

Lenke Molnár

**PATHOGENETIKAI ÉS PROGNOSZTIKAI
VIZSGÁLATOK MYELODYSPLASIÁS SYNDROMÁBAN
IN VITRO CSONTVELŐ TENYÉSZTÉSES, PROLIFERÁCIÓS ÉS
IMMUNOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL**

PhD tézisek

**Dr. Molnár Lenke
I. sz. Belgyógyászati Klinika**

**Programvezető: Dr. Losonczy Hajna egyetemi tanár
I. sz. Belgyógyászati Klinika**

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar**

Pécs, 2000

1. Bevezetés

A csontvelő kóros működése következtében kialakuló, változó súlyosságú mono- bi- vagy pancytopeniával járó, ezáltal változatos klinikai tüneteket és kórfolyást mutató, nem ritkán heveny leukaemiába torkolló kórképeket 1982-ben **Bennett** és munkatársai - francia, amerikai és brit haematopatológusok munkacsoportja (**FAB**) - **myelodysplasiás szindrómának (MDS)** nevezték el, és a csontvelő és perifériás vér mennyiségi és minőségi jellemzői alapján osztályozták. A következő öt betegségecsoportot különítették el: refractaer anaemia (RA), refractaer anaemia ring sideroblastokkal (RARS), refractaer anaemia blast szaporulattal (RAEB), refractaer anaemia blast szaporulattal transzformációban (RAEB-t), valamint chronicus myelomonocytás leukaemia (CMML). Ezen osztályozás a klinikai gyakorlatban jól hasznosíthatónak bizonyult, és prognosztikai támpontot is nyújtott.

A vérképzőrendszer azon betegségei váltak ez által jól definiálható entitássá, melyeket korábban számos diagnózissal illetünk, aszerint, hogy mely sejtszisztéma, milyen fokú kóros elváltozása okozta a tüneteket. A más okkal nem magyarázható, ún. **terápia refractaer** anaemiák, egyéb cytopeniák, a többségében idős korban fellépő súlyos pancytopeniák tehát egységes, jól definiálható szempontok alapján váltak besorolhatóvá a MDS valamely alcsoportjába.

A betegségecsoport azonban korántsem egységes, sem a prognózist, sem a kezelhetőséget illetően, ami szükségessé teszi modern vizsgáló módszerekkel a közöttük fellelhető alapvető különbségek kutatását.

Ma már nem vitatott, hogy a betegség hátterében a haemopoetikus őssejt **klonális léziója** áll. A myelodysplasiás szindróma klinikai megnyilvánulásait, prognózisát döntő módon a betegséget elindító őssejt lézió helye - az őssejt differenciálódás mely fokán következik be az iniciális lézió -, valamint annak súlyossága, és az ebből eredő következmények befolyásolják.

Az őssejt lézió következménye a **malignus transzformáció**, ami a normális, poliklonális haemopoiesis, a genetikailag szabályozott, kiegyensúlyozott sejtproliferáció, differenciálódás és sejthalál egyensúlyának megváltozását eredményezi.

A klonális őssejt lézióhoz vezető folyamatok vizsgálata a patogenezis és prognózis jobb megítélését segítik elő, egyedi sajátosságokkal rendelkező betegség alcsoportok kialakítását, és így a terápia individualizálását teszik lehetővé. A **beteg adaptált kezelés** csak ezek segítségével valósítható meg.

2. Célkitűzések:

Munkánk fő **célkitűzése** az volt, hogy a rendelkezésünkre álló módszerekkel analizáljuk a MDS patogenezisében szereplő tényezőket, ezáltal javítsuk az objektív diagnosztika lehetőségeit, továbbá eredményeink segítsék a prognózis megítélését és a terápia megválasztását.

E célból az alábbi vizsgálatokat végeztük:

2. 1. A MDS-t jellemző kóros haemopoiesis tanulmányozása céljából in vitro **csontvelő tenyésztés**es módszerrel vizsgáltuk a betegek csontvelői progenitor sejteinek növekedési képességét.

2. 2. Az **immunrendszer vizsgálatát** több szempont alapján is célul tűztük ki. A celluláris és humorális immunszisztéma mennyiségi ill. funkcionális eltérései patogenetikai és prognosztikai jelentőséggel is rendelkezhetnek, valamint támpontul szolgálhatnak a terápia megválasztásában. Vizsgáltuk, ezért hogy kimutatható-e a lymphoid rendszer ill. az immunfunkciók zavarára utaló olyan kóros eltérés, ami patogenetikai vagy prognosztikai tényezőként is értékelhető.

2. 3. A MDS-t jellemző **ineffektív haemopoiesis** hátterében a sejtproliferáció és sejthalál homeosztázisának eltérései állhatnak. A hypercelluláris csontvelői kép és a funkcionális csontvelőelégtelenség, a perifériás cytopenia magyarázatoként az utóbbi évek kutatásai alapján fokozott intramedullaris programozott sejthalál (az apoptózis) szerepe merült fel. Vizsgálni kívántuk ezért a **proliferációs és sejtkinetikai sajátosságokat** immunhisztokémiai (Ki-67 proliferációs marker analízis) és áramlásos cytometriás módszerrel (S fázis meghatározás, BrdU inkorporáció).

2. 4. Vizsgáltuk továbbá az **apoptosis szabályozásában** fontos szerepet játszó cytokin, a **TNF α** szerepét a MDS betegekben több vonatkozásban, nevezetesen a csontvelői expressziót, a perifériás vér mononukleáris sejtek intracelluláris TNF α expresszióját és TNF α termelő képességét.

2. 5. A **MDS diagnózis** és prognózis sarokköve a csontvelői és perifériás vér blast aránya, amelynek objektív meghatározására és az abnormális differenciálódás következtében kialakuló fenotípus eltérések vizsgálatára nyújtanak lehetőséget a korszerű áramlásos cytometriás módszerek. Ezen módszerekkel vizsgáltuk a csontvelői **non erythroid blast arány**, valamint az éretlen (CD34), ill. atípusos antigen expresszió diagnosztikai előnyeit és prognosztikai értékét.

3. Betegek és módszerek:

Az 1985 és 1999 között végzett vizsgálatokban összesen **74 beteg** szerepel. 1985 és 1995 között a POTE II. Belklinikán kezelt betegek közül 35, 1995 és 1999 között a POTE I. Belklinikán észlelt MDS betegek közül 39 beteg vett részt a különböző vizsgálatokban. Munkánkban az egyes vizsgálatok eredményeit a vizsgálatban résztvevő betegek klinikai adataival együtt, fejezetenként értékeltük és diszkutáltuk. A prognosztikai értékelést minden esetben a Bournemouth score szerint végeztük el, Mufti javaslata alapján.

3. 1. In vitro csontvelő tenyésztéses vizsgálatok: Az aspirációval nyert csontvelő mintákból mononukleáris sejteket nyertünk Ficoll-Hypaque szeparálás révén. A CFU-GM meghatározás Pike és Robinson (1970) által leírt módszer szerint történt, szemiszolid agar kultúrákban, a colonia stimuláló factor (CSF) forrása human placenta kondicionáló médium (HPCM) volt. A CFU-G(E)MM meghatározás Messner és Fauser (1978) módszere szerint történt, methylcellulose médiumban, a CSF forrás phytohaemagglutinin stimulált leukocytá kondicionáló médium volt (PHA-LCM). 7 napos tenyésztés után ferdított mikroszkópban számoltuk a coloniákat (40 sejt <) és clustereket (40 sejt >). Az in vitro csontvelő tenyésztéses vizsgálatokban 24 beteg szerepelt, a vizsgálatok a POTE II. Belklinikán történtek.

3. 2. Immunológiai vizsgálatok során az alábbi vizsgálatokat végeztük: az abszolút lymphocita szám, a T és B sejtarány, T (birka vvt) és B (EAC) rosetta módszer szerint, ill. immunfluorescens módszerrel (felszíni Ig direkt IF, CD3 mAT), kvantitatív immunglobulin, paraprotein meghatározás (Mancini módszer), immunkomplex kimutatás (PEG precipitáció), komplement aktivitás mérése (nefelometria). Autoantitest vizsgálatok indirekt IF ill. ELISA, a lymphocytotoxikus antitest meghatározás Terasaki módszer szerint történt. A lymphocita alcsoportok meghatározását részben direkt immunfluorescens, mikroszkópos módszerrel, részben flow cytometriás módszerrel végeztük. A lymphocita blastos transzformáció vizsgálatokat spontán és phytohaemagglutinin stimuláció után H^3 thymidin inkorporáció mérésével végeztük. Az immunológiai vizsgálatokban 56 beteg vett részt.

3. 3. Proliferációs aktivitás vizsgálata: A crista biopsiás minták metszetein MIB-1 monoklonális antitesttel mutattuk ki a Ki-67 nukleáris proliferációs antigen jelenlétét immunhisztokémiai módszerrel, majd 500 magvas sejt analízisével a pozitív sejtek %-ában fejeztük ki a Ki-67 indexet. A crista biopsia során nyert csontvelő aspirátum sejtjein flow cytometriás módszerrel kettős jelöléssel (BrdU és propidium jodid) meghatároztuk az aktív DNS szintetizáló, BrdU-t beépítő sejtek arányát. A vizsgálatban 26 beteg szerepelt.

3. 4. TNF α expresszió vizsgálata: A csontvelő biopsiás minták metszetein a TNF α expresszió mértékét immunhisztokémiai módszerrel anti-human TNF α monoklonális antitesttel határoztuk meg, amit szemikvantitatív módon értékeltünk. A mononukleáris sejtek TNF α termelő képességét betegek friss, heparinnal antikoagulált perifériás vérből izolált (FicollPaque) sejteken vizsgáltuk 24 órás tenyésztés során, valamint nem specifikus stimuláció (phorbol myristat acetat) hatására a tenyésztett sejtek felülcsúzóiban ELISA módszerrel (Hycult Biotechnology kit). A perifériás mononukleáris sejtek intracelluláris TNF α expresszióját áramlásos cytometriás módszerrel határoztuk meg. A TNF α vizsgálatokban 15 beteg szerepelt.

3. 5. Flow cytometriás immunfenotípus vizsgálatok: Az EDTA-val antikoagulált csontvelői és perifériás vérésejteket PBS-el hígítottuk, majd mosás után direkt immunfluorescens jelölés (30 perc szobahőn, a gyártó által megadott koncentrációban) történt a következő monoklonális antitestekkel: CD 7 (FITC, BDIS) - T sejt, CD 19 (RPE, DAKO A/S): B sejt, CD 13 (RPE, DAKO A/S): elkötelezett progenitor, myelo-, monoblast, myelomonocytoid sejtek, CD 14 (RPE, DAKO A/S): promonocyt, monocyt, CD 33: (PE, BDIS): éretlen myeloid, CFU-GM, myelocyt, monocyt, CD 34 (PE, BDIS): pluripotens őssejt, CFU-GM, CD 45 (FITC, BDIS): LCA (leukocyt common antigen). A FCM vizsgálatokban 30 beteg szerepelt.

Valamennyi vizsgálat során kontrollként normális morfológiát mutató csontvelő minták (lymphoma staging) valamint önkéntes donoroktól származó perifériás vérminták szerepeltek.

4. Eredmények és következtetések

4. 1. In vitro csontvelő tenyésztés vizsgálatok

Az in vitro CFU-GM vizsgálatok során a vizsgált 12 **alacsony blast arányú** MDS beteg közül 8 esetben normális colonia képződést figyeltünk meg, csökkent colonia szám 4 betegnél volt, un. cluster típusú növekedést (néhány sejtől álló csoportok nőnek nagy számban) egy betegnél tapasztaltunk.

