

# Új klonalitásvizsgálat a T-sejt-receptor béta-láncának konstans-1 és -2 régiójára specifikus antitestek használatával T-sejtes lymphoproliferációkban

Forró Barbara<sup>1D</sup> ▪ Vida Livia dr.  
Kereskai László dr. ▪ Lacza Ágnes ▪ Jáksó Pál dr.

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Klinikai Központ, Patológiai Intézet, Pécs

**Bevezetés:** A T-sejt-receptor-klonalitás vizsgálata régóta alkalmazott rutin diagnosztikai módszer T-sejtes lymphoproliferációkban, amely a T-sejt-receptor génátrendeződésének vizsgálatán alapul. Előnye a klonalitás molekuláris igazolása, hátránya azonban – az áramlási citometriához képest – a kisebb érzékenység, a viszonylag hosszú vizsgálati időtartam, valamint az, hogy nem ad fenotípusos információt. A T-sejt-receptor-klonalitás vizsgálata egy új, nemzetközi ajánlás szerinti áramlási citometriai módszerrel is végezhető. Ilyen egyszerűsített és hatékony megközelítés korábban nem állt rendelkezésre a rutin klinikai diagnosztikában.

**Célkitűzés:** Célunk az irodalomban leírt legújabb ajánlás alapján a T-sejt-receptor konstans  $\beta$ -láncához tervezett antitestek együttes használata során szerzett tapasztalatok gyűjtése és azok összevetése a polimeráz-láncreakciót alkalmazó génátrendeződés-vizsgálatok eredményeivel.

**Módszer:** A vizsgálat alapja a T-sejt-receptor konstans  $\beta$ -láncához tervezett, fluoreszcens festékkel konjugált kétféle monoklonális antitest alkalmazása, amelyek – a B-sejtes neoplasiák diagnosztizálásakor használatos kappa-lambda immunoglobulin-könnyűláncok vizsgálatához hasonlóan – a normál expressziós arányoktól való eltéréseken alapul.

**Eredmények:** Az 54 mintából 20 esetben lymphoproliferatív betegség nem volt kimutatható, 11 esetben találtunk klonális populációt, amelyek jó összhangban voltak a konvencionális vizsgálati módszer eredményeivel. Egyéb 23 esetben találtunk kisebb fenotípusos eltéréseket, sejtarány-eltolódásokat, minor monoklonális populáció jelenlétét.

**Megbeszélés és következtetés:** Az 54 minta eredményei alapján elmondható, hogy a vizsgálat nemcsak egyértelmű T- és NKT-sejtes klónoknak, hanem minor klonális populációknak az azonosítására is alkalmas, és számos esetben lehetővé teszi a T-sejtes kórképek gyorsabb diagnózisát.

Orv Hetil. 2026; 167(15): 576–584.

**Kulcsszavak:** T-sejt-klonalitás, T-sejt-receptor, T-sejt-receptor-génátrendeződés, áramlási citometria

## Novel T-cell clonality assessment using T-cell receptor beta constant region 1 and 2 antibodies in T-cell lymphoproliferative disorders

**Introduction:** T-cell receptor clonality testing is a routine diagnostic method based on the detection of T-cell receptor gene rearrangements. Its advantage is the molecular confirmation of clonality, but its disadvantage – compared to flow cytometry – is the lower sensitivity, the actual long testing duration, and the lack of phenotypic information. More recently, T-cell receptor clonality testing can also be performed using a new, internationally recommended flow cytometry method. A simplified and efficient approach was previously not available in routine clinical diagnostics.

**Objective:** Our aim was to collect the experiences gained from the combined use of antibodies designed for the constant beta-chain of the T-cell receptor based on the latest recommendations described in the literature and to compare them with the results of conventional T-cell receptor clonality testing method.

**Method:** The test is based on the use of two types of monoclonal antibodies conjugated with a fluorescent dye designed for the constant beta-chain of the T-cell receptor and investigates the deviations from normal expression ratios, similar to the testing of kappa-lambda immunoglobulin light chains used in the diagnosis of B-cell neoplasias.

**Results:** Among the 54 samples analyzed, no lymphoproliferative disorder was detected in 20 cases. In 11 cases, a clonal population was identified, showing good concordance with the results of conventional diagnostic methods. In the remaining 23 cases, minor phenotypic abnormalities, shifts in cell population ratios, and the presence of minor monoclonal populations were observed.

*Discussion and conclusion:* Based on the results of the 54 samples, the test proved to be suitable not only for the identification of clear T and NKT cell clones, but also for the identification of minor clonal populations, furthermore, it may offer faster diagnosis of T-cell diseases.

**Keywords:** T-cell clonality, T-cell receptor, T-cell gene rearrangement, flow cytometry

Forró B, Vida L, Kereskai L, Lacza Á, Jáksó P. [Novel T-cell clonality assessment using T-cell receptor beta constant region 1 and 2 antibodies in T-cell lymphoproliferative disorders]. *Orv Hetil.* 2026; 167(15): 576–584.

(Beérkezett: 2026. január 19.; elfogadva: 2026. február 18.)

### Rövidítések

AF700 = alexa fluor 700; AIHA = autoimmun haemolytic anaemia; APC = allophycocyanin; APC-Vio770 = allophycocyanin-vio770; BV421 = brilliant violet 421; BV510 = brilliant violet 510; BV605 = brilliant violet 605; BV711 = brilliant violet 711; CD = (cluster of differentiation) differenciációs klaszter; DNS = dezoxiribonukleinsav; FITC = fluorescein isothiocyanate; Ig = immunoglobulin; KB520 = kiravia blue 520; MHC = (major histocompatibility complex) fő hisztokompatibilitási komplex; NKT = (natural killer T) természetes ölésejt; PBS = (phosphate-buffered saline) foszfáttal puffertelt sóoldat; PCR = (polymerase chain reaction) polimeráz-láncreakció; PE = phycoerythrin; PE-Cy7 = phycoerythrin-cyanine 7; PE-Dazzle 594 = phycoerythrin-dazzle 594; PerCP = peridinin chlorophyll protein; PerCP Vio700 = Peridinin-chlorophyll protein-Vio700; Spark NIR 685 = Spark Near Infrared 685; SSC = (side scatter) oldalirányú fényszórás; TCR = (T-cell receptor) T-sejt-receptor; TCRG = T-sejt-receptor- $\gamma$ -lánc; T-LGL = (T-cell large granular lymphocyte) T-sejtes nagy granulális lymphocyt; TRBC = (TCR beta constant region) a TCR-béta konstans régiója

T-sejt-receptoroknak (TCR) a T-sejtek felszínén található antigénfelismerő fehérjestruktúrákat nevezzük, amelyek azok membránjában nyolc polipeptidláncból álló komplexet alkotnak. Az extracelluláris MHC-antigénkomplexeket felismerő egységek emberben túlnyomórészt  $\alpha$ - $\beta$ - (90%) ( $\alpha\beta$ -TCR-) és részben (1–10%)  $\gamma$ - $\delta$ -láncokból álló ( $\gamma\delta$ -TCR-) receptorok. Szerkezetileg hasonlóak, mindkét típus tartalmaz egy membrántól távolabb eső variábilis (V) szakaszt, illetve egy membránhoz közel eső konstans (C) domént. Ez utóbbit egy rövid, 20–24 aminosavat tartalmazó transzmembrán szakasz köti a sejtmembránhoz. Lényeges különbség van a két típus között a V domén variabilitásának mértéke és az azt kialakító genetikai mechanizmusok tekintetében [1, 2].

A TRC-ek sokféleségét a TCR-génátrendeződés biztosítja. A TCR-gének szomatikus átrendeződései nagyban hasonlítanak a B-sejtek membránján található antigénfelismerő receptorokat kódoló gének szerveződéséhez. Az Ig-gének szegmentumaihoz hasonlóan a TCR  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -láncjai is tartalmaznak variábilis (V), diverzitás (D), kisebb kapcsolódási (J-joining) és konstans (C) régiós géneket egyaránt. E génszegmentumok véletlenszerű egymás mellé kerülése, a V(D)J-rekombináció fog-

ja kialakítani az adott génhelyről származó funkcionális exont és egyben a TCR-ek variábilis régióinak sokféleségét [2].

Leukaemiák és egyes T-sejtes lymphoproliferációk esetén azonos átrendeződést hordozó génszakaszokat tartalmazó, vagyis klonális TCR-rel rendelkező populációkat lehet azonosítani. A különböző T-sejtes lymphoproliferatív rendellenességek diagnózisa citológiai és/vagy immunfenotípusos kóros T-sejt-populációk azonosításán alapul, összefüggésben a klinikai eredményekkel és a kiegészítő laboratóriumi vizsgálatokkal. A perifériás vérben felbukkanó atipikus T-sejt-populáció magabiztos értelmezése T-sejtes daganatok diagnosztizálásában azonban gyakran kihívást jelent, tekintettel arra, hogy hasonló atipikus T-sejt-alcsoportok sok esetben előfordulhatnak reaktív körülmények között is. Ezenkívül egyes leukaemiás T-sejtes neoplasiák nem mindig bírnak nyilvánvaló immunfenotípusos eltérésekkel és/vagy meggyőző, citológiai rendellenes képpel, amely egyértelműen alátámasztaná a diagnózist.

A TCR-klonalitás vizsgálata régóta használatos rutin diagnosztikai módszer, amelynek alapja a TCR-génátrendeződés vizsgálata (a legtöbb esetben a  $\gamma/\delta$  szegmentumok) multiplex PCR, majd kapilláris gélelektroforézis segítségével. A vizsgálat előnye a klonalitás molekuláris bizonyítéka, hátránya, hogy az eredmény nem minden esetben egyértelmű, kis mennyiségű monoklonális T-sejtet nem tud azonosítani poliklonális T-sejtek háttérben, továbbá a relatív hosszú vizsgálati időtartam (1–2 nap), valamint hogy ez a módszer nem ad információt a populáció immunfenotípusáról [3, 4].

TCR-klonalitás-vizsgálatot áramlási citometriával is végezhetünk. Ilyen egyszerűsített és hatékony megközelítés korábban nem állt rendelkezésre a T-sejtek analízisére a rutin klinikai diagnosztikában. A vizsgálat alapja két, a TCR konstans  $\beta$ -láncához (TRBC) tervezett fluorescens festékekkel konjugált monoklonális antitest, amelyek közül a TRBC1 izoformára specifikus antitest már korábban jelen volt az áramlási citometriai laborok számára, azonban a TRBC2 izoformára specifikus antitest csak 2024-ben lett elérhető a rutindiagnosztikában. A módszer a B-sejtes neoplasiák diagnosztizálásakor használatos kappa-lambda immunoglobulin-könnyűláncok vizsgálatához hasonlatos [5, 6], és a normál expressziós arányoktól való eltéréseken alapul.

Célunk az irodalomban leírt legújabb ajánlás alapján a TRBC1 és TRBC2 antitestek együttes használata során szerzett tapasztalatok gyűjtése és azok összevetése a PCR-rel vizsgált génátrendeződések eredményeivel.

## Módszer

### Betegminták

A minták és adatok gyűjtése és kezelése a Pécsi Tudományegyetem Regionális Etikai Bizottságának felhatalmazásával történt (az adatgyűjtési engedély száma: KK/576-1/2025). A munka megfelel a Helsinki Deklaráció előírásaiban foglaltaknak. A vizsgált pácienskohorsz 54 esetet tartalmazott, a demográfiai megoszlás 48 év és 85 év közötti, az átlagéletkor 67 év volt. Három betegcsoportot vizsgáltunk. 1) Az első csoportba olyan betegek tartoztak, akiknél a feltételezett klinikai diagnózis valamilyen T-sejtes lymphoproliferatív betegség volt, amelyet hematopatológiai vizsgálatok nem igazoltak ( $n = 20$ ). A demográfiai megoszlás 1 év és 84 év közötti, az átlagéletkor 42,5 év volt. 2) A második csoportban a TCR-PCR alapján klonális diagnózisú betegek ( $n = 11$ ) demográfiai megoszlása 48–85 közötti, az átlagéletkor 68,5 év volt. 3) A harmadik csoportban szintén valamilyen feltételezett klinikai diagnózissal érkező páciens eredményei szerepelnek ( $n = 23$ ), amelyekben minimális T-sejtes fenotípusos eltérést, CD4/CD8 arány eltolódást, minor T-, NKT-sejt-klónt vagy eosinophiliát mutattunk ki. A csoport demográfiai megoszlása 14 és 89 év közötti, átlagéletkora 55 év volt.

**1. táblázat** | A táblázat tartalmazza a vizsgálatban használt monoklonális antitestek nevét, és a fluoreszcens jelölőanyag (fluorokróm) típusát, két különböző készüléken alkalmazva. A fluorokróm nevei rövidítve szerepelnek, azok teljes nevei a „Rövidítések” fejezetben találhatóak meg

Antitest	Fluoreszcens festék (Cytek Northern Lights)	Fluoreszcens festék (Beckman Coulter Navios)
CD4	Brilliant Violet 421	PE-Cy7
DNS-festék	Syto41	Syto41
CD8	Brilliant Violet 510	Brilliant Violet 510
CD56	Brilliant Violet 605	Kiravia Blue 520
CD20	Brilliant Violet 711	
CD16	FITC	FITC
TRBC-1	PE	PE
CD3	PE-Dazzle 594	PE-Dazzle 594
CD45	PerCP	CD45-PerCP-Vio700
TRBC-2	APC	APC
CD7	Spark NIR 685	
CD2	AF700	AF700
CD5	APC-Vio770	APC-Vio770

### Minták előkészítése áramlási citometriához

A csontvelő-aspirátumból származó és a perifériás vérmintákat alvadásgátló (BD Vacutainer à EDTA) csövekben kaptuk. A mintákból a fluoreszcens jelöléshez 50  $\mu$ l térfogatban, 500 000 db fehérvérsejtet használtunk. Magas fehérvérsejtszám esetén foszfáttal puffertelt sóoldattal (PBS) hígítottunk. Ezt követően a mintákat fluoreszcensen konjugált antitestekkel jelöltük, és 15 percig szobahőmérsékleten, fénytől védve inkubáltuk. A T-sejtek analízisére a két készülékhez megfelelően optimalizált antitestpanelt állítottunk össze, amelyet az 1. táblázat tartalmaz. A vörösvértestlízist és a sejtfixálást a gyártó ajánlása szerint végeztük, röviden: Excellyse I lizáló puffert (Exbio, Prága, Csehország) adtunk a mintákhoz, inkubáltuk 2–3 percig, majd desztillált vízzel hígítva további 10 percig inkubáltuk. A mintákat szobahőmérsékleten, 400  $g$ -vel 5 percig centrifugáltuk, és a pelletet 500  $\mu$ l PBS-ben felfuszpendáltuk. Végül Syto 41 (S41) DNS-festéket (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) adtunk hozzá, és 2 percig inkubáltuk. A mérések során – amelyeket Beckman Coulter (Brea, CA, USA) Navios konvencionális és Cytek (Fremont, CA, USA) Northern Lights spektrális áramlási citométer segítségével végeztünk –  $1 \times 10^5$  S41-pozitív fehérvérsejt begyűjtésére törekedtünk. Az adatok elemzése a Navios készüléken mért minták esetén Flowjo (9.8.5. verzió), míg a Northern Lights készüléken mért minták esetén Kaluza C (1.2.1) szoftverrel történt.

### A kiértékelés menete

A T-sejt-klonalitás vizsgálatát többszínű áramlási citometriával végeztük, amely lehetővé teszi a különböző T-sejt-szubpopulációk részletes fenotípusos jellemzését. A Syto41 DNS-festék alkalmazása lehetővé teszi az intact sejtes elemek és a sejttörmelékek elkülönítését, míg a CD45-expresszió és a sejtek granularitása (SSC) alapján a különböző fehérvérsejt-populációk differenciálása történik.

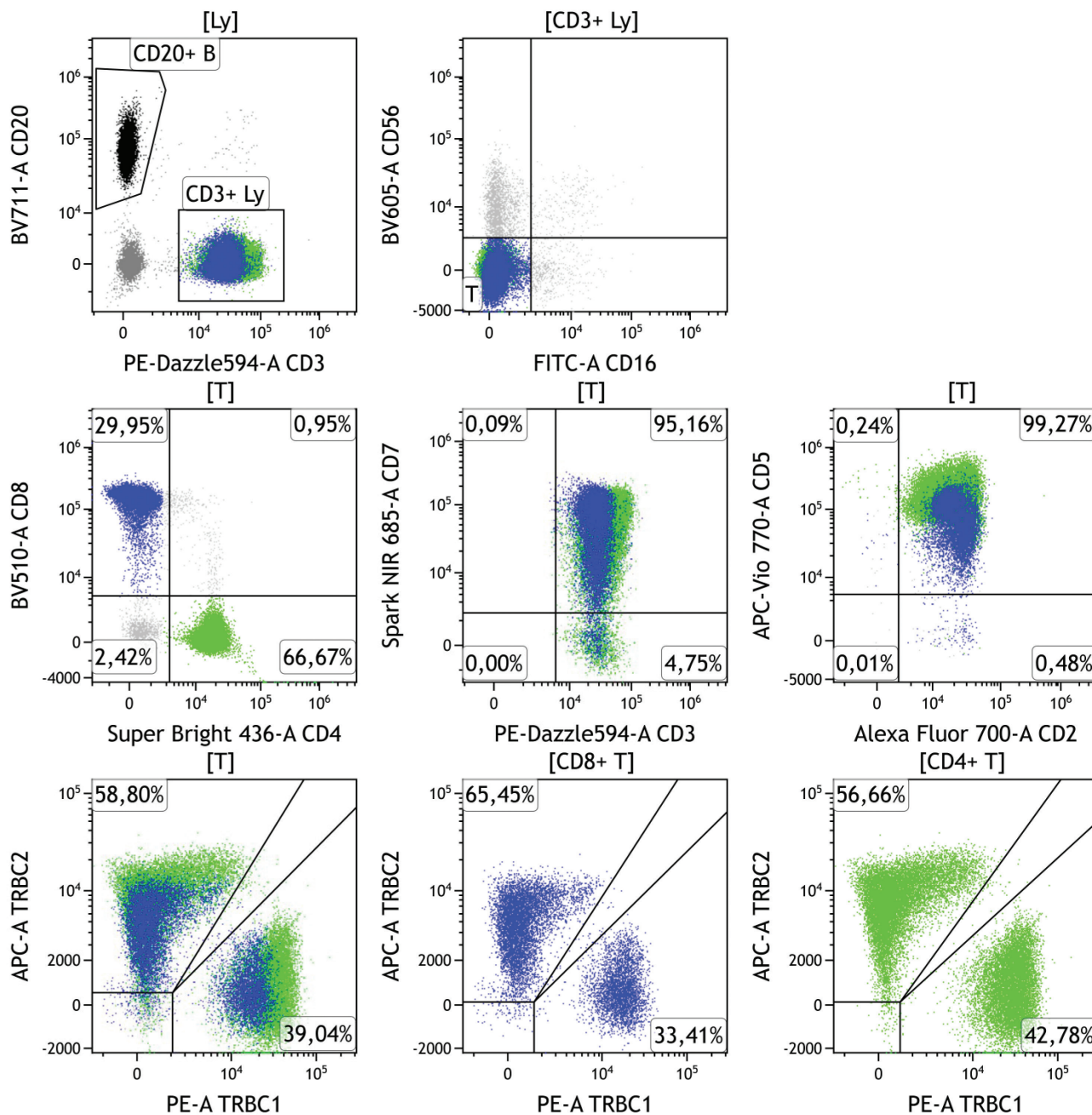
A panelben szereplő markerek (CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7) lehetővé tették a fő T-sejt-szubpopulációk (citotoxikus-, helper-T, NKT) azonosítását, a természetes ölősejtekhez (NK-sejtek) kapcsolódó fenotípusú sejtek (CD16, CD56) elkülönítését, valamint a B-sejtek (CD20) szeparálását. A TCR- $\beta$ -lánc konstans régiójára specifikus antitestek (TRBC1, TRBC2) együttes alkalmazása biztosította a klonalitás vizsgálatát. Az expressziós mintázatokat fluoreszcenciaintenzitás alapján, felhőképek segítségével értékeltük, amelyek szemléletesen ábrázolják a különböző szubpopulációk eloszlását és a klonalitási viszonyokat. A klonalitás meghatározásához szükséges küszöbértékeket a korábbi irodalmi adatok alapján határoztuk meg. A jelen vizsgálatban ennek megfelelően a klonalitás kritériumát >85%-os TRBC1-vagy TRBC2-pozitivitás, illetve az ezzel ekvivalens TRBC2/TRBC1 arány (<0,18 vagy >5,7) jelentette [5].

*A T-sejt-receptor-génátrendeződés vizsgálata*

A vér- vagy csontvelőmintákból a DNS-izolálást QIAamp DNA FFPE Tissue Kittel (QIAGEN, Venio, Hollandia) végeztük a gyártói protokoll szerint. A DNS mennyiségét Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) spektrofotométerrel határoztuk meg, a PCR-reakciókhoz 200 ng genomikus DNS-t használtunk mintánként. A DNS-mintákat felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

A T-sejt-receptor- $\gamma$ -lánc (TCRG) génátrendeződéseinek kimutatását multiplex PCR-módszerrel végeztük a

*Trainor és mtsai* által leírt eljárás alapján, a V és J régiókat felismerő, családspecifikus primerek (forward primerek: V2, V3, V4, V8, V9 és reverz primerek: JGT12, JGT3 és JGT4) segítségével. A PCR-elegy összterfoga 25  $\mu$ l volt, AmpliTaq Gold 360 Master Mixet (Thermo Fisher Scientific) – a gyártó leírása szerint – és egyenként 5 pmol primereket és a fenti mennyiségű templát DNS-t tartalmazott. A PCR-reakció Genesys 96T PCR Thermal Cycler (Tianlong, Zhenjiang, Kína) készülékben futott, 95 °C, 2 perc elődenaturálás után 35 cikluson keresztül (denaturálás: 94 °C 1 perc, annealing: 58 °C 1 perc,



1. ábra | A perifériás vér lymphocytáinak többparaméteres áramlási citometriás vizsgálata. A felső dot plotok a B- (CD20<sup>+</sup>) és T-sejtek (CD3<sup>+</sup>), valamint a CD16/CD56 expressziójának megoszlását mutatják. A középső dot plotok a fő T-sejt-markerek (CD4, CD8, CD7, CD5, CD2) eloszlását, míg az alsók a TRBC1/TRBC2 poliklonális mintázatát ábrázolják a teljes, illetve a CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> T-sejt-populációban  
CD = differenciációs klaszter; TRBC = a T-sejt-receptor-béta konstans régiója

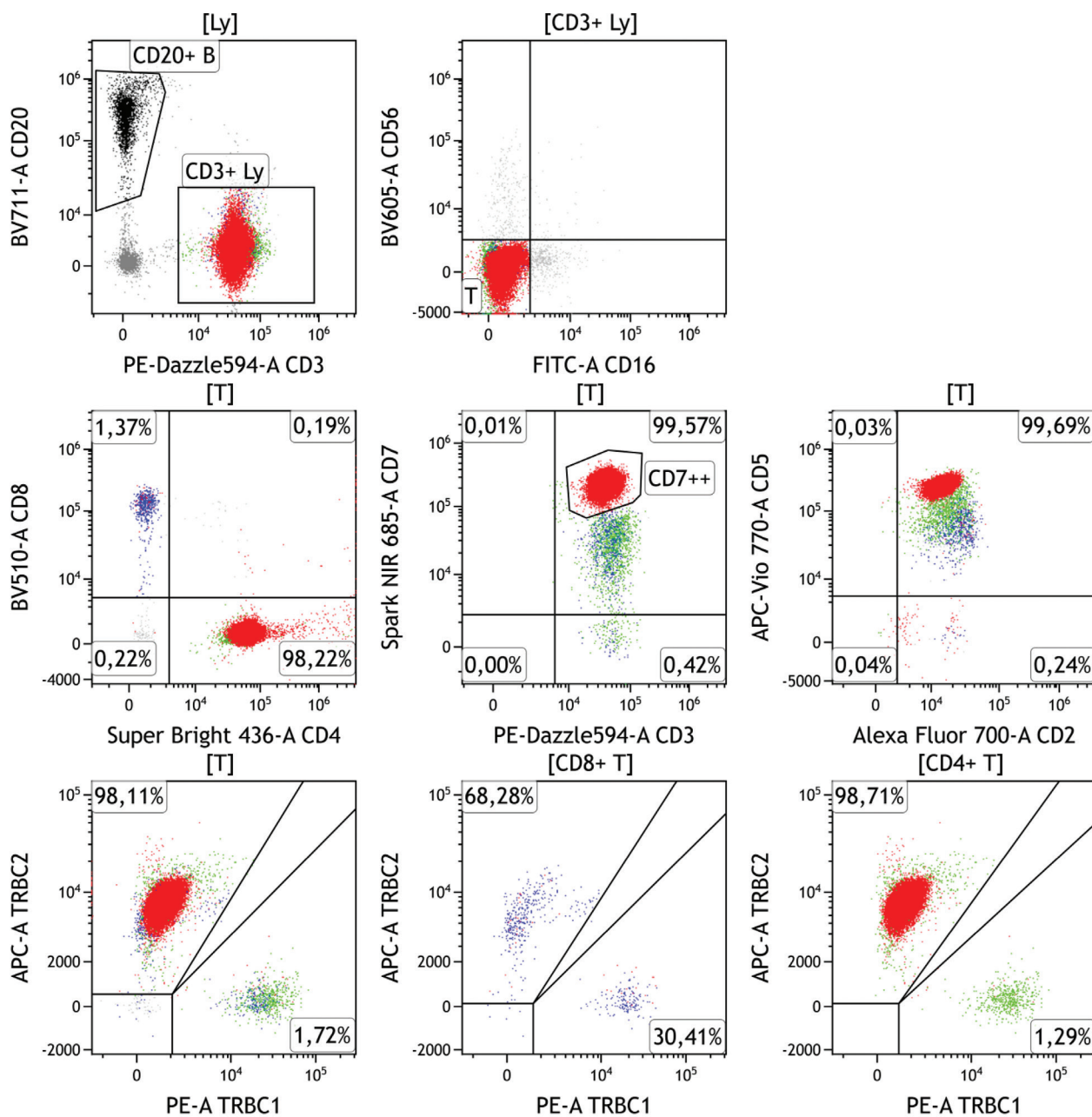
elongáció: 72 °C 1 perc), amit egy végső elongációs lépés (72 °C, 5 perc) követett. A PCR-termékek detektálása fragmentanalízissel történt fluoreszcensen jelölt reverz primerek és molsúlymarker használatával SeqStudio Genetic Analyzer Instrument (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) készüléken.

Az elektroferogramok kiértékelését GeneMapper (Applied Biosystems) szoftverrel végeztük; klonális átrendeződés esetén egy vagy néhány éles, jól elkülönülő csúcs, míg poliklonális T-sejt-populáció esetén széles, Gauss-görbe-szerű eloszlás volt látható a várt mérettartományban (180–230 bp) [6].

## Eredmények

*Az első csoportra vonatkozó eredmények bemutatása (lymphoproliferatív betegség nem volt igazolható)*

Egy reprezentatív minta (1. ábra) analízise során a vizsgált lymphocytapopulációk immunfenotípusa a normális megoszlásnak megfelelő eredményt mutatott. A T-sejtmarkerek normálisnak tekintett expressziós mintázatot mutattak, valamennyi szubpopuláció a fiziológiás arányoknak megfelelően volt azonosítható. A CD16 és



2. ábra A perifériás vérből származó mintában CD3<sup>+</sup>, CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD5<sup>++</sup>, CD7<sup>++</sup> immunfenotípusú, TRBC2-domináns klonális T-prolymphocytás leukaemiás populáció ábrázolódik, amelynek jelenlétét a TCR-génátrendeződés vizsgálata is megerősítette

CD = differenciációs klaszter; TCR = T-sejt-receptor; TRBC = a TCR-béta konstans régiója

CD56 markerek az NK-sejtek élettani szintű előfordulását tükrözték. A TRBC1- és TRBC2-expresszió kiegyensúlyozottsága a TCR-repertoár poliklonális jellegét támasztotta alá. A 20 mintában a TRBC2/TRBC1 arányok megoszlása a CD4<sup>+</sup> T-sejteken belül a 0,96–4,3 közötti, a CD8<sup>+</sup> T-sejteken belül a 0,87 és 5,38 közötti tartományban volt. Mediánértékük 1,57 volt a CD4<sup>+</sup> és 1,96 a CD8<sup>+</sup> T-sejt-populáció esetén.

*A klonális T-sejtes kórképekre vonatkozó eredmények bemutatása*

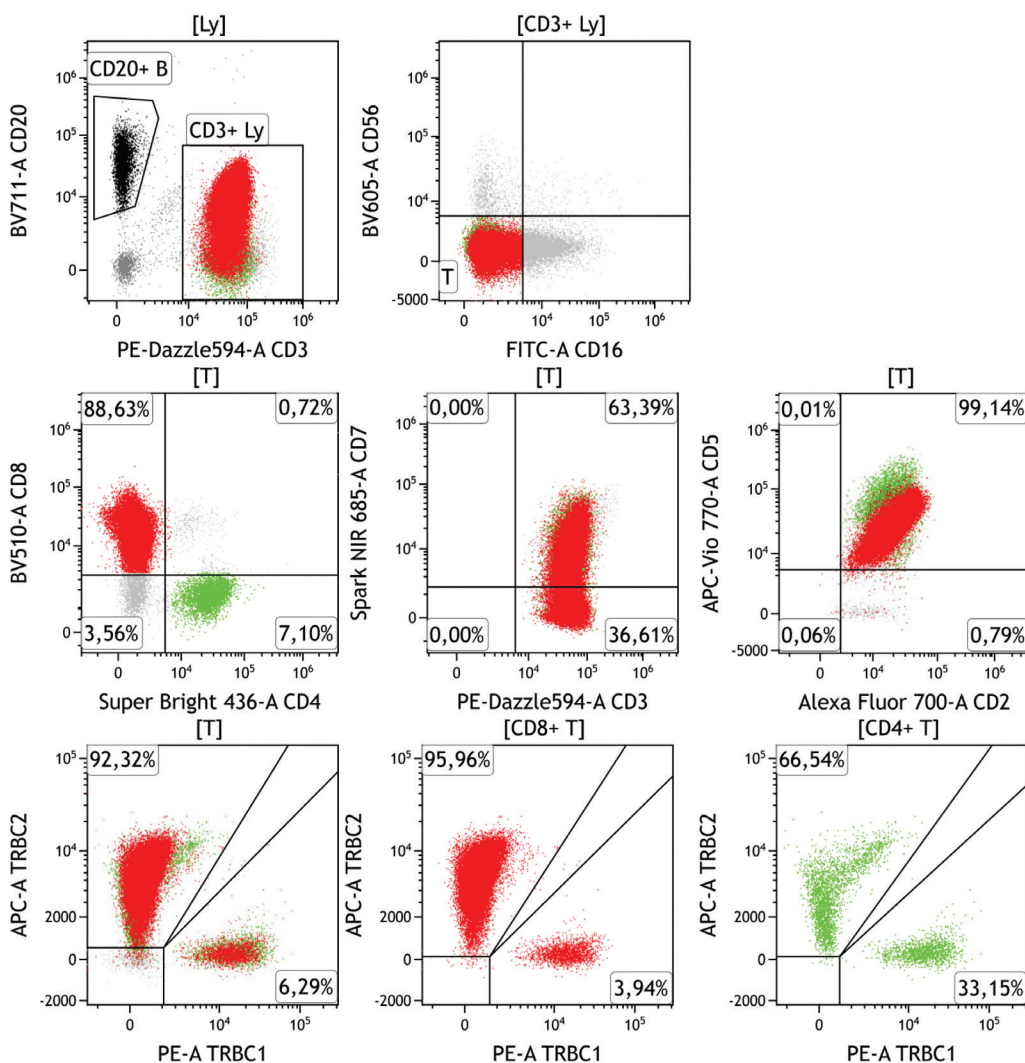
**Klonalitás kimutatása egy reprezentatív T-prolymphocytás leukaemiás (T-PLL) eseten a klonális csoportból (2. ábra)**

Egy 79 éves nőbeteg perifériás vérében észlelt lymphocytosis miatt vizsgáltak. Az első áramlási citometriai vizsgálat 51%-os klonális T-sejt-populációt igazolt. A popu-

láció CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD7<sup>+</sup>, CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup> expressziós mintát mutatott. Az immunfenotípus alapján T-prolymphocytás leukaemia merült fel. A csontvelői mintavétel után ismételt áramlási citometriai panel már tartalmazta a klonalitásvizsgálatra alkalmas TRBC1- és TRBC2-antitesteket. Az áramlási citometriai vizsgálat 39% CD3<sup>+</sup>, CD7<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD2<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>, TRBC2<sup>+</sup>, TRBC1<sup>-</sup> fenotípusú klonális (TRBC2/TRBC1 arány: 90) populációt igazolt az aspirátumban. Ezzel összhangban a konvencionális TCR-génátrendeződés-vizsgálat is visszaigazolta a klonális populáció jelenlétét.

**Klonalitás kimutatása nagy granuláris T-sejtes leukaemiában (T-LGL) (3. ábra)**

A 85 éves férfi beteget korábban B-sejtes lymphomával és autoimmun haemolyticus anaemiával (AIHA) diagnosztizálták. Ismételt patológiai vizsgálatra a laborjaiban



3. ábra

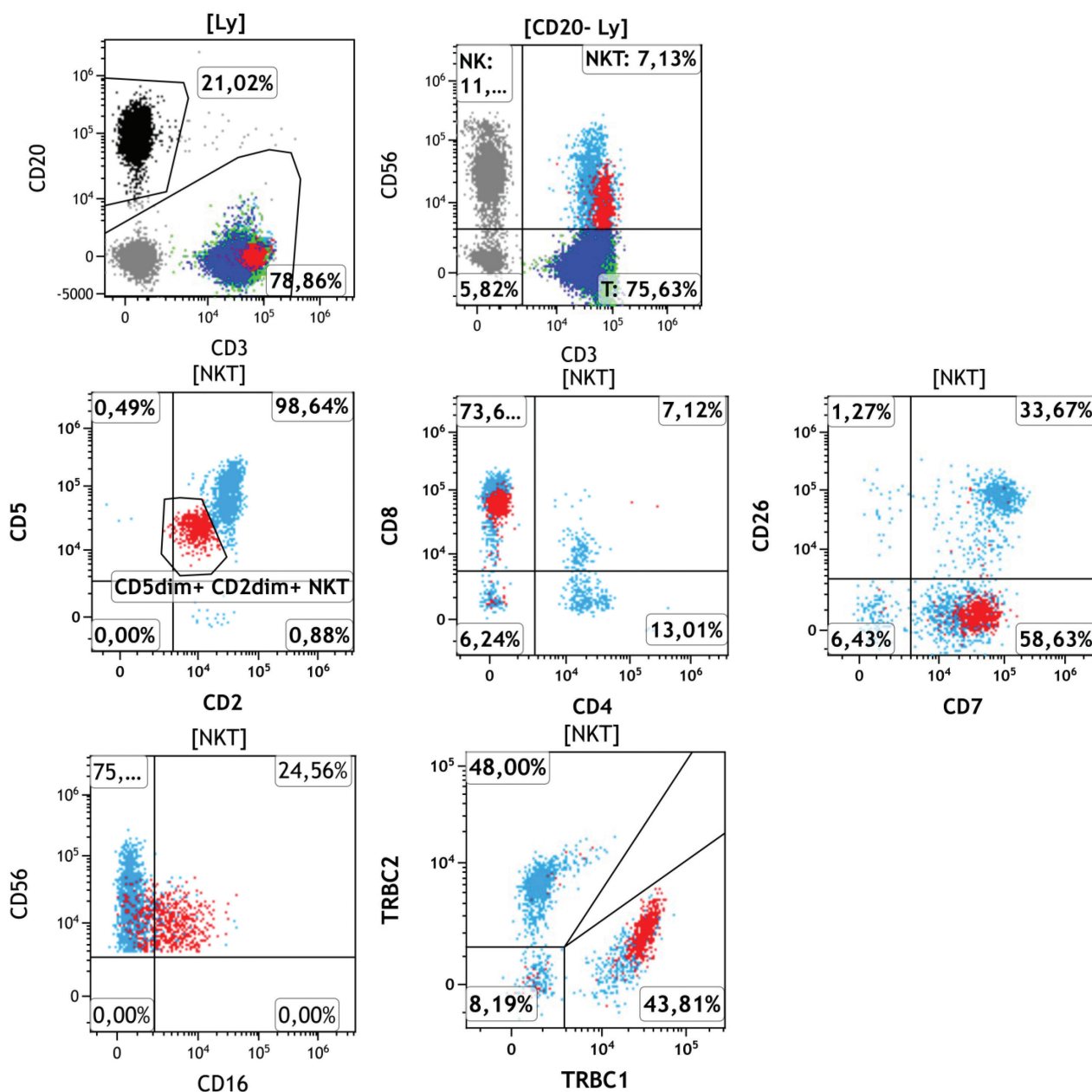
A csontvelői mintában a T-LGL-populáció sejtei 26%-os arányban voltak jelen, többségük CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>-</sup> fenotípust mutatott, kis CD4/CD8 aránnyal és csökkent CD7-expresszióval. A sejtek TRBC2/TRBC1 arányának 24,36 értéke kifejezett restriktóra utalt, amelyet a TCR-génátrendeződés monoklonális mintázata is megerősített

CD = differenciációs klaszter; TCR = (T-cell receptor) T-sejt-receptor; T-LGL = T-sejtes nagy granuláris lymphocyt; TRBC = a TCR-béta konstans régiója

észlelt thrombocytopenia, leukopenia és fokozódó anaemia miatt érkezett. Pancytopenia miatt a korábbi B-sejtes lymphoma csontvelői manifesztációja merült fel. A csontvelői mintában mindössze 1,5% bizonyult CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD5<sup>-</sup>, CD23<sup>-</sup>, CD200 gyenge<sup>+/-</sup>, CD10<sup>-</sup>, kappa<sup>+</sup> B-sejtnak. Ezenkívül kb. 26% T-sejt mutatkozott, amelyek 90%-a CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>-</sup>/CD16<sup>-</sup>/CD2<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>, a sejtek többsége közepes intenzitású CD20, valamint csökkent intenzitású, részben negatív CD7 jelölődést mutatott. A sejtek TRBC2/TRBC1 aránya 24,36 volt, ami jelentős restrikiót jelez, így klonalitásra utal. A TCR-génátrendeződés vizsgálata során is monoklonális génátrendeződés volt igazolható.

*A harmadik betegcsoport (nem egyértelmű biológiai relevanciával bíró esetek) eredményei*

Az általunk vizsgált betegkohorszban 23 esetben találtunk minimális fenotípusos eltérést, sejtarány-eltolódásokat, eosinophiliát vagy minor monoklonális T-, NKT-sejt-populációt, ám ezen elváltozások biológiai jelentősége jelenleg kérdéses. Egy reprezentatív példában egy 50 éves nőbetegnél, aki Sjögren-szindrómában szenved, a perifériás vérben 0,6% CD3<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD2 dim<sup>+</sup>, CD5 dim<sup>+</sup>, CD7<sup>+</sup>, CD26<sup>-</sup>, CD16 dim<sup>+</sup> fenotípusú, TRBC1 monoklonális NKT-sejt-populációt találtunk (4. ábra).



4. ábra

Reaktív vagy autoimmun környezetben – például Sjögren-szindrómában vagy eosinophiliás állapotokban – kisebb, atipikus fenotípusú, klonális T-sejt-populációk is megjelenhetnek. A perifériás vérben 0,6% CD3<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD2 dim<sup>+</sup>, CD5 dim<sup>+</sup>, CD7<sup>+</sup>, CD26<sup>-</sup>, CD16 dim<sup>+</sup> fenotípusú, TRBC1 monoklonális NKT-sejt-populáció látható

## Megbeszélés és következtetés

A T-sejtes lymphoproliferatív betegségek diagnosztikája számos kihívást hordoz, tekintettel arra, hogy a kóros T-sejt-populációk immunfenotípus- és morfológiai eltérései gyakran diszkrét, és nem mindig különíthetők el egyértelműen reaktív folyamatoktól [1]. A klasszikus megközelítés, vagyis a TCR-génátrendeződés vizsgálata PCR-alapú módszerekkel, hosszú évek óta rutin diagnosztikai eszköznek számít [2]. Ez a technika képes kimutatni a klonális átrendeződéseket, azonban időigényes, és nem nyújt közvetlen információt az adott sejtek immunfenotípusáról. Ezzel szemben az áramlási citometriai módszereken alapuló TCR-klonalitás-vizsgálat új perspektívát nyit, amely a B-sejtes neoplasiák esetében bevált kappa-lambda könnyűlánc-restríktív analógia mentén a T-sejtekre is kiterjeszhető [3, 4, 7].

Jelen vizsgálatunkban a TCR konstans  $\beta$ -láncára specifikus TRBC1 és TRBC2 antitestek együttes alkalmazását teszteltük különböző klinikai környezetekben. Normális kontrollminták esetén a két izoforma kiegyensúlyozott expressziós mintázatot figyeltük meg, amely megfelel a poliklonális TCR-repertoár elvárható eloszlásának. Ez alátámasztja, hogy a módszer megbízhatóan alkalmazható fiziológiai állapotok igazolására.

A kóros esetekben ezzel szemben markáns restríktív volt azonosítható, összhangban a PCR-alapú TCR-génátrendeződés-vizsgálattal [2, 6]. Az áramlási citometriai módszer képes gyors és pontos eredményt szolgáltatni, amely a diagnózis felállításában közvetlenül alkalmazható. A TCR klonalitásának ilyen típusú igazolása lehetővé teszi a fenotípus és a klonalitás integrált értékelését, ami különösen hasznos lehet a differenciáldiagnosztikai dilemmák megoldásában. Eredményeink alapján a TRBC-antitestek alkalmazása azonnali támpontot adhat a T-sejtes klonális proliferációk felismeréséhez, amely különösen hasznos lehet akkor, ha a morfológiai és immunfenotípusos eltérések önmagukban nem kellően specifikusak [3, 8, 9].

A módszer egyik jelentős előnye a gyorsaság és az egyszerűség: a teljes vizsgálat a standard áramlási citometriás munkafolyamatba integrálható, így néhány órán belül eredményt ad. Ez lényeges különbség a PCR-alapú módszerhez képest, amely többnapos átfutási idővel járhat. További előny, hogy a klonalitás vizsgálata közvetlenül a fenotípusos adatokkal együtt értékelhető, ami komplexebb diagnosztikai képet nyújt [2, 5].

Vizsgálatunk során az áramlási citometriával végzett TRBC-analízis a PCR-rel igazolt 11 klonális eset közül 10-ben egyértelmű klonalitást igazolt, és a két módszer eredményei teljes mértékben összhangban voltak egymással. Egy esetben azonban az áramlási citometriás vizsgálat nem felelt meg a nemzetközi ajánlásokban meghatározott klonalitätsi kritériumoknak (normális TRBC2/TRBC1 tartomány: 0,18–5,7) [6]. Az áramlási citometriás vizsgálat során egy 4,2%-os arányban jelen lévő atípusos immunfenotípust mutató NKT-sejt-popu-

láció volt kimutatható, amelynél a TRBC2/TRBC1 arány 0,2 volt. Ez az érték ugyan a normáltartományon belül helyezkedett el, ám közel esett annak alsó határához. A TCR-PCR módszerrel végzett elemzés ebben az esetben poliklonális háttér mellett klonális eltérést mutatott. Az ilyen határértékhez közeli eredmények esetében továbbra is kiemelt jelentőséggel bír a molekuláris módszerekkel történő megerősítő vizsgálat a klonalitás pontos megítélésére.

Fontos megjegyezni ugyanakkor, hogy a módszernek korlátai is vannak. A TRBC1 és TRBC2 izoformák kizárólag a TCR- $\beta$ -lánc konstans régióira terjednek ki, így a TCR $\gamma/\delta$ -receptort hordozó sejtek klonalitása ezzel a megközelítéssel nem vizsgálható. Emellett előfordulhatnak olyan esetek, amikor a restríktív mértéke nem egyértelmű, és a poliklonális háttér mellett csak részleges dominancia igazolható. Emellett, mivel a TRBC-epitópok a funkcionális TCR/CD3 komplex részeként jelennek meg a sejtfelszínen, a felszíni TRBC1/2 detektálása felszíni CD3-pozitív T-sejteken lehetséges megbízhatóan. Sejtfelszíni CD3-negatív esetekben a TRBC1/2 detektálása csak citoplazmatikus vizsgálattal lehetséges [6].

Vizsgálatunk során – elsősorban a harmadik betegcsoportba sorolt esetekben – több beteg esetében is észleltünk kisebb arányú, atipikus immunfenotípusú, TRBC-restríktív T- vagy NKT-sejt-populációkat, illetve eosinophiliát, amelyek biológiai és klinikai jelentősége nem volt egyértelmű. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy reaktív vagy autoimmun környezetben – például Sjögren-szindrómában vagy eosinophiliával járó állapotokban – minor, atipikus fenotípusú T-sejt-populációk is megjelenhetnek, amelyek nem feltétlenül malignus folyamatot tükröznek [2]. Ezt jól példázza egy Sjögren-szindrómában szenvedő beteg esete, akinél a perifériás vérben kis arányú, TRBC1-restríktív, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> NKT-sejt-populáció volt kimutatható (4. ábra). Bár az áramlási citometriás vizsgálat monoklonális mintázatot jelzett, a klinikai kontextus és a kísérő diagnosztikus paraméterek figyelembevételével malignus T-sejtes lymphoproliferatív betegség nem igazolódott.

Ezek az esetek hangsúlyozzák, hogy a TRBC2/TRBC1-alapú klonalitätsvizsgálat eredményeit minden esetben a klinikai kép, az immunfenotípus és az egyéb laboratóriumi eltérések együttes értékelésével szükséges interpretálni.

Összességében vizsgálatunk megerősíti, hogy a TRBC1- és TRBC2-antitestek együttes használata ígéretes, gyors és hatékony módszer a T-sejt-klonalitás kimutatására. A PCR-alapú vizsgálatokkal való jó egyezés (10/11 eset), valamint a fenotípusos adatokkal történő egyidejű értékelhetőség révén a módszer alkalmas lehet bizonyos klinikai situációkban a konvencionális klonalitätsvizsgálatok részbeni kiváltására. A jövőben nagyobb beteganyagokon végzett vizsgálatok szükségesek annak pontos meghatározására, hogy lehet-e rutinszerűen alkalmazni az áramlási citometriás TRBC-vizsgálatot első vonalbeli diagnosztikai eszközként a klonalitás megállapításához.

**Anyagi támogatás:** A tanulmány megírása, illetve a kapcsolódó kutatómunka nem részesült anyagi támogatásban.

**Szerzői munkamegosztás:** F. B.: Adatgyűjtés, kiértékelés, a kézirat elkészítése. J. P.: Konceptió, szakmai vezetés. L. Á.: Adatgyűjtés, kiértékelés. V. L., K. L.: A kézirat ellenőrzése. A közlemény végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

**Érdekeltségek:** A szerzőknek nincsenek érdekeltségeik.

## Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak *Radvánszky Lajosné* szakasszisztens kolleganőnek a minták előkészítéséért.

## Irodalom

- [1] Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med.* 2006; 354: 1166–1176.
- [2] Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: the immune system in health and disease.* 5th edition. Garland Science, New York, NY, 2001. T-cell receptor gene rearrangement, 4. 11–14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27145/> [accessed: Jan 15 2026].
- [3] Mahe E, Pugh T, Kamel-Reid S. T cell clonality assessment: past, present and future. *J Clin Pathol.* 2018; 71: 195–200. Erratum: *J Clin Pathol.* 2018; 71: 660.
- [4] Oak J, Furtado FM, Devitt KA, et al. A practical approach to panel design, validation, and interpretation for the evaluation of T-cell neoplasms by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2025; 108: 430–447.
- [5] Devitt KA, Kern W, Li W, et al. TRBC1 in flow cytometry: Assay development, validation, and reporting considerations. *Cytometry B Clin Cytom.* 2024; 106: 192–202.
- [6] Horna P, Weybright MJ, Ferrari M, et al. Dual T-cell constant  $\beta$  chain (TRBC)1 and TRBC2 staining for the identification of T-cell neoplasms by flow cytometry. *Blood Cancer J.* 2024; 14: 34.
- [7] Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, et al. Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood* 1991; 78: 192–196.
- [8] Ginaldi L, Farahat N, Matutes E, et al. Differential expression of T cell antigens in normal peripheral blood lymphocytes: a quantitative analysis by flow cytometry. *J Clin Pathol.* 1996; 49: 539–544.
- [9] Kovács S, Szabó Z, Iványi JL, et al. The diverse manifestations of T-cell large granular lymphocytic leukemia and successful treatment. [T-sejtes nagy granuláris lymphocytás leukémia ezer arca és sikeres kezelése.] *Hematol Transzfuziol.* 2022; 55: 50–53. [Hungarian]

(Forró Barbara, MSc  
Pécs, Szigeti út 2., 7624  
e-mail: forro.barbara@pte.hu)

„*Ni gradus servetur, nulli tutus est summus locus.*”  
(Ha nem vigyázod lépteid, magas helyen biztonságban nem lehetsz.)

A cikk a Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) feltételei szerint publikált Open Access közlemény, melynek szellemében a cikk bármilyen médiumban szabadon felhasználható, megosztható és újraközölhető, feltéve, hogy az eredeti szerző és a közlés helye, illetve a CC License linkje és az esetlegesen végrehajtott módosítások feltüntetésre kerülnek. (SID\_1)