Doktori (Ph.D.) értekezés

# Automatizált képalkotó-citometria alkalmazási lehetőségei húgyhólyagrák ürített vizeletből történő molekuláris citogenetikai vizsgálatánál

Pajor Gábor

Doktori iskola: Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs Program: Humán molekuláris genetika Program és témavezető: Prof. Dr. Melegh Béla

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Genetikai Intézet

Pécs, 2012.

<u>1</u>	BEVEZETÉS	5
1.1	CITOGENETIKA	5
1.1.	1 TÖRTÉNETI ÁTTEKINTÉS	5
1.1.	2 DNS-szonda típusok	6
1.1.	3 MOLEKULÁRIS CITOGENETIKAI MÓDSZEREK	7
1.1.	4 INTERFÁZIS FISH (I-FISH) KIÉRTÉKELÉSE	11
1.1.	5 I-FISH DIAGNOSZTIKUS HATÁRÉRTÉKÉNEK MEGÁLLAPÍTÁSA; VIZSGÁLT SEJTSZÁM	12
1.2	Automatizált Fénymikroszkópia alkalmazása interfázis FISH	
KIÉ	rtékelésénél – Részleges- és Teljes Automatizáció	- 13
1.2.	1 TÖRTÉNETI ÁTTEKINTÉS, ÁLTALÁNOS ELVEK	13
1.2.	2 ELŐPROGRAMOZOTT ÉS PROGRAMOZHATÓ RENDSZEREK	16
1.2.	3 AUTOMATIZÁLT ANALÍZIS FŐBB LÉPÉSEI ÉS AZOKHOZ SZÜKSÉGES MŰSZEREZETTSÉG	18
1.3	HÚGYHÓLYAGRÁK	- 22
1.3.	1 Epidemiológia, klasszifikáció	22
1.3.	2 DIAGNOSZTIKA	25
1.3.	3 HÓLYAGDAGANATOK CITOGENETIKÁJA	28
1.3.	4 FISH SZEREPE A HÓLYAGDAGANATOK DIAGNOSZTIZÁLÁSÁBAN	28
2	<b>σέι κιτ</b> ή <b>7</b> ές	37
4	CELNII UZES	- 34
	, ,	
<u>3</u>	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	- 35
3.1	Minták	- 35
31	1 KONTROLL MINTÁK	35
31	7 – KUNIKOLL MINTÁK 7 – KUNIKAI MINTÁK	35
3.1	2 CITOLÓGIAL PREPARÁTUMOK	36
31	A NALITIKALHATÉKONVSÁGVIZSGÁLAT	36
32	ΚΕΤΤŐS ÜZEMMÓDÚ PÁSZTÁZÓ FÉNVMIKPOSZKÓPIA (PFM)	- 36
3.2	FÉL-AUTOMATIZÁLT FENOTIDIZÁLÁS (CÉLSEITEK MECHATÁDOZÁSA TADCETINC)	- 37
33	1 Kromogén Immuncitokémia (c-ICC)	37
3.3.	<ul> <li>AUTOMATIZÁLT KROMOGÉN IMMUNEENOTIPIZÁLÁS: PEM - TRANSZMISSZIÓS ÜZEMMÓD</li> </ul>	38
3.5.	FI ŐSZEI EKTÁLT SEITEK CENOTIDIZÁLÁSA	- 10
3.1	LEOSZELEKTALT SEJTEK GENOTII IZALASA	- 40
3.4	2 IEI MINTÁZAT KIÉDTÉKEI ÉSE: PEM – EL LIODESZCENCIA ÜZEMMÓD	<del>-</del> 1
3.4	2 JELMINTAZAT KIEKTEKELESE. I I MI – PEOOKESZCENCIA OZEMINOD	41
5.4.	5 KEFFELDOLOOZAS	49
	,	
<u>4</u>	EREDMENYEK	<u>- 50</u>
4.1	UROEPITHELIÁLIS SEJTEK EGYMÁST KÖVETŐ FÉL-AUTOMATIZÁLT FENO- ÉS	
GEN	IOTIPIZÁLÁSA KROMOGÉN IMMUNCITOKÉMIAI ÉS SOKSZONDÁS FISH ALKALMAZÁSÁVAL	- 50
4.1.	1 ANALITIKAI HATÉKONYSÁG	50
4.1.	2 DIAGNOSZTIKUS HATÉKONYSÁG	53
4.2	Sokszondás, lókusz és centromer specifikus FISH jelmintázatok teljes-	
AUT	OMATIZÁLT KIÉRTÉKELÉSE PFM SEGÍTSÉGÉVEL	- 57
4.2	1 ANALITIKAI HATÉKONYSÁG	57
4.2	2 DIAGNOSZTIKUS HATÉKONYSÁG	60
		55
_		
<u>5</u>	MEGBESZELES	- 62
6	ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	- 73

<u>7</u>	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	
<u>8</u>	IRODALOMJEGYZÉK	<u>76</u>
<u>9</u>	KÖZLEMÉNYEK GYŰJTEMÉNYE	
9.1	Az értekezés alapját képező közlemények	
9.1	.1 EREDETI KÖZLEMÉNYEK	93
9.1	.2 IDÉZHETŐ ABSZTRAKT	93
9.2	Egyéb közlemények	

# 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)
СК	citokeratin
CTC	keringő tumorsejt (circulating tumor cell)
CIN	kromoszómális instabilitás
COBRA	kombinált bináris arány jelölés (COmbined Binary RAtio)
DOF	Mélységélesség (Depth of Field)
Del	deléció
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 polimorphism)
TIc	kontúrterületen belüli teljes festődési intenzitás (total intensity contour)
YAC	Élesztő mesterséges kromoszóma (yeast arteficial chromosome)

## 1 Bevezetés

## 1.1 Citogenetika

#### 1.1.1 Történeti áttekintés

A citogenetika a sejttan (citológia) valamint az örökléstan (genetika) határterületén kialakult diszciplína; fő tárgya a kromoszómális szintű rendellenességek vizsgálata. A citogenetika története a 19. századig nyúlik vissza (1-3), s habár már ekkor vizualizálták a kromoszómákat, az emberi sejtekre jellemző össz-kromoszómaszám (46) csupán alig több mint 50 éve, 1956 óta ismert (4-5). A tudományág jelentősége ekkortól nőtt meg igazán, s a 20. század közepétől sorra azonosították az olyan különböző betegségek hátterében meghúzódó számbeli kromoszóma eltéréseket, mint például a Down szindróma (1958) vagy a Klinefelter és Turner szindrómák (1959). A korai évek talán legizgalmasabb felfedezése és egyben az első humán daganat specifikus kromoszóma aberráció a krónikus mieloid leukémiában szenvedő betegek perifériás vérében 1960-ban azonosított, kiegyensúlyozott reciprok transzlokáció eredményezte ún. Philadelphia kromoszóma volt (t(9;22)(q34;q11)). A kezdeti technikák ugyan számos fontos eredményt szolgáltattak, igazán részletes kromoszóma vizsgálatot csupán a '60-'70 években kifejlesztett sávozási technikák tettek lehetővé. Többek között ekkor (1973) derült ki az is, hogy az addig deléciónak azaz részleges kromoszómavesztés eredményének hitt Philadelphia kromoszóma valójában a fent említett transzlokáció következménye.

A molekuláris szintű módszerek alkalmazása a kromoszóma vizsgálatok során először azoknak a megfigyeléseknek köszönhetően vált lehetővé, melyek rávilágítottak arra, hogy a komplementer nukleotid szakaszok lényegesen nagyobb affinitással hibridizálnak egymáshoz, mint a nem komplementer szakaszok (6-7). Az első valóban *in situ* azaz '*eredeti helyzetben, természetes helyen történő*' hibridizáción alapuló vizsgálat Joe Gall és Mary Lou Pardue nevéhez fűződik (1969). Kísérleteik során DNS-RNS hibridizációt alkalmaztak, hogy meghatározzák a riboszómális RNS-t kódoló génszakaszok helyét (8).

A korai in situ hibridizációs eljárások radioaktív jelölésen alapultak, majd ezt követte az először 1977-ben bemutatott fluoreszcens festékkel jelölt antitestek megjelenése, melyek DNS-RNS hibridekhez kötődtek (9). Az ezt követő, ennél is egyszerűbb megközelítésben a fluorokrómot kémiailag kötötték az RNS szondához. Az így keletkezett hibrid vizualizálhatósága gyorsabb és jóval hatékonyabb volt, az eljárás Fluoreszcencia In Situ Hibridizáció (FISH) néven vált ismerté (10). A fejlődés következő jelentős mérföldköve az ún. amino-allyl asszociált bázisok alkalmazása volt. Az így kémiailag módosított nukleotid már képes volt bármilyen haptén vagy fluorofór molekulához kötődni. Mindez azért volt jelentős, mert a módszer viszonylag egyszerű kémiai eljárással tette lehetővé alacsony jel-zaj arányt eredményező szondák előállítását. A szignálok sok esetben azonban még mindig nem voltak elég intenzívek, így a biotin jelölés kidolgozásával megjelentek a mesterségesen erősíthető ún. indirekt módon jelölt polinukleotidok. A 80-as évek elején nick-transzláció segítségével számos biotinnal jelölt szondát állítottak elő, melyeket aztán streptavidin konjugálta különböző fluorokrómokkal lehetett másodlagosan jelölni, azaz a szignált akár többszörösére erősíteni (11-12). Körülbelül egy évtizedet kellett várni a továbbfejlesztett, szintetikus egyszálú DNS szondák megjelenésére. Ezek már képesek voltak emelt mennyiségű fluoreszcens molekula megkötésére, lehetővé téve a hatékony 'direkt' jelölést, melynek köszönhetően a jel erőssége így olyan mértékűvé válhatott, mely korábban csupán az indirekt eljárással volt elképzelhető (13). A citogenetika molekuláris szintű vizsgáló módszereit molekuláris citogenetikának nevezzük.

#### 1.1.2 DNS-szonda típusok

A molekuláris citogenetikai módszerek fejlesztésének az egyik legfontosabb célja mindig is a felbontás növelése volt, melyet jellemzően a szonda és vagy a célszekvencia 'fejlesztésével' próbáltak meg elérni. Az elmúlt évtizedek során a vizsgálati elem felbontása a metafázisban látható egész kromoszómák vizsgálatától (~5 megabázisos (Mb) felbontás), az interfázis magok vizsgálatán keresztül (~50 kilobázis-2Mb) egészen a kromatin szálak analíziséig (fibre-FISH) fejlődött. Sőt, a szondák előállításának folyamatos fejlődésével (beleértve a jelölési hatékonyságot és a széles spektrumot átfogó szondaszekvencia variációkat) a felbontás napjainkban már az egyedi nukleotid szintjét is elérte (14).

A vizualizálandó célszekvencia minősége alapján három alapvető szondatípust szokás megkülönböztetni: teljes kromoszómát festő szondák (wcp), repetitív szekvenciához kapcsolódó szondák és lókusz specifikus szondák.

A teljes kromoszóma festés során csaknem a teljes kromoszóma láthatóvá van téve kromoszóma specifikus kompozit fluoreszcens szondakészlettel, mely eljárást főleg metafázis preparátumok vizsgálata során alkalmaznak (15). Az ilyen típusú szondák általában magas szenzitivitással és specificitással bírnak és kiválóan alkalmasak mind szám- mind szerkezetbeli kromoszóma eltérések kimutatására. Előállításukhoz az adott kromoszómákat áramlási citometria segítségével szortírozzák, majd DOP-PCR (degeneratív oligonukleotid primer - polymerase chain reaction) segítségével azokat amplifikálják és jelölik. A repetitív szekvenciákat megcélzó szondák olyan kromoszóma részletekhez hibridizálnak, melyek rövid, több ezer kópiában ismétlődő szakaszokból épülnek fel. Ilyen például a TTAGGG szekvenciából álló telomérákat célzó ún. pán-telomerikus szonda, vagy a centromerikus szondák, melyek  $\alpha$  és  $\beta$  satellita szekvenciákhoz hibridizálnak. Utóbbiak az ún. CEP-ek (chromosome enumeration probe azaz kromoszómaszámláló szonda) az aneuszómiák kimutatásának alapvető molekuláris citogenetikai eszközei. A lókusz specifikus szondák általában genomiális klónok, melyek mérete összefügg az őket hordozó klónozó-vektorral és széles skálán változik: 1-10kb-tól (plazmid) a PAC, YAC és BAC vektorok által hordozott lényegesen nagyobb, akár 1-2 Mb méretű szondákig. A szondákat hordozó különböző vektorokat legtöbbször valamilyen baktériumban (pl. kólibaktérium) sokszorosítják. Az ilyen típusú DNS szondák különösen alkalmasak szerkezeti rendellenességek, mint például transzlokációk, inverziók, valamint deléciók vizsgálatára, azonban a biológiai problémától függően számos további változatuk alakult ki.

Bizonyos esetekben a mintában vizsgálandó célszekvenciák jóval nagyobb számúak, mint amennyi szabad szemmel spektrálisan elkülöníthető fluorokróm rendelkezésre áll. Ezt a problémát a kombinatorikai (16) vagy az ún. arány (ratio) (17) jelölési módok kifejlesztése oldotta meg. Ezen módszerek lényege, hogy az egyes szondák egyedi kombinációban tartalmazzák a különböző fluorokrómokat, így még azonos fluorokrómok alkalmazása mellett is számos kromoszóma különíthető el.

#### 1.1.3 Molekuláris citogenetikai módszerek

#### Interfázis citogenetika

A molekuláris citogenetika azon változatait mely során interfázisban lévő, tehát nem osztódó sejteket vizsgálunk in situ molekuláris jelöléssel, interfázis citogenetikának nevezzük (1. ábra). Az interfázisban lévő sejtmagok FISH vizsgálatának talán legnagyobb előnye hogy nincsen szükség sejtek tenyésztésére és azok metafázisának preparálására, továbbá

nagyszámú sejten teszi lehetővé a citogenetikai eltérések vizsgálatát; tenyésztés hiányában ráadásul nem kell számolni a tenyésztés okozta klonális szelekcióval, illetve genetikai instabilitással.



**1.** Ábra: A sejtciklus főbb szakaszai. S: DNS megkettőződés, G2: DNS szintézist követő szakasz, M: sejtosztódás (mitózis), G1: növekedési szakasz, G0: nyugalmi szakasz. A G1, S, valamint G2 szakaszokat nevezzük együttesen interfázisnak. A fluoreszcencia in situ hibridizációs vizsgálatok többségben ebben a fázisban levő sejteket analizálja; a módszer ezért az interfázis citogenetikai eljárások egyik legjelentősebb tagjaként említhető. A konvencionális citogenetikai vizsgálatok az 'M' fázisban zajló számtartó sejtosztódás (mitózis) pro- és anafázisa közötti ún. metafázisban levő sejteket analizálják, ezért is nevezik a módszert gyakran metafázis citogenetikának.

Előny még, hogy az interfázis citogenetikai vizsgálatok során egyedi sejtmagok kromoszómáinak vizsgálatára van lehetőség *in situ*, mely információ így a metafázis vizsgálatokhoz képest természetesebb 'forrásból' (közegből) származik. Ráadásul, mivel az interfázis sejtmagban a kromatin állomány csaknem tízszer lazább formában fordul elő, mint metafázis kromoszómákban, lehetőség nyílik rövidebb (~5 Mb helyett ~50 Kb - 2 MB)

szakaszokat érintő eltérések kimutatására is (18-20). Az interfázis vizsgálatok rendkívül hasznosnak bizonyultak olyan ritka események vizsgálatánál, mint például a minimális reziduális betegség (MRD) vagy a mikrometasztázisok. Visszatérő vagy éppen nagyon korai stádiumban levő daganatos betegek vérében disszeminálódott (szétszóródott) keringő tumorsejtek (CTC) szintén rendkívül kis arányban fordulnak elő, mely gyakorlatilag ellehetetleníti az élő sejt kinyerését, tenyésztését, s így azok metafázis vizsgálatának lehetőségét (21). Érdekesség, hogy éppen a kis arányú szétszóródott sejtek interfázis FISH vizsgálatának köszönhetően derült fény arra, hogy számos daganat, már korai stádiumban is rendkívül nagy genotípusos változatosságot mutat (22).

#### Speciális citogenetikai módszerek

<u>Arány-jelöléses technikák:</u> A fent említett arány-jelöléses módszeren alapszik többek között a multiplex-FISH (m-FISH), spektrális kariotipizálás (SKY) vagy a kombinált bináris arány jelölés (COBRA). Ezen módszerek számos biológiai kérdés vizsgálatára alkalmazhatók, mint például szerkezeti interkromoszómális eltérések, valamint összetett kromoszómális átrendeződések jellemzésére (23-24).

Összehasonlító genomiális hibridizáció (CGH): A fent említett hátrányok mellett a metafázison végzett hagyományos citogenetikai vizsgálatoknak számos létező indikációja van. Szolid tumorok esetében azonban nehezebb a hemopoetikus tumorokhoz hasonló jó minőségű metafázis preparátumokat készíteni; a probléma megoldására fejlesztették ki a CGH módszerét (25-27). A CGH során mind a mintából, mind egy kontroll anyagból DNS-t izolálnak, majd mindkét DNS-t fluoreszcensen jelölik, az egyiket zöld a másikat piros fluoreszcens festékkel. Ez követően mindkét mintát egy időben normál metafázisokhoz hibridizálják, melyek így egymással versengve próbálnak kötődni a különböző komplementer szakaszokhoz. Ezek értelmében, ha egy régió nagyobb mennyiségben van jelen a klinikai minta DNS-ben, akkor nagyobb eséllyel fog a normál metafázishoz hibridizálni és így az a szín fog túlsúlyba kerülni, amelyikkel a klinikai mintát jelöltük. Az egyes kromoszómák színarányait jellemzően digitális képvizsgálattal elemzik. A CGH legfőbb előnye, hogy nem igényel előzetes ismereteket a vélt daganat citogenetikai jellemzőit illetően; a technika egyedi sejt szinten is alkalmazható (28-30). A módszer hasznos prenatális diagnosztikában (31-32), valamint minimális reziduális betegség (MRD) vizsgálatokban (33), hátránya azonban, hogy kiegyensúlyozott átrendeződéseket nem képes detektálni. Továbbá, a teljes genomot érintő kópiaszám változást (ploiditás) nem képes felismerni, valamint a nyereségek és vesztések hátterében meghúzódó szerkezeti átrendeződésekről sem nyújt részletes információt.

<u>Fibre FISH:</u> FISH vizsgálatok során a legnagyobb 'target-felbontás' úgy érhető el, hogy a reakciót speciális technikával, kinyújtott DNS szálon hajtják végre. A kezdeti módszerek azonban egyenlőtlen méretű szálakat eredményeztek, sőt a szálak tömöttsége is nagy változatosságot mutatott, így a szignál terjedelme nem feltétlenül állt arányban a szonda méretével (34-35). Számszerűsíthető (kvantitatív) mérésekhez tehát nagyban uniform, egyenletesen kinyújtott DNS szálakra volt szükség. A megoldást a 'molecular-combing' módszer jelentette (36); a módszer lényege, hogy DNS-t tartalmazó oldatból lassan, egyenletes sebességgel kihúzott tárgylemez végső soron egyenletesen kinyújtott és egymáshoz képest párhuzamosan elhelyezkedő DNS szálakat fog tartalmazni. Az így preparált mintán végzett fibre-FISH magas felbontása (akár néhány kilobázis) lehetőséget biztosít a genom egyes régióinak térképezésére (37-38).

Tömbösített (array) technikák: Az array CGH módszernél az egyes kromoszómák helyett több ezer genomiális részlet van külön területeken elhelyezve egy chipen, a módszer így tulajdonképpen egy rendkívül magas felbontású CGH. A minta és a referencia DNS kompetitív ko-hibridizálását követően az DNS chipet digitális képelemzéssel értékelik és a hagyományos CGH-el megegyezően a festődés aránya nyújt információt a minta genomjának egyes régióiról. A módszer nagy előnye, hogy magas áteresztőképességű ún. high-throughput eljárás, mely automatizálható. A technika felbontása a kezdeti megabázis nagyságrendről napjainkra egészen az 5-10 kb-ig fejlődött, sőt egyes ún. magas felbontású array-CGH módszerek akár 200 bp-régió eltéréseit is képesek érzékelni (39). A felbontással együtt a chipek sűrűsége is változott, míg kezdetben pár 10000 klónnal végeztek teljes genom arrayket, addig napjainkban több százezer oligonukleotid szondát hibridizálnak egy tárgylemezre.

<u>SNP (egyedi nukleotid polimorfizmusok) array:</u> a SNP-k egyedi nukleotidokat érintő változatok a genomban, számuk 10 millióra becsült. A detektálásukra kifejlesztett DNS chipek nagy sűrűségben tartalmaznak oligonucleotid szakaszokat, akár milliós mennyiségben is. A módszer más chipes technikákkal szembeni előnye, hogy képesek észlelni az uniparentális diszómia következtében kialakuló, számszerűen semleges, heterozigótaság elvesztéshez (LOH) vezető kromoszómális rendellenességet.

<u>3D-FISH</u>: A kromoszómák térbeli elrendeződése bizonyítottan összefüggésben van számos intracelluláris folyamattal, mint például a sejt genomiális aktivitásával, sejtosztódással valamint a meiozis, illetve mitózis során történő kromoszóma átrendeződésekkel (40-41). Továbbá a legtöbb szövetben a kromoszómák radiális elrendeződése korrelál a génsűrűséggel (42-43), ritkán azonban (pl. fibroblaszt) inkább a kromoszóma méretével (44). A kromoszómák térbeli elhelyezkedése nem csupán a gén aktivitásra lehet hatással, hanem a

kromoszómák akár kölcsönhatásba is kerülhetnek egymással, ezáltal koordinálva a génkifejeződést (45). Háromdimenziós FISH vizsgálatoknál a sejtmagokat fixálják, hogy a különböző kromoszóma territóriumok térbeli viszonya ne változzon. A 3D-FISH nagyban profitált a modern mikroszkópia (pl. konfokális) és képfeldolgozás vívmányaiból (pl. képélesítő, ún. dekonvolúciós algoritmusok). Érdekesség, hogy napjainkban már számos olyan in vivo technika is ismeretes, mely lehetővé teszi, hogy élő sejtek DNS-ét vagy fehérjéit láthatóvá tegyük (46). Az így létrejövő négydimenziós technológia (4D-FISH), tulajdonképpen élő sejteken végrehajtott 3D-FISH; a fluoreszcens nukleotidok az S fázis során a replikáció közben épülnek be.

#### 1.1.4 Interfázis FISH (i-FISH) kiértékelése

FISH generálta szignálok vizsgálhatók és értékelhetők áramlási- vagy statikus citometriával, továbbá bármely mikroszkóppal, mely képes fluoreszcenciát észlelni. Azok a sejtanalitikai technikák, melyek a teljes DNS mennyiséget képesek detektálni, alkalmasak átfogó mennyiségi átrendeződések vizsgálatára, azonban vesztéssel vagy gyarapodással járó mindössze egy-két kromoszómát érintő rendellenesség csak nehezen, kiegyensúlyozott átrendeződések pedig egyáltalán nem észlelhetők. Egy közelmúltban kifejlesztett citometriai technika (ImageStream) ugyan kombinálja a mikroszkópos és az áramlási citometriai módszerek legfőbb erényeit (vizualizálás + rendkívül nagy sebesség) (47), azonban a módszer egyelőre inkább fenotípizálásra alkalmazható nagy biztonsággal; az i-FISH alkalmazása még nem teljesen körüljárt, szerkezeti eltérések észlelése pedig a 3 dimenziós kép hiányában még modern szondákkal sem megoldott.

A legtöbb labor fluoreszcencia mikroszkópiát alkalmaz interfázis FISH kiértékelésére. A fentiek értelmében ez a technika választandó amennyiben szimultán szerkezeti és számbeli információkra is szükség van egy adott kromoszómáról; továbbá mozaicizmus vizsgálatoknál, valamint kiegyensúlyozott kromoszóma átrendeződéseknél.

*Számbeli* kromoszóma aberrációk vizsgálatánál bármely, a normál diszómiás állapot generálta 2 fluoreszcens szignáltól eltérő mintázat természetellenesnek tekintendő (férfiak nemi kromoszómáit kivéve). Egyes esetekben (5/19; 13/21 és a 14/22) a kromoszómák azonban kereszt-hibridizációt mutatnak, így amennyiben ezek a kromoszómák centromerikus szondával vannak jelölve, úgy dupla (azaz négy) szignált fognak generálni (48). A szerkezetbeli átrendeződések felismerése specifikus, adott kromoszómarégióra tervezett szondákkal lehetséges. Vesztések (deléciók) és nyerések (amplifikációk) esetén a szignál

hiánya, avagy a normálhoz képest sokszoros intenzitása és mérete (illetve száma) az abnormalitás jele. Ezeknél a módszereknél azonban ajánlatos egy centromerikus referencia szonda egyidejű alkalmazása is, mivel a fenti jelmintázatok természetüktől fogva aneuszómia következményei is lehetnek. A szöveti környezet további kihívásokat támaszt, melyek közül talán a legfontosabb, hogy a metszési síknak megfelelően a random elhelyezkedő sejtmagok egy jelentős része sérül. Az elvesztett területekkel elveszhetnek a genom egyes részei is, ami rendellenességtől függően okozhat álnegativitást, amennyiben a keresett elváltozás például triszómia, vagy álpozitivitást amennyiben a keresett elváltozás például deléció (49). A jelenség, melyet trunkációs hatásnak neveznek, különböző technikákkal elkerülhető; például a megszokottnál vastagabb (~20 μm) metszet, valamint konfokális mikroszkópia ugyan megoldja a gondot, azonban ezen eljárások növelik a költségeket. Egy másik lehetséges mód a sejtek szöveti környezetből történő elkülönítése, azonban ezzel a módszerrel fontos szöveti mintázati (helyrajzi) ismereteket veszítünk, mely például gondot okozhat az egyes heterogenitások térbeli eredeztetettségét illetően. Utóbbi jelenség különösen a karcinogenezis vizsgálatánál jelent akadályt (50).

#### 1.1.5 I-FISH diagnosztikus határértékének megállapítása; vizsgált sejtszám

Minden FISH vizsgálatnál szükségszerű a pozitivitás azon határértékének megállapítása, amely felett a minta valós pozitívnak tekinthető. Az ehhez szükségszerű kontroll kísérleteket, fontos, hogy minden labor maga végezze el, még akkor is, ha látszólag mindenben (biológiai minta, szonda, laboratóriumi eszköztár, kiértékelésnél alkalmazott műszer) egyezik az alkalmazás egy más munkacsoport által végzettel, hiszen a laborok közötti variabilitás akár jelentős is lehet (51). A határérték megállapítására számos elfogadott számítás ismeretes; talán az egyik legelterjedtebb, amikor az átlagos analitikai álpozitivitást kiterjesztik a szórás kétszeresével (FP+2SD) (52). Amennyiben számbeli eltérések vizsgálatára 1 szondát alkalmazunk, úgy a határérték a leggyakrabban 5-15% közé esik, azonban további szondák alkalmazása jelentősen csökkentheti az álpozitivitást s ez által a határértéket is. Szerkezeti eltérések vizsgálatánál szintén számos körülmény befolyásolhatja a diagnosztikus határértéket, úgymint a transzlokációs régiók térbeli egymásra vetülése miatt adott álpozitív fúziós szignálja (ún. random kolokalizáció); az aspecifikus jelek, vagy éppen az alacsony jel-zaj arány. Általánosságban elmondható, hogy minél összetettebb egy szonda készlet annál alacsonyabb az álpozitivitása, viszont annál magasabb az álnegativitása. A megállapítás alól

azonban léteznek kivételek, például jelentős befolyásoló tényező a pozitív sejt definíció, azaz, hogy mely mintázato(ka)t tekintünk pozitívnak.

A kiértékelés egyik jelentős tényezője az eredmények értelmezése, statisztikai elemzése. Ehhez elengedhetetlen megfelelő számú esemény (sejt) vizsgálata. A FISH vizsgálatok során kiértékelt sejtek mennyiségéről számos ajánlás tesz említés; az értékelendő sejtek száma minden esetben az alkalmazás jellegétől függ. Az Európai Citogenetikusok Társasága (ECA) ajánlása alapján például a prenatális aneuploidia vizsgálat esetében legalább 30 sejt értékelendő, míg mozaikosság, valamint hematológiai vagy onkológiai betegségek esetén minimum 100 sejt vizsgálandó (53). Egyes ajánlások, mint például az Amerikai Orvosgenetikai Kollégium (ACMG), iránymutatása szerint rendellenes populációk kimutatásánál egyedi – a binomiális eloszlás szerinti – számítással kell meghatározni az adott mintára vonatkozó legkisebb vizsgálandó sejtszámot (54). A gyakorlat rendkívül változatos e tekintetben is, azonban a statisztikai elemzésre törekedő laboratóriumok általában 150-200 sejtet vizsgálnak mintánként. Összességében a legkisebb mértékben szükséges vizsgált sejtek száma, s még inkább a diagnosztikus határérték megállapítása napjainkban még mindig megegyezés nélküli, s nem ritkán került téma. Utóbbit példázza, hogy a Klinikai Citogenetikusok Szervezete (ACC Egyesült Királyság) ide vonatkozó némely ajánlása még említést sem tesz e tényezőről (55).

# 1.2 Automatizált fénymikroszkópia alkalmazása interfázis FISH kiértékelésénél – részleges és teljes automatizáció

#### 1.2.1 Történeti áttekintés, általános elvek

Bár az i-FISH vizsgálatokkal kapcsolatban, napjainkban még mindig a manuális kiértékelés az uralkodó eljárás, a módszer számos ismert hátránnyal bír: alacsony pozitivitásnál (pl. keringő tumorsejtek, minimális reziduális betegség) statisztikai okokból meg kell emelni a vizsgált sejtszámot, szükségszerűen fokozva ezzel a ráfordítandó időt is; (ii) szélsőséges értékeknél a kiértékelő elfogultsága torzíthatja az eredményeket, melyek így alul- vagy felülértékelődhetnek. Az állandó minőségű kiértékelési teljesítmény egyik legnagyobb ellensége az emberi ítélőképesség egyhangú helyzetben történő ösztönös

uniformitásba hajlása. Egyes tanulmányok szerzőinek megfigyelései szerint akár ugyanazon értékelő más eredményeket ad reggel, mint a késő délutáni órákban; ahogyan nő a fáradtság, úgy csökken szélsőséges mintázatok gyakorisága, s úgy nő a szokványos, várható diagnózisok száma (56). A standardizációt tovább nehezíti a FISH nagymértékű vizsgálók (57), illetve laboratóriumok (68) közötti variabilitása. Számos egyéb technikai gond nehezítheti még a kiértékelést. Transzlokációk esetében alkalmazott fúziós szondáknál például külön nehézséget jelent annak megállapítása mikortól tekintendő az észlelt színkombináció fúziós jelnek. Elméletileg, minél összetettebb egy szonda készlet, általában annál pontosabb eredményt adhat; mivel azonban a fent említett tényezők is emelkedett mértékben nyilvánulnak meg, így ez még sincs mindig így.

Összességében a manuális FISH vizsgálat fáradságos és időigényes procedúra, melyhez, a minta minőségétől és az alkalmazástól függően, akár 2 magasan képzett, tapasztalt személyre is szükség lehet. Mindezek tükrében talán nem meglepő, hogy a FISH kifejlesztését mindössze pár év lemaradással követte a különböző fél- vagy teljes automata rendszerek fejlesztése.

Az első próbálkozások közleményei a '90-es évek elején, közepén még saját fejlesztésű software-ekkel üzemeltetett, javarészt szintén saját fejlesztésű mikroszkópos munkaállomásokon végzett kísérletekről számoltak be. Az ekkor még kiforratlan területen zajlódó kísérletek rendkívül nagy figyelmet fordítottak optikai, statisztikai és legfőképpen digitális topológiai kérdésekre. Számos tanulmány nem a manuális kiértékeléssel hasonlítja össze az automata rendszert ekkor még, hanem ugyanazon rendszeren belül több, egymástól lényegesen eltérő matematikai morfológiai megközelítés eredményességét vizsgálják sejtmagok, illetve a jelek, stb. felismerésére. Az adaptációt (és standardizációt) nehezítette, hogy ez időben még nem (vagy csak kis számban) léteztek kereskedelmi forgalomban kapható, széles körben elterjedt FISH szonda készletek, azaz a legtöbb munkacsoport saját maga előállított szondákkal dolgozott. Körülbelül egy évtized telt el mire megjelentek a kereskedelmi forgalomban kapható készletek és mikroszkópos rendszerek. A közlemények ekkorra már inkább származtak biológusok, orvosok "tollából", mintsem fizikusok vagy éppen matematikusokéból. Ugyan a rutin alkalmazhatóság vizsgálata kezdett előtérbe kerülni, a technika továbbra is lassan nyert teret, mely jelenséget elsősorban a viszonylag magas kezdeti költségek valamint a módszer összetettsége okozta.

Az irodalomban az elmúlt 20 évben fellelhető közlemények döntő többsége (~80%) citológiai preparátumokon végzet kísérletekről számol be, míg a szöveti környezetben végzett tanulmányok viszonylag ritkák. A felhasznált DNS szondák változatosak; általánosságban

elmondható az elmúlt 20 év kutatási eredményeit figyelembe véve, hogy a CEP vs. LSI arány megközelítőleg 60:40%. Ez az arány a '90-es években nagyobb volt, míg napjainkban egyre inkább kiegyenlítődni látszik. Ennek fő oka, hogy míg 15-20 évvel ezelőtt megbízhatóan robusztus szignált (mely ugyanolyan fontos az automatizált kiértékelésnél, mint a manuálisnál) leginkább centromerikus szondákkal lehetet előállítani, addig mára közel hasonló eredményt lehet elérni lókusz specifikus szondákkal.

A műszerek tekintetében szintén nagyon nagy a változatosság, alapvetően mégis elmondható, hogy a rendszerek többsége fluoreszcencia mikroszkópra épül, míg viszonylag ritkábban alkalmaznak konfokális lézer-pásztázó mikroszkópot illetve lézer-pásztázó citométert (az automatizált FISH analízishez szükséges műszerezettséget részletesebben ld. később, a 1.2.2. és 1.2.3 alfejezetekben).

A kiértékelésnél a vizsgálat sebességére kiható egyik legfőbb tényező a vizsgált sejtek száma; ez még azon rendszerekre is igaz melyek alapelve, hogy először a megfelelő észleléshez szükséges minimálás morfometriai paraméterek gyűjtése mellett mintegy előpásztázza a mintát, majd az elő szelekciót követően újabb részletes pásztázást hajt végre (69). A manuális kiértékeléssel szemben, végletes esetben (rendkívül kis pozitivitás, vagy negativitás), a statisztikai megbízhatósághoz szükséges nagy mennyiségű sejtek vizsgálata sem jelent problémát. Az irodalomban fellelhető tanulmányokban közölt sejtszámok széles skálán mozognak. Általánosságban azonban elmondható, hogy a technika fejlődésével együtt nőtt a vizsgált sejtek száma. Míg a '90-es évek elején egy pár ezres vizsgálat (mely adott esetben csak kis statisztikai plusz ismerettel szolgált a manuális vizsgálathoz képest) jelentős mértékkel megnövelte a vizsgálati időt, addig napjainkban ez csak részben igaz, továbbá még fontosabb, hogy a jelenlegi számítógépes technika mellett sokkal gyorsabbá vált az adatok kiértékelése is.

A sejtenkénti vizsgálati idő (sec/sejt) nagyon széles skálán mozog a szakirodalomban (~0.18-406 sec), az egyes tanulmányokban ráadásul olykor nem egyértelmű, pontosan mit is értenek a vizsgálódás idején. Vannak munkacsoportok, melyek kizárólag a pásztázási időt veszik figyelembe majd ezt osztják vissza a vizsgált sejtek számával (60), vannak melyek a kiértékelést is, vagy éppen a manuális verifikálást is beleszámolják. Annak ellenére, hogy az egyes tanulmányokban nagyon eltérő az automatizált vizsgálati sebesség értelmezése, általánosságban elmondható, hogy a technika fejlődésével a sebesség folyamatosan növekszik, és napjainkban sok esetben már nem hogy eléri, hanem meg is haladja a manuális kiértékelés sebességét. Az automatizáció mértéke az irodalmi adatok alapján a technika fejlődésével és a benne rejlő lehetőségek felfedezésével fokozatosan nőtt. Eleinte például nem volt szükség

automatizált filterfoglalatra, hiszen a kezdeti FISH vizsgálatok általában egy, esetleg két szondával dolgoztak, melyet csupán egy szűrő alkalmazásával lehetett észlelni. A gépesítés mértékére utaló irodalmi nómenklatúra azonban nem egyértelmű. Egyes közlemények teljes mértékű gépi analízisről számolnak be s a folyamat valóban mellőzi a manuális beavatkozást (61), míg mások – annak ellenére, hogy átfogóan automatizáltnak nevezik a vizsgálatukat csupán egyes elemeit automatizálják a teljes folyamatnak (62). Utóbbiak közé sorolhatók olyan tanulmányok, ahol a minőségileg nem kívánatos elemek szelektív kizárása manuálisan történik (63), vagy ahol az analízis ugyan automatizált, azonban egy korábban manuálisan ellenőrzött magas minőségű területen zajlik (64). Mások autofókusz nélküli rendszerről számoltak be (65) (autofókusz nélkül sok tárgylemez egymást követő pásztázása és analízise gyakorlatilag lehetetlen). Megint csak mások "mindössze" arra használják a motorizált, érzékelővel ellátott mikroszkópot, hogy nagy mennyiségű sejtszintű digitális felvételt készítsenek, majd azokat a számítógép monitorán szelektálják, értékelik (62). A félautomatizált vizsgálatok egyik általános formája, hogy a rendszer a lehető legmagasabb szenzitivitásra van beállítva, - akkor is, ha ez adott esetben alacsony specificitással jár együtt -, a sejtvesztések (álnegatívok) minimalizálása érdekében; a digitális dokumentumon azután a kezelő végez manuális, vagy jól definiálható eltérések esetén fél-automatizált ún. kapuzási szelekciót (57). Egy másik gyakori fél-automatizált módszer az egyes sejtek automatizált fenotipizálása, majd konszekutív manuális vagy kis mértékben automatizált genotipizálása (66-68).

Bármilyen mértékű is a folyamat gépiesítése, a legtöbb esetben mindenképpen előnnyel jár, azonban az olykor következetlen nómenklatúra rendkívül megnehezíti az egyes tanulmányok által vázolt gépiesített folyamatok összehasonlítását, azok klinikai relevanciájának mérlegelését.

#### 1.2.2 Előprogramozott és programozható rendszerek

Napjainkban alapvetően 2 típusú rendszer létezik: az előprogramozott, csak kis részben változtatható és a felhasználó által gyakorlatilag teljes mértékben programozható rendszerek. Előbbiek előnye az azonnali alkalmazhatóság és a könnyű kezelés, azonban hátrányuk, hogy minden egyes új klinikai alkalmazáshoz újabb szoftver megvásárlása szükséges, ráadásul folyamatos szerviz-kapcsolatra van szükség az anyacéggel; további hátrány, hogy az előre meghatározott gépi vizsgálódás kis mozgásteret ad kutatási célokhoz. A programozható

rendszerek hátránya az előprogramozottakkal szemben, hogy a beüzemelés egy viszonylag lassan emelkedő tanulási görbével jár együtt. Ez az ismeret azonban a későbbi újabb és újabb alkalmazások során összehasonlíthatatlanul nagyobb kutatási mozgásteret biztosít, lévén a felhasználó sok száz paraméter közül választhat; beleértve mind a pásztázással, kép felvétellel, valamint a digitális analízissel kapcsolatos mutatók beállítását, továbbá a különböző származtatott (derivált) algoritmusokat. Az ilyen típusú rendszereknél alapvetően minden új alkalmazás esetében egy ún. 'betanítási' (training) fázissal kezdődik a rendszer beállítása (megjegyzés: az elsődleges betanítást gyártás során az előprogramozott rendszereken is elvégzik, azonban ez később nem, vagy csak részben módosítható). A training lényege, hogy a lehető legjobb magszegmentálás valamint jelfelismerés érdekében a felhasználó mintegy 'megtanítja' a szoftvert az alapvető morfometriai feltételekre. Fontos megjegyezni, hogy mint minden alkalmazásfüggő paraméter-beállításra érzékeny rendszernél, itt is lehetőség van korábbi, hasonló biológiai alkalmazásokra már kikísérletezett paraméterkészletek mintegy kiindulási alapul vételére. Minél több korábban finomhangolt beállítást tartalmaz a rendszer, annál rövidebb a kezdeti beállítási idő. Igaz ugyan, hogy még azonos alkalmazások között is jelentős variabilitás figyelhető meg, az alkalmazás specifikus finomhangolás tehát elengedhetetlen. Ha a training megfelelő érzékenységű sejtmag és jelfelismerést eredményezett, a valós vizsgálat megkezdése előtt szükséges minden a vizsgálatot érintő egyéb körülmény pontos definiálása is. Ilyenek például a kamera és a mikroszkóp (pl. tárgylencse, szűrők) végső beállításai, a képfelvétel alatt és a digitális képfeldolgozás során alkalmazandó algoritmusok, valamint a számítógép monitorán megjelenő különböző tájékoztatók, tartalmi valamint ergonómia elrendezése. Fontos megjegyezni, hogy napjaink számítógépeinek nagy teljesítménye ellenére még mindig nagy hatással van a vizsgálat sebességére a pásztázó képfelvétel során egyedi sejt szinten tárolt nyers morfometriai adatok mennyisége. A felesleges mérések elvégzése és az abból származó adatok egyedi sejt szintű tárolása a későbbi szelektív analízist is jelentős mértékben lassítja (az automatizációról és annak egyes lépéseit részletesen ld. következő alfejezetben).

Legyen az előreprogramozott vagy programozható eszköz, egy automatizált FISH kiértékelésre alkalmas rendszernek tartalmaznia kell: megbízható, homogén fényforrást, fluoreszcencia mikroszkóp esetén specifikus szűrőkészletet, megfelelő tárgylencséket, nagy felbontású kamerát és egy nagy teljesítményű számítógépet melyen egy digitális képfeldolgozásra valamint digitális sejtanalitikai vizsgálatokra alkalmas szoftver fut.

#### 1.2.3 Automatizált analízis főbb lépései és azokhoz szükséges műszerezettség

#### (1) Pásztázás, digitalizálás

A tárgylemez pásztázásához elengedhetetlen egy pontos, 3D mozgásokra (mikrométeres lépték) képes tárgyasztal, melyet a számítógép vezérel. A legtöbb munkaállomás több (8-10) tárgylemez befogadására képes, sőt, napjainkban egyre inkább elterjedni látszik az akár több 100 lemez befogadására képes ún. lemez-adagolók (slide-feeder) alkalmazása (69). Ugyan első hallásra a "minél több, annál jobb" elv látszik érvényesülni, fontos megjegyezni, hogy a gyakorlatban többszöri állásváltás gyújtópont eltolódást eredményezhet. Utóbbi annak ellenére is bekövetkezhet, hogy ún. referencia fókuszpontot minden egyes álláshoz megad a felhasználó (a folyamat további részleteit, ld. 3.4.2. alfejezet/automatizált 'kiértékelés'). A pásztázó képfelvétel során tehát fontos, hogy a felület végig fókuszban legyen, emellett azonban elengedhetetlen a megfelelő erősségű, térben és időben egyenletes fényforrás. Utóbbit a legtöbb esetben még mindig higanygőz lámpa (ún. HBO lámpa) segítségével érik el, mely viszonylag olcsó, azonban nem (vagy csak költséges nehézségek árán) képes tökéletesen homogén fényintenzitást biztosítani, továbbá élettartama is viszonylag rövid (általában 200-300 óra). További zavaró tényező, hogy viszonylag hangos, valamint működése során nagy hőt generál. Napjaink modern fényforrásai közé sorolhatók a különböző világító diódák (LED) elvére épülő technológiák, valamint egy új módszer, melynek alapja egy optikai szálakkal teli vezeték, amelyen keresztül vezetett fény kalibráció nélkül is tökéletesen homogén, időben is csupán rendkívül kismértékben ingadozó fényt biztosít (X-Cite) (70). A módszer további előnye, hogy akár 5-10x tartósabb, mint a HBO lámpák, alkalmazása során sem elektronikai zajt, sem rezgést vagy hőt nem közvetít a mikroszkóp felé, hátrányuk azonban, hogy jelenleg még viszonylag költségesek. Végül a lézer fényforrások ugyan valós monokromatikus fényt bocsátanak ki és az összes technika közül a legerősebb megvilágítást teszik lehetővé, azonban szintén költségesek, ezért leginkább csupán a nagy komplexitású mikroszkópos technikákban (pl. konfokális mikroszkópia, teljes belső visszaverődésű fluoreszcencia mikroszkópia [TIRFM]) kerülnek alkalmazásra.

A megfelelő tárgylencse kiválasztása megalkuvást igénylő döntés. A nagyobb nagyítás (60x, 100x) ugyan növelheti az érzékelés pontosságát, azonban nagymértékben lassítja tárgylemez pásztázását. Az irodalmi adatok szerint a leggyakrabban alkalmazott nagyítás a 40x, ill. a 100x; ezzel a 2 tárgylencsével készült az eddig közölt tanulmányok ~60%. A nagyítás mértékén kívül további rendkívül fontos tulajdonsága a használt tárgylencsének a

numerikus apertúra (NA). Röviden, minél nagyobb egy lencse numerikus apertúrája, annál nagyobb a fénygyűjtő képessége, következésképpen annál több, a gerjesztett fluorokróm által emittált (kibocsátott) fényt képes befogadni. A NA a felbontást is meghatározza: például egy 60x és egy 100x nagyítású tárgylencse, melyeknek azonos, 1.4 a NA-juk, ugyanolyan mértékű felbontást biztosít, utóbbi ráadásul fakóbb lesz (71).

A másik oldalon azonban a numerikus apertúra növelésével párhuzamosan csökken a mélységélesség (Depth Of Field – DOF), azaz az élességi síktól az elfogadható élesség határáig terjedő – a tárgy X,Y síkjára merőleges – Z tartomány. Ebből viszont az következik, hogy magas NA-val ugyan kiváló felbontást érhetünk el, azonban egy bizonyos szint felett elengedhetetlen a réteges mintavétel.

Az érzékelő (kamera) megválasztása szintén rendkívül fontos. Messze a legelterjedtebb eszközök a 'töltés-csatolt eszköz' (charge coupled device - CCD) kamerák. A CCD kamerák képesek analóg jelek továbbítására, s egy fényérzékeny alkotóelemmel a fény elektronikus jellé alakítására. Léteznek fekete-fehér illetve színes érzékelők is. A színes kamerák felgyorsítják a vizsgálatot, azonban mivel napjainkban egyre elterjedtebb a sokszínű FISH alkalmazása és a kereskedelmi forgalomban kapható szűrők csak korlátozott számú, spektrálisan elkülönülő hullámhosszon képesek fényt átereszteni (általában magfestés + 2 csatorna) automatizáltan állítható filterfoglalatra mindenképpen szükség van. A megfelelő kamera kiválasztása rendkívül nagy körültekintést igényel, hiszen az eszköznek számos ismérvnek kell megfelelnie. Az alábbiakban a teljesség igénye nélkül kettő, nagy gyakorlati jelentőségűt említünk ezek közül.

Az egyik legfontosabb tulajdonság, a kamera érzékenysége, vagy más néven *kvantumhatékonysága* (QE). Ez határozza meg, hogy az érzékelő foto-reaktív felületét érő fotonok hány százalékban generálnak detektálható elektronokat. A tulajdonság nagyban függ a fény hullámhosszától (lévén az nagyban befolyásolja az energiaszintet); az elméleti tökéletes százaléktól ez az érték alig marad el (akár 90% feletti) vörös tartományban, azonban kék fénynél drasztikusan lecsökkenhet. Egy másik fontos jellemző a *kiolvasási sebesség* (mértékegysége: MHz) azt határozza meg, hogy a rendszer milyen gyorsan képes az összegyűjtött elektronokat digitalizálni. Mivel FISH vizsgálatok általában (nem mindig) statikus mintára irányulnak, ez az érték lehet viszonylag alacsony, márt csak azért is, mert a kiolvasási sebesség növelésével egyenes arányban mindig nő a kiolvasott zaj mennyisége is. Ha több beállítási lehetőség van (10 MHz – 20 MHz) a FISH vizsgálat során, érdemesebb az alacsonyabb sebességet választani. E dolgozat kereteit ugyan meghaladja további tényezők részletezése, azonban megemlítendő, hogy fontos szerepe van a fentiek mellett az ún. dinamikus tartománynak (mely a kamera azon képességét határozza meg, hogy mennyire képes érzékelni a minta intenzitásbeli különbségeit), továbbá a kamera pixel mérete (mely jellemzőre általánosságban igaz, hogy minél kisebb genomiális részletet vizualizál az általunk használt DNS szonda, annál kisebb pixel méretű kamerával érdemes dolgozni (~6-10 µm).

A specifikus szűrők kiválasztása nem kevésbé kritikus mozzanat. A széles színképű gerjesztő szűrők növelik a fluoreszcens jel erősségét, hiszen ezáltal több foton gerjeszti a szonda fluorokrómjait, azonban túl széles spektrum esetén, más, nem specifikus fluorkrómok is gerjedhetnek, továbbá a túlzott foton mennyiség növeli a zajt is. További gondot jelent a túlzott foton mennyiség esetleges fakító hatása. A szűk színképű gerjesztő szűrők ugyan kis eséllyel gerjesztenek aspecifikus fluorokrómokat és a mintát sem terhelik túlzott foton mennyiséggel, azonban amennyiben a színkép túl szűk, a mintáról kibocsátott fotonok mennyisége annyira lecsökken, hogy ez már csökkentheti a jel-zaj arányt. (A kérdést gyakran nagyon nehéz megoldani és különleges esetekben az egyetlen mód, a lehető legpontosabban kiszámítani a minta fluorokróm tartalmát, hogy optimális mennyiségű (és minőségű) fotonnal tudjuk gerjeszteni azokat (71).) A gerjesztő szűrők mellett fontos az emissziós (tehát a mintáról kibocsátódó fényt megszűrő) filterek tulajdonságainak figyelembevétele is. Általánosságban igaz, hogy amennyiben eredetileg megfelelő szűrőn keresztül gerjesztettük a mintánkat, minél szélesebb színképű az emissziós szűrőnk, annál nagyobb FISH jelet tud észlelni a kamera fényérzékeny felülete. A zajra azonban itt is figyelni kell, továbbá egyes ritka esetekben a nagyon széles hullámhossz tartomány még specifikus gerjesztésnél is gyűjthet aspecifikus, más fluorokrómról származó fotonokat.

A fent említett képfakulási jelenség (photobleaching) minimalizálása érdekében fontos lehet a szűrők által a mintára engedett gerjesztő fény karakterisztikáját (pl. hullámhossz) figyelembe venni a többszörös fluorokrómal jelölt minták konszekutív, több csatornában történő pásztázásánál. A rövidebb hullámhosszú fény nagyobb energiájú, így nagyobb mértékben fakítja a mintát, ezért érdemes mindig a nagyobb hullámhosszú fluorokrómok (pl. vörös tartomány) detektálásával kezdeni az analízist és úgy haladni az egyre rövidebb hullámhossz felé (71).

#### (2) Digitalizált adatok kiértékelése

A munkaállomást irányító software a tárgyasztalon kívül vezérli a szűrőváltást, a megvilágítási (expozíciós) időt, képet tárol a vizsgálati elemekről (objektumokról), melyek galériában megjeleníthetők. Fontos, hogy a rendszer egyedi sejt szintű paramétergyűjtést végez, így a vizsgálati elemek a későbbiekben tetszőleges szempontok szerint szelektálhatók,

akár több lépcsőben is. A képek felvétele közben elengedhetetlen digitális képfeldolgozás számos digitális topológiai megoldásra épülhet. Általánosságban a FISH reakcióból származó megfelelő információ kinyerése két részre bontható: sejtmag szegmentáció és jelfelismerés (megjegyzendő, hogy egyes esetekben az első lépés akár el is hagyható). Az egyik leggyakoribb és legalapvetőbb eljárás mind magszegmentálásra mind jelészlelésre az ún. szürke szint küszöbölés (gray-level thresholding). Utóbbi esetében az egyik legalkalmasabb és általánosan alkalmazott eljárás az ún. top-hat transzformáció, mely egyfajta felületáteresztő szűrőnek tekinthető, mivel a kép nagy frekvenciás összetevőit, részleteit engedi át (72). A szegmentálás legelterjedtebb és mégis talán legbonyolultabb módszere az ún. watershed transzformáció. Ez az algoritmus a képet topológiai felületként értelmezi, ahol az egyes elemek intenzitásuk (erősségük) alapján tűnnek ki a kevésbé intenzívebb területekből. A folyamat lényege azon alapszik, hogy addig növeljük a lokális minimumok által elfoglalt területek nagyságát, míg azok össze nem érnek (73). Mivel a topológiai 'magasságot' az adott terület szürke árnyalata (erőssége) határozza meg, a legintenzívebb területek fognak kitűnni a 'tájat elöntő vízből' (innen az eljárás elnevezése). A nukleusz valamint a jelek helyes felismeréséhez számos további feltétel megléte szükséges; az elengedhetetlen morfometriai paraméterekhez tartozó méret, forma és intenzitásjellemzők paraméter-csoportokba sorolhatók.

A képfeldolgozás tekintetében a legtöbb módszer alkalmaz különféle képminőség javító algoritmusokat, melyek legfőbb célja a minőségi (kvalitatív) maszkolás, élesítés valamint háttérkorrekció és zajszűrés. Az akár több tucat képfeldolgozó algoritmus természetesen számtalan szekvenciában módosíthatja a nyers képet.

A megfelelő minőségű digitális állományok (fájl-ok) célirányos szelekciójához, az automatizált analízis eredményének esetleges manuális verifikálásához sokrétű, mégis a lehető legjobban átlátható, felhasználóbarát, több ablakot tartalmazó főpanel szükséges. Ez a monitoron megjelenő panel tartalmazza többek között a sejtek galériáját, a szelekcióhoz szükséges halmazábrákat, de emellett tartalmazhat átfogó, vagy részletesebb sematikus képet a tárgylemezről, valamint az azon érzékelt sejtes elemekről. Az automatizált mikroszkópos rendszerek, különös tekintettel a moduláris munkaállomásokra, kiterjedt paraméter beállítási lehetőséget kínálnak, melyeknek köszönhetően napjainkban az egyre fejlettebb számítógépeket is figyelembe véve a képalkotó sejtanalitika vizsgálódási lehetőségei szinte számolhatatlanok.

Az automatizált fénymikroszkópiát is magában foglaló *tárgylemez alapú képalkotósejtanalitika* napjainkra külön tudományággá nőtte ki magát.

## 1.3 Húgyhólyagrák

#### 1.3.1 Epidemiológia, klasszifikáció

A húgyhólyagrák 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 (74).

Előfordulását tekintve a húgyhólyagrák a nyugati világban a férfiak negyedik, a nők hetedik leggyakoribb rákos megbetegedése (75). Előfordulási gyakorisága nők körében lényegesen ritkább - harmada, negyede - a férfiaknál tapasztalt mértéknél; terhességen átesett nőknél a gyakoriság tovább csökken (76). 2008-ban világszerte több mint 385 000 új beteget regisztráltak, s ugyanebben az évben több mint 150 000 beteg vesztette életét húgyhólyagrák következtében. A területi eloszlás nem egyenletes, nemzetközi összehasonlításban a gyakoriság akár tizennégyszeres különbsége is tapasztalható. Leggyakrabban Európában és Észak-Amerikában fordul elő (75). Az átlag halálozási ráta 2-10 haláleset / 100.000 fő / év. A diagnózis időpontjában az átlag életkor 65-70 év (76).

A hólyagtumoroknak jól ismert és jelentős környezeti kockázati tényezői vannak, melyek között elsősorban a dohányzás említendő (77). E káros szenvedély kóroki szerepe bizonyított, 2-4x növeli a betegség kialakulásának valószínűségét; a húgyhólyagrákos betegek 30-50%-a dohányos. Érdekesség, hogy a leszokás ugyan csökkenti rizikót (a leszokástól számított 4. évtől a kockázat 30%-t, a 25. évtől pedig több mint 60%-t csökken) a soha nem dohányzók szintjét azonban többé nem fogja elérni. A második legfontosabb kockázati tényezőt a foglalkozásköri hatások jelentik, melyek – egyes számvetések szerint – az összes hólyagrák 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 hólyagrák kialakulásának valószínűségét. További emelt kockázatot jelentő foglalkozások a festő, mázoló, valamint a fodrász. Egyéb környezeti kockázati tényezőnek tekinthető az idült húgyúti fertőzés, valamint egyes tanulmányok szerint a dülmirigy tumorok kezelésénél alkalmazott sugárterápia (78). 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) húgyhólyagrákhoz. A familiáris típusú hólyagtumor viszonylag ritka (75-77), azonban az egyenesági rokonságban némileg emelkedett kockázati tényező figyelhető meg.

Az összes húgyhólyagrák több mint 90%-a ún. átmeneti sejtes karcinóma (Transitional Cell Carcinoma – TCC), 5% laphám rák és 1%-a adenokarcinóma (78). A TCC-k hisztopatológiai gradálása az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 1973 óta elfogadott klasszifikációs rendszere szerint grade 1-3, ahol a fokozat a differenciáltságra, a daganatszövet sejtdússágára ill. a mitózis számára utal. Ezt a rendszert változtatta meg a WHO és az International Society of Urological Pathology (ISUP) megegyezéses, 1998-ban elfogadott klasszifikációja, melyet végül 2004-ben kismértékben újból változattak. A legfrissebb dokumentum a húgyhólyagdaganatokat négy fő csoportba osztja: papilloma, papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (PULMP), low grade carcinoma és high grade carcinoma (79). Ezt a klasszifikációt azonban számos kritika érte, többek között: (i) a korábbiakhoz képest nem eredményezett lényegi javulást, különös tekintettel a reprodukálhatóság tekintetében az alacsony grádusú tumoroknál (80-81), (ii) invazív tumorok esetében prognosztikai használhatósága a besorolásnak csekély (82). Mi több, nemrégen a Nemzetközi Húgyhólyagrák Csoport (IBCG) hivatalos ajánlásában előirányozza, hogy mind az 1973 mind az 1998 klasszifikáció maradjon érvényben és használatban, amíg a későbbi besorolással kapcsolatban nem készülnek nagy kiterjedésű klinikai hatékonyság hitelesítő (validációs) vizsgálatok (78). Mindezen körülményeket figyelembe véve vizsgálataink során – melyeket 2005-ben kezdtünk meg - elsősorban az eredeti (és a mai napig legelterjedtebb) G1-3 grádus beosztást alkalmaztuk (lásd 'Anyag és módszer' fejezet). A hólyagtumorok kórszövettani stádiumbeosztása továbbra is a TNM (Tumor-Node-Metastasis system) beosztást követi (2. ábra, 1 táblázat).



**2.** *Ábra:* A különböző stádiumú húgyhólyagtumorok elhelyezkedése a hólyag falában

рТа	Non invazív papillaris carcinoma
pTis	Carcinoma in situ (lapos tumor)
pT1	A tumor átterjedt a subepithelialis kötőszövetre
pT2	A tumor infiltrálja az izomszövetet
pT2a	A tumor infiltrálja a (belső) felületes izomréteget
pT2b	A tumor infiltrálja a (külső) mély izomréteget
pT3	A perivesicalis (zsír)szöveteket is infiltrálja a tumor
pT3a	Mikroszkópos perivesicalis tumoros infiltráció
pT3b	Makroszkópos perivesicalis tumoros infiltráció
pT4	A prosztatára, vesicula seminalisokra, nőknél vaginára, uterusra, mindkét nemnél a hasfalra, illetve medencefalra terjedő tumor
pT4a	A tumor a prostatára, vaginára, uterusra terjed
pT4b	A tumor a medencefalra, hasfalra terjed

1. táblázat: Húgyhólyagtumorok egyes stádiumainak meghatározása

Az összes átmeneti sejtes karcinóma ~70%-a ún. szuperficiális vagy felületes 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 előrevetíteni, hogy mely betegeknél fog a felületes 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 progressziómentes 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%. Mindez arra is enged következtetni, hogy a lamina propria inváziója szintén meghatározó jelentőségű prognosztikai tényező lehet.

Klinikai megjelenés és tünet tekintetében elmondható, hogy a hólyagrákok elsődleges - a betegek ~ 85%-át érintő - tünete a makro-, vagy mikroszkópos vérvizelés, mely azonban általában fájdalommentes és gyakran csupán időszakosan jelentkezik. Fontos azonban megjegyezni, hogy a vérvizelés okaként az esetek csupán alig több mint 10%-ában állapítható meg húgyhólyagrák (78, 83). További – kevésbé gyakori – tünetek a fájdalmas, gyakori nehéz vizelés, vesetáji fájdalom, láz vagy vizelethiány (anúria) (84).

#### 1.3.2 Diagnosztika

Húgyhólyagrák gyanúja esetén a rutin kivizsgálás napjainkban még mindig az ürített vizelet citológia, cisztoszkópia, valamint a felső húgyutak radiológiai vizsgálatát jelenti. Magas szenzitivitású/specificitású, minél olcsóbb és egyszerűbb diagnosztikára nem csak új betegség felismerésénél, hanem a monitorizálásnál is szükség van. Mind a cisztoszkópos klinikai vizsgálat, mind a citológia számos előnnyel bír, azonban e módszerek hátrányai szintén jól ismertek és 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 - annak ellenére, hogy az elmúlt években számos technikai újításon esett át (77, 85) - a módszer továbbra is invazív beavatkozásnak számít, mely egyes esetekben helyi traumák okozta szövődményekkel, 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 számolások szerint a legtöbb pénzt felemésztő malignus tumor (86).

A vizeletcitológia nagy előnye, hogy a beteg szemszögéből a vizsgálat különösebb előkészületet nem igényel, továbbá nincs szükség különleges eszközökre. A specificitás összességében magas; irodalmi adatok nemegyszer 100%-ról számolnak be, így álpozitív diagnózis csak ritkán fordul elő (86-87). 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% (86). További gyakran emlegetett hátránya a módszernek, hogy a diagnózis pontossága nagyban függ a citopatológus képességeitől, tapasztalatától (85-86).

#### Szolúbilis és sejtalapú tumor markerek

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: sejt alapú, ill. szolúbilis markerek.

#### Szolúbilis markerek

<u>- Vérvizelésen alapuló vizsgálatok:</u> A makro-, illetve mikroszkópos vérvizelés a hólyagrák legáltalánosabb, az esetek 85%-ban elforduló tünete. Diagnosztikai szerepe a vörösvértestek számának illetve a vizelet hemoglobin tartalmának van. Ezek a tesztek olcsók, viszonylag magas szenzitivitásúak, azonban specificitásuk alacsony.

<u>- BTA stat, BTA-TRAK:</u> Ezek a tesztek a hólyagtumorok által okozott, bazális membrán valamint az alatta elterülő mátrix szekretálta humán komplementer faktor-H szintjét mérik vizeletben.

<u>- Nuclear Matrix Protein (NMP-22):</u> Az NMP-22 mitotikus fehérje, mely a sejtosztódás során a kromatin lánysejtekben történő elosztásában játszik fontos szerepet. Egészséges egyének vizeletében viszonylag alacsony szinten mutatható ki, azonban hólyagtumoros betegeknél a normál érték akár huszonötszöröse is mérhető. Hátránya, hogy emelkedett sejthalál esetén szintén magas összérték mérhető.

<u>- BCL-4:</u> Transzkripciós faktor mely ugyan megtalálható a betegek hólyagjának tumoros és tumormentes régiójában is, azonban egészséges egyéneknél nem kimutatható. A módszer szenzitivitása és specificitása is magas.

<u>- Survivin:</u> Antiapoptotikus fehérje, szenzitivitása 64 és 100% között változik, míg specificitása 78-100% (85).

<u>- Citokeratinok (UBC, CYFRA 21-1):</u> ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) alapú tesztek, melyek kombinációban detektálják a citokeratin (CK) 8, 18 és 19-es fragmenteket. Mind specificitásuk mind szenzitivitásuk viszonylag alacsony (főleg előbbi), így alkalmazhatóságuk korlátozott.

<u>- HA-HAase Tests:</u> Hialuronsav és Hialuronidáz kimutatására szolgáló, szintén ELISA alapú vizsgálat. Szenzitivitása magas (83-94%), még alacsony stádiumú és grádusú tumorok esetén is, míg specificitása valamivel alacsonyabb (~80%).

#### Sejt alapú markerek

<u>- Mikroszatellita Analízis:</u> Mikroszatellita instabilitás valamint heterozigótaság vesztése vizsgálható ezzel a módszerrel. Az eljárás lényege, hogy lesodródott daganat sejtek DNS-ét izolálják, majd PCR reakcióval mutatják ki az elváltozásokat. Irodalmi adatok szerint mind specificitása mind szenzitivitása viszonylag magas ezeknek a módszereknek, azonban hátrányuk, hogy a megfelelő érzékenység érdekében szükséges magas számú marker (legalább 15-20) miatt rendkívül költséges.

<u>- Telomeráz</u>: Szintén PCR alapú eljárás mely során a telomeráz enzimet mutatják ki. Érzékenysége 70 és 90% között mozog, specificitása alacsonyabb (60-70%), gondot okoz viszont, hogy gyulladásos körülmények tovább növelhetik az álpozitivitást.

<u>- uCyt</u>: A leggyakrabban használt immuncitokémiai teszt mely a hólyag daganatsejtek felszínén található szulfatált mucin glikoproteineket valamint karcioembrionális antigént mutatja ki. Szenzitivitása nagy variabilitást mutat (38-100%), specificitása 75 és 90% között változik.

<u>- DD23</u>: Monoklonális antitest mely daganatsejtek felszínén levő protein dimerek kimutatására alkalmas. Szenzitivitása viszonylag magas (70-80%), specificitása azonban ettől elmarad (~60%).

<u>- Quanticyt Nukleáris Kariometria</u>: Automatizált mennyiségi kariometrikus citológiai eljárás, mely lehetővé teszi a különböző nukleáris alaktani illetve DNS tartalomra vonatkozó jellemzők tárgyilagos vizsgálatát. Szenzitivitása mindössze 59 és 69% között változik, míg specificitása sem túl magas, ~ 70%.

<u>- Urovysion</u>: Az elmúlt évek egyik legígéretesebb, sejtalapú, non-invazív húgyhólyag diagnosztikai módszere, mely a molekuláris citogenetika módszerével daganatra jellemző kromoszómális rendellenességek kimutatását teszi lehetővé ürített vizeletben (részletesebben lásd '*FISH szerepe a hólyagdaganatok diagnosztizálásában*').

#### 1.3.3 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 vesztése gyakran jelentkezik (~50%) (88). A 9-es kromoszómához kapcsolódó vesztések gyakorisága arra enged következtetni, hogy ezek az eltérések a patogenezis korai eseményei, azonban egységes álláspont e tekintetben sincs (89). A 9p deléció gyakran érinti a CDKN2A/ARF (P16) tumorszupresszor kódoló régiót, sőt ez a rendellenesség (del9p21) tekinthető a leggyakoribbnak a hólyag tumoroknál (90). Érdekesség azonban, hogy a CDKN2A gént érintő 9p21 deléció egyes esetekben normál uroteliumban is előfordul, alátámasztva a feltételezést, hogy számos egymást követő genetikai károsodás következik be mire a tumor klinikailag detektálhatóvá válik (91). További ismert jelentősebb deléció a 10q, mely a PTEN/MMAC1 tumorszupresszor útvonalat érintheti (92), valamint a del (17p), mely TP53 fehérje funkcióvesztést eredményezhet. Utóbbi – egyes munkák tanúsága szerint - összefügg a tumor differenciáltságával valamint a stádiumbeosztással is (93, 94). A hólyagtumor citogenetikai heterogenitását mutatja az az ellentmondás is, miszerint, míg egyes tanulmányok az Y kromoszóma vesztéséről – ráadásul, mint önálló patognómikus abnormalitás -, addig mások ugyanezen kromoszóma poliszómiájáról számolnak be, mi több, utóbbi emelkedett grádussal és stádiummal asszociált mivoltát is bizonyítottnak látják (95). Számos további számbeli kromoszómális rendellenesség ismert, melyek jelentős része nyerés, azaz valamilyen mértékű poliszómia. Ilyen természetellenes mintázatot mutathatnak többek között az 1, 7, 9, 11, 15, 17, 18 kromoszómák (96).

#### 1.3.4 FISH 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 mitótikus 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 (1993) javasolták a több kromoszóma eltérés egyidejű analízisét (97). Számos próbálkozást követően végül is közel 2 évtized múlva 2000-ben Sokolova és mtsi (98) 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 legérintettebb 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, lókusz 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) tumorszupresszorként funkcionáló fehérjét kódol (3. ábra).



(magyarázatot ld. következő /30./ oldalon)



**3.** *Ábra:* Urovysion FISH készlet: Az 'A' ábra mutatja a készletben a 4 szondát, idiogrammon ábrázolva a pontos elhelyezkedést valamint sematikusan a szondákhoz kötött fluorokrómok színeit. A 'B', 'C' és'D' képek sejtvonalból származó tumoros, egészséges sejtből származó normál diploid valamint beteganyagból származó szintén tumoros mintázatot bemutató reprezentatív sejtmagok.

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 ≥12 sejtet melyben megvalósul a 9p21 biallelikus vesztése. 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 (99), majd 2005-ben újból, ismert hólyag tumoros múlttal nem rendelkező, makro-, vagy mikrohematúriával jelentkező betegek vizsgálatára (100). 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% (101). 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% (102-111); 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 közét 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 (111-115).

# 2 Célkitűzés

A vizeletcitológiai preparátumokon végzett sokszondás fluoreszcencia in situ hibridizációval kapcsolatban számos kritika merül fel az irodalomban. Ezek közül az egyik az analizálandó sejtek objektív definíciójának hiánya (115). A jelenlegi célsejt ('target') meghatározás DAPI asszociált mag-morfológiára hagyatkozik, azonban az ürített vizeletre gyakran jellemző, hogy (i) degeneratív elváltozásokkal terhelt, (ii) az uroteliális sejteken kívül nagy mennyiségben tartalmaz egyéb alakokat (pl. gyulladásos sejtek, laphám) (115-116); továbbá, egy tumoros sejtmag alaki megjelenésében (főleg korai szakaszokban) nem feltétlenül nyilvánul meg a már jelen levő genotípusos elváltozás (117) (4. ábra).



**4.** Ábra: DAPI morfológia (objektív: 63x). Az 'A' és 'B' jelzésű képek a hólyagtumorsejteket jellemző nagy alaki változatosságot szemléltetik; a DAPI festés alapján rendkívül eltérő méretű, morfológiájú magok (fehér nyíl) mindegyike aberráns poliszómiás mintázatot mutat sokszondás fluoreszcens in situ hibridizáció alapján.

Következésképpen a minták pásztázása fluoreszcens fénynél a vizeletcitológiához hasonló tévedésekre adhat lehetőséget, ezen túl időigényes és fáradságos (118).

Mindezért célul tűztük ki egy olyan módszer kidolgozását, mely során a genotípizálás az uroepiteliális sejtek fenotipizálását követően, azt figyelembe véve, célirányosan valósul meg.

I. Elsődleges vizsgálataink során célunk volt a lehető leghatékonyabb konszekutív feno- és genotipizálás kidolgozása kontroll körülmények között, ezen belül:

- a fenotipikus szelekció mind magasabb mértékű automatizációjának kidolgozása

- a fenotipizálás valamint a konszekutív manuális genotipizálás analitikai hatékonyságának megállapítása

- a kombinált módszer, tehát az egymást követő feno- és genotípizálás együttes analitikai hatékonyságának megállapítása.

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

II/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 pozitivitás százalékos arányát is figyelembe vevő kiértékelési séma bevezetésének klasszifikációs jelentősége lehet (119-121). 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 pozitivitással konvencionális (önálló) valamint a célzott-FISH kiértékelésénél.

III. A rutin 2 dimenziós 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 pozitivitásnál a

vizsgálódó elfogulttá válhat, mely végső soron a pozitivitás alul vagy felül becslését okozhatja (iii) személyek, ill. laboratóriumok közötti variabilitás komolyan akadályozhatja az eredmények összevethetőségét (57, 123). 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 fáradságos 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 - lókusz 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 megállapítatását, valamint az esetleges korlátozó tényezők, ill. fejlődési pontok feltérképezését.

## 3 Anyagok és módszerek

### 3.1 Minták

#### 3.1.1 Kontroll minták

#### Negatív kontroll

Vizsgálataink során végzett kísérleteknél negatív kontrollként humán perifériás vért, valamint egészséges humán vizeletet használtunk. A perifériás vért egészséges személyektől vettük, feldolgozásuk során a mononukleáris alakokat Ficollozással nyertük ki. A kontrollként használt vizeletet szintén egészséges személyektől vettük; a vizelet feldolgozását, ld. lent. A kontrol vér és vizeletmintákat tájékoztatáson alapuló beleegyezés után vettük.

#### Pozitív kontroll

A kísérletek során humán hólyagtumor sejtvonalat alkalmaztunk. A HT-1376 jelzésű sejtvonal számos vesztést és nyerést hordozó pentaploid kariotípussal bír; hordozza az általunk vizsgált eltérések mindegyekét, beleértve a del(9)(p21) –et. Fenotípusát tekintve, többek között citokeratin-7, -17, -18 pozitív (124).

#### 3.1.2 Klinikai minták

Tanulmányunkba 73 betegtől származó vizelet mintát vezettünk be; 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 kórmeghatározás a fent vázolt okok miatt elsősorban az 1973 WHO osztályozásnak megfelelően történt; a vizelet sejttani vizsgálatát nemzetközileg elfogadott citopatológiai irányvonalak mentén végeztük (125). Mintavétel előtt minden beteg beleegyező nyilatkozatot írt alá. Tanulmányainkat az 1975-ben elfogadott Helsinki Bioetikai Deklaráció, élő emberen valamint az azonosítható emberi anyaggal vagy emberi adatokkal végzett kutatásokra vonatkozó rendelkezései szerint végeztük.

Tíz beteg mintáját technikai okok miatt ki kellett zárni az vizsgálatból; a manuálisan kiértékelt célzott- és önálló-FISH, valamint az automatizáltan kiértékelt önálló-FISH

vizsgálatokhoz végső soron 42 valamint 21 betegen tudtuk a vizsgálatokat átfogóan elvégezni (a különböző módszerek részletes leírását lásd 3.4.2. alfejezetben).

#### 3.1.3 Citológiai preparátumok

Klinikai vizsgálódásainkhoz bizonyítottan hólyagtumoros betegek reggeli (beavatkozás előtti, középsugár) vizeletéből készítettünk citológiai preparátumokat a következők szerint. Vizeletvétel előtti napon a betegek 500 mg C-vitamint kaptak, ezzel biztosítottunk optimális savas pH-t (5.5) a lesodródott sejtek számára, melyek ezáltal könnyebben őrizték meg eredeti morfológiájukat (125). Az átlagosan 50 ml (30-150 ml) vizeletet lecentrifugáltuk (1500 rpm, 10 perc) majd az üledékhez 75 mmol-os hipotóniás KCl oldatot adtunk (10 perc), újabb centrifugálást követően (1500 rpm, 10 perc) az üledéket 70%-os alkoholban tároltuk (-20°C). Az etanol fixált sejteket tárgylemezre helyeztük. A centrifugálás (Andreas Hettich GmbH&Co.KG, Tuttlingen, Germany) során tárgylemezre erősíthető 3 férőhelyes sejtkamrákat alkalmaztunk kicseppentés helyett. Erre egyrészt azért volt szükség, mert így egy jól meghatározott területen helyezkedtek el a sejtek, másrészt ily módon egy lemezre 3 minta is elfért. A sejtkamrák űrtartalma 1,5 ml volt; a sejtsűrűség akkor volt ideálisnak tekinthető, ha 10x tárgylencsénél látómezőnként 100-150 sejtet láttunk.

#### 3.1.4 Analitikai hatékonyságvizsgálat

Az egyes módszerek *analitikai hatékonyságát* (szenzitivitás; specificitás) valamint a diagnosztikus határértékeket a fent említett 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.

## 3.2 Kettős üzemmódú pásztázó fénymikroszkópia (PFM)

Sejtanalitikai vizsgálódásaink során minden esetben egy multifunkcionális automatizált mikroszkópos munkaállomást használtunk. Az eszköz egy kettős üzemmódú, különböző bővítmények által megtámogatott, így automatizálható fénymikroszkóp, mely mind hagyományos transzmissziós, mind fluoreszcencia üzemmódban használható. Maga a
mikroszkóp egy Zeiss Axioplan-MOT II. (Zeiss, Germany) típusú készülék, mely bővítményként tartalmaz még egy Merzhauser típusú nyolc tárgylemez befogadására alkalmas motorizált tárgyasztalt, továbbá egy szintén motorizált revolver szűrőfoglalatot mely nyolc szűrő befogadására 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 - többek között - digitális képrögzítésre és –feldolgozásra, valamint a hatalmas mennyiségű gyűjthető alaktani adatnak köszönhetően bonyolult sejtanalitikai mérésekre is. A rendszer egyik 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.

# 3.3 Fél-automatizált fenotipizálás (célsejtek meghatározása, targeting)

#### 3.3.1 Kromogén immuncitokémia (c-ICC)

Az uroteliális eredetű sejtek fenotípizálásához citokeratin-7 (CK-7) ellen termeltetett monoklonális antitestet használtunk. Azért döntöttünk CK-7 alkalmazása mellett, mert ez az alacsony mólsúlyú keratin az urotelium összes rétegében jól expresszálódik, csakúgy, mint az ezekből a sejtekből kialakuló neopláziákban (126-129); ezzel ellentétben, laphám sejtekben valamint gyulladásos sejtekben nem vált ki vizualizálható reakciót (5. ábra).

A preparátumokon az immuncitokémiai eljárást a következőképen végeztük. A kuktával végzett feltárás során a lemezeket citrát pufferbe helyeztük (0,01 mól/liter, pH 6.0, 120 bár). Ezt követően az endogén peroxid gátlást 3% hidrogén peroxiddal (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) végeztük vizes közegben (15', szobahőmérsékleten), majd 3x3' dH<sub>2</sub>O mosást követően az aspecifikus kötőhelyeket TNB pufferrel blokkoltuk (15-20', szobahőmérsékleten) majd ezt követően a mintákat egérben termeltetett jelöletlen CK-7 antitest (DAKO, Dánia) jelenlétében 90' inkubáltuk (37°C). PBS mosást követően, az antitesthez En-vision dextrán gerincen elhelyezkedő másodlagos antitestekkel inkubáltuk (30', szobahőmérsékleten), majd újabb PBS mosást követően 3-Amino-9-Ethylcarbazole segítségével vizualizáltuk (Vector Laboratories, USA). Végül, a sejteket rövid, 1 perces hematoxilin festésnek vetettük alá.



<u>5. Ábra: Hólyagsejtek CK-7 jelölődése:</u> Az 'A' jelzésű ábra mutatja, hogy a húgyhólyag falának minden rétege citokeratin-7 pozitív, csakúgy, mint a 'B' képen látható hólyagtumorból származó sejtvonalsejtek (HT1376 sejtvonal)

## 3.3.2 Automatizált kromogén immunfenotipizálás: PFM - transzmissziós üzemmód

A CK-7 és hematoxilin jelölt mintákat normál fénymikroszkópos üzemmódban, automatizált pásztázással fényképeztük (a továbbiakban: 'scanneltük' vagy '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 (counterstain object threshold) 12%, legkisebb magterület (minimum object area) 20 µm<sup>2</sup>, legnagyobb magterület (maximum object area) 1000 µm<sup>2</sup>, legnagyobb konkavitás mélység (maximum concavity depth) 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 oszlopdiagram segítségével történt. A szelekciós határértékeket 28000 negatív valamint 71000 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 abszcissza tengelyen felvett ún. tetszőleges festődési érték (arbitrary staining unit, asu) függvényében jelenítettük meg az egyes – kontroll típustól függő – hamis ('ál', fals) eseményeket.



**6.** *Ábra:* CK-7 jelölődés alapján történő célsejtmeghatározás kettős (teljes [A] és átlagos festődési [B] erősség) feltétel alapján.

Mivel kettő tulajdonság (sejtkontúron belüli teljes jelerősség [TIc], valamint sejtkontúron belüli átlagos jelerősség [MIc]) alapján próbáltuk elkülöníteni a sejteket, végeredményben kettő darab, két-két görbét ábrázoló függvényábrát kaptunk (6. ábra). 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' (7. ábra).



7. ábra: Az automatizált sejtanalitikai vizsgálathoz használt alapvető vezérlő (Metafer) főpaneljának részlete. A kép a CK-7 immunjelölődés alapján történő kettős feltétel szerinti (TIc, MIc) kapuzást mutatja be beteganyagon, reprezentatív módon. A sejtgaléria zöld keretes elemei kerültek kizárásra félа automatizált szelekciós folyamat következményeként. A galériában látható sejtek valós elemeket ábrázolnak; piros а színezettség csupán mesterségesen hozzárendelt, azonban közvetlenül a kromogén festődést reprezentálja mind mennyiségi, mind minőségi szempontból. A szelekció során minden egyes elem pontos (x, y, z)koordinátája rögzítésre került.

# 3.4 Előszelektált sejtek genotipizálása

# 3.4.1 FISH jelölés

Csakúgy, mint az önálló-genotípizáláshoz 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 (30 perc, szobahőmérsékleten) a mintákat 0,01% pepszinben emésztettük (10', 37°C, pH=2.0), PBS-ben mostuk (3x4 perc, szobahőmérsékleten, utó-fixáltuk 4% formalinban (10 perc, 4°C), újra mostuk PBS-ben (3x4 perc, szobahőmérsékleten). Ezek után a mintákat felszálló alkoholsorban (70-90-100%, 4 - 4 perc) szobahőmérsékleten dehidráltuk, majd légszárítottuk (30 perc, szobahőmérsékleten). A denaturációt 3 µl szondakészlet (Urovysion) jelenlétében végeztük (mely tehát tartalmazta mind a 3 CEP- valamit, a 9p21 szondát) (5 perc, 85°C), majd ezt követően a hibridizációhoz a mintákat nedves kamrában, éjszakán át inkubáltuk (37°C).

A poszthibridizációs mosásokhoz először 50% formamid / 2X SSC-t (saline-sodium citrate) (3x5 perc, 42°C) alkalmaztunk majd 2 x SSC (2x7 perc, 42°C). A lefedéshez Vectashield médiumot használtunk, mely a magfestés céljából 0,2 μg/ml koncentrációban 4,6-diamidine, 2-phenylindole dihydrochloride-t (DAPI) tartalmazott; a preparátumokat fedőlemezzel lefedtük a felesleges fedőoldatot eltávolítottuk.

## 3.4.2 Jelmintázat kiértékelése: PFM – fluoreszcencia üzemmód

### Manuális kiértékelés

Összehasonlító manuális vizsgálataink során az célzott-FISH-t (egymást követő feno- és genotípizálás) hasonlítottuk össze az önálló-Urovysion vizsgálattal. A minták kiértékelése mindkét esetben alapvetően 3 fő részre osztható (8. ábra).

(1) A célsejtek meghatározása: a) amikor önálló-FISH-t alkalmaztunk, a célsejtek meghatározását a gyártó ajánlásának megfelelően DAPI magmorfológia alapján végeztük. Ennek értelmében minden olyan sejtnek rögzítettük a mintázatát, mely "gyanús morfológiát" mutatott, mint pl. foltos, felhős DAPI festődés, szabálytalan körvonal, nagy méret. b) ezzel szemben, amikor célzott-FISH-t alkalmaztunk, kizárólag azokat a sejteket vizsgáltuk melyekről korábban bebizonyosodott, hogy citokeratin-7 pozitívak.



8. Ábra: Folyamatábra a célzott-FISH, önálló-FISH valamint a hagyományos illetve statisztikai kiértékelést magába foglaló összehasonlító klinikai vizsgálatokról

(2) A mintázat értékelése: a célsejtek meghatározásának módjától függetlenül a pozitív-sejt definíció mindig ugyanaz volt és a legelfogadottabb ajánlásnak felelt meg. Ennek értelmében az a sejt volt pozitívnak tekinthető, amelyre igaz volt, hogy 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 pozitívnak, 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 elveszítették a 9 kromoszóma p21 lókuszát. 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 bináris, azaz pozitív/negatív jellegű, a pozitív sejtek arányának semmilyen jelentősége nincs; tehát az eredmény szempontjából közömbös, hogy a diagnosztikus határértéket (4db sejt) 25 vagy 1000 sejt vizsgálatával értük el (130). b) a statisztikai megfontolásokon alapuló értelmezés esetében egy mintának két lokálisan meghatározott feltételnek kellett megfelelnie, ahhoz, hogy a vizsgáló pozitívnak 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; utóbbi valójában 0,6%-nak adódott, de statisztikai szigorúság miatt 1%-ra módosítottuk.

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, afelett pedig a negatívokét) számszerűen elkülöníteni a többségi csoporttól. Az alkalmazott algoritmus a binomiális eloszlás egyoldalú hipotézis vizsgálatán alapult (131) és az analitikai szenzitivitás függvényében határozta meg azt a legkisebb mintaszámot, amelynél a kiértékelés során kapott FISH pozitivitás minimum 95% megbízhatósággal adható meg (9. ábra). Egy mintát akkor tekintettünk pozitívnak, 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).



Változó pozitivitásoknál szükséges minimum mintaszám, az önálló-genotipizálás 95,9% analitikai szenzitivitásnál

Változó pozitivitásoknál szükséges minimum mintaszám, a célzott-genotipizálás 93,3% analitikai szenzitivitásnál



9. Ábra: Binomiális eloszlás egyoldalú hipotézis vizsgálatán alapuló mintaszámmeghatározás. Az alkalmazott algoritmus -  $N = [Z_{\alpha}(p_0(1-p_o))^{-1/2} Z_{\beta}(p_a(1-p_a))^{-1/2} / p_0-p_a]^2 - az$  Amerikai Orvosgenetikai Kollégium ajánlása minorpopulációk meghatározásához szükséges legkisebb mintaméret(N) meghatározásához. A képlet további elemei:  $Z_{\alpha}=az$  elsőfajú hiba kritikus értéke az adott a szignifikancia szinten (értéke:1,645),  $Z_{\beta}=a$  másodfajú hiba kritikus értéke az adott  $\beta$  szignifikancia szinten (értéke:2,330),  $p_o=$  analitikai szenzitivitás (értéke: 0-1),  $p_a=$ a majorfrakció aránya (értéke: 0-1)

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

Paraméter beállítás, optimalizálás: Az automatizált FISH mintázat kiértékelés minden esetben az előre kijelölt terület összes látómezejének digitális rögzítésével, tehát az automatikus pásztázással indult. Első lépésként kijelöltük a pásztázandó terület sarokpontjait valamint egy referencia ablakot. Utóbbi egy általunk optimálisnak ítélt területet tartalmazott, mely a továbbiakban a tér mindhárom kiterjedésében x, y és z irányokban, mint abszolút viszonyítási alap szolgált (tehát fókuszpontként is). A referencia ablak ezen túlmenően közvetlen módon befolyásolta a teljes későbbi pásztázási folyamatra vonatkozó fénybeállítást valamint ebből következően CCD kamera integrációs idejét (amennyiben utóbbi minden egyes látómező esetébe automatikusan kerül meghatározásra). Mindebből következik, hogy a megfelelő viszonyítási kép beállítása kritikus a zavartalan és hatékony pásztázó-képfelvételhez.

Ezt követően két alkalommal történt automatizált fókuszálás. Az első, ún. 'grid' vagy rácsos fókuszálás a pásztázás kezdetekor történt. A folyamat során – mely egy speciális autofókusz algoritmusra épül – a rendszer egy virtuális szabályos rácsokból álló térhálót helyez a korábban kijelölt vizsgálandó területre. Utóbbi rács-, azaz fókuszpontjait x, y irányban egymástól 1000 µm távolságra állítottuk be, mely pontokon z (mélységi) irányban összesen 9, egymástól 1,75 µm távolságra levő képsík elemzésével történt az automatizált éleskép állítás. Miután a kijelölt terület minden rácspontján lezajlott a folyamat, a rendszer az optimális fókuszsíkot a terület összes látómezőjére intrapolálta. A második, ún. finom fókuszálás 7, egymástól 1 µm távolságra levő fókuszsíkon történt, így összességében a magok vertikálisan mintegy 19 µm mélységben kerültek kivizsgálásra.

A digitális látómezők 40x tárgylencsével kerültek felvételre, az expozíciós idő automatikusra, de felülről korlátosra volt állítva. Ennek értelmében a megvilágítás addig tartott, amíg a látómező egy meghatározott százaléka (pixelmennyisége) nem érte el a teljes szaturációt (telítődést) és/vagy az eltelt idő felső maximumát, tehát DAPI csatorna esetében az 1,00 másodperces, a különböző jelcsatornáknál pedig a 2,00 másodperces határt. A szaturációra vonatkozó maximum, DAPI csatornában 4  $\mu$ m<sup>2</sup>, jelcsatornákban pedig 1  $\mu$ m<sup>2</sup> volt.

A DAPI csatornában a képeket 1db éles képsíkban rögzítettük, míg a különböző jelcsatornákban 5 képsík képének összegzése került analizálásra. Utóbbi során – melynek köszönhetően a vizsgálódás 3D hatásúnak mondható - az egyes síkok közötti Z távolság 0,5 µm volt. Végeredményben a rendszer a külön síkokban rögzített egyes képeken összesített digitális képként jelenítette meg a sejtmagokat. A kameraerősítés (camera gain - rögzített elektronok száma / digitális kép 1 egysége) viszonylag alacsony értékre, 2,0-re volt állítva, hogy csökkentsük az elektronikus zajt.

<u>Training – a rendszer betanítása:</u> A rendszer "betanítása" ürített vizeletből készített átlagos minőségű preparátum (tárgylemez) felületes pásztázásával kezdődött. Az így nyert digitális gyakorló (training) mezőkön három, egymással szorosan összefüggő lépés jelentette a rendszer "betanítását": klasszifikáció, tesztelés és optimalizáció.



10. Ábra: Reprezentatív kép mely az automatizált jelfelismeréshez szükséges 'betanítási' folyamatot mutatja be. A zöld körök a 'betanítást végző' által valósnak tekinthető vizsgálati elemeket tartalmazza, míg pirossal a betanítási folyamatból kizárandókat jelöltük. A zöld körök szélén látható számok a humán vizsgáló által vélt FISH szignálszámokat jelölik. A vizsgálónak mind a vizsgálati elemekre, mind azok jelszámára vonatkozó osztályozása, a későbbiekben a rendszer számára, mint abszolút referencia fog szerepelni.

A klasszifikáció a sejtmagok DAPI csatornában történő manuális meghatározásával kezdődött (10. ábra); a gépi magfelismerés későbbi tesztelései során e klasszifikáció asszociálta beállítások szolgáltak referenciaként. A magszegmentációs paraméterek a kromogén fenotipikus előszelekcióhoz hasonlóan következőek voltak: DAPI csatornához társított szürke-szint küszöbölési érték, legkisebb és legnagyobb magterület, legnagyobb konkavitás mélység, valamint a legrövidebb és leghosszabb átló aránya (2. Táblázat). A paramétereket addig állítottuk, amíg a detektálás hatékonysága nem volt optimális. A FISH szignálok észlelését a négy jelcsatornában külön-külön optimalizáltuk. A jelészlelés alapvető paraméterei a következőek voltak: legnagyobb jelméret, legkisebb jeltávolság, legkisebb viszonylagos jelerősség (1. Táblázat).

Magszegmentáció (Cell Selection)						
Jellemező	Meghatározás			égső, opti értél	malizált k	
DAPI csatornához társított szürke- szint küszöbölési érték (%) (counterstain object threshold)	A magszegmentáció során alkalmazott magfestés asszociálta szürke- szintet határozza meg; százalékos érték, mely a háttérfestés csatornájában felvett digitális kép szürke-árnyalatának teljes spektrumán alapul.			16		
Legkisebb vizsgálati elem terület (µm <sup>2</sup> ) (minimum object area)	Az a legkisebb vizsgálati elem terület négyzetmikrométerben kifejezve, melyet a rendszer még elfogad.			33		
Legnagyobb vizsgálati elem terület (µm <sup>2</sup> ) (maximum object area)	Az a legnagyobb vizsgálati elem terület négyzetmikrométerben kifejezve, melyet a rendszer még elfogad.			500	)	
Legnagyobb konkavitás mélység (Maximum concavity depth)	b , A különálló sejtek összetapadtaktól való elkülönítését szolgáló kiterjesztés nélküli mutató, mely a sejtmag átmérőjéhez van viszonyítva (d/konkavitás).			0.35	5	
Legrövidebb és leghosszabb átló aránya (maximum aspect ratio)				2.240		
Jelfelismerés (spot counting)						
Jellemező	Meghatározás Végső.				, optimalizált érték	
	CEP CE 3 7		CEP 7	CEP 17	LSI 9p21	

Jelméret (µm <sup>2</sup> ) (Spot measurement area)	Azt a legnagyobb jelméretet határozza meg négyzetmikroméretben, melyet még elfogad a rendszer, mint valós, egyedülálló szignál.	37	37	18	13	
Legkisebb jeltávolság (Minimum distance) (µm)	Azt a legkisebb jelek közötti távolságot határozza meg mikroméretben, mely felett a rendszer különálló jelként kezel 2 fluoreszcens szignált.	16	16	15	17	
Legkisebb viszonylagos jelerősség (%) Minimum spot relative intensity	A sejtmagon belüli legfényesebb területhez viszonyított legkisebb jelerősséget határozza meg százalékban kifejezve.	32	32	37	46	
	előzetes képfeldolgozás (image processing)					
Jellemező	Meghatározás					
Háttérkorrekció (SBHistoMax) (Background Correction)	Átfogó háttérkorrekció mely a digitális kép minden pontján azonos mértékben csökkenti a háttérintenzitást.					
Magfestés maszkolás (Counterstain Mask, 'ApplyMask')	Eltávolítja a digitális kép sejtmag határvonalán kívül található területeit.					
utólagos képfeldolgozás (image processing)						
Jellemező	Meghatározás					
Szürke-szint növelés (Gray Level Enhancement [AddImage/x/])	Meghatározható mértékben [X] növeli a digitális kép minden pixelének szürke-szintjét. A túl nagy értékek egy felső korláthoz igazodnak [X=10]					
Top Hat Transzformáció (SBTopHat R,S])	Top hat transzformáció alkalmazásával csökkenti a háttérintenzitást. A tartomány (range, [R]) és a 'simítás' (smoothing, [S]) mértéke meghatározható. Magába foglal továbbá egy alsó és egy felső korlátot jelentő szűrőt, mely segítségével kiküszöbölhetők a sejtmag határán megjelenő gyűrűszerű digitális melléktermékek [R=9; S=3]					

**2.** *Táblázat:* A magszegmentációhoz, jelfelismeréshez és a képfeldolgozáshoz szükséges alapvető jellemzők

Az automatizált tesztsorozatok során – melyeket szintén az egyes csatornákban különkülön 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 procedúra – 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.

Hátrányként említendő, hogy a kezdeti betanítási eljárás rendkívül időigényes és csak korlátozott számban (pár száz) teszi lehetővé a jelészlelés tesztelését, ráadásul némiképp torzító körülmény, hogy a manuális klasszifikáció során a 'betanítást' végző vizsgáló némiképp alaposabban osztályoz, mint ahogyan azt valós körülmények között tenné. Ráadásul mindezt egy monitoron megjelenített digitális felvétel segítségével teszi. 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.

## 3.4.3 Képfeldolgozás

Az optimalizált képfelvételi eljárásnál végső soron két előzetes-képfeldolgozási műveletet alkalmaztunk. Háttérkorrekció céljából a rendszer kiszámolta a szürke-szinteket, majd megállapította a maximum jelerősségi értéket. Utóbbit az algoritmus kivonta a digitális kép minden egyes képpontjából (pixel). A másik kép-feldolgozási művelet a háttérfestés csatornájában érzékelt vizsgálati elem körvonalán kívüli terület maszkolása volt (1. Táblázat).

Az egyes csatornákban nem volt azonos a képfeldolgozó algoritmusok alkalmazásának szekvenciája. Mivel a háttér szürke-szint számításához a sejtmagon kívüli területre is szükség van, a DAPI csatornában értelemszerűen a háttérigazítást a maszkolás előtt alkalmaztuk, míg a jelcsatornák esetében ezt pont fordítva tettük. A digitális képfelvétel és az előzetes-képfeldolgozás után két további utólagos-képmódosítás került alkalmazásra. Az egyik egy diszkrét szürke szint megemelés, mely adott mértékben megemeli minden képsejt (pixel) szürke szintjét és a kiemelkedő intenzitású képpontokat egy maximalizált értéken tartja. A másik utólagos módosítás pedig egy a fent is említett top-hat transformáció volt, mely egyfajta felületi szűrőként a kisméretű zajszerű elemek eltávolítását szolgálta.

# 4 Eredmények

4.1 Uroepitheliális sejtek egymást követő fél-automatizált feno- és genotipizálása kromogén immuncitokémiai és sokszondás FISH alkalmazásával

## 4.1.1 Analitikai hatékonyság

Az immunfenotipizáláson alapuló sejt szelekció során elsődleges célunk egy olyan határérték beállítása volt, amely magas szenzitivitást, tehát alacsony álnegativitást eredményezett. Az álnegatív események minél alacsonyabb szinten tartása azért volt fontos, mert az ezen a 'rostán' kihulló sejtek genotípusa már értelemszerűen nem kerül kivizsgálásra a későbbi FISH analízis során. A végső határérték meghatározásánál mindenképpen figyelembe kellett venni az álnegativitás csökkentésével párhuzamosan növekvő álpozitivitást. A két függvénygörbe nem lineáris természetű volt, ezért ott húztuk meg a határvonalat, ahol az álpozitivitást megjelenítő görbe meredeken emelkedni kezdett (5. ábra). A sejten belül mért átlagos jelerősségen (MIc) alapuló függvény esetében az optimális értéknél (0,372 asu) a szelekció 2,67% álnegativitással (97,33% szenzitivitás) és 23,58% álpozitivitással (76,42% specificitás) volt jellemezhető. Az álpozitív események ennél a határértéknél tapasztalt viszonylag magas arányát nagyrészt aránylag kisméretű, főleg gyulladásos sejtek eredményezték, melyek magas sejtmag/citoplazma aránnyal és/vagy gyűrődött citoplazmával bírtak. Az ilyen típusú fals eseményeket hatékonyan el lehetett azonban különíteni a sejten belül mért ún. összesített jelerősségi mutató (teljes jelerősség - TIc) alapján. A teljes jelerősséget ábrázoló görbe esetében az optimalizált értékkel (485 asu) az álnegativitást 0% ra lehetett levinni (100% szenzitivitás), hiszen az álpozitivitás még ekkor is csak 16,54%-nak bizonyult (83,46% specificitás) (5. ábra).

Végeredményben a CK-7 pozitivitás kettős feltétel-rendszer szerint került meghatározásra, azaz: bármely sejtet, mely bármely feltétel (MIc, TIc) határértéke alatti értékkel volt jellemezhető, nem-uroteliálisnak tekintettük és kizártuk a későbbi genotípizálásból. Az ilyen

típusú, álpozitivitást és álnegativitást egyaránt ábrázoló görbék (5. ábra) határérték optimalizálásra történő alkalmazása azért rendkívül hasznos, mert az érték változtatásával (határvonal "csúsztatása" az abszcisszán), további kísérletek nélkül szimultán határozható meg a specificitás és a szenzitivitás. Két függvény alkalmazásánál azonban ez nem akadálymentes.

Az átlagos és teljes intenzitásjellemzők ún. egymást kölcsönösen nem kizáró tényezők. Amennyiben az egyikre vonatkozó függvényértéket változtatjuk, úgy nagy valószínűséggel nem elhanyagolható mértékben befolyásoljuk a másik értékét is. A kettős feltétel szerinti kombinált immunszelekció estében tehát nem lehetséges a fenti egyszerű módosítással meghatározni (leolvasni) a hatékonysági mutatókat képviselő értékeket, melyeket a függvény a változó határértékeknél vesz fel. Ahhoz, hogy a szelekció analitikai hatékonysága mégis könnyen meghatározható legyen változó határértékeknél is, a *két egymást kölcsönösen ki nem záró esemény közötti összefüggésre vonatkozó valószínűség* számítási algoritmust alkalmaztuk (11. ábra). Ez azt határozza meg, hogy mi a valószínűsége, annak hogy 'A' illetve 'B' esemény közül legalább az egyik bekövetkezik, ez esetben tehát: mi a valószínűsége annak, hogy egy sejt legalább egy feltételnek *nem* felel meg a kettő közül; lévén, jelen helyzetben a null-hipotézis az egyik vagy másik fenotipikus jelleg szerinti *negativitás*. Mindebből következik, hogy a pozitív kontrollnál ezzel a módszerrel közvetett módon állapítható meg a szenzitivitás (97,33%). Negatív kontrolloknál ugyanígy - de közvetlen módon - pedig a specificitás állapítható meg (96,1%).

Általános algoritmus két, egymást kölcsönösen nem kizáró esemény közötti összefüggésre (azaz, "*mi a valószínűsége annak, hogy "A" <u>vagy</u> "B" esemény bekövetkezzen"): P(A+B)=[P(A)+P(B)]-P(A)xP(B)* 

Behelyettesítve a korábban kapott valós (true [T]) illetve ál- (fals [F]) negativitás [N] értékeket:

P(TNTIc+TNMIc) = [P(TNTIc) + P(TNMIc)] - P(TNTIc) x P(TNMIc) = [0,7642 + 0,8346] - 0,6378 = 1,5988 - 0,6378 = 0,961 => **Specificitás**= 96,1%

 $P(FNTIc+FNMIc) = [P(FNTic) + P(FNMIc)] - P(FNTIc) \times P(FNMIc) = [0,0 + 0,0267] - 0,0 \times 0,0267 = 0,0267 - 0,0 = 0,0267 => 2,67\% => Szenzitivitás=100\% - 2,67\% = 97,33\%$ 

**Pontosság**=(9610+27252/38000)x100=(36862/38000)x100=0,97005x100=97,1%

**11. ábra:** Az analitikai pontosság kiszámolása a két immunfenotípushoz asszociált jellemző szerint, egy matematikai képlet segítségével

Miután ezt a két értéket meghatároztuk, az analitikai pontosságot (accuracy) az elterjedt, 'valós pozitív események + valós negatív események / az összes vizsgált esemény' tétellel számítottuk. Az így kapott pontosság 97,1% volt. Az analitikai pontosság tehát ez esetben azt mutatta meg, hogy bármely vizsgált eseményből (akár negatív akár pozitív) az esetek hány százalékában szolgáltat a módszer valós ítéletet. Hogy az analitikai pontosságot empirikusan teszteljük, és egyben ellenőrizzük a fenti algoritmus helyességét, a fél-automatizált immunszelekciót kontroll hígítási sorokon is teszteltük. A 3 parallel sorozaton a szelekciót a fent említett módon végeztük. Az 'A', 'B' és 'C' sorozatok esetében a várt és a mért pozitivitások közötti összefüggés 0,9858, 0,9963, 0,9883 Pearson-féle korrelációs koefficienssel volt jellemezhető, melyek átlaga 0,9901 volt. Ebből a determinációs együttható ( $r^2$ ) 0,9802, mely érték azt határozza meg, hogy a hígítások lineáris sorozata hány %-ban felelős a mért pozitivitásokért, valamint hány százalékban felelősek egyéb tényezők, ez esetben például maga a mérési hiba. Mindkét érték erős kapcsolatot mutatott magas analitikai pontosságot jelezvén ezzel, továbbá alátámasztva ezzel a fenti algoritmusos, változó körülményekhez alkalmazható hatékonyság-megállapítási módszert.

Az immunfenotípizálást követő FISH-t az 'A' jelzésű hígítási soron végeztük el. A vizsgálat az összesen 9 féle hígításból közel 1200 előzetesen szelektált CK-7 pozitív sejtet érintett. A kromoszómális rendellenességeket 95,9% szenzitivitással észleltük, míg ugyanezen keverékek negatív populációinak genotípizálása 95,1% specificitást eredményezett; az analitikai pontosság 95,5%-nak bizonyult (3. Táblázat).

А	<u>CK-7</u>		<u>konszekutív</u>	<b>3.</b> táblázat:		
	Immunfenotipizálás <sup>†</sup>		FISH <sup>‡</sup>	immunfenotipizálás		
hígítás	Várt érték	Mért érték	Pozitivitás	analitikai pontossaganak		
1.	50,00%	49,62%	97,44%	meghatározásához		
2.	25,00%	22,30%	95,74%	alkalmazott 'A' hígítási		
3.	10,00%	16,90%	97,50%	sornál tapasztalt lineáris		
4.	5,00%	5,10%	97,64%	összefüggés a várt és a mért		
5.	2,00%	1,95%	91,66%	értékek között, valamint a		
6.	1,00%	1,80%	95,77%	konszekutív célzott-FISH		
7.	0,50%	0,49%	100%	analízis szenzitivitása. A		
8.	0,10%	0,13%	87,75%	hígítási sort pozitív (HT-		
9.	0,05%	0,04%	100%	1376 hólyagtumor		
Korreláció†: r = 0,9858 <sup>†</sup> Az 'A' jelzésű hígítási sor várt és mért értékei közé ‡ A CK-7 pozitív elemek FISH vizsgálata során tapa			95,9% ± 2,89% lineáris összefüggés tal aberráns sejtek aránya	sejtvonal) és negatív (egészséges perifériás vér mononukleáris frakciója) kontrollok felhasználásával készítettük.		

A kromogén immunfenotipizáláson alapuló elő-szelekció valamint a konszekutív FISH vizsgálat (12. ábra) együttes szenzitivitása és specificitása végeredményben 93,3%, illetve 99,8% volt, míg a kombinált analitikai pontosság 97,3% volt.



12. ábra: Reprezentatív kép az egymást követő feno- és genotípizálásról (célzott-FISH)

# 4.1.2 Diagnosztikus hatékonyság

Szövettan és vizeletcitológia

A kórszövettani vizsgálat során a klinikai minták 17%-ánál (7/42) nem volt kimutatható neoplasztikus elváltozás. Azon esetek közül melyeknél a szövettan tumor jelenlétét igazolta 8,6% (3/35) bizonyult grade1 –nek (G1), 57,1%-uk (20/35) G2, 34,3%-uk (12/35) pedig G3 volt. A szövettanilag negatív esetek közül a vizeletcitológia egy kivételével mind helyes diagnózist adott, ezzel 86% specificitást mutatva. A pozitív populációban a citológia szenzitivitása G1, G2 ill. G3 esetekben 67, 50, ill. 75%-nak bizonyult; ezek értelmében az összesített szenzitivitás 60%, míg a teljes diagnosztikus pontosság 62%-nak bizonyult. (4. Táblázat). A nem egyértelmű vagy atípusos citológiai eredményeket – nemzetközi irodalmak alapján - negatívnak tekintettük.

	Citológia	FISH					
		Önálló-genotipizálás			Célzott-genotipizálás		
		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)
Specificitás	86% (6/7)	71% (5/7)	100% (7/7)	86%	100% (7/7)	100% (7/7)	100%
Szenzitivitás	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%
Pontosság	64% (27/42)	82% (33/40)	80% 32/40)	81%	98% (41/42)	91% (38/42)	94%

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

Az önálló-genotípizálás diagnosztikus hatékonysága – szövettani grádushoz viszonyítva

<u>Hagyományos kiértékelés:</u> A szövettan szerinti negatív mintákban a gyári ajánlásnak megfelelő kiértékelési sémát követve 71%-os specificitást regisztráltunk. A G1 egyes esetek mindegyike, míg a G2 és G3 esetek 78, ill. 92% bizonyult pozitívnak. Ezek értelmében az összesített szenzitivitás 85% a diagnosztikus pontosság pedig 82% volt.

<u>Statisztikai megfontolásokon alapuló kiértékelés:</u> Az összes minta megfelelt a genotípizálásra vonatkozó *legkisebb cellularitás* feltételének. A FP+2SD határértéket alkalmazva a FISH az összes szövettanilag negatív esetet negatívnak ítélte (100% specificitás), míg a G1, G2 valamint G3 esetek 100, 61 és 92%-a bizonyult pozitívnak; 76%-os össz.-szenzitivitást és 80% diagnosztikus pontosságot jelezve ezzel (3. Táblázat).

Az átlagos pozitivitás (%) a G 1-2-3 mintáknál 12,9%, 28,7% valamint 33,7% volt. Ezek a különbségek azonban Kruskal-Wallis teszt alapján nem bizonyultak szignifikánsak (p=0,1097) (12. ábra).

### Célzott-FISH vizsgálat diagnosztikus hatékonysága (grádusok szerint)

<u>Hagyományos kiértékelés:</u> Az összes negatív esetet helyesen ítélte meg a módszer (100% specificitás), míg a neoplasztikus G1-2-3 eseteknél a szenzitivitás 100-95-100%-nak

bizonyult. Az összesített szenzitivitás így 97% míg a diagnosztikus pontosság 98%-nak felelt meg (3. Táblázat).

<u>Statisztikai megfontolásokon alapuló kiértékelés:</u> A statisztikai határérték alapján minden negatív mintát helyesen ítélt meg a célzott-FISH (100% specificitás), továbbá hat minta nem felelt meg a megfelelő cellularitás feltételének. A hisztológiailag pozitívak között négy minta nem érte el a megfelelő cellularitást; az összesített szenzitivitás 89%, míg a diagnosztikus pontosság 91% volt. A minták átlagos FISH pozitivitása G1-2-3-ban 30,8%, 42,5% és 84,4% volt, mely különbségek a fent említett statisztikai teszt alapján is szignifikánsnak voltak (p=0,0019) (13. ábra).



13. ábra: Klinikai minták önálló- és célzott-FISH-el végzet vizsgálata során tapasztalt rendellenes sejtek aránya a különböző, kórszövettani besorolás szerinti osztályoknak megfelelően.

## Szenzitivitás a különböző kórszövettani stádiumokban

A szövettanilag pozitív esetek 40-40%-a (14-14/35) volt pTa ill. T1 karcinóma, míg az esetek 20%-a (6/35) T2 lézió volt. Amennyiben a nem izom-invazív uroteliális karcinómákat

(pTa, pT1) együtt vizsgáljuk, a szenzitivitás határozott emelkedést mutat citológia, önállógenotípizálás valamint célzott-genotípizálás sorrendjében (48-72-91%).

	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)	
рТа	27% (4/15)	71% (10/14)	57% (8/14)	93% (14/15)	87% (13/15)	
T1	71% (10/14)	85% (11/13)	77% (10/13)	100% (14/14)	86% (12/14)	
átlag (pTa, T1)	48%	72%		91%		
T2	83% (5/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	

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

Ha külön vizsgáljuk a nem izom-invazív kategória két alcsoportját, a nem invazív pTa csoportnál ezek a különbségek kifejezettebbek voltak a pT1 csoporthoz képest. Az izom invazív pT2 csoport esetében a citológia szenzitivitása valamivel alacsonyabb volt (83%), mint azt a különböző FISH kiértékelésnél tapasztaltuk, melyek mindegyike 100% szenzitivitást mutatott (5. táblázat). A FISH pozitív sejtek aránya önálló-genotípizálással a pTa, T1 ill. T2 patológiai stádiumokban 23,1%, 36,2% és 39,9%-nek mutatkozott (p=0,2938), míg a célzott-FISH-el ugyanezen stádiumokban 39,2%, 59,0% és 87,3% (p=0,005) volt (13. ábra).

# 4.2 Sokszondás, lókusz és centromer specifikus FISH jelmintázatok teljesautomatizált kiértékelése PFM segítségével

## 4.2.1 Analitikai hatékonyság

## Automatizált sejtmag és jelfelismerés

Az automatizált sejtmagfelismerést a rendszer 7,3% álpozitivitás mellett végezte, míg az álnegativitás 3,4% volt. A jelfelismerés pontossága (accuracy) a 3, 7 és 17 centromerikus szondák esetében 72,5, 78,5 és 87,5% volt, míg a lókusz specifikus azonosító esetében 86%. Feltételezvén, hogy az egyes csatornákban előforduló hibák egymástól függetlenek, az összesített valószínűsége annak, hogy egy mag minden FISH jelét helyesen észlelje a rendszer, megegyezik az egyes valószínűségek szorzatával; azaz,  $0,725 \times 0,785 \times 0,872 \times 0,860$ , tehát 42,7%. Az eredeti training mezők mindegyikének digitális újrapásztázása során megállapítottuk, hogy a jelfelismerés pontossága a 3, 7 és 17 CEP szondák esetében 77,3, 82,6 és 81,0% volt, míg a 9p21 LSI esetében 87,1%. Mindezek tükrében a várt összesített jelfelismerési valószínűség 45% lett volna, míg a manuális verifikálás végeredményben 53,8% empirikus jelfelismerési valószínűséget eredményezett. Nem sejtes elemeket csupán elhanyagolható mértékben detektált a rendszer, míg a sejtek 3%-a valójában aggregátum volt.

# Sejtmagok genotipikus klasszifikációja

A sejtmagok gép-asszisztált citogenetikai klasszifikációját a szondakészlet, valamint a vonatkozó pozitív-sejt definíció(k) (jelmintázat) összetettsége miatt interaktív módon végeztük, tehát a folyamat fél-automatizált volt. A FISH jelmintázat szerinti osztályozás 2 fő lépésből állt melyeket végeredményben összesen három, a különböző csatornákban mért mintázatokat ábrázoló pontábrán végeztünk (14./A, B ábra).



14. ábra: Reprezentatív valós (A) valamint a teljes folyamatot bemutató sematizált (B) kép a Urovysion automatizált FISH *jelfelismeréséhez* szükséges háromlépcsős kapuzásról; a folyamat során kiválasztottuk a definícó szerinti aberráns sejteket valamint ezzel egy időben eltávolítottuk а vizsgálatra alkalmatlanokat; a szelekciót *3x2* minta а jelszámát ábrázoló pontdiagramon végeztük.



Az első lépésben kizártuk azokat a magokat, amelyek bármely centromerikus szondából nullát tartalmaztak. Második lépésként megjelöltük azokat a magokat, melyek minimum triszómiát mutattak a 7 és 17 kromoszómára nézve és/vagy biallelikus deléciót jeleztek a 9p21 lókuszra vonatkozóan. Végül a harmadik lépésként azokat a magokat jelöltük meg melyek triszómiát mutattak a 7 vagy 17 kromoszómára nézve és ezzel egy időben a 3 kromoszómára nézve is (13. ábra). Az ily módon kivitelezett automatizált kiértékelés során három parallel kísérlettel összesen 5400 pozitív valamint 5720 negatív kontroll sejt kiértékelésével megállapított szenzitivitás 97,6% (SD=0,74%), a specificitás pedig 92,2% (SD=1,53%) volt (6. táblázat).

Pozitív kontroll sejtek			N	Negatív kontroll sejtek			
Álnegativitás			Álpozitivi	Álpozitivitás			
I.	2,44%		I.	8,22%			
II.	3,11%		II.	6,02%			
III.	1,63%		III.	8,96%			
átlag	2,39%	$(\pm 0,74\%)$	átlag	7,73%	(±1,53%)		
'0' CEP miatti kizárások aránya			'0' CEP n kizárások	niatti aránya			
I.	3,47%		I.	14,27%			
II.	7,03%		II.	9,37%			
III.	5,14%		III.	12,57%			
Átlag	5,21%	(±1,78%)	átlag	12,07%	$(\pm 2,49\%)$		

6. táblázat: Az automatizált jelfelismerés analitikai hatékonysága

A manuális genotípus alapján történő osztályozás egyedi sejt szinten és egyenként történt. Három kísérlet összesen 1130 pozitív és 1060 negatív kontroll sejtjének manuális vizsgálata 99,5% (SD=0,9%) szenzitivitást és 96,4% (SD=2,65%) specificitást fedett fel.

Összességében a manuális és az automatizált analízist 97,9% valamint 94,8% analitikai pontosság jellemezte. A hígítási sorokon végzett, összesen 10400 sejt vizsgálatát magában foglaló összehasonlító vizsgálatok során szoros lineáris összefüggés mutatkozott a mért és várt értékek között (r=0,99; ebből determinációs együttható:  $r^2$ =0,98).

Átlagosan a negatív sejtek 12,1%-át, míg a pozitív sejtek 5,2%-át kellett a vizsgálatból kizárni egy vagy több centromerikus szonda asszociálta szignálok biallelikus hiánya miatt.

Az automatizált vizsgálathoz szükséges teljes idő (mely magába foglalja a pásztázástól egészen a végső klasszifikációig tartó folyamatot) átlagosan 11 másodperc volt (8-17s), míg a manuális analízis sejtenként átlagosan 13 másodpercet vett igénybe (10-17s).

### 4.2.2 Diagnosztikus hatékonyság

Azokat az eseteket, melyek a szövettani vizsgálat alapján pozitívnak bizonyultak, a manuális analízis helyesen diagnosztizálta a G1-2-3 minták esetében 1/3, 6/8, ill. 4/5 arányban. Az automatizált vizsgálat a G1 mintáknál 0/3, a G2-nél 5/8, míg a G 3-nál 5/5 arányban diagnosztizált helyesen (7. táblázat).

	Helyes diagnózis manuális kiértékeléssel	Helyes diagnózis automatizált kiértékeléssel
Negatív (5)±	5 (5)	5 (5)
Grade1 (3)	1 (3)	0 (3)
Grade2 (8)	6 (8)	5 (8)
Grade3 (5)	4 (5)	5 (5)
Ta (6)	3 (6)	2 (6)
T1 (6)	5 (6)	4 (6)
T2 (4)	3 (4)	4 (4)
Átlagos szenzitivitás	69% (11/16)	63% (10/16)
Pontosság	76% (16/21)	71% (15/21)

±kórszövettanilag negatív

7. táblázat: Az automatizált jelfelismerés diagnosztikus hatékonysága

A manuális analízis a hat felszíni lézió közül hármat helyesen ítélt meg, míg az invazív léziók közül a helyes diagnózis aránya 5/6 volt a T1, valamint 3/4 a T2 eseteknél. A Ta, T1 és T2 tumorok automatizált vizsgálata 2/6, 4/6 valamint 4/4 arányban bizonyult helyesnek.

Az összesített diagnosztikus szenzitivitás 69% (11/16) volt a manuális vizsgálat esetében, míg ugyanez az érték 63% (10/16) volt az automatizált analízisnél. A hisztológiailag negatív eseteket mindkét módszer 100%-ban helyesen diagnosztizálta (5/5). A fentiek értelmében a manuális analízis 76, míg az automatizált 71% összesített

diagnosztikus pontossággal volt jellemezhető; a különbség a 2 érték között statisztikailag nem volt szignifikáns (Fisher's exact test: p>0,05).

Átlagosan a sejtek mintegy 22%-át (6-41%) kellett kizárni egy vagy több kromoszómához asszociált mindkét centromerikus FISH szignál hiánya miatt. A manuális, illetve automatizált analízis által detektált pozitivitások (%) között az átlagos különbség 3,20% (±2,98%), volt, míg a két adathalmaz közötti lineáris kapcsolat szoros korrelációval volt jellemezhető (r=0,9455).

# 5 Megbeszélés

A vizeletben található interfázis sejtmagokon végzett sokszondás molekuláris citogenetikai vizsgálat az egyik legígéretesebb non-invazív módszer hólyagtumorok diagnosztizálására. Mivel azonban a célsejtek azonosítása nehézségekbe ütközik, valamint a jelen ajánlás nem egyértelmű és időigényes, a vizsgálataink során célul tűztük ki egy olyan módszer kidolgozását, mely során az uroepiteliális sejtek fenotipizálását követően a genotipizálás célirányosan kerülhet kivitelezésre. Az alap elképzelés természetéből fakadóan célunk volt a fenotipikus szelekció mind magasabb mértékű automatizálása is.

Az uroteliális sejtek fenotípizálása során a megszokottól eltérően azért választottuk a kromogén immuncitokémiát, mert az általunk alkalmazott szondakészlet lefedte a négy főbb, spektrálisan jól elkülöníthető fluorokrómot, és bár a citoplazma a preparálás során eltávolításra kerül, a kismértékben visszamaradó specifikus, illetve aspecifikus szignálok nagyban nehezítették a konszekutív FISH analízist. A hasonló vizsgálatok esetében ritkábban alkalmazott 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 tehát a legnagyobb kihívást azok mind hatékonyabb, de mégis egyszerű, alapvetően festék erősségen alapuló szelekciója jelentette. Gondot jelentettek a gyűrődött, zsugorodott gyulladásos sejtek, melyek egységnyi területre vonatkoztatott festési intenzitása (MIc) rendkívül magas volt, de ugyanekkora problémát okoztak egyes laphámsejtek is, melyek rendkívül nagy mérete miatt különösen nagy teljes festődési intenzitást (TIc) mutattak. A fent vázoltak értelmében nem lehetett tehát csupán egy mutató alapján differenciálni, hanem szükséges volt szimultán alkalmazni mind az átlagos- mind a teljes festődés intenzitást megmutató jellemzőket.

Az egy időben és két alaktani paraméter alapján történő sejtszelekció nagy analitikai hatékonysággal 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 fenotípizálást genotípizálás 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 rendkívül 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 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.

A módszer kidolgozása után vizsgálódásaink során további célként tűztük ki az eljárás összehasonlító klinikai tesztelését, valamint a diagnosztikus hatékonyságának megállapítását beteganyagokon.

Összehasonlítva a különböző FISH kiértékelések specificitásait, a hagyományos kiértékelés szerinti önálló-genotípizálásé 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 analízisét igényelte. A jelenség nem meglepő, hiszen egy adott minta (lényegében bármely sejtpopuláció) sejtjeinek egy bizonyos aránya mindenképpen pozitívnak fog mutatkozni; egészen pontosan az analitikai FP mértékéig. Ennek értelmében megfelelő méretű minta esetén a pozitivitás mindenképpen át fogja lépni a rögzített, abszolút értékű határértéket. Eredményeink rámutatnak, hogy ez a jelenség könnyedén kiküszöbölhető olyan határérték alkalmazásával, amely eredendően figyelembe veszi a módszer helyi analitikai álpozitivitását (lsd. FP+2SD szabály); így elérhető akár a 100% specificitás. A célzott-genotipizálás önmagában elegendőnek bizonyult az álpozitivitás minimalizálására. Érdekes módon – ugyan más-más megközelítésből - mind a hagyományos mind a statisztikai megfontolásokon alapuló kiértékelésnél az alacsony sejtszámnak volt köszönhető, hogy a minták nem érték el az előbbinél az abszolút határértéket az utóbbinál pedig a minimális cellularitás kritériumát. 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.

Az összesített *szenzitivitás* tekintetében a citológia valamennyi FISH vizsgálatnál gyengébbnek bizonyult. Utóbbiakról általánosságban elmondható, hogy a célzott-genotípizálás 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 talán a célzott-genotípizálás egyik legnagyobb előnye. Az önálló-genotípizálás statisztikai megfontolásokon alapuló kiértékelésénél tapasztalt álnegatív esetek elsősorban abból fakadtak, hogy a pozitivitás nem érte el a diagnosztikus határértéket. Ez annak köszönhető, hogy az önálló-genotípizálás 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 pozitivitásának alulbecslését (123).

Amennyiben a tárgyilagos célsejt-kiválasztás minden következményét figyelembe vesszük, jól látszik, hogy a megnövekedett analitikai pontosság, melyet azzal értünk el, hogy az analízist kizárólag a CK-7 pozitív sejtekre korlátoztuk, szintén emelkedett diagnosztikus pontosságban manifesztálódik. Továbbá 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 - egyes tanulmányok tükrében (132-133) - további előnyökkel járhat a fent vázoltak szerinti, genotípizálást megelőző fenotípizálás. Az általunk alkalmazott szondakészlet 4 kromoszómát érintő rendellenességet képes észlelni, melyek számos egyéb tumorral kapcsolatban is érintettek lehetnek; 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 fenotípikus jellemzőitől függ, ez azonban a módszer csak kismértékű változtatását igényli. Szintén a FISH-t megelőző fenotipizálás 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 ciktokeratinokkal [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.

Az eredmények statisztikai típusú diagnosztikus értelmezése azonban egyértelmű előnyökkel is járt. A pozitivitás meghatározása - szemben a bináris diagnózist eredményező hagyományos kiértékeléssel - hasznos mennyiségi (kvantitatív) információkat szolgáltatott; lévén mind az önálló-, mind a célzott-FISH analízis esetében lineáris összefüggés mutatkozott a FISH pozitív sejtek aránya és tumor kórszövettani osztályozás (grádus, stádium) között. Fontos azonban megjegyezni, hogy statisztikai jelentőségű lineáris összefüggés csupán a célzott-genotípizálás esetében volt tapasztalható. Az összefüggés különösen szoros volt a magas grádusú/stádiumú tumorok esetében. 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 (134). Mi több, Kipp és munkatársai eredményeikkel bemutatták, hogy a rendellenes sejtek aránya prognosztikai jelentőségű lehet mind a recidíva, mind a progresszió szempontjából (121). 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-közti 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; utóbbit a minták eltérő kontaminálódása is jelentős mértékben befolyásolhatja (123). Az összetett sokszondás készletekre a fenti körülmények még nagyobb mértékben vonatkozhatnak. Következésképpen egy ugyanazon, előre meghatározott, abszolút értéken vett határérték alkalmazása 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 ily módon az egyes tanulmányok valódi jelentőségének összehasonlíthatóságát. Ezek tükrében amellett, hogy a százalékos kiértékelés hasznos információkat nyújthat, amennyiben harmonizálni kívánjuk a vizsgálati eredmények értelmezését, egy egységesített határérték-determinációs protokoll kidolgozását szintén meg kell fontolni a jövőben.

A vizsgálataink során alkalmazott négyszondás fluoreszcens in situ hibridizáció (Urovysion) ugyan az egyik legígéretesebb non-invazív technika hólyagtumorok detektálására, a kiértékelés folyamata félrevezető lehet, időigényes és rendkívül fáradságos. Így a részleges vagy átfogó automatizációra legalább akkora igény merül fel, mint más FISH módszereknél.

Ugyan számos riport részletezte korábban az automatizáció lehetőségeit számbeli vagy szerkezeti kromoszóma rendellenességeken, tényleges alkalmazással kapcsolatban (57, 122, 135-141) a sokszondás készletekkel kapcsolatos, gyakorlati szempontból is tájékoztató jellegű közlemények száma rendkívül korlátozott. Továbbá ilyen típusú FISH készlet automatizációja moduláris rendszereken még kisebb számban, ürített vizeleten pedig még egyáltalán nem került közlésre. Elmondható tehát, hogy elsőként tűztük ki célul, hogy részleteiben megvizsgáljuk a módszert, feltárva annak analitikai valamint diagnosztikus hatékonyságát, továbbá lényegi korlátait.

A magfelismerés (szegmentálás) 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) természetszerűen 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. 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 lókusz 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.

Annak ellenére, hogy az egyes csatornákban a szignálok átlagosan több mint 80% pontossággal kerültek észlelésre, az összesített jelmintázat felismerési pontossága ~54% volt. Ez valamivel ugyan magasabb volt, mint amit matematikailag vártunk volna (~45%), mégis alátámasztja, hogy az egyes csatornákban történő hibák többnyire egymástól függetlenül következnek be és csak viszonylag kis arányban vezethetők vissza átfogó, a sejt egészét érintő minőségi hibákra. Szemben a 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 (±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, mivel egy vagy több CEP asszociált szignálból nulla szignált produkáltak. Amikor a tényleges körülményeket hígítási sorok segítségével modelleztük az automatizált vizsgálattal 'mért' eredmények szoros lineáris összefüggést mutattak a várt értékekkel.

15. ábra: A kép reprezentatív módon mutatja be kontroll а populációknál tapasztalt jelerősségbeli különbséget. pozitív sejtek jelei Α szisztematikusan erősebbnek mutatkoztak. A sejtek különböző jelcsatornákban tapasztalt jelerősségeit a fluorokrómnak megfelelő színű vonal jelzi a fehér nvilakkal jelölt diagrammokon





16. ábra: A negatív populáció alulbecslését az erősen aberrált magasabb jelintenzitása sejtek eredményezte rövidebb expozíciós idő okozta. Utóbbi annyira rövid volt, hogy a gyengébb jelerősségű negatív sejtek szignáljainak jelentős része digitálisan alulreprezentált maradt, s így a rendszer nem volt képes detektálni azokat (A). A rögzített idejű expozíció sem oldotta meg a problémát, mivel a viszonylag nagy intenzitásbeli különbség miatt a sejtekhez. negatív szükséges expozíciós időnél a tumorsejtek túlexponált, diffúz jelekkel bírtak, melyeket a rendszer nem volt képes megfelelő pontossággal felismerni hibridizációs *(B)*. Mivel a körülmények azonosak voltak, a magmorfológia, jelenség а maghártya vagy kromoszómális architektúrában keresendő, mely differenciákat okozhatják előkezelésbeli különbségek vagy maga a malignus transzformáció. Fontos azonban megjegyezni, hogy a jelenséget klinikai mintáknál nem tapasztaltuk.

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 (15-16. ábra) 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). Mi több, – figyelembe véve a biológiai minták minőségének variabilitását is – kérdéses, hogy jelen szondakészlet (vagy bármely sok-szondás, poliszómiák észlelését szolgáló szondakészlet) automatizált kiértékelése el fogja-e valaha érni a humán vizsgáló diagnosztikus pontosságát kismértékű poliszómia (aneuploiditás) esetében.

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. A DAPI morfológia információ szegénységének negatív hatásával, korábbi tanulmányainkkal kapcsolatban szóltunk (ld. fent); a jelenséget más munkacsoportok is felvetették már (80-81, 115, 118). 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 a fél-automatizált, tárgyilagos (immunofenotípizáláson alapuló) célsejt kiválasztás lehetséges előnyeit; többek között, hogy növeli a konszekutív manuális Urovysion analízis pontosságát (80, 81). 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, mely során a vizeletben található sejtek diagnosztikus értékű klasszifikációja gépi vezérlés által, tárgyilagos feno- és genotipikus feltételek mentén kerülne kivitelezésre, minimalizálva ezzel az emberi tényezőt.

Az automatizáció egyik leginkább emlegetett jellemzője az analízishez szükséges idő, melynek értéke a releváns tanulmányokban rendkívül széles határok között mozog (0,15-406,0s); ez a fajta variabilitás részben ennek a jellemzőnek ('idő') az eltérő definíciójában rejlik. Vizsgálataink során egy sejt analíziséhez átlagosan 11 másodpercre volt szükség, mely némileg gyorsabb volt, mint a manuális analízis sebessége (13 másodperc/sejtmag). Fontos azonban leszögezni, hogy a rendszert vezérlő számítógép alapvető teljesítményén kívül számos paraméter befolyásolja a vizsgálat sebességét, mint például a tárgylencse nagyítása, vagy az egyedi sejt szinten begyűjtött morfometriai adatok. A nagyobb nagyítás ugyan több információval szolgál(hat), azonban lelassítja az analízist. Vizsgálataink során 40x tárgylencsét alkalmaztunk, azonban az irodalomban fellelhető tanulmányok 10 és 100x nagyítás között az összes nagyítást alkalmazzák. A párhuzamosan gyűjtött alaktani jellemzőkkel kapcsolatban, ha lehet, még nehezebb a mérlegelés, mivel a többlet ismeret ugyan többlet időt jelent, azonban ezek a többlet adatok nélkülözhetetlenek lehetnek egyes később felmerülő kiegészítő vizsgálatoknál. A korreláltan gyűjtött alaktani paraméterek meghatározásánál tehát inkább érdemes többet gyűjteni, mint amennyi előre feltételezhetően szükséges lehet.

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.

## További általános következtetések, gondolatok az automatizált i-FISH kiértékelésről

A FISH kiértékelés automatizációjára irányuló törekvéseknek mindig is két alapvető célja volt: elérni vagy akár meghaladni a manuális vizsgálati pontosságot, valamint gyors és fáradhatatlan diagnosztikai munkaállomásokat létrehozni a szükséges humán felügyelet mellett. Α pontosság tekintetében, minimalizálása az irodalmi adatok alapos tanulmányozásával valamint saját tapasztalatainkat, eredményeinket is figyelembe véve, megállapítható: nem valószínű, hogy az automatizált analízis minőségi értelemben valaha is pontosabb lesz, mint a manuális. Ennek oka, hogy a FISH kiértékelésének minőségét alapvetően két tényező határozza meg: az egyik maga a pontos jelfelismerés, a másik pedig az észlelt mintázat diagnosztikus értelmezése (interpretálása). Jelfelismerés tekintetében a gépi rendszerek valójában egyre inkább megközelítik a humán kiértékelés minőségét, sőt bizonyos szempontból már meg is haladják azt (ezt példázza a csekély megvilágításnál tapasztalt kvantum-hatékonyság terén mutatkozó gépi előny). Az észlelt mintázat értelmezése azonban korántsem ennyire egyértelmű. A FISH szignálok nem uniform képletek; a szonda típusa, a célszekvencia mérete, de még a fluorokróm minősége is mind olyan tényezők, melyek nagymértékű morfológiai változatosságot eredményeznek, továbbá növelhetik a szignál-szerű aspecifikus jelek mennyiségét; a megfelelő interpretálás ezért egyedi mérlegelést igényel. Az automatizált analízis kezdeti fázisában zajló betanítási folyamat azonban szintén terhelt e tényezőktől, így könnyen belátható, hogy a manuális kiértékelés minőségi korlátai szükségszerűen manifesztálódnak a gépi kiértékelés során is. A másik oldalon viszont a humán erőforrás nyilvánvalóan nem képes versenyezni egy gépiesített rendszer sebességével és munkabírásával; nem beszélve az előbbi általános szubjektív jellegéről, vagy az eltérő értékelők közötti különbségről (57). Az automatizált FISH analízis tehát - még ha pontosságban nem is haladja meg a humán kiértékelést - jelentős terhet képes levenni a citogenetikai laboratóriumok válláról. A megállapítás még akkor is igaz, ha figyelembe vesszük, hogy a legtöbb laboratórium vagy diagnosztikai központ nem dolgoz fel annyi mintát, hogy szükség legyen állandó 24 órás gépi analízisre, hiszen a humán erőforrás bármilyen mértékű kiváltása előnyös, továbbá fontos gazdasági jelentőséggel bír.

Látva a mérhetetlen fejlődést a molekuláris genetikai módszerek területén, különös tekintettel a teljes genom szekvenálás területén tapasztalható robbanásszerű fejlődésre, az automatizált FISH vizsgálatok szerepe, létjogosultsága azonban némiképp megkérdőjeleződik, azok felhasználási tartománya idővel talán szűkül. Egyes területeken azonban továbbra is bizonyosan szükség lesz sejt alapú, képalkotást is magába foglaló vizsgálatokra. Ilyen

egyértelmű indikációk például a szöveten végzett vizsgálatok, ahol a topográfiai adatok nélkülözhetetlen diagnosztikai értékkel bírnak; a szimultán feno és genotipizálást igénylő analízisek; olyan genetikai vizsgálatok, ahol az abnormális klón pontos arányának megállapítása elengedhetetlen vagy azok az esetek ahol a tumorfejlődés klonális evolúciós vizsgálata indokolt.

Mindent egybevéve megállapítható, hogy az interfázis FISH vizsgálat kiértékelésének automatizációja hasznos technológia, mely rendkívül nagy segítséget nyújthat minden (molekuláris) citogenetikai laboratóriumnak. A hatékonyság tekintetében érdemes azonban észben tartani, hogy éppen azok az akadályok hátráltathatják a megfelelő észlelési pontosság elérését, melyek eredendően generálták az igényt egy ilyesfajta gépi segédletre. Mivel nem elképzelhető, hogy e tekintetben e rendszerek felülmúlhatják az emberi erőforrást, a csaknem feltétel nélküli következetesség és nagy teherbírás kell, hogy legyen a fő szempont egy ilyen rendszer beszerzésénél.
# 6 Új eredmények összefoglalása

- Elsőként dolgoztunk ki olyan automatizált képalkotó-sejtanalitikai módszert, mellyel képesek voltunk a vizeletben található uroepiteliális sejtek egymást követő fenoilletve genotípizálására; a módszer során a gyakoribb fluoreszcens jelölés helyett kromogén immuncitokémiát alkalmaztunk. Munkánk során
  - Meghatároztuk a fél-automatizált kromogén fenotípikus 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 célsejtmeghatározást, mely ily módon nem igényel kiemelt citológiai ismereteket.
    - Megállapítottuk továbbá, hogy a kombinált módszer emelkedett analitikai pontossággal jellemezhető az önálló-genotípizáláshoz (FISH) képest.
- Összehasonlító módon megállapítottuk a módszer diagnosztikus hatékonyságát, mely során az önálló-genotipizálás és a célzott-genotipizálás 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 végzet 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 kórszövettani besorolásával (grádus, stádium), azonban megállapítottuk, hogy statisztikailag is szignifikáns eredményeket a célzott-genotípizálás eredményezhet, mely így pontosabb képet adhat a valós tumortömegről; irodalmi adatok alapján utóbbinak komoly prediktív jelentősége lehet.
- Elsőként automatizáltunk ürített vizeleten végzet 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 csatornákban 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 jelcsatornákban 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 estekben ahol egy (esetleg kettő) szonda asszociálta mintázat önmagában patognómikus.
  - Megállapítottuk, hogy amennyiben az egyes csatornákban 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.

### 7 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 orvosdiagnosztikai 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 sejttenyésztés terén nyújtott segítő, tanító tevékenységéért, Dr. Somogyi László Tanár Úrnak, aki nélkül a klinikai tanulmány nem valósulhatott volna meg, 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 perceken, miközben azokat a "színes pöttyöket nézegettem...".

## 8 Irodalomjegyzék

- Arnold, J. Beobachtungen über Kerntheilungen in den Zellen der Geschwülste. Virchows Archiv 1879;78,279–301.
- Flemming, W Beitrage zur Kenntnis der Zelle und ihrer lebenserscheinungen. 3. Teil. Archiv für mikroskopische Anatomie 1881;20,1-86.
- 3. D. von Hansemann Über asymmetrische Zellteilung in Epithelzellen und deren biologische Bedeutung. In: Virchows Arch A Pathol Anat 1890;S.299-326.
- 4. Tijo, I.H., Levan, A. The chromosome number of man. Hereditas 1956;42,1-6.
- 5. Ford, C. E., Hamerton, J. L. The chromosomes of man. Nature 1956;178,1020-1023.
- Rowley, J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrin fluorescence and Giemsa staining. Nature 1973;243,290-293.
- 7. Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. Nat Rev Genet 2005;6(10):782-792.
- 8. Gall, J. G., Pardue, M. L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc Natl Acad Sci USA 1969;63:378-383.
- 9. Rudkin, G. T., Stollar, B. D. High resolution detection of DNA-RNA hibrid sin situ by direct immmunofluorescence. Nature 1977;265:472-473.
- Bauman, J.G., Wiegant, J., Borst. P., van Duijin, P. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. Exp. Cell Res. 1980;128:485-490.

- 11. Manuelidis L, Langer-Safer PR, Ward DC. High-resolution mapping of satellite DNA using biotin-labeled DNA probes. J Cell Biol. 1982;95:619-25.
- Singer RH, Ward DC Actin gene expression visualized in chicken muscle tissue culture by using in situ hybridization with a biotinated nucleotide analog. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982;79(23):7331-5.
- 13. Kislauskis EH, Li Z, Singer RH, Taneja KL. Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort alpha-cardiac and beta-cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments. J Cell Biol. 1993;123(1):165-72.
- 14. International Human Genom Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genom. Nature 2004;431:931-945.
- Telenius H, Pelmear AH, Tunnacliffe A, Carter NP, Behmel A, Ferguson-Smith MA, Nordenskjöld M, Pfragner R, Ponder BA.Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. Gene Chromosomes Cancer 1992;4:257-263.
- Nederlof PM, Robinson D, Abuknesha R, Wiegant J, Hopman AH, Tanke HJ, Raap AK. Three color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. Cytometry 1989;10:20-27.
- Nederlof, P.M., van der Flier, S., Vrolijk, I. Tanke, H.J., Raap, A.K. Fluorescence ratio measurements of double labeled probes for multiple in situ hybridization by digital imaging microscopy. Cytometry 1992;13:839-845.
- van den Engh, G., Sach, R, R., Trask, B. J. Estimating genomic distance from DNA sequence location in cell nuclei by a random walk model. Science 1992;257:1410-1412.
- Trask, B. J. Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. Trends Genet 1991;7:149-154.

- Tkachuk DC, Westbrook CA, Andreeff M, Donlon TA, Cleary ML, Suryanarayan K, Homge M, Redner A, Gray J, Pinkel D. Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization. Science 1990;250:559-562.
- 21. Pantel, K., Brakenhoff, R. H. Dissecting the metastatic cascade. Nature Rev. Cancer 2004;4:448-456.
- 22. Solakoglu, O. et. al. Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. Proc Natl Acad. Si. USA 2002;99:2246-2251.
- Brown J, Saracoglu K, Uhrig S, Speicher MR, Eils R, Kearney L. Subtelomeric chromosome rearrangment are detected using innovative 12-color FISH assay (M-TEL). Narure Med. 2001;7:497-501.
- Fauth C, Zhang H, Harabacz S, Brown J, Saracoglu K, Lederer G, Rittinger O, Rost I, Eils R, Kearney L, Speicher MR. A new strategy for the detection of subtelomeric rearrangements. Hum Genet 2001;109(6):576-83.
- 25. Mitelman, F., Johansson, B., Mertens, F. Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosome aberration in cancer. Nature Genet. 2004;36:331
- 26. Kallioniemi, A. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science 1992;258:818-821.
- 27. du Manuir, S. et. al. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. Hum. Genet. 1993;90:590-610.
- Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmüller G. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999;96:4494-4499.

- 29. Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JD. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. Nucleic Acids Res 1999;15;27(4):1214-8.
- *30.* Voullaire, L., Wilton, L., Slater, H., Williamson, R. Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. Prenat Diagnosis 1999;19:846-851.
- 31. Wilton, L., Williamson, R., McBain, J., Edgar, D., Voullaire, L. Birth of a healthy infant after preimplantation of euploidy by comparative genomic hybridization. New Eng. J. Med. 2001;345:1537-1541.
- Wells, D. et. al. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuplody. Fertil Steril. 2002;78:543-549.
- 33. Gangnus R, Langer S, Breit E, Pantel K, Speicher MR. Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients. Clin Cancer Res 2004;15;10(10):3457-64.
- 34. Heng , H. H., Squire, J., Tsui, L. C. High-resolution mapping of mammalian genes by in situ hybridzation to free chromatin. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1992;89:9509-9513.
- Fidlerova, H., Senger, G., Kost, M., Sanseau, P., Sheer, D. Two simple procedures for releasing chromatin from routinly fixed cells for fluorescence in situ hybridizatio. Cytogenet. Cell Genet 1994;65:203-205.
- 36. Bensimon A, Simon A, Chiffaudel A, Croquette V, Heslot F, Bensimon D. Aligment and sensitive detection of DNA by a moving interface. Science 1994;265:2096-2098.
- Florijn RJ, Bonden LA, Vrolijk H, Wiegant J, Vaandrager JW, Baas F, den Dunnen JT, Tanke HJ, van Ommen GJ, Raap AK. High-resolution DNA fiber-FISH for genomic DNA mapping and colour bar-coding of large genes. Hum. Mol. Genet. 1995;4:831-836.

- Bentley, D. R. et. al. The physical maps for sequencing human chromos 1, 6, 9, 10, 13, 20 and X. Nature 2001;409:942-943.
- Urban, A.E., Korbel, J.O., Selzer, R., Richmond, T., Hacker, A., Popescu,G.V., Cubells, J.F., Green, R., Emanuel, B.S., Gerstein, M.B. High-resolution mapping of DNA copy alterations in human chromosome 22 using high-density tiling oligonucleotide arrays. Proc. Natl. Acad. Sci. 2006;103:4534–4539.
- 40. Cremer T, Cremer M, Dietzel S, Muller S, Solovei I, Fakan S: Chromosome territories . a functional nuclear landscape. Curr Opin Cell Biol 2006,18:307-316.
- 41. Goetze S, Mateos-Langarek J, van Driel R: Three-dimensional genome organization in interphase and its relation to genome function. Semin Cell Dev Biol. 2007;18:707-714.
- 42. Croft, J. A. et. al. Differences in the localization and morphology of chromosomes int he human nucleus. J. Cell. Biol. 1999;145:1119-1131.
- 43. Cremer M, Küpper K, Wagler B, Wizelman L, von Hase J, Weiland Y, Kreja L, Diebold J, Speicher MR, Cremer T. Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. J Cell Biol. 2003;162:809-820.
- 44. Sun H. B., Shen, J., Yokota, H. Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei Biophys. J. 2000;79:184-190.
- 45. Spilianakis C. G., Lalioti, M. D., Town T., Lee G. R., Flavell R. A. Interchromosomal association between alternatively expressed loci. Nature 2005;435:637-645.
- Belmont A. Dynamics of cromatin, proteins and bodies within the ceell nucleus. Curr.
  Opin. Cell Biol. 2003;15:304-310.
- 47. Zuba-Surma EK, Kucia M, Abdel-Latif A, Lillard JW Jr, Ratajczak MZ The ImageStream System: a key step to a new era in imaging. Folia Histochem Cytobiol 2007;45(4):279-90.

- 48. Tkachuk D. C., Pinkel D., Kuo W.-L., Weier H.-U., and Gray J. W. Clinical applications of fluorescence in situ hybridization. GATA 1991;8:67-74.
- 49. Gelpi E, Ambros IM, Birner P, Luegmayr A, Drlicek M, Fischer I, Kleinert R, Maier H, Huemer M, Gatterbauer B, Anton J, Rössler K, Budka H, Ambros PF, Hainfellner JA. Fluorescent in situ hybridization on isolated tumor cell nuclei: a sensitive method for 1p and 19p deletion analysis in paraffin embedded oligodendroglial tumor specimens. Mod Pathol 2003;16(7):708-15.
- 50. Qian J, Bostwick DG, Takahashi S, Borell TJ, Brown JA, Lieber MM, Jenkins RB. Comparison of fluorescence in situ hybridization analysis of isolated nuclei and routine histological sections from paraffin-embedded prostatic adenocarcinoma specimens. Am J Pathol 1996;149(4):1139-9.
- Moore DH 2nd, Epstein L, Reeder J, Wheeless L, Waldman FM. Interlaboratory variability in fluorescence in situ hybridization analysis. The NCI Bladder Tumor Marker Network. Cytometry 1996;25(2):125-32.
- 52. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, Siebert R. J Mol Diagn. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. 2006;8(2):141-51. Review.
- 53. European Cytogeneticists Association Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance (http://www.biologia.uniba.it/eca/NEWSLETTER/NS-17/Guidelines.pdf)
- 54. AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories 2006 Edition (http://www.acmg.net/Pages/ACMG\_Activities/stds-2002/stdsmenu-n.htm)
- 55. Association for Clinical Cytogenetics Profesional Standards/FISH scoring in oncology (http://www.cytogenetics.org.uk/prof\_standards/fish\_oncology.pdf)

- 56. Coté GB. Nuclear FISH: automation, analysis and interpretation. Diagn Mol Pathology 2009;18(2):119-24.
- 57. 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 A, 2006;69(6):506-514.
- Moore DH 2nd, Epstein L, Reeder J, Wheeless L, Waldman FM. Interlaboratory variability in fluorescence in situ hybridization analysis. The NCI Bladder Tumor Marker Network. Cytometry 1996;25(2):125-132.
- Wauters J, Assche EV, Antsaklis A, Tepperberg J, Sharp SM, Kilpatrick MW, Tafas T,Tsipouras P. Fully automated FISH examination of amniotic fluid cells. Prenat Diagn 2007;27(10):951-955.
- 60. Lev D, Daniely M, Zudik A, Preisler E, Hoffmann N, Kaplan T, Raz U, Yanoov-Sharav M, Vinkler H, Malinger G. Automatic scanning of interphase FISH for prenatal diagnosis in uncultured amniocytes. Genet Test 2005;9(1):41-47.
- 61. Côté GB. Nuclear FISH: automation, analysis, and interpretation. Diagn Mol Pathol 2009;18(2):119-124.
- 62. Evans MI, Sharp M, Tepperberg J, Kilpatrick MW, Tsipouras P, Tafas T. Automated microscopy of amniotic fluid cells: detection of FISH signals using the FastFISH imaging system. Fetal Diagn Ther 2006;21(6):523-527.
- Nederlof PM, van der Flier S, Verwoerd NP, Vrolijk J, Raap AK, Tanke HJ. Quantification of fluorescence in situ hybridization signals by image cytometry. Cytometry 1992;13(8):846-852.
- 64. Lörch T, Piper J, Tomisek JD. "Tile sampling": a new metod for the automated quantitative analysis of samples with high cell density and its application to Her2 scanning. In Proceedings of The Third Euroconference on Quantitative Molecular Cytogenetics, Stockholm, Sweden, 2002;9-14.

- 65. Gué M, Messaoudi C, Sun JS, Boudier T. Smart 3D-FISH: automation of distance analysis in nuclei of interphase cells by image processing. Cytometry A 2005;67(1):18-26.
- 66. 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 A 2008;73A(3):259-265.
- 67. Pajor G, Somogyi L, Melegh B, Alpár D, Kajtár B, Farkas L, Kneif M, Bollmann D, Pajor L, Süle N. Urovysion: considerations on modifying current evaluation scheme, including immunophenotypic targeting and locally set statistically derived diagnostic criteria. Cytometry A 2011;79(5):375-382.
- Giltnane JM, Murren JR, Rimm DL, King BL AQUA and FISH analysis of HER-2/neu expression and amplification in a small cell lung carcinoma tissue microarray. Histopathology. 2006 Aug;49(2):161-9.
- Digitized mocroscopy in the diagnosis of bladder cancer: analysis of >3000 cases during a 7 month period Marganski WA, El-Sirgany Costa V V, Kilpatric MW, Tafas T, Yim J, Matthews M. Cancer Cytopathology 2011;119 (4):279-89.
- 70. http://www.ldgi-xcite.com/
- Kumar GL, Zucker RM. Fluorescence in situ hybridization (FISH) imaging. Chapter in Education Guide - Immunohistochemical (IHC) Staining Methods, fifth edition. DAKO, 2008;84p.
- 72. Theodosiou Z, Kasampalidis IN, Livanos G, Zervakis M, Pitas I, Lyroudia K. Automated analysis of FISH and immunohistochemistry images: a review. Cytometry A 2007;71(7):439-450.

- 73. Beucher S, Meyer F. The morphological approach to segmentation: The watershed transformation. In: Dougherty E, editor. Mathematical Morphology in Image Processing. New York: Marcel Dekker 1992;433–481.
- 74. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemeney L, Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, Sesterhenn IA, Tachibana M, Weider J.Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. Urology 2005;66:4-34.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011;61(2):69-90.
- 76. Morgan TM, Keegan KA, Clark PE. Bladder cancer. Curr Opin Oncol 2011;23(3):275-82.
- 77. Colombel M, Soloway M, Akaza H, Bohle A, Palou J, Buckley R, Lammg D, Brausi M, Alfred Witjes J, Persad R. Epidemiology, Staging, Grading, and Risk Stratification of Bladder Cancer european urology supplements 7 2008;618–626.
- 78. Khadra MH, Pickard RS, Charlton M, Powell PH, Neal DE. A prospective analysis of 1,930 patients with hematuria to evaluate current diagnostic practice. J Urol 2000;163(2): 524-7.
- 79. Yorukoglu K, Tuna B, Dikicioglu E, Duzcan E, Isisag A, Sen S, Mungan U, Kirkali Z.Reproducibility of the 1998 World Health Organization/International Society of Urologic Pathology classification of papillary urothelial neoplasms of the urinary bladder. Virchows Arch 2003;443(6):734-40.
- 80. Oosterhuis JW, Schapers RF, Janssen-Heijnen ML, Pauwels RP, Newling DW, ten Kate F. Histological grading of papillary urothelial carcinoma of the bladder: prognostic value of the 1998 WHO/ISUP classification system and comparison with conventional grading systems. J Clin Pathol 2002;55(12):900-905.

- 81. Cheng L, Montironi R, Davidson DD, Lopez-Beltran A. Staging and reporting of urothelial carcinoma of the urinary bladder. Mod Pathol 2009;22Suppl 2:S70-95.
- 82. Budman LI, Kassouf W, Steinberg JR. Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. Can Urol Assoc J 2008;2(3):212-21.
- Froom P, J. Froom and J. Ribak, Asymptomatic microscopic hematuria is investigation necessary? J Clin Epidemiol 1997;1197–1200.
- 84. Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS. Bladder cancer. Lancet. 2009;18;374(9685):239-49.
- 85. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, Murphy WM, Hautmann SH, Hemstreet GP 3rd, Bono AV, Getzenberg RH, Goebell P, Schmitz-Dräger BJ, Schalken JA, Fradet Y, Marberger M, Messing E, Droller MJ. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. Urology. 2005;66:35-63.
- 86. Lotan Y and Roehrborn CG. Cost-effectiveness of a modified care protocol substituting bladder tumor markers for cystoscopy for the followup of patients with transitional cell carcinoma of the bladder a decision analytical approach J Urol 2002;167:75.
- Olaf PJ Vrooman, Alfred Witjes J. Urinary Markers in Bladder Cancer. Eur Urol 2008;53:909.
- Fadl-Emula I. Chromosomal changes in uroepithelial carcinomas Cell Chromosome 2005;4:1.
- Fadl-Emula I, Gorunova L, Mandahl N, Elfving P, Lundgren R, Mitelman F, Heim S. Cytogenetic monoclonality in multifocal uroepithelial carcinomas: evidence of intraluminal tumor seeding. Br J Cancer 1999;81:6-12.
- 90. Berggren P, Kumar R, Sakano S, Hemminki L, Wanda T, Steineck G, Adolfsson J, Larsson P, Norming U, Wijkstrom H, Hemminki K Detecting homozygous deletion in

the CDKN2A (p16(INK4a))/ARF(p14(ARF)) gene in urinary bladder cancer using real time quantitative PCR. Clin Cancer Res 2003;9:235-242.

- 91. Obermann EC, Meyer S Hellge D, Zaak D, Filbeck T, Stoehr R, Hofstaedter F, Hartmann A, Knuechel R Fluorsecence in situ hybridization detects frequent chromosome 9 deletions and aneuploidy in histologically normal urotélium of bladder cancer patients. Oncol Rep 2004;11:745-751.
- 92. Cairns P, Evron E, Okami K, Halachmi N, Esteller M, Herman JG, Bose S, Wang SI, Parson R, Sidransky Point mutation and homozygous deletion of PTEN/MMAC1 in primary bladder cancer. Oncogene 1998;16:3215-3218
- 93. Galluci M, Guadagni F, Marzano R, Leonardo C, Merola R, Sentinelli S, Ruggeri EM, Cantiani R, Sperduti I, Lopez Fde L, Cianciulli AM Status of the p53, p16, RB1, and HER-2 genes and chromosomes 3, 7, 9 and 17 in advanced bladder cancer: corerlation with adjacent mucosa and pathological parameters. J Clinical Pathol 2005;58:367-371.
- 94. Abraham R, Pagano F, Gomella LG, Baffa R Chromosomal deletions in bladder cancer: shutting down pathways. Front Biosci 2007;12:826-838.
- 95. Panani AD, Roussos C Sex chromosome abnormalities in bladder cancer: Y polysomies are linked to PT1-grade III transitional cell carcinoma. Anticancer Res 2006;26:319-323.
- 96. Sandberg AA, Berger CS. Review if Chromosome studies in urological tumors. II. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. J Urol 1994;151(3):545-60.
- 97. Meloni AM, Pier AM, Haddad, FS Powel IJ, Block AW, Huben RP, Todd I, Potte W, Sandberg AA (): A new approach in the diagnosis and follow up of bladder cancer. FISH analysis of urine, bladder washings and tumors. Cancer Genet Cytogenet 1993;71:105-118.

- 98. Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, Burkhardt HM, Meyer RG, Seelig SA, King W. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma from uine. J. Mol Diagn 2000;2:116-123.
- 99. Sarosdy MF, Schellhammer P, Bokinsky G, Kahn P, Chao R, Yore L, Zadra J, Burzon D, Osher G, Bridge JA, Anderson S, Johansson SL, Lieber M, Soloway M, Flom K. Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. J Urol 2002;168:1950-1954.
- 100. Sarosdy MF, Kahn PR, Ziffer MD, Love WR, Barkin J, Abara EO, Jansz K, Bridge JA, Johansson SL, Persons DL, Gibson JS. Use of a multitarget fluorescence in situ hybridazition assay to diagnose bladder cancer in patients with hematuria. J Urol 2006;176:44-47.
- Hajdinjak T. Urovysion FISH test for detecting urothelial cancer: metaanalysis of diagnostic accuracy and comparison with urinary cytology testing. Urol Oncol 2008;26(6):646-651.
- 102. Skacel M., J. D. Pettay E. K. Tsifitsakis G. W. Procop, C. V. Biscotti, and R. R. Tubbs. Validation of multicolor interphase fluorescence in situ hybridization assay for detection of transitional cell carcinoma on fresh and archival thin-layer, liquid based cytology slides. Anal Quant Cytol Histol 2001;23(6):381–387.
- 103. Bubendorf L., B. Grilli, G. Sauter, M. J. Mihatsch, T. C. Gasser, and P. Dalquen. Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings. Am J Clin Pathol 2001;116(1):79–86.
- 104. Veeramachaneni, R., M. L. Nordberg, R. Shi, M. L. Herrera, and E. A. Turbat-Herrera. Evaluation of fluorescence in situ hybridization as an ancillary tool to urine cytology in diagnosing urothelial carcinoma. Diagn Cytopathol 2003;28(6):301–307.
- 105. Halling KC, King W, Sokolova IA, Karnes RJ, Meyer RG, Powell EL, Sebo TJ, Cheville JC, Clayton AC, Krajnik KL, Ebert TA, Nelson RE, Burkhardt HM, Ramakumar S, Stewart CS, Pankratz VS, Lieber MM, Blute ML, Zincke H, Seelig SA,

Jenkins RB, O'Kane DJ. A comparison of BTA Stat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis OroVysion assays for the detection of urothelial carcinoma in urine. J Urol 2002;167(5):2001–2006.

- 106. Friedrich MG, Toma MI, Hellstern A, Pantel K, Weisenberger DJ, Noldus J, Huland H. Comparison of multitarget fluorescence in situ hybridization in urine with other noninvasive tests for detecting bladder cancer. BJU Int 2003;92(9):911–914.
- 107. Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, Pettay JD, Biscotti CV, Liou LS, Procop GW, Jones JS, Ulchaker J, Zippe CD, Tubbs RR. Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology. J Urol 2003;169(6):2101–2105.
- 108. Marín-Aguilera M, Mengual L, Ribal MJ, Musquera M, Ars E, Villavicencio H, Algaba F, Alcaraz A. Utility of fluorescence in situ hybridization as a non-invasive technique in the diagnosis of upper urinary tract urothelial carcinoma. Eur Urol 2007;51(2):409–415.
- 109. Zellweger T, Benz G, Cathomas G, Mihatsch MJ, Sulser T, Gasser TC, Bubendorf L. Multi-target fluorescence in situ hybridization in bladder washings for prediction of recurrent bladder cancer. Int J Cancer 2006;119(7):1660–1665.
- 110. Ferra S., R. Denley, H. Herr, G. Dalbagni, S. Jhanwar, and O. Lin . Reflex UroVysion testing suspicious urine cytology cases. Cancer Cytopathol 2009;117(1):7–14.
- 111. Sullivan PS, Nooraie F, Sanchez H, Hirschowitz S, Levin M, Rao PN, Rao J. Comparison of Immunocyt, UroVysion, and urine cytology in detection of recurrent urothelial carcinoma: a split sample study. Cancer Cytopathol 2009;117(3):167–173.
- 112. Lotan Y and Roehrborn CG. Cost-effectiveness of a modified care protocol substituting bladder tumor markers for cystoscopy for the followup of patients with transitional cell carcinoma of the bladder a decision analytical approach. J Urol 2002;167:75.

- 113. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, Murphy WM, Hautmann SH, Hemstreet GP 3rd, Bono AV, Getzenberg RH, Goebell P, Schmitz-Dräger BJ, Schalken JA, Fradet Y, Marberger M, Messing E, Droller MJ. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. Urol 2005;66:35.
- 114. Gudjónsson S, Isfoss BL, Hansson K, Domanski AM, Warenholt J, Soller W, Lundberg LM, Liedberg F, Grabe M, Månsson W. The Value of the UroVysion<sup>®</sup> Assay for Surveillance of Non–Muscle-Invasive Bladder Cancer. Eur Urol 2008;54:402.
- 115. Riesz P, Lotz G, Páska C, Szendrôi A, Majoros A, Németh Z, Törzsök P, Szarvas T, Kovalszky I, Schaff Z, Romics I, Kiss A. Detection of Bladder Cancer from the Urine using Fluorescence in situ Hybridization Technique. Pathol Oncol Res. 2007;13:187.
- 116. Bubendorf L. Editorial comment on: the value of the UroVysion assay for surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. Eur Urol. 2008;54(2):407-408.
- Pycha A. Editorial comment on: the value of the UroVysion assay for surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. Eur Urol. 2008;54(2):408.
- 118. Daniely M, Rona R, Kaplan T, Olsfanger S, Elboim L, Zilberstien Y, Friberger A, Kidron D, Kaplan E, Lew S, Leibovitch I. Combined analysis of morphology and fluorescence in situ hybridization significantly increases accuracy of bladder cancer detection in voided urine samples. Urology 2005;66(6):1354-1359.
- 119. Marín-Aguilera M, Mengual L, Ribal MJ, Burset M, Arce Y, Ars E, Oliver A, Villavicencio H, Algaba F, Alcaraz A. Utility of a multiprobe fluorescence in situ hybridization assaay in the detection of superficial urothelial bladder cancer. Cancer Genet Cytogen 2007;173:131.
- 120. Zellweger T, Benz G, Cathomas G, Mihatsch MJ, Sulser T, Gasser TC, Bubendorf L. Multi-target fluorescence in situ hybridization in bladder washings for prediction of recurrent bladder cancer. Int J Cancer 2006;119:1660.

- 121. Kipp BR, Tanasescu M, Else TA, Bryant SC, Karnes RJ, Sebo TJ, Halling KC. Quantitative fluorescence in situ hybridization and its ability to predict bladder cancer recurrence and progression to muscle-invasive bladder cancer. J Mol Diagn 2009;11:148.
- 122. Alpar D, Hermesz 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
- 123. Moore DH 2nd, Epstein L, Reeder J, Wheeless L, Waldman FM. Interlaboratory variability in fluorescence in situ hybridization analysis. The NCI Bladder Tumor Marker Network. Cytometry 1996;25:125.
- 124. www.dsmz.de (DSMZ no.: ACC 397)
- 125. Richard M. DeMay. The Art & Science of Cytopathology. ASCP Press 1996;Chapt.10:392.
- Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, Matos T, Cordon-Cardo C. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. Urol Oncol. 2010;28(4):401-8.
- 127. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. Histochem Cell Biol 2008;129(6):705-33.
- 128. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell 1982;31:11.
- 129. Schaafsma H.E., Ramaekers F.C. Cytokeratin subtyping in normal and neoplastic epithelium: Basic principles and diagnostic applications. Pathol Annu 1994;29:21.
- 130. Kevin C. Halling UroVysion Testing for the Detection of Bladder Cancer. Meeting of the College of American Pathologists. (CAP) Education by the Experts 2007.

- 131. Dewald G, Stallard R, Al Saadi A, Arnold S, Bader PI, Blough R, Chen K, Elejalde BR, Harris CJ, Higgins RR, Hoeltge GA, Hsu WT, Kubic V, McCorquodale DJ, Micale MA, Moore JW, Phillips RM, Scheib-Wixted S, Schwartz S, Siembieda S, Strole K, VanTuinen P, Vance GH, Wiktor A, Zinsmeister A. A multicenter investigation with interphase fluorescence in situ hybridization using X- and Y-chromosome probes. Am J Med Genet 1998;76:318.
- 132. Michelle D Reid-Nicholso, Preetha Ramalingam, Bamidele Adeagbo, Ningli Cheng, Stephen C Peiper and Martha K Terris. The use of Urovysion fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and surveillance of non-urothelial carcinoma of the bladder. Mod Pathol 2009;22:119.
- 133. Chuang KL, Chuang HC, Ng KF, Chang YH, Wu CT, Chuang CK, Liao SK, Pang ST. Urinary fluorescence in situ hybridization assay for detecting urothelial carcinoma in Taiwanese patients. BJU Int 2010;105:1413.
- Halling KC., Kipp B.R.: Bladder cancer detection using FISH (UroVysion assay). Adv Anat Pathol 2008;15:279.
- 135. Blandin AT, Mühlematter D, Bougeon S, Gogniat C, Porter S, Beyer V, Parlier V, Beckmann JS, van Melle G, Jotterand M. Automated four-color interphase fluorescence in situ hybridization approach for the simultaneous detection of specific aneuploidies of diagnostic and prognostic significance in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet Cytogenet 2008;186(2):69-77.
- 136. Carrell DT. The clinical implementation of sperm chromosome aneuploidy testing: pitfalls and promises. J Androl 2008;29(2):124-133.
- 137. Erlecke J, Hartmann I, Hoffmann M, Kroll T, Starke H, Heller A, Gloria A, Sayer HG, Johannes T, Claussen U, Liehr T, Loncarevic IF. Automated detection of residual cells after sex-mismatched stem-cell transplantation - evidence for presence of diseasemarker negative residual cells. Mol Cytogenet 2009;2:12.

- 138. Johnson KL, Stroh H, Khosrotehrani K, Bianchi DW. Spot counting to locate fetal cells in maternal blood and tissue: a comparison of manual and automated microscopy. Microsc Res Tech 2007;70(7):585-588.
- 139. Kozubek M, Kozubek S, Lukasova E, Mareckova E, Bartova E, Skalnikova M, Jergova A. High-resolution cytometry of FISH dots in interphase cell nuclei. Cytometry 1999;36:279-293.
- 140. Martín-Subero JI, Chudoba I, Harder L, Gesk S, Grote W, Novo FJ, Calasanz MJ, Siebert R. Multicolor-FICTION: expanding the possibilities of combined morphologic, immunophenotypic, and genetic single cell analyses. Am J Pathol 2002;161(2):413-20.
- 141. Netten H, Young IT, van Vliet LJ, Tanke HJ, Vroljik H, Sloos WC.FISH and chips: automation of fluorescent dot counting in interphase cell nuclei. Cytometry 1997;28(1):1-10.

# 9 Közlemények gyűjteménye

### 9.1 Az értekezés alapját képező közlemények

#### 9.1.1 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

#### 9.1.2 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

### 9.2 Egyéb 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, Hermesz 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. *I.F.:* 1,479

Impakt faktor:10,079

Impakt faktor összesen: 21,030