A **magas blast arányú** betegcsoportban (RAEB, RAEB-t 11, CMML I beteg) viszont közel normális növekedési kép csak egy, CMML diagnózisú esetben volt, a RAEB és RAEBt diagnózisú esetekben vagy csökkent (6 beteg) vagy cluster típusú növekedés (5 beteg) volt jellemző. Ismételt vizsgálat 6 esetben történt, jelentős különbséget egy fiatal, RAEB diagnózisú betegnél figyeltünk meg, akinél kis dózisú cytosin-arabinosid kezelést követően a klinikai és haematológiai remisszió idején átmenetileg normális in vitro növekedési kép volt, a rövidesen bekövetkező AML transzformáció idején ismét nem volt colonia képződés.

Az in vitro növekedési sajátosságokat a Bournemouth féle prognosztikai score eredményekkel összevetve értékeltük.

A növekedési kép megváltozása jól tükrözte az őssejt lézió súlyosságát, ezáltal **prognosztikai jelentőségű**, az alacsony blast arányú betegcsoportban a csökkent coloniaképződést mutató betegek túlélése rövidebb. A cluster típusú növekedés agresszív betegséget, leukaemiás transzformációt jelez. Remisszióban a normális növekedés visszatérhet.

4. 2. Immunabnormalitások vizsgálata

A humorális és celluláris immunsztéma mennyiségi és funkcionális paramétereinek vizsgálata során a betegek nagy részében (49 beteg) figyeltünk meg abnormalitásokat mind a B mind a T sejtszisztémáról, mindössze 7 beteg volt, akinél valamennyi vizsgálat negatív eredményt mutatott.

A leggyakoribb eltérés az abszolút lymphocita szám csökkenése mellett a B sejtszisztémáról a poliklonális immunglobulin szaporulat (53%), és az autoantitest pozitivitás (39%), a T sejtszisztémáról az abszolút T sejtszám, a CD4+ sejtarány és NK sejtarány csökkenése, valamint a mitogénre adott csökkent válaszkészség volt. A magas blast arányú és CMML betegeknél fokozott spontán blastos transzformációs készség volt megfigyelhető.

A Bournemouth score alapján a betegeket két prognosztikai csoportra osztottuk, az 1-2 score érték alacsony, a 3-4 score magas rizikót jelent. Ha a megfigyelt kóros immunológiai paramétereket ennek megfelelően elemezzük, jól szembetűnő különbségek mutatkoznak. A magas kockázatú, II. csoportban jelentősen gyakoribb az Ig szaporulat, az autoAT pozitivitás, a CD4+ sejtszám csökkenés, a csökkent, mitogén indukált és fokozott spontán transzformációs készség.

A myelodysplasiás szindrómában megfigyelhető gyakori és változatos immunológiai eltérések **okairól, jelentőségéről és következményeiről** több feltételezés van, egységes magyarázat azonban eddig nem született és nem is valószínű.

A lymphoid sejtvonal **klonális érintettsége** eredményezheti a lymphoid progenitor sejtek mennyiségi és funkcionális károsodását. Ezt a klonalitás igazolása (genetikai marker kimutatása a myeloid és lymphoid sejteken), valamint ritkán előforduló ALL transzformáció bizonyíthat.

Beteganyagunkban néhány esetben volt lehetőségünk **klonalitás vizsgálatra** HUMARA (humán androgén receptor X chromosomához kötött polimorfizmusa) módszerrel. A négy nőbeteg közül 2 esetben a myeloid sejtpopuláció bizonyult monoklonálisnak, két beteg homozygota volt. ALL transzformáció egy betegnél fordult elő, akinél kiterjedt immunabnormalitásokat figyeltünk meg és a transzformáció rövid RA fázis után következett be.

Az immunabnormalitások a MDS **patogenezisében** feltételezett immunpatomechanizmus következményei is lehetnek, amit több adat is támogat és az újabban sikerrel alkalmazott immunszuppresszív terápia - antithymocyt globulin ill. cyclosporin A - is megerősít. A MDS betegek egy részében - főleg a hypocellularis kórképekben, valamint egyes alacsony blast arányú esetben a cytotoxikus T lymphocyták patogenetikai szerepe valószínű. A progenitor sejtek elleni cytotoxikus hatás mellett azonban a lymphocyták által termelt inhibitor cytokinek szerepe is felmerült, amelyet mi is vizsgáltunk munkánk következő részében. Anyagunkban hat hypocellularis csontvelői képet mutató beteg volt, akinél kiterjedt immunabnormalitásokat észleltünk.

Megfigyeléseinket összegezve a lymphoid szisztéma érintettsége myelodysplasiás syndromában nem vitatható, az immunológiai paraméterek vizsgálata indokolt és fontos. A myelodysplasiás syndromában szenvedő betegek jelentős része infekció következtében hal meg, melyben a granulocytá hiány és funkció zavar mellett a humoralis és cellularis immunszisztéma kóros működése is fontos tényező.

4. 2. 1. Az immunabnormalitások gyakorisága és kiterjedtsége kapcsolatban van a **klonális lézió helyével és súlyosságával**. Kiterjedt immunabnormalitásokat mutató esetekben felmerül a lymphoid sejt vonal klonális érintettsége, ami rossz prognózist jelent.

4. 2. 2. A MDS többségében a **granulocytá-macrophag progenitor (CFU-GM)** érintett, a patológiás klónból származó monocyták és granulocyták kóros funkciója a gyakori infekciók, hiányos antigén clearance, perszisztáló immunstimulusok révén idézheti elő az immunszisztéma működési zavarait.

4. 2. 3. A betegek egy részében **patogenetikai tényező**t jelezhetnek az immuneltérések, ennek igazolása azért fontos, mert a terápia megválasztásában nyújthat segítséget. Hypocellularis MDS-ben, valamint multiplex immunabnormalitások esetében a cytotoxikus lymphocyták szerepe valószínű, ezért az erélyes immunszuppresszív terápia hatékony lehet, és megkísérelendő.

4. 3. A proliferációs aktivitás és sejtkinetika vizsgálata.

A proliferációs vizsgálatokat a csontbiopsziás mintavétellel egyidejűleg nyert aspirátumon és beágyazott metszeteken végeztük. Meghatároztuk a **Ki-67 nukleáris proliferációs marker pozitív sejtek** arányát a csontvelő metszeteken, valamint az aktív S fázisban lévő sejtek arányát flow cytometriás módszerrel, BrdU és propidium jodid kettős jelöléssel a csontvelői sejtuszupenióban. A Ki-67 antigén a sejtmagban jelenlévő, az aktív, ciklusban lévő sejteken expresszálandó (S, G₂, M és késői G₁ fázis) protein, amelynek immunhisztológiai vagy FCM kimutatása a daganatok proliferációs képességének vizsgálatában elfogadott, bár MDS-ben a közölt proliferációs vizsgálatok eredményei elég változatosak.

Az **aktív, DNS szintetizáló sejtek** aránya in vitro BrdU beépítésen és DNS festésen alapuló kettős jelöléssel végzett FCM sejtciklus analízis során határozható meg.

Vizsgálataink során mind a **Ki-67** proliferációs marker in situ, csontvelő metszeteken végzett meghatározásával mind a szimultán végzett, dinamikus **BrdU/Pi** jelöléssel történő FCM mérésrel az alacsony blast arányú kórképek és a RAEB esetek

egy részében figyeltünk meg fokozott proliferációs készséget, ugyanakkor a leukaemiás (RAEB-L, blast 30% <) ill. "leukaemiához közeli", (RAEB-t) fázisban lévő betegeknél a proliferációs készség inkább alacsonyabb volt.

A Ki-67 vizsgálat során néhány refractaer anaemiás esetben tapasztalt erős pozitívitás viszont **rossz prognosztikai jel** volt, gyakori leukaemiás transformatioval, valószínűleg instabil, agresszív klón jelenlétét jelezve. A Ki-67 proliferációs index vizsgálatoknál magasabb volt a proliferáló sejtarány, mint az FCM vizsgálatoknál, aminek oka, hogy nemcsak az aktív S fázisban lévő sejtek mutatnak Ki-67 reaktivitást.

A **proliferációs vizsgálatok eredményei** a MDS sajátos biológiai természetét tükrözik. A többlépcsős myelodysplasiás folyamat során az első fázisra - alacsony blast arányú kórképek, RA, RARS, CMML és hypocellularis MDS esetek egy része, valamint a blast arány növekedés korábbi stádiuma - magasabb proliferációs készség jellemző, amely fokozott intramedullaris sejtpusztulással, nagyarányú apoptosissal jár. A transzformálódó stádiumban, a valódi leukaemiás blast sejtek kinetikai sajátosságai eltérőek, a DNS szintézis zavara következhet be, a sejt ciklus idő hosszabb, az apoptosis készség csökkent. A differenciálódási blokk miatt a sejtek tovább élnek, ezáltal csökken az aktív ciklusban lévő sejtek aránya.

4. 4. Apoptosis szabályozás - TNF α szerepének vizsgálata.

A MDS egyedi biológiai sajátosságokkal bíró betegség a neopláziás kórképek között, a hyperproliferatív csontvelői vérképzés ellenére fennálló perifériás cytopenia miatt. Ezen paradoxonra vonatkozó legújabb megfigyelések vezérelték munkánk további részét, amelyek a fokozott intramedullaris sejtpusztulást, az apoptosis vizsgálatára irányultak.

Számos módszer ismert az apoptosis vizsgálatára, amelyek a sejthalál folyamán fokozatosan szabaddá és kimutathatóvá váló nuclearis (DNS) és egyéb sejtorganelum (mitochondrium) eredetű struktúrák, az apoptosis cascade folyamatában (caspase-k), valamint a genetikai szabályozásban (c-myc, bcl-2 géncsalád) szereplő komponensek különböző módszerekkel történő kimutatásán alapulnak (morfológia, immunhisztokémia, gélelektroforézis, flow cytometria, molekuláris biológia).

Az apoptosis korrekt kvantitatív vizsgálata azonban nehéz, az eltérő irodalmi megfigyelések is ezt tükrözik. A csontvelő cellularis heterogenitása, a programozott sejthalál gyors, nehezen követhető folyamata, a metodikai procedurák során fennálló veszélyek és artefaktumok állnak a háttérben.

Vizsgálataink során az apoptosisban kulcsszerepet betöltő cytokin, a TNF α szerepével foglalkoztunk.

MDS betegeinknél vizsgáltuk a csontvelőben és a perifériás vér mononukleáris sejteiben a **TNF α expresszió** mértékét, valamint a perifériás mononukleáris sejtek **TNF α termelő képességét**.

A csontvelőminták **immunhisztokémiai vizsgálata** során az alacsony blast arányú MDS betegeknél (RA, RARS) minden esetben kimutatható volt cytokin expresszió, a szemikvantitatív értékelés alapján háromnál magas, két esetben intermedier, két esetben alacsony reaktivitást figyeltünk meg. A magas blast arányú betegek közül kettőnél negatív, egynél alacsony expresszió volt. A CMML betegeknél intermedier ill. alacsony reaktivitást észleltünk.

A vizsgálatban szereplő betegek közül tíznél került sor a következő pontban ismertetésre kerülő FCM csontvelői immunfenotípus vizsgálatra, amely során 5 betegnél, a kontrollnál jelentősen magasabbnak találtuk a **csontvelői lymphoid sejtarányt**,

valamennyi beteg az alacsony blast arányú csoportba tartozott és a jelen vizsgálatnál pozitív TNF α expressziót mutatott. Feltételezzük az emelkedett lymphoid sejtarány és a fokozott cytokin termelés kapcsolatát, amit támogatnak olyan adatok is, melyek a haemopoiesis szuppressziójában cytotoxikus lymphocyták és az általuk termelt mediátorok szerepét vetik fel.

A **perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek** vizsgálata során a kontrollnál magasabb stimuláció nélküli TNF α produkció volt mind a négy alacsony blast arányú betegnél, és két CMML diagnózisú betegnél, ami a nem specifikus stimuláció hatására fokozódott. A vizsgált RAEB diagnózisú betegek esetében mind a spontán, mind a stimuláció utáni cytokin termelés a kontrolloknál alacsonyabb volt.

13 betegnél határoztuk meg a perifériás vérben az intracelluláris TNF α pozitív sejtek arányát FCM módszerrel, ami két beteg kivételével a kontrollnál magasabbnak bizonyult, négy esetben jelentősen emelkedett volt.

A csontvelői TNF α expresszió és a perifériás mononukleáris sejtek intracelluláris cytokin pozitivitása és cytokin produkciós képessége nem mutatott minden esetben párhuzamosságot, melynek oka lehet egyrészt az alacsony blast arányú betegnél a csontvelői progresszió korai fázisa, másrészt a TNF α termelésre képes sejtek funkcionális és mennyiségi zavara, kóros cytokin szekréció. Ezen kérdések tisztázása további vizsgálataink tárgya.

A **fokozott apoptózis patogenetikai szerepe** ma aligha vitatható elsősorban a korai stádiumú, alacsony blast arányú MDS betegeknél, amelyet nemcsak az apoptózis jelenségének kimutatása, hanem a szabályozásában szereplő tényezők eltérései is támogatnak.

Vizsgálataink az apoptózis szabályozásában szereplő egyik fontos cytokin, a TNF α szerepét erősítik meg az alacsony blast arányú MDS kórképekben, a betegség progressziójával csökken a fokozott csontvelői expresszió és a perifériás mononukleáris sejtek cytokin produkciója. A fokozott TNF α expressziót mutató esetek többségében magasabb volt a csontvelői lymphoid sejtarány, amely a fokozott cytokin hatásban szerepet játszhat.

5. Flow cytometriás immunfenotípus vizsgálatok

A csontvelő különböző érési stádiumban lévő, valamennyi haemopoetikus sejtvonalból származó sejtekből áll, e sejtek identifikálása a csontvelő aspirátum és biopszia morfológiai és hisztokémiai analizisén alapul. A MDS diagnosztikájának és a prognózis megítélésének sarokköve a FAB munkacsoport által javasolt kritériumok szerinti diagnózis, ezen belül a csontvelői blast arány képezi az egyes alcsoportok elkülönítésének alapját.

A flow cytometria (FCM) elterjedése új lehetőségeket nyújt a csontvelői és perifériás vérésejtek vizsgálatában. A sejtek analizise történhet a **sejtnagyság (FSC)** és **granularitás (SSC)** különbözősége miatti fényszórási tulajdonságok alapján. A csontvelői sejtek szétválasztására azonban e módszer nem alkalmas, mivel a hasonló nagyságú és szemcsézettességű sejtek különböző eredetűek. A CD45 antigén expresszió a sejtek érésével arányosan nő, az erythroid sejteken nincs, legerősebb a lymphocytákon. A FCM analizis során egyik paraméterként (**CD45 vs. SSC**) alkalmazva jól elkülönülő sejtpopulációkat kapunk, melyeken belül külön populációt képeznek a kevés CD45 Ag-t hordozó, szemcse nélküli **non erythroid blastok**.

30 betegünknel végeztük el a csontvelő és a perifériás vér vizsgálatát, meghatároztuk a csontvelői sejtek megoszlását a CD45 vs. SSC kapuzás szerint, vizsgáltuk a non erythroid blastok immunfenotípusát lymphoid, őssejt valamint myeloid és monocyta felszíni marker mAT jelöléssel.

A CD45 vs. SSC kapuzással meghatározott **non erythroid blast arány** minden esetben megfelelt a morfológiai és citológiai kritériumok alapján felállított FAB diagnózisnak, korszerű, objektív és jól reprodukálható diagnosztikus módszerrel bővítve a haematológiai diagnózis eszköztárát.

A CD45 vs. SSC kapuzással mennyiségileg és minőségileg is meghatározhatók a csontvelői egyéb sejtarányok, a CMML-re jellemző monocyta szaporulat. Vizsgálataink során 10 esetben tapasztaltuk a **lymphoid sejtarány** növekedését, főleg az alacsony blast arányú és hypocelluláris kórképekben, amelynek a patogenezisben feltételezett szerepét fentebb részleteztük.

A CD45 vs. SSC cytogramok tükrözték a MDS-re jellemző **dysplasiás** morfológiai sajátosságokat is, a hypogranulált, dysplasiás intermedier myeloid sejtpopuláció megjelenésével.

Az éretlen, korai progenitor sejtekre jellemző **CD34 antigén expresszió** mértékét vizsgáltuk a non erythroid blast sejteken belül, valamint a csontvelői mononukleáris sejtek viszonylatában és a perifériás vérben is. A non erythroid blast populáción belül az előrehaladott, magas blastarányú betegeknél magasabb volt a CD34+ sejtek aránya. Az összes magas sejthez viszonyítva a CD34+ sejtarány 4 betegnél volt magasabb, mint a non erythroid blast arány, ami azt jelzi, hogy a kóros klónból származó érettebb sejtek a kóros differenciálódás következtében megőriznek bizonyos őssejt tulajdonságot. A perifériás vérben megjelenő CD34+ sejt leukaemiás átalakulással volt kapcsolatos, annak előjelzője, vagy már megnyilvánulása volt, minden esetben **rossz prognózist**, rövid túlélést jelentett.

Atípusos antigén expressziót 4 esetben észleltünk, egy betegnél az összes CD34+ sejt CD13 koexpresszió volt, három betegnél a CD33 reaktív antigen struktúra hiányát figyeltük meg.

6. Összefoglalás és új megállapítások

Megfigyeléseinket, következtetéseinket és új megállapításainkat az alábbiakban foglaljuk össze:

6. 1. Az in vitro növekedési sajátosságok vizsgálata során az alacsony blast arányú betegcsoportban normális vagy közel normális növekedési képet figyeltünk meg, ami arra utal, hogy a megmaradó normális progenitor sejtek nőnek a kultúra körülmények között. A későbbi vizsgálatok alapján fokozott proliferációs készségű MDS progenitor az általunk alkalmazott körülmények között **nem mutatott fokozott** növekedést. A cluster típusú növekedést mutató esetek a kóros klón **in vitro** proliferációs sajátosságait mutatják.

6. 2. Az immunrendszer vizsgálata során a betegek nagy része mutatott valamely vizsgált paraméter részéről kóros eltérést. Súlyos, a T és B sejtszisztéma kóros működését jelző immunabnormalitást felveti a lymphoid sejtvonal klonális részvételét, pluripotens őssejt eredetű, rossz prognózist jelez (ALL transzformáció bekövetkezése refractaer anaemiás betegünknel), vagy immunmechanizmus patogenetikai szerepére utal

(alacsony blast arányú kórképek, RA, hypocelluláris MDS esetek), erélyes immunuszpresszív terápia ilyen esetekben megkísérelendő és hatékony lehet.

6. 3. A proliferációs aktivitás és az apoptózis szabályozás tanulmányozására irányuló vizsgálataink alapján a MDS két eltérő proliferációs készséggel rendelkező csoportra osztható. Magas proliferációs aktivitás jellemző az alacsony blast arányú alcsoportra (RA, RARS, hypocelluláris MDS), a blast növekedés korai fázisára (RAEB egy része), és a CMML egy részére. Alacsonyabb a proliferáló sejtarány a leukaemiához közeli és leukaemiás fázisban. Az első csoportban, a csontvelőben és a perifériás vérben **TNF α expresszió fokozott**, flow cytometriás immunfenotípzálás alapján a csontvelőben a lymphoid sejtarány növekedés gyakori.

6. 4. Végül bevezettük, és tapasztalatokat szereztünk a csontvelő **flow cytometriás immunfenotípus** vizsgálatával MDS-ben, amely a CD45 vs SSC kapuzás révén a napi klinikai gyakorlatban hasznosítható, gyors és objektív diagnosztikus segítség. A non erythroid blastok aránya, a FAB szubtypus megállapításával, valamint CD34+ pozitív sejtarány vizsgálata a csontvelőben és a perifériás vérben prognosztikai jelentőségű is.

Megfigyeléseink a **MDS egyedi biológiai természetét** tükrözik: A MDS malignus betegség, azonban a neoplasztikus betegségekre jellemző „**tumorsejtek tömege**” **nélkül!** A malignitást bizonyítja a monoklonalitás, ami a malignus transzformáció egyik fő megnyilvánulása. A sejtkinetika azonban eltér a malignus betegségekre jellemzőtől. A „myelodysplasiás daganatsejtekre” nem a hosszú túlélés és ennek következményeképpen létrejövő felhalmozódás jellemző – ami a valódi daganatoknál elfedheti a hyperproliferatív jelleget –, hanem a fokozott intramedullaris pusztulás, apoptózis, emiatt a proliferáló sejtarány abszolút mértékben és relatíve is nő.

A valódi kuratív **gyógyítás** MDS-ben is a cytotoxikus terápia, a malignus klón elpusztítása, – ami e betegcsoportban különösen nagy kockázatú és gyakran ineffektív is a nem ritkán előforduló multidrug rezisztencia miatt. Ezzel szemben az **antiapoptotikus kezelés** is eredményes lehet, a hosszabb – rövidebb ideig tartó hyperproliferatív, fokozott apoptosissal járó fázisban, sokkal kisebb kockázattal és költségekkel, a „quality of life” romlása nélkül.

A MDS folyamatot elindító tényező ma még nem ismert, és nem is könnyű megismerni. Az **immunfolyamatok**, a cytotoxikus T sejtek, az általuk, vagy hatásukra bekövetkező cytokin termelési zavar egyik lehetséges elindító mechanizmus lehet, amelynek kimutatása a terápia megválasztásában ugyancsak fontos és reménykeltően hatásos segítség.

A témával kapcsolatos közelmények és absztraktok jegyzéke:

1. Klinikai haematológiai és in vitro csontvelőtenyésztéses vizsgálatok myelodysplasiás syndromában.
Molnár Lenke, Fábán György, Burger Tibor, Schmelcz Matild.
Magyar Belorv. Arch. 41: 63-69, 1988.
2. Immunológiai vizsgálatok myelodysplasiás syndromában.
Molnár Lenke, Burger Tibor, Schmelcz Matild, Fábán György.
Orv. Hetil. 132/42: 2299-2303, 1991.
3. Flow cytometriás immunphenotypus vizsgálatok myelodysplasiás syndromában
Molnár L., Jáksó P., A. Hussain, Szomor Á, Losonczy H.
Magyar Belorv. Arch. 52: 61-66, 1999.
4. A TNF α szerepének immunserológiai és immunhistochemiai vizsgálata myelodysplasiás syndromában.
Molnár Lenke, Berki Tímea, Alizadeh Hussain, Németh Péter, Losonczy Hajna
Orv. Hetil. (közlés alatt)
5. Proliferációs aktivitás vizsgálata myelodysplasiás syndromában
Molnár Lenke, Jáksó Pál, Kalász Veronika, Alizadeh Hussain, Szomor Árpád, Nagy Ágnes, Losonczy Hajna, Pajor László
Magyar Belorv. Arch. (közlésre elfogadva)
6. Detection of TNF α expression in the bone marrow and determination of TNF α production of peripheral blood mononuclear cells in myelodysplastic syndrome.
L. Molnár, T. Berki, A. Hussain, P. Németh, H. Losonczy
Pathol. Onc. Res. 6, No 1. 2000. (in press)
7. Proliferációs marker vizsgálatok myelodysplasiás syndromában.
Molnár L., Szomor Á, Losonczy H., Nagy Á., Dávid M., Hussain A., Pajor L.
MBA, suppl. 51: 35, 1998.
8. Immunológiai abnormalitások myelodysplasiás syndromában.
Molnár L., Paál M, Alizadeh Hussain, Szomor Á, Losonczy H.
MBA, suppl. 52: 44, 1999.

Előadások:

1. Myelodysplasiás syndroma – praeleukaemia. Klinikai, cytologiai, immunológiai és cytogenetikai eltérések.
Molnár L., Burger T., Schmelcz M., Fábán Gy.
Dunántúli Belgyógyász Vándorgyűlés, Dunaujváros, 1985

2. Klinikai haematológiai és in vitro csontvelőtenyésztés vizsgálatok myelodysplasiás szindrómában.

Molnár L., Fábán Gy., Burger T., Schmelcz M.
Dunántúli Belgyógyász Vándorgyűlés, Veszprém, 1986.

3. A myelodysplasiás szindróma kezelésével szerzett tapasztalataink.

Molnár L., Schmelcz M., Burger T., Fábán Gy.
Hematológus Kongresszus, Budapest, 1988.

4. A myelodysplasiás szindrómáról (referátum).

Molnár Lenke.
Dunántúli Belgyógyász Vándorgyűlés, Nagykanizsa, 1988.

5-6. Immunológiai vizsgálatok myelodysplasiás szindrómában.

Molnár L., Fábán Gy., Burger T., Schmelcz M.
Dunántúli Belgyógyász Vándorgyűlés, Zalaegerszeg, 1989.
Haematológus Kongresszus, Szombathely, 1990.

7. Immunologische Untersuchungen bei myelodysplastischem Syndrom.

Molnár L., Fábán Gy., Schmelcz M., Burger T.
Gemeinsamer Kongress der Medizin. Fakultäten der Universitäten Pécs und Tübingen,
1990.

8. A myelodysplasiás szindróma körlefordulásáról.

Molnár L., Burger T., Schmelcz M., Fábán Gy.
Dunántúli Belgyógyász Vándorgyűlés, Esztergom, 1990.

9. Dyshaemopoiesisű betegek sejtjei által termelt mediátorok hatása a normális csontvelő in vitro növekedésére.

Molnár L., Fábán Gy., Schmelcz M.
Dunántúli Belgyógyász Vándorgyűlés, Szekszárd, 1992.

10. Proliferációs marker vizsgálatok myelodysplasiás szindrómában.

Molnár L., Szomor Á., Losonczy H., Nagy Á., Dávid M., Hussain A., Pajor L.
Dunántúli Belgyógyász Vándorgyűlés, Bükfürdő, 1998.

11. A myelodysplasiás szindróma genetikája és diagnosztikája (referátum).

Molnár L.
Fiatal Haematológusok Fóruma, Alsópáhok, 1999.

12. A myelodysplasiás szindróma genetikája (referátum).

Molnár L.
MHT XVII. Kongresszusa Budapest, 1999.

13. Immunológiai abnormalitások myelodysplasiás szindrómában.

Molnár L., Paál M., Alizadeh Hussain, Szomor Á., Losonczy H.
Dunántúli Belgyógyász Vándorgyűlés, Zalaegerszeg, 1999.

Egyéb publikációk

1. Ultrastructural Differences in Cell Membranes of Erythrocytes, Myeloid and Lymphoid Cells as Shown by Topo-Optical Reactions.

Gy. Romhányi, Lenke Molnár, Á. Németh
Histochemistry, 39, 261-276, 1974.

2. Optical polarisation indicates arrangement of rhodopsin oligosaccharide chain in rod disk membranes of frog retina.

Gy. Romhányi, Lenke Molnár
Nature, 249, 486-488, 1974.

3. A fiberoscopia értéke a gyomorrák diagnosztikában. Kétlépcsős gyomorrák szűrés eredményei.

Rumi György, Solt István, Molnár Lenke
Magyar Belorvosi Archivum, 29, 81-89, 1976.

4. The Effect of Cytostatics on Intestinal Protein Loss in Rats.

T. Beró, L. Molnár, and T. Javor
Adv. Physiol. Sci. 29, 315-326, 1981.

5. Szérum béta-2-mikroglobulin krónikus lymphoid leukaemiában.

Schmelcz Matild, Burger Tibor, Molnár Lenke, Schmelcz Margit.
Orv. Hetil., 126, 1775-1777, 1985.

6. Epidemiology of Gallstone Disease in Hungary.

Á. Gógl, T. Szabó, Lenke Molnár.
Quart. Bull. Hung. Gastroent. Soc. 3/3, 59-65, 1985.

7. Lymphocytá subpopulációk és immunglobulinok idiopathiás thrombocytopeniás purpurában.

Burger Tibor, Balázs Lujza, Schmelcz Matild, Molnár Lenke, Török Ljubov, Fábán György.
Orv. Hetil., 127, 379-384, 1986.

8. SLE-hez társuló autoimmun haemolyticus anaemia és haemolyzáló Escherichia coli okozta haemolyticus krízis együttes előfordulása.

Molnár Lenke, Emödy Levente, Paál Mária, Burger Tibor, Csermely Lajos, Schmelcz Matild.
Orv. Hetil., 127, 1771-1774, 1986.

9. A valódi polycythaemia körlefordulása, transformációja és ennek kapcsolata az alkalmazott kezeléssel.

Burger Tibor, Schmelcz Matild, Molnár Lenke, Pajor László, Koszorus Sándor.
Orv. Hetil., 128, 2723-2730, 1987.

10. Lymphocyte Subpopulations and Immunglobulins in Idiopathic Thrombocytopenic Purpura (ITP).
T. Burger, L. Balázs, M. Schmelczer, L. Molnár, L. Török, Gy. Fábán.
Acta Med. Hung., 44/2-3, 243-256, 1987.
11. T-lymphocytá subpopulációk különböző glomerulopathiákban.
Süle Tamás, Molnár Lenke, Tóvári Eszter, Burger Tibor, Bártfai Imre, Goffman Ljubov.
Orv. Hetil., 128, 1671-1676, 1987.
12. Epidemiology of Gallstone Disease in Hungary.
Á. Gögl, T. Szabó, Lenke Molnár, Z. Thán.
Assesment and Management of Hepatobiliary Disease, Eds: L. Okolcsányi, G. Csomós, G. Crepari. Springer - Verlag, Berlin, 1987.
13. Course and Transformation of Polycythaemia Vera in Relation to Therapy.
T. Burger, Matild Schmelczer, Lenke Molnár, L. Pajor, S. Koszorus.
Acta Med. Hung. 45/1, 97-113, 1988.
14. Urinary Escherichia Coli Infections Presenting with Jaundice.
Levente Emödy, Lenke Molnár, Miklós Kellermayer, Mária Paál.
Torkel Wadstrom Scand. J. Infect. Dis. 21, 579-582, 1989.
15. T. lymphocytá alcsoportok változása és ezek hatása chronicus B - lymphoid leukaemiában.
Burger Tibor, Molnár Lenke, Schmelczer Matild, Tóvári Eszter, Szabó Adél, Paál Mária, Királyfalvi László.
Orv. Hetil., 129/41, 2189-2193, 1988.
16. Changes of T-Lymphocyte-Subsets and Their Consequences in B-CLL.
T. Burger, L. Molnár, M. Schmelczer, E. Tóvári, A. Szabó, M. Paál, L. Királyfalvi.
Folia Haematol., 117, 115-125, 1990.
17. A de novo és secundaer acut leukaemiák kezeléséről.
Molnár L., Schmelczer M., Herendi E. Lakatos J.
MBA. Suppl. 46: 1993. (abstr.)
18. Haemostasis examination of patients receiving platelet transfusions.
J. Lakatos, E. Herendi, L. Molnár, M. Schmelczer, I. Nemes.
Trends in Haemostasis. (Eds.: H.Losonczy, M. Dávid), Akad. Kiadó Budapest, 172-181, 1995.
19. Efficacy of platelets collected by blood separator.
J. Lakatos, E. Herendi, L. Molnár, I. Nemes, M. Schmelczer.
Thrombosis and Haemostasis, 73, 1066, 1995. (abstr.)
20. CHOP - interferon kezelés non Hodgkin lymphomában.
Molnár L., Schmelczer M.
MBA. Suppl. 49/2., 1996. 183.

21. A report of the long relapse free AML survivors treated with Idarubicin - Ara-C.
L. Molnár, T. Burger, M. Schmelczer.
Third International Congress of the WHMA, 1996, Abstracts
22. Idarubicin - Ara-C inductio és intensiv postinductio kezelésével szerzett tapasztalataink AML-ben.
Molnár L., Szomor Á, Dávid M., Losonczy H.
MBA, Suppl., 50/1, 1997, 36.
23. Szérum, vörösvértest és lymphocytá-ferritin változása Hodgkin és non-Hodgkin lymphomás betegekben különböző kezelésekre hatására.
Schmelczer M., Molnár L.
Magyar Belorv. Arch. 51, 51-54, 1998.
24. A distalis ileum arteriovenosus malformatioja által okozott vashiányos anaemia.
Faludi Réka, Molnár Lenke, Afsin Tavakoli, Wéber György, László Terézia, Mezőfi Beáta
Orv. Hetil. 139(17), 1025-1027, 1998.
25. Kezelési eredmények akut myeloid leukaemiában.
Losonczy Hajna, Alizadeh Hussain, Molnár Lenke, Nagy Ágnes, Dávid Marianna, Szomor Árpád, Kecskés Marianna, Vidra Tímea, Jeges Sára
Magyar Belorv. Arch. 52: 53-60, 1999.
26. Genetikai vizsgálatok szerepe véralvadási betegségek diagnosztikájában
Nagy Ágnes, Melegh Béla, Dávid Marianna, Alizadeh Hussain, Kecskés Marianna, Vidra Tímea, Molnár Lenke, Szomor Árpád, Losonczy Hajna
Magyar Belorv. Arch. 52: 67-72, 1999.
27. Anaplastic large cell lymphoma (ALCL): clinical presentation and outcome of 40 patients.
Á. Szomor, G. Radványi, Zs. Nagy, L. Molnár, G. Kelényi, M. Nagy, J. Demeter, H. Losonczy.
Ann. Onc. 10/3 suppl., 109, 1999 (abstr.)
28. Kumarin-necrosis és heparin okozta Quincke-oedema egy esetünk kapcsán.
A. Hussain, Nagy Á, Molnár L., Dávid M, Szomor Á, Vidra T, Losonczy H.
MBA suppl. 52: 49, 1999.
29. Silent Philadelphia Chromosome: A distinct developmental stage in a Philadelphia Chromosome positive chronic myeloproliferation.
L. Pajor, JA. Vass, L. Kereskai, K. Szuhai, L. Molnár, P. Jáksó
Cancer Genet. Cytogenet. (közlésre elfogadva)