

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A véralvadás XIII-as faktorának megjelenése akut myeloid leukémiás
sejtekben**

Dr. Simon Ágnes

Témavezető: Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2012

A VÉRALVADÁS XIII-AS FAKTORÁNAK MEGJELENÉSE AKUT MYELOID LEUKÉMIÁS SEJTEKBEN

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a Klinikai Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Simon Ágnes okleveles orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskola doktori iskolája
(Trombózis, Hemosztázis és Vaszkuláris betegségek programja) keretében

Témavezető: Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Dr. Udvardy Miklós, az MTA doktora
Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja, helyszíne: 2012. november 29. 12:00 óra, DE OEC
Gyermekeklinika könyvtára

Az értekezés bírálói:

Dr. Demeter Judit, az MTA doktora
Dr. Gergely Lajos, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Dr. Demeter Judit, az MTA doktora
Dr. Gergely Lajos, Ph.D.
Dr. Udvardy Miklós, az MTA doktora
Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja, helyszíne: 2012. november 29. 14:00 óra, a DE OEC
Bőrgyógyászati Klinika tanterme

BEVEZETÉS

A XIII-as faktor felépítése, plazma és celluláris XIII-as faktor jellemzése

A véralvadás XIII-as faktora (FXIII) egy protranszglutamináz, melyet a thrombin Ca^{2+} jelenlétében proteolitikus úton aktivál. A folyamatot kalcium mellett a fibrin(ogén) szabályozza. Az enzim aktív formája (FXIIIa) $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})\text{lizil}$ keresztkötéseket alakít ki fibrin monomerek között, így stabilizálva a véralvadási folyamat végső fázisában kialakuló fibrinhálót.

A véralvadás során a keringő prekursor enzimfehérjék (véralvadási faktorok) kaszkádszerűen, proteolízis útján aktiválódnak. A folyamat elindításának legerősebb stimulusa a sejtek felszínén lévő szöveti faktor (TF). Szöveti faktort számos sejttípus jelenít meg: pl. fibroblastok és pericyták az érfalban, az agy astrocytái, veseglomerulusok epithel sejtjei, szívizomsejtek. Ezek azonban a vér alkotóelemeivel csak akkor kerülnek kapcsolatba, ha endothel sérülés következik be. A keringő vérben a monocyták és az erek endothel sejtjei TF-t expresszálhatnak. Ezen kívül a keringésbe került TF-t hordozó tumor sejtek okozhatnak alvadás aktivációt. A TF foszfolipid és Ca^{2+} jelenlétében aktiválja a FVII-t, ami a prothrombináz komplexet alkotó FV és FX aktivációját végzi. A TF-FVIIa komplex a FIX-t is aktiválja. A prothrombináz komplex hatására a prothrombin aktív proteázzá, thrombinná alakul. A thrombin thrombocytákat és a FXIII-t aktiválja valamint a fibrinogént fibrinné alakítja.

Robbins és munkatársai állapították meg kísérleteik során, hogy a kalcium nem elegendő a fibrin alvadék gyenge savban vagy lúgban való oldhatatlanná tételéhez, feltételezték egy további, szérumban meglévő faktor jelenlétét. A fibrin alvadék stabillá válásához szükséges szérumban meglévő faktor jelenlétét két magyar kutató, Laki Kálmán és Lóránd László írta le elsőként 1948-ban. Az általuk fibrinstabilizáló faktornak elnevezett fehérjét Loewy és munkatársai állították elő tisztított formában és írták le enzimatisztikus tulajdonságait. 1963-ban ismerték el véralvadási faktorként XIII-as sorszámmal.

A XIII-as faktor A és B alegységeinek expressziós helyei

A FXIII-nak két formája található meg az emberi szervezetben: a vérben heterotetramerként kering, intracellulárisan két A alegységből álló homodimerként (A_2) van jelen. A heterotetramer forma két potenciálisan aktív A (FXIII-A) és két gátló/stabilizáló B (FXIII-B) alegységből áll (A_2B_2). A B alegység megakadályozza az A

alegység aktiválódását. A B alegységet az emberi szervezetben a májsejtek, az A alegységet a megakaryocyták/thrombocyták és a monocyta/macrophag rendszer sejtjei, valamint kis mértékben a májsejtek szintetizálják. Az egyéb sejtípusok közül a chondrocyták FXIII-A szintetizáló képességét is bizonyították, valamint osteoblasokban is kimutatták. A vérben lévő FXIII-B mennyiség kb. fele szabadon kering a plazmában, míg a FXIII-A teljes mennyisége a tetramer komplexben található. A FXIII komplex átlagos plazma koncentrációja 21 mg/L. A FXIII-A₂B₂ komplex képződésének körülményei máig nem tisztáztak.

A FXIII-A intracelluláris lokalizációs helyei (szubcelluláris megoszlás)

A thrombocyták igen nagy mennyiségű FXIII-A-t tartalmaznak, 150-szer többet, mint a vérplazma, a monocyták FXIII-A tartalma viszont egy nagyságrenddel kisebb, mint a thrombocytáké. A csontvelői megakaryocyta és monocyta prekursor sejtek FXIII-A expresszióját is leírták. Az intracelluláris enzim funkciója még nem teljesen ismert, de számos kísérleti eredmény azt mutatja, hogy a megakaryocyták, monocyta és macrophag sejtek nem csupán a FXIII-A szintézis helyei, hanem a sejtek patofiziológiai funkcióinak aktív részesei.

A FXIII-A macrophag sejtekben jellegzetes citoplazmatikus eloszlást mutat; megfigyelhető a citoplazmatikus vakuolumok körül és a pseudopodiumokban, a fagocitotikus vakuolumokban azonban nem mutatható ki. A monocyta /macrophag érés korai szakaszában a FXIII-A nukleáris akkumulációját figyelték meg a sejtekben. Feltételezik szerepét a fagocitózisban és az alternatív macrophag aktivációban. A thrombocytákban a FXIII-A egy alacsony molekulásúlyú hősokk proteinhez, a HSP27-hez kapcsolódva található meg.

A malignus kórképekben megjelenő FXIII-A

A FXIII-A a megakaryocyta/thrombocyta és monocyta/macrophag rendszer sejtein kívül nem található meg egyéb csontvelői és perifériás vérsejtben. A FXIII-A jelenlétét azonban sok más betegségben és malignus kórképben vizsgálták. Megfigyelték, hogy a Hodgkin-kórban szenvedők nyirokcsomóiban fibrin lerakódások vannak jelen, valamint a nyirokcsomókban döntő többségben vannak a macrophag-szerű sejtek. Ez a sejtpopuláció FXIII-A alegységet tartalmaz. Bizonyították a macrophag eredetet és így azt, hogy tumor-

asszociált macrophagokról van szó.

Vizsgálták a FXIII-A megjelenését malignus fibrotikus histiocytómában (MFH). A sejtek FXIII-A pozitivitást mutattak MFH-ban, amely így elkülöníthető a szövettanilag hasonló lágy szöveti tumoroktól. Azt tapasztalták, hogy a FXIII-A pozitivitas nem a malignus sejtekben, hanem a tumor-asszociált sejtekben jelenik meg, pl. a macrophagokban, folliculáris dendritikus reticulum sejtekben (DRCs), fibroblast-szerű mesenchymális sejtekben, valamint a sinusoidális és interfolliculáris histiocyta reticulum sejtekben.

Feltételezték, hogy a megakaryocita és monocyta sejtek malignusan transzformálódott formái is expresszálhatnak FXIII-A antigént. Invernizzi és munkatársai akut myeloid leukémiás beteg mintáit vizsgálták FXIII-A ellenes nyúl antitestet alkalmazva peroxidáz-anti-peroxidáz (PAP) immunológiai módszerrel. Az AML megakaryocytás (M7), myelomonocytás (M4) és monocytás (M5) szubtypusaiban pozitív reakciót detektáltak.

Vizsgálatainkban mi elsőként alkalmaztunk egy újonnan kifejlesztett FXIII-A ellenes monoklonális antitestet, amivel áramlási citométeren vizsgáltuk akut myeloid leukémiás beteg mintákon a FXIII-A expressziót, amely az AML diagnosztikában és követésben is hasznosnak bizonyulhat.

CÉLKITŰZÉSEK

A munkám során célul tűztem ki a XIII-as faktor akut myeloid leukémiákban (AML) történő megjelenésