedelmi forgalomban elérhető pásztázó fluoreszcencia mikroszkópos (SFM) rendszert használtunk.

2.1. Genotípus vizsgálat citológiai preparátumon

A hematológiai elváltozásokra jellemző reciprok transzlokációk klasszikus példája a t(9;22)(q34;q11) (*BCR* és *ABL* gének fúziója), melynek eredménye a krónikus mieloid leukémiára (CML) patognomikus, úgynevezett 'Philadelphia-kromoszóma' (Ph). Mivel a leukémiás sejtpopuláció redukciójának mértéke fontos prognosztikai szereppel bír a terápia folyamán, e transzlokáció kvantitatív detektálása elengedhetetlen a betegség monitorozásakor.

Mikroszkópos rendszerünket először *BCR/ABL* transzlokáció, perifériás fehérvérsejtekben történő kimutatásához teszteltük. Jellemeztük az automatizált műszer képességét (*i*) citológiai preparátumon történő sejtmag szelekció, (*ii*) jelfelismerés és (*iii*) a jelek közötti távolságok meghatározásának tekintetében. Az automatizált módszer álpozitivitását és álnegativitását összevetettük a manuális vizsgálat hasonló értékeivel.

2.2. Kombinált immunfenotipizálás és genotípus vizsgálat citológiai preparátumon

Az utóbbi években egyre inkább növekszik az igény a minimális reziduális betegség (MRD) pontos meghatározása iránt, többek között a gyermekkori akut limfoblasztos leukémia (pALL) esetében is. Az MRD módszerek alkalmasak az első indukciós kezelésre adott válasz sebességének-, illetve dinamikájának meghatározására, mely fontos prognosztikai szereppel bír. Ezen felül az MRD vizsgálatok képesek elkülöníteni a pALL különböző biológiai viselkedésű alcsoportjait, lehetővé téve ezáltal a terápia későbbi stratifikációját.

Második vizsgálatunk során az automatizált módszer továbbfejlesztéseként előzetes - szintén automatizált - immunfenotipizálással kombináltuk az i-FISH analízist. Az álpozitivitás csökkenésével így lehetővé vált alacsony arányban jelenlévő kóros sejtek azonosítása is. Az eljárást CD10 pozitív és t(12;21)(p13;q22) (*ETV6/RUNX1*) transzlokációt hordozó prekursor B-sejtes pALL-ben szenvedő betegek reziduális tumortömegének nyomon követéséhez standardizáltuk. Meghatároztuk e sejtalapú MRD módszer szenzitivitását, specificitását, minimális detektálási szintjét és kvantitatív megbízhatóságát.

2.3. Hisztológiai preparátumok genotípusos jellemzése

Malignus hemopoetikus betegségek vizsgálatához gyakran csak formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FP) anyag áll rendelkezésre. Irodalmi adatok szerint az i-FISH a legmegbízhatóbb módszer transzlokációk FP anyagokon történő kimutatásához.

Munkánk harmadik fázisában az automatizált i-FISH értékelést kiterjesztettük formalin-fixált, paraffinba ágyazott hisztológiai preparátumok vizsgálatára. Ezen felül összehasonlítottuk a kereskedelmi forgalomban elérhető, fúziós- és disszociációs elven működő szondák hatékonyságát paraffinos metszetek automatizált értékelése tekintetében. A kísérleteket olyan köpenysejtes malignus limfómában-, valamint folliculáris limfómában szenvedő betegek archivált anyagain végeztük, melyekben korábban kimutattuk a betegségre jellemző t(11;14)(q13;q32) (*IGH/CCND1*), illetve t(14;18)(q32;q21) (*IGH/BCL-2*) transzlokációt.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Minták

Citológiai preparátumon történő *BCR/ABL*, illetve kombinált CD10 és *ETV6/RUNX1* vizsgálatokhoz negatív kontrollként egészséges felnőttek perifériás vérmintáit használtuk. Pozitív kontrollnak (i) a *BCR/ABL* transzlokáció vizsgálatához az SD-1 sejtvonalat és akcelerációs fázisban lévő CML-es betegek mintáit használtuk, (ii) a CD10+*ETV6/RUNX1* transzlokációs vizsgálatához pedig a REH sejtvonalat. A *BCR/ABL* analízist további CML-es betegek perifériás vérmintáin is elvégeztük. Az MRD vizsgálat kvantitatív megbízhatóságát hígítási sorokkal ellenőriztük. A hisztológiai minták analíziséhez nem-neoplasztikus nyirokcsomó biopsziából készült szöveti vékony metszeteket használtunk negatív kontrollként. A vizsgálat beállítása köpenysejtes- (*IGH/CCND1*⁺), illetve folliculáris (*IGH/BCL-2*⁺) limfómában szenvedő betegek nyirokcsomóinak szöveti metszetein történt. A standardizált módszer hatékonyságát további negatív- és pozitív mintákkal teszteltük.

3.2. Immuncitokémia

A mononukleáris frakciót tartalmazó szuszpenzióból citospin preparátumokat (5×10^5 db sejt / lemez) készítettünk. A többlépcsős jelöléshez primer antitestként jelöletlen egér anti-CD10-et használtunk, melyet biotinilált anti-egér antitesttel és avidin-FITC-cel hívtunk elő. A lemezeket 0,005 µg/ml DAPI-t tartalmazó Vectashield oldattal fedtük le.

3.3. Áramlási citometria

A hígítási sorok mintáit FITC konjugált egér monoklonális anti-CD10 antitesttel jelöltük. A CD10⁺ sejtek arányának meghatározásához a jelintenzitást FACSsort áramlási citométerrel (BD Immunocytometry Systems) detektáltuk és értékeltük.

3.4. Pásztázó fluoreszcencia mikroszkópia (SFM)

Az automatizált tárgylemez-pásztázó és analizáló rendszer PC-ből és egy Zeiss Axioplan2ie MOT motorizált, epifluoreszcens elrendezésű mikroszkópból állt. A digitális képfelvételhez és feldolgozáshoz, valamint a citometriai mérésekhez a Metafer 4.0/MetaCyte és az Isis - In situ imaging system (MetaSystems) software-eket használtuk.

3.5. Immunfenotipizálás SFM-mel

A sejtfelismerést és CD10 detektálást Fluor 10x/0,5 objektívvel végeztük. Az autofókuszálás után az SFM rendszer a citospin preparátum teljes területéről érintkező, átfedés-mentes képeket vett fel. A sejtek felismerése előzetesen optimalizált paraméterekkel történt, a pontos helykoordináták tárolása lehetővé tette a későbbi relokalizációt. Ezután a rendszer fix integrációs idővel (0,58 másodperc) megmérte a sejtek átlagos pixelintenzitását a jelcsatornában (CD10-FITC) és - az autofluoreszcens objektumok felismerésének és kizárásának érdekében - egy kontroll csatornában (SpectrumOrange) is. A sejtek DAPI, FITC és SpectrumOrange csatornában felvett képei kombinált RGB (red-green-blue) formában, galériában is megjelentek. A CD10⁺ és a CD10⁻ sejteket, valamint az autofluoreszcens objektumokat a CD10-FITC, illetve a SpectrumOrange csatornában detektált intenzitások alapján különítettük el.

3.6. I-FISH jelölés

A t(9;22)(q34;q11) transzlokáció vizsgálatánál a jelölést LSI *BCR/ABL* kétszínű, egyszerű-fúziós (SF) szonda kombinációval (Vysis) végeztük a cég által javasolt metodikához hasonlóan. Kombinált fenó- és genotípusos analízis esetén a CD10 immunfenotipizálást követően a mintákat LSI *ETV6/RUNX1* kétszínű, fúziós extraszignálos (ES) szonda kombinációval (Vysis) jelöltük a cég által javasolt metodikához hasonlóan. A formalin-fixált, paraffinba ágyazott szöveti blokkok 3 - 5 µm vastag metszetein deparaffinálást, rehidrációt, majd feltárást végeztünk. A jelöléshez LSI *IGH/CCND1-XT* és LSI *IGH/BCL-2* kétszínű, dupla-fúziós (DF), valamint LSI *IGH* disszociációs (DI) szonda kombinációt (Vysis) használtunk. A lemezeket mindhárom esetben 0,005 µg/ml DAPI-t tartalmazó Vectashield oldattal fedtük le.

3.7. Manuális i-FISH analízis

A manuális i-FISH értékelést Zeiss Axioskop 50, vagy Nikon Microphot 3A mikroszkóppal végeztük, melyek 100x/1,3 immerziós objektívvel és a megfelelő kettős szűrővel (SpectrumOrange/SpectrumGreen) lettek felszerelve. Citológiai preparátumokon minimum 200 db sejtmagot analizáltunk. Hisztológiai preparátumok értékelése során a limfoid infiltrátumot reprezentáló teljes mintaterületet megvizsgáltuk.

3.8. Automatizált i-FISH analízis

Transzlokációk automatizált i-FISH analízise követi a manuális értékelés lépéseit. Először a sejtmagokat kell felismerni, mely a magfestést detektáló, digitális csatorna által felvett képek szegmentálásával történik. Hisztológiai környezetben végzett i-FISH analízisnél a sejtmagokat nem lehet hatékonyan szegmentálni azok érintkezése-, illetve átfedése miatt. Az automatizált vizsgálat számára így kis méretű, analizálandó területeket kell meghatározni. Ennek a mintavételi módnak alapvetően két típusa van: az egyedülálló sejtmagokat azonosítani próbáló „mozaikos mintavétel”, valamint a látómezőre egy szabályos négyzethálót fektető, és e háló egységeit (cella) vizsgáló „rácsos mintavétel”. Másodszor a jeleket kell helyesen detektálni, harmadszor pedig az eltérő színű jelek közötti távolságokat kell meghatározni. Mivel a sejtmagok 3D objektumok, elengedhetetlen a 3D mérés annak érdekében, hogy a 2D vetületben összefekvő jelek által okozott álpozitivitás/álnegativitás lecsökkenjen.

3.8.1. Citológiai preparátumok értékelése

Sejtmag szelekció

A Plan-Neofluar 40x/0,75 objektívvel történő mintavétel folyamán az SFM rendszer a DAPI csatornát használta az i-FISH értékelésre alkalmas sejtmagok azonosításához. Egyszerű i-FISH analízisnél a vizsgálandó terület (search window) határait manuálisan adtuk meg, míg előzetes immunfenotipizálás esetén a rendszer - az elmentett koordináták alapján - csak az előszelektált sejtmagokat relokálta egyenként. Az autofókuszálás és a képfelvétel után a látómezők (image field) DAPI képeit szegmentálta egy kontúrkövető algoritmussal. Az eredményként kapott objektumok közül az egyedül álló sejtmagokat előzetesen optimalizált paraméterek alapján különítette el az összetapadt sejtmagok által alkotott klaszterektől, illetve a sejtmag törmelékektől.

I-FISH szignál detektálás és jelmintázat értékelés

A jelcsatornában (SpectrumOrange, SpectrumGreen) felvett képek háttérkorrekciója és élesítése után a műszer a jeleket kontrasztjuk, intenzitásuk, méretük és a többi azonos színű jeltől való távolságuk alapján ismerte fel. A jelek geometriai centrumának meghatározását a különböző fókuszsíkokban felvett és összegzett 3D képek tették lehetővé.

Transzlokációs i-FISH mintázatok értékelésénél fontos a fúziós szignálnak, mint szelekciós paraméternek a pontos definiálása. SF és ES szondák esetén az eltérő színű jelek közötti legrövidebb távolság bír döntő jelentőséggel etekintetben. A piros- és zöld jelek 3D távolságát pixelben (1 pixel = 0,168 μm) adta meg a műszer. A transzlokációra nézve pozitív- és negatív magokat legjobban elkülönítő optimális határértéket e minimális távolság negatív- és pozitív kontroll sejtmagokban mért eloszlása alapján határoztuk meg. A diagnosztikai határértéket a negatív kontroll minták átlagos álpozitivitásából és a standard deviáció értékéből számoltuk ki (átlagos álpozitivitás + 2SD).

3.8.2. Hisztológiai preparátumok értékelése

Rácsos mintavétel

A citológiai preparátumok analíziséhez hasonlóan itt is 40x-es objektívet és DAPI csatornát használt a rendszer a mintavételhez. Vizsgálandó területnek az FP metszetek limfoid szövetet tartalmazó, reprezentatív területeit jelöltük ki. Az autofókuszálást és 3D képfelvételt követően a szegmentálás rácsos mintavétellel történt. A rendszer minden látómezőt felosztott 15 x 12, azonos méretű (146,3 μm^2) cellára. A cella volt minden további analízis alapja.

I-FISH szignál detektálás és jelmintázat értékelés

A háttérkorrekció után az SFM rendszer a DAPI objektumokkal maszkolást végzett, így a jelcsatornában felvett, de a DAPI kontúron kívül elhelyezkedő jelszerű műtermékeket kizárta az analízisből. Az i-FISH jeleket a műszer a korábban ismertetett módon azonosította.

DF szonda használatakor kizártuk a további analízisből azon cellákat, melyek nem tartalmaztak legalább két piros- és két zöld jelet. A jelfelismerési hibák- és a random kolokalizáció magas valószínűsége miatt szintén kizártuk azokat a cellákat, melyek több mint nyolc darab piros-, vagy zöld jellel rendelkeztek. Pozitívnak tekintettük a cellát, ha legalább két fúziós jelet tartalmazott. DI szonda esetén csak azokat a cellákat vettük figyelembe, melyek legalább egy zöld- és egy piros jelet tartalmaztak. Itt is kizártuk a több mint nyolc darab piros-, vagy zöld jellel rendelkező cellákat. A cellát akkor tekintettük pozitívnak, ha a piros jelek száma meghaladta a fúziós jelek számát. Referenciaként azért a piros jeleket használtuk, mert ezek, a zöld jelekhez képest sokkal megbízhatóbbak voltak.

A fúziós szignál optimális határértékének mindegyik szonda esetén azt a jeltávolságot választottuk, mellyel a legnagyobb különbséget tapasztaltuk a pozitív- és negatív minták pozitivitása között. A diagnosztikai határértéket a negatív- és pozitív minták pozitivitásának figyelembevételével, bináris lineáris logisztikus regresszióval határoztuk meg.

A mintavételi módszerek összehasonlítása

A rácsos- és a mozaikos mintavétel teljesítményét összehasonlítottuk azonos látómezők vizsgálata alapján. Az értékelt mozaikok/cellák számát, valamint a vizsgált területek arányát vetettük össze. A mozaikos mintavételt az irodalomban leírt eljárás alapján végeztük (Reichard és mtsai. *Mod Pathol* 2006).

4. Eredmények

4.1. A BCR/ABL transzlokáció automatizált i-FISH analízise

4.1.1. Eredmények

Sejtmag szelekció

A sejtmag felismerés szenzitivitása 88,7 %-nak adódott. A sejtmagként felismert DAPI objektumoknak átlagosan 10,4 (\pm 8,3) %-a valójában kisebb sejtmagok csoportja volt. Ezek kizárását morfológiai paramétereken (objektum terület, excentricitás) alapuló szóródási diagramok tették lehetővé, melyeken az aggregátumok külön populációként jelentek meg. Az interaktív kapuzást követően, a fennmaradó objektumoknak csak 0,07 (\pm 0,06) %-a volt érintkező/átfedő sejtmagok klasztere.

I-FISH szignál detektálás és jeltávolság mérés

A piros jelek (ABL) 84,9 %-át, míg a zöld jelek (BCR) 80,9 %-át ismerte fel helyesen a műszer. Annak a feltételezésnek megfelelően, miszerint a piros- és zöld csatorna hibái egymástól függetlenek, a műszer a sejtmagok 68,7 %-ában (84,9 x 80,9 %) detektálta helyesen a jeleket mindkét csatornában. Az analízisre alkalmatlan sejtmagok aránya nem különbözött jelentősen a negatív- és pozitív kontroll mintákban, így nem befolyásolta az analízis végső eredményét azon sejtmagok kizárása, melyekben a jelfelismerés helytelen volt.

A fúziós jel optimális határértékének meghatározásához megfigyeltük a legrövidebb távolságok eloszlását a transzlokáció negatív- és pozitív kontroll sejtmagokban. Elkülönítésük során a legkisebb mértékű hibát 5 pixeles (0,84 μ m) határértéknél tapasztaltuk.

A manuális és az automatizált értékelés eredményeinek összehasonlítása

A kontrollként használt hat mintát és a tizennyolc CML-es beteganyagot manuálisan is vizsgálta három független értékelő. A manuális analízis álpozitivitása Ph⁻ minták eredményei alapján 5,8 (\pm 1,5) % volt. Az automatizált analízis magasabb 7,0 (\pm 2,7) %-os álpozitivitással rendelkezett (diagnosztikai határérték: 12,4 %). Az SD-1 sejtek manuális analízise 2,7 (\pm 7,3) % álnegativitást mutatott. Az automatizált analízis álnegativitása valamivel magasabbnak, 5,5 (\pm 8,0) %-osnak bizonyult. Míg a manuális vizsgálatnál minden értékelő 200 db sejtmagot analizált mintánként, az automata rendszer átlagosan 1177 (580 - 3520) db sejtmagot értékelt. Az automata, illetve a manuális módon nyert eredmények szoros lineáris korrelációt mutattak ($R^2 = 0,9892$). A két módszer közötti különbség átlagosan 3,7 (\pm 7,4) % volt. A jobb statisztikai összehasonlíthatóság érdekében az automatizált rendszer által vizsgált sejtmagokat három, egyenként 200 db sejtmagot tartalmazó csoportra szeparáltuk az eredeti detektálási sorrendet figyelembe véve. Ezeket a részpopulációkat külön-külön vizsgáltuk, majd az eredményeket összevetettük éppúgy, mint ahogy azt a három független manuális vizsgáló eredményeivel tettük. A részpopulációk eredményeinek átlagtól való átlagos eltérése 0,0 % volt. Az eltérések 8,3 (-3,5 - 4,8) %-os tartományban szórtak, mely érték mutatja, hogy a pozitív sejtmagok koncentrációja variabilitást mutat a random szelektált 200 db sejtmagtól függően. A független értékelők eredményeinek átlagos eltérése a manuális átlagtól 0,7 % volt, a tartomány 32,2 (-16,8 - 15,4) %, mely reprezentálja az értékelők közötti jelentős eltérést.

Az automatizált analízis sebessége erősen függött a tárgylemezen elhelyezkedő sejtmagok sűrűségétől és az i-FISH szignálok intenzitásától. A 200 db sejtmag analíziséhez átlagosan 36,5 percre volt szükség, mely körülbelül megegyezik azzal a mikroszkópos

munkamennyiséggel, amit egy multicentrumos vizsgálati tanulmány közölt a *BCR/ABL* transzlokáció manuális i-FISH analízisével kapcsolatosan (*Dewald és mtsai. Cancer Genet Cytogenet 2000*). A manuális analízis sebessége a mi laborunkban kétszer ilyen gyors, eltekintve minden egyes kép felvételétől és elmentésétől, mely azonban igénybe venne jónéhány órát.

4.1.2. Az eredmények értékelése

Perifériás fehérvérsejtek interfázisos magjain elvégzett i-FISH analízis ajánlott, mint alternatív módszer CML-es betegek terápiája során, a *BCR/ABL* transzlokációt hordozó sejtek számának monitorozásához. A manuális i-FISH analízis specificitása limitált. A jelek random kolokalizációja SF szonda használatkor elkerülhetetlen álpozitivitást okoz, melynek mértéke függ a pozitívitás kritériumától, a preparálási körülményektől és az értékelő gyakorlottságától. Az alacsony koncentrációban jelenlévő pozitív sejtek pontos detektálásához nagyszámú sejt analízisére van szükség, mely fáradtságos és időigényes.

Vizsgálataink során egy automatizált i-FISH analízisre alkalmas rendszer lehetőségeit és korlátait térképeztük fel és hasonlítottuk össze a manuális értékeléssel. Meghatároztuk a sejtmag szelekció-, az i-FISH szignál detektálás- és a jeltávolság mérés hatékonyságát.

E munkánkhoz hasonló, automatizált i-FISH analízist részletesen tárgyaló közleményt kettőt találtunk az irodalomban. Lukasova és mtsai. *BCR* és *ABL* géneket vizualizáló szondák közötti 3D távolságokat mértek (*Lukasova és mtsai. Hum Genet 1997*). Tanulmányukban a fúziós jeltávolság határértékeként 0,5 μm -t használtak, mely kisebb a mi értékünkénél. Ez annak tulajdonítható, hogy a Lukasova és mtsai. által analizált sejtmagok kisebbek voltak, mint a mi általunk vizsgáltak (átlagos sejtmag sugár: 4,7 μm vs. 8,0 μm). Az álnegativitást és a hibás jelfelismerést nem közölték. Az álpozitivitás értéke náluk 17,6 % volt. Kozubek és mtsai. a t(9;22)(q34;q11) 2D automatizált i-FISH analíziséről számoltak be (*Kozubek és mtsai. Cytometry 1999*). Határértékként 0,5 μm -es távolságot használtak, mely mellett 5,0 %-os álpozitivitást tapasztaltak. A sejtmag- és jeldetektálásról, valamint az álnegativitásról nem közöltek adatot. Az automatizált analízist egyik tanulmányban sem hasonlították össze manuális értékeléssel.

Kísérleteink során az automatizált analízist t(9;22)(q34;q11) - LSI *BCR/ABL* SF szondával való - detektálásához dolgoztuk ki. A kritériumok ehhez hasonlóan beállíthatók más genetikai aberrációkhoz és más, különböző jelmintázatot létrehozó szonda típusokhoz is. Az automatizáció (i) lehetővé teszi nagy számú sejt analízisét anélkül, hogy a manuális értékeléshez szükséges munkamennyiségnél többet kellene befektetni; (ii) csökkenti a mintavételi hibát és (iii) növeli a nagyon alacsony koncentrációban jelenlévő pozitívitás detektálásának valószínűségét. A vizsgált minta méretének csak az automatizált rendszer hardware specifikációi szabnak határt, melyekkel jelenleg 10^4 nagyságrendű sejtmag analízise lehetséges. Ez igen jelentős eredménynek tekinthető a rutin diagnosztikában vizsgált 200 db sejtmaghoz képest. Automatizált analízissel az értékelők közötti variabilitás elkerülhető, a sejtmagokról elmentett képeknek köszönhetően pedig az analízis jól dokumentálható. Ezen túlmenően minden sejt pontos koordinátájának rögzítésével lehetővé válik a későbbi relokalizáció, így megvalósíthatók immunfenotipizálást követő i-FISH vizsgálatok is, melyekkel kombinált fenó- és genotípusos jellemzéshez juthatunk egyedi sejt szinten.

4.2. Reziduális leukémiás sejtek automatizált detektálása egymást követő CD10 immunfenotipizálással és *ETV6/RUNX1* i-FISH analízissel gyermekkori akut limfoblasztos leukémiában

4.2.1. Eredmények

Sejtfelismerés és CD10 detektálás

A minta sűrűségétől függően a sejtek körülbelül 4 - 5 %-a veszett el a látómező szélének érintése, vagy átlépése miatt. Az automatizált rendszer a - teljes egészében a látómezőn belül elhelyezkedő - sejtek 99,38 %-át felismerte az előre meghatározott kritériumok alapján. A detektált objektumok átlagosan 7,22 (\pm 5,64) %-a volt sejtaggregátum. Az összetapadt sejteket kétparaméteres (objektum terület, excentricitás) szóródási diagram alapján, interaktív kapuzással zártuk ki a további analízisből. Mintánként 2000 db galéria kép manuális értékelése alapján a sejtfelismerés specificitása 99,71 %-nak bizonyult.

A több mint 260000 db pozitív kontroll sejt átlagos jelintenzitása (CD10-FITC) 0,49 (\pm 0,19) afu (önkényes fluoreszcencia egység), míg a több mint 195000 db negatív kontroll sejt hasonló értéke 0,19 (\pm 0,07) afu volt. A különbség statisztikailag szignifikánsnak ($p < 0,001$, Student-próba) tekinthető. Annak ellenére, hogy a pozitív- és negatív kontroll sejtpopulációk között jelentős fluoreszcencia intenzitásbeli különbség mutatkozott, tapasztaltunk némi átfedést közöttük. Mivel MRD-t akartunk meghatározni, meg akartunk szabadulni ettől az első látásra jelentéktelennek tűnő, de az MRD szempontjából nem megengedhető mértékű átfedéstől. A zöld jelcsatornában magas fluoreszcenciával bíró negatív sejtek magas intenzitást mutattak a kontroll SpectrumOrange csatornában is. Ez alapján lehetővé vált ezeknek az autofluoreszcens objektumoknak a kizárása, melyek átlagosan az összes egyedülálló sejt 1,07 (0,44 - 3,77) %-át tették ki.

A pozitív- és negatív sejtek elkülönítéséhez meghatároztuk azt a küszöbértéket (0,18 afu), melynek használata mellett az álpozitivitás és álnegativitás összege minimumot mutat. Ezt használva a CD10⁺ sejtek detektálásának szenzitivitása 99,78 %-nak, specificitása 99,79 %-nak adódott. A kimutathatóság alsó szintjét 0,51 %-nál (átlagos álpozitivitás + 2SD) határoztuk meg.

A CD10 immunfenotipizálás megbízhatóságát három párhuzamos hígítási sorral ellenőriztük. Átlagosan több mint 49000 db sejtet vizsgáltunk mintánként. A mérési eredmények és a teoretikus értékek erős korrelációt mutattak ($R^2 = 0,9831$). Az átlagos különbség csupán 0,74 % volt. A hígítási sor mintáit áramlási citometriával is megvizsgáltuk, az eredmények szorosan korreláltak az automatizált mikroszkópiával nyert adatokkal ($R^2 = 0,9895$). Pásztázó fluoreszcencia mikroszkópiával a CD10 pozitivitás vizsgálatának sebessége - sejtdenzitástól függően - mintánként változó volt. A rendszer átlagosan 33 db sejtet detektált, analizált és rögzített másodpercenként.

I-FISH mintázat értékelés

A transzlokációra nézve pozitív-, illetve negatív sejtmagok i-FISH mintázatainak elkülönítéséhez szintén minimalizáltuk az álpozitivitás és álnegativitás összegét. Határértéknek az 1,18 μ m-es (7 pixel) távolságot választottuk. Ezt használva a módszer szenzitivitása 98,00 %-nak, specificitása 82,70 %-nak bizonyult. A relatív alacsony specificitás annak volt köszönhető, hogy kizártuk a pozitivitás kritériumából az extraszignál jelenlétét. Erre a jel változó mérete és rendkívül variábilis fluoreszcencia intenzitása miatt volt szükség, melyek a megbízható detektálást gyakran akadályozták. Az analízis specificitása így csökkent, viszont szenzitivitása nőtt.

Kombinált immunfenotipizálás és i-FISH (CIF)

A mintavétel során rögzített koordináták alapján a rendszer relokálta a CD10⁺ sejteket és vizsgálta azok i-FISH mintázatát pozitív- és negatív kontrollokban, valamint a hígítási sor mintáiban. Azáltal, hogy az i-FISH analízist csak a CD10⁺ sejteken hajtottuk végre, lehetővé vált a sejtfelszíni markerre nézve pozitív és transzlokációt hordozó leukémiás típusú sejtek elkülönítése a normál hematogónium típusú (sejtfelszíni marker pozitív, transzlokáció negatív) sejtektől. A kombinált immunfenotipizálás és i-FISH analízis 98,67 %-os szenzitivitása 99,97 %-os specificitással párosult. A diagnosztikai határértéket az átlagos álpozitivitás + 2SD alapján határoztuk meg: 0,03 % + 0,06 % = 0,09 %.

A hígítási sor teoretikus értékei szorosabb korrelációt mutattak a CIF eredményeivel, mint a kizárólag immunfenotipizálással nyert adatokkal (0,9983 vs. 0,9831). A teoretikus és a CIF során kapott értékek átlagosan 0,26 %-os eltérést mutattak, de az MRD szempontjából fontos, legalsó tartományban (0,1 - 0,5 %-os hígítás) ez csupán 0,01 %-nak bizonyult.

Egy immunfluoreszcenciára nézve pozitív objektum relokalizációja, i-FISH mintázatának rögzítése és értékelése átlagosan 15 másodpercet vett igénybe.

4.2.2. Az eredmények értékelése

A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia esetén alkalmazott terápia hatékonysága az utóbbi időben jelentősen javult, így a komplett remisszió és a teljes gyógyulás aránya mára már eléri a 80 %-ot. Néhány tanulmány alapján azonban úgy tűnik, hogy a betegek egy része túlzott mértékű kezelést kap, míg más részük alul-, vagy helytelenül kezelt. Mivel ezek a jelenségek terápiás hibákhoz vezetnek, szükséges a terápiás stratégiák új prognosztikai faktorok alapján történő, további stratifikációja.

Az egyik ilyen új prognosztikai faktor a reziduális tumortömeg (minimális reziduális betegség - MRD) pontos meghatározása. A leukémiás sejtek nagyon alacsony mennyiségben (10^{-5} - 10^{-6} szint) való kimutatásának klinikai jelentősége nem egyértelmű. Májig nem ismert, hogy ekkora mértékű reziduumnak van-e egyáltalán jelentős biológiai következménye. Az azonban már bizonyos, hogy a tumorsejtek 10^{-3} szintre történő redukciója és a leukémiás sejtek tisztulási (clearance) dinamikája fontos prognosztikai értékkel bír.

A molekuláris genetikai módszerek magas szenzitivitással bírnak, de a tumortömeg mennyiségéről csak közvetett, referencia génhez viszonyított információt szolgáltatnak. A sejt alapú technikák szenzitivitása alacsonyabb, de ezek a módszerek közvetlenül a leukémiás sejtek számát adják meg. Az áramlási citometria rendkívül nagy sebességgel képes azonosítani aberráns sejteket kombinált fényszórási és immunfluoreszcenciás tulajdonságok alapján. Probléma lehet azonban, hogy a patológiai fenotípus nem minden esetben különbözik a normál hematogóniumokétól. A legelterjedtebb MRD vizsgálati módszerek e hátrányai miatt kidolgoztunk egy olyan sejt- és mikroszkóp alapú eljárást, mellyel az adott leukémia jellemző fenotípusa és genotípusa egymást követő, automatizált immunfenotipizálással és i-FISH analízissel vizsgálható.

A beállított vizsgálati módszerrel kimutathatóak a pALL-ben leggyakoribb geno- és fenotípusos elváltozást mutató, CD10⁺ és t(12;21)(p13;q22) transzlokációt hordozó sejtek. Az eljárás 98,67 %-os szenzitivitással és 99,97 %-os specificitással bír, diagnosztikus határértéke 0,09 %. E határérték lehetővé teszi leukémiás sejtek nagy pontosságú azonosítását, valamivel a 10^{-3} szint alatt is, mely küszöbértéket meghatározónak tekintenek a klinikai döntések meghozatala során.

4.3. Dupla-fúziós és disszociációs i-FISH szondák mintázatainak automatizált értékelése formalin-fixált, paraffinba ágyazott szöveti metszeteken

4.3.1. Eredmények

A hibridizáció hatékonysága, a szöveti metszetek vastagsága és az analízis sebessége

A hibridizáció minden esetben sikeres volt, igaz az i-FISH szignálok minősége variabilitást mutatott, leginkább a szöveti metszetek vastagságának köszönhetően. Huszonhat esetben meghatároztuk a metszet átlagos vastagságát a minta négy különböző pontján végzett mérések alapján. Átlag: 4,42 (3,03 - 8,03) μm . A 3,6 μm és 5,0 μm közötti vastagság bizonyult az automatizált értékelés számára optimálisnak. E tartományban a kizárt cellák aránya nem érte el a 35 %-ot. Minden minta esetén legalább 1000 cellát vizsgáltunk. Egy minta komplett analízise, beleértve az értékelést is, átlagosan 9 percet vett igénybe.

A fúziós szignál meghatározása és a diagnosztikai határérték megállapítása

Az optimális határérték az LSI *IGH/CCND1* DF, az *IGH/BCL-2* DF és az *IGH* DI szonda tekintetében 0,5-, 1,0- és 1,2 μm -nek adódott.

Az *IGH/CCND1* szonda esetén a kettő, vagy több fúziós jelet tartalmazó cellák átlagos aránya 5,3 (1,5 - 10,2) % volt a módszer beállításához használt tíz negatív mintában. Ugyanez az érték a tíz köpenysejtes limfómás minta esetén 36,7 (26,6 - 52,0) %-nak bizonyult. Az *IGH/BCL-2* szonda esetén a negatív minták 11,4 (4,0 - 17,3) %-ban tartalmaztak két, vagy több fúziós jellel rendelkező cellát, míg a folliculáris limfómás esetekben 65,2 (39,9 - 79,6) % volt e cellák aránya.

Az említett eloszlásokat figyelembe véve, a diagnosztikai határértéket - bináris lineáris logisztikus regresszió alapján - *IGH/CCND1* esetén 18,5 %-os pozitív cella aránynál határoztuk meg, míg az *IGH/BCL-2* esetében ugyanez az érték 28,8 %-nak adódott.

Ha az *IGH* szonda használata esetén minden olyan cellát megvizsgáltunk, mely legalább egy piros- és egy zöld jelet tartalmazott, a negatív minták átlagosan 48,2 (26,8 - 69,1) %-ban, míg a pozitív minták 77,7 (67,8 - 93,6) %-ban tartalmaztak pozitív cellákat. Ez a pozitív- és negatív minták megbízható szeparálását lehetetlenné tette. A jelfelismerési hibák gyakran vezettek hibás jeltöbblet, vagy jelvesztéshez, eltérő számú piros- és zöld jelet eredményezve a cellákban. Ha csak azokat a cellákat vizsgáltuk, melyekben a piros- és zöld jelek száma megegyezett, helyesen el lehetett különíteni a negatív- és pozitív mintákat. A negatív minták így 28,1 (7,0 - 41,7) %-ban, míg a pozitív minták 74,2 (64,5 - 93,9) %-ban tartalmaztak pozitív cellákat. A szigorított kritériumrendszerrel használva a diagnosztikai határérték 52,9 % lett.

A módszer beállítása után egy harminchét mintából álló teszt csoporton, vakon vizsgáltuk az automatizált analízis hatékonyságát. Az eredmények minden esetben megegyeztek a manuális értékeléssel.

A negatív minták pozitív celláinak aránya a 0,8 - 10,2 %-os, a 4,0 - 17,3 %-os és a 7,0 - 41,7 %-os tartományba esett az *IGH/CCND1*, az *IGH/BCL-2*, illetve az *IGH* szonda esetén. A pozitív minták hasonló értékei a 23,5 - 52,0 %-os, a 38,3 - 79,6 %-os, illetve a 64,5 - 93,9 %-os tartományba estek.

A cellánkénti jelszám hatása az álpozitivitásra és a mintavételi módszerek összehasonlítása

Az i-FISH szignálok számának cellánkénti növekedésével a cellák álpozitivitása nőtt. Átlagos jelszám mellett az álpozitivitás 3,4 % és 7,5 % volt az *IGH/CCND1*, illetve az

IGH/BCL-2 szondák esetén, míg a DI szondánál 56,5 %-nak adódott. Utóbbi esetben ez az érték 38,5 %-ra redukálódott, ha csak az egyenlő számú piros- és zöld jeleket tartalmazó cellákat vettük figyelembe. A DF szondákhoz képest a DI szonda teljesítményét erőteljesebben befolyásolta a jelek számának emelkedése. DF szondák esetén az átlag \pm SD számú jelet tartalmazó cellák álpozitivitása 2,5 - 11,6 %, illetve 1,5 - 9,9 % közötti tartományba esett. Ez az érték 42,7 - 77,1 % volt DI szonda esetén és 10,2 - 60,8 %-os értéket vett fel abban az esetben, ha csak a megegyező számú piros- és zöld jelet tartalmazó cellákat vizsgáltuk.

Az SFM rendszer a mozaikos mintavétellel átlagosan 16,2 mozaikot míg rácson mintavétellel 61,0 cellát értékelt ugyanazon a látómezőkön. Figyelembe véve egy átlagos mozaik ($91,6 \mu\text{m}^2$), illetve egy cella ($146,3 \mu\text{m}^2$) méretét, a digitálisan rögzített teljes terület 33,8 %-át vizsgálta a rendszer rácson mintavétellel, míg csupán 5,8 %-át mozaikos mintavétellel.

4.3.2. Az eredmények értékelése

Az i-FISH hatékony módszer citogenetikai aberrációk detektálásához formalin-fixált, paraffinba ágyazott mintákon. Munkánk során megvizsgáltuk a hatékonyságát egy olyan automatizált értékelési módszernek, mely rácson mintavételt használ a limfómás- és normál nyirokcsomókból készült szövettani metszetek analizéséhez. Ezenkívül összehasonlítottuk az *IGH* disszociációs, illetve az *IGH/CCND1* és *IGH/BCL-2* dupla-fúziós szondák teljesítményét.

A fúziós (kolokalizált) jel definiálásához szükséges piros- és zöld jelek közötti távolságok optimális határértékét minden egyes szonda esetén meghatároztuk. Az irodalomban közölt eredményekhez (0,8 - 1,2 μm) hasonló értékeket kaptunk (Reichard és mtsai. *Mod Pathol* 2006). A szondák közötti különbség magyarázható a fúziós szignálokat alkotó, jelölt DNS szakaszok különböző fizikai távolságával. A diagnosztikai határérték 2 - 3x magasabb volt DI szonda esetén, mint a DF szondáknál. Az érték számolásához jelen esetben nem a megszokott eljárást (átlagos álpozitivitás + 2SD), hanem bináris lineáris logisztikus regressziót alkalmaztunk. Ez egy szigorúbb statisztika, melyet azért használtuk, mert a rácson mintavétel egy újszerű-, szokatlan-, nem sejtalapú technika, másrészt a módszer beállítása során nem állt módunkban kizárólag pozitív sejteket tartalmazó mintán vizsgálatokat végezni. A teszt csoportként használt további harminchét mintát a rendszer hiba nélkül diagnosztizálta.

A cellánkénti jelszám növekedése nagymértékben befolyásolta a DI szonda álpozitivitását, míg a DF szondák teljesítményére ez kisebb hatást gyakorolt. A DI szonda szerény teljesítménye meglepőnek tűnhet. Többen ezt a szonda típust hatékonyabbnak tartják transzlokációk szöveti környezetben való kimutatására, mivel akár egy piros-, vagy egy zöld jel is elegendő a pozitivitás megállapításához. Az automatizált analízis szempontjából azonban éppen ez az, ami miatt a DI szonda hajlamosabb a magasabb álpozitivitásra, hiszen akár egyetlen jel hibás felismerése is közvetlenül álpozitivitáshoz vezethet, míg DF szonda esetén a hibás jelfelismerés ritkán okoz két fúziós szignált.

A rácson mintavétel körülbelül ötször annyi területet értékelt, mint a mozaikos mintavétel. Korábban említésre került, hogy a minta egy bizonyos részének elvesztése nem befolyásolja szignifikáns mértékben a végső eredményt. Ötszörös különbség azonban már jelentősnek tekinthető, ezenkívül - citológiai preparátumokkal ellentétben - hisztológiai környezetben a pozitív sejtmagok topográfiai eloszlása rendkívül változó lehet.

Összességében elmondható, hogy sikerült beállítanunk egy gyors és megbízható i-FISH mintázat értékelő eljárást transzlokációk szöveti metszeteken történő automatizált kimutatásához.

5. Az új eredmények összefoglalása

1. Citológiai preparátumokon végzett i-FISH vizsgálataink során kidolgoztuk a t(9;22)(q34;q11) LSI *BCR/ABL* SF szondával való automatizált értékelését. Elsőként írtuk le a módszer teljes specifikációját, mely nem csak a már más munkacsoportok által is ismertetett specificitást és a kimutathatóság alsó szintjét foglalja magában, hanem a szenzitivitást, valamint a sejtmag azonosítással és a szignál detektálással kapcsolatos paramétereket is.
2. A beállított automatizált eljárást összehasonlítottuk a manuális értékeléssel. Megállapítottuk, hogy a manuális vizsgálatnál az értékelők között tapasztalt nagymértékű variabilitás elkerülhető automatizált analízissel, így nagyobb statisztikai megbízhatósághoz juthatunk akkor is, ha csak 200 db sejtmagot vizsgálunk mintánként.
3. Az automatizált i-FISH módszer továbbfejlesztéseként előzetes - szintén automatizált - immunfenotipizálással kombináltuk az i-FISH analízist, így beállítottunk egy olyan eljárást, mellyel lehetővé vált a pALL-ben leggyakoribb geno- és fenotípusos elváltozást mutató CD10⁺ és t(12;21)(p13;q22) transzlokációt hordozó sejtek kimutatása, valamivel a klinikai döntések szempontjából fontos 10⁻³ szint alatt is. A módszer teljes specifikációját megadtuk, kvantitatív megbízhatóságát ellenőriztük.
4. Elsőként használtunk rácsos mintavételt transzlokációs i-FISH mintázatok - paraffinos metszeteken történő - automatizált értékeléséhez, mely eljárás mentes a mozaikos mintavétel során jelentkező problémáktól: (i) háttérfestés heterogenitása; (ii) sejtmagok méretének variabilitása; (iii) többszörös jeldetektálás.
5. Elsőként számoltunk be disszociációs szonda alkalmazásáról hisztológiai környezetben történő, automatizált i-FISH analízis kapcsán.
6. Összehasonlítottuk a disszociációs (*IGH*), valamint a dupla-fúziós (*IGH/CCND1*, *IGH/BCL-2*) szondák hatékonyságát szöveti metszeten történő, automatizált i-FISH analízis tekintetében. Megállapítottuk, hogy mindkét szondatípus alkalmas a pozitív- és negatív minták helyes szeparálására, de a disszociációs szonda esetén szigorúbb analitikai körülményekre van szükség és mindenképpen magasabb álpozitivitással kell számolnunk.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Pajor László professzor úrnak, aki diákkörös korom óta támogat, aki bevezetett a tudományos kutatómunka minden egyes fázisába és aki mindemellett intézetben belül teljes mértékben megteremtette a munkám számára elengedhetetlen infrastrukturális hátteret.

Köszönöm Dr. Kajtár Béla segítségét, akihez minden nap fordulhattam kérdéseimmel és aki rendkívül sokat segített az egész munka során. Értékes tanácsai és a publikálás során nyújtott közreműködése nagymértékben hozzájárult e disszertáció megszületéséhez.

Köszönettel tartozom a Patológiai Intézet összes munkatársának, kiemelten Kalász Veronikának a sejtenyésztésben, Kneif Máriának, Hermes Juditnak és Sepsei Ivettnak a preparátumok készítése során nyújtott segítségért, Jáksó Pálnak az áramlási citometriai mérésekért és a publikálás során nyújtott technikai segítségért valamint Pinczés Zoltánné Dr. László Renátának és Lacza Ágnesnek az értékes tudományos beszélgetésekért.

Köszönöm Dr. Póty Lászlónak a statisztikai elemzésben nyújtott segítségét.

Végül de nem utolsó sorban köszönöm Családom sok éves támogatását, türelmét, szeretetét és megértését, mellyel lehetővé vált számomra e munka elkészítése.

A tézisek alapját képező publikációk

Eredeti közlemények

1. Kajtár B, Méhes G, Lörch T, Deák L, Kneif M, **Alpár D**, Pajor L. Automated Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) Analysis of t(9;22)(q34;q11) in Interphase Nuclei. *Cytometry Part A*, 2006 Jun;69(6):506-14. IF.: 3,293.
2. **Alpár D**, Kajtár B, Kneif M, Jáksó P, László R, Kereskai R, Pajor L. Automated detection of residual leukemic cells by consecutive immunolabeling for CD10 and FISH for *ETV6/RUNX1* rearrangement in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2007 Feb;173(1):23-30. IF.: 1,559.
3. **Alpár D**, Hermes J, Póto L, László R, Kereskai L, Jáksó P, Pajor G, Pajor L, Kajtár B. Automated FISH analysis using dual-fusion and break-apart probes on paraffin-embedded tissue sections. *Cytometry Part A*, 2008 Jul;73(A):651-57. IF.: 2,978.

Idézhető absztraktok

1. **Alpár D**, Kajtár B, Kneif M, Pajor L. Pásztázó fluoreszcens mikroszkópia alkalmazása minimális reziduális betegség nyomkövetéséhez. *Hematológia Transzfuziológia*, 2006, 1. Suppl., 39:7.
2. László R, **Alpár D**, Kajtár B, Lacza Á, Pajor L. Sejt-, gén- és expresszió alapú technikák alkalmazása a minimális reziduális betegség nyomkövetésére. *Hematológia Transzfuziológia*, 2006, 1. Suppl., 39:35.
3. **Alpár D**, Kajtár B, Tóth J, Nagy Zs, Jáksó P, László R, Kereskai L, Pajor L. Automated evaluation of dual fusion and breakapart FISH probes on paraffin-embedded tissue sections. *Blood reviews*, 2007, Suppl. 1., 21:124. IF: 5,922.

Kongresszusi előadások/poszterek száma (elsőszerzős): 16 (11)

Egyéb publikációk

Eredeti közlemények

1. 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 Mar;73A(3):259-65. IF.: 2,978.

Idézhető absztraktok száma (elsőszerzős): 5 (0)

Kongresszusi előadások/poszterek száma (elsőszerzős): 13 (2)

Közlemények összesített impakt faktora (tézishez kapcsolódó): 10,808 (7,830)

Idézhető absztraktok összesített impakt faktora (tézishez kapcsolódó): 23,688 (5,922)

Összes idézettség (független): 9 (6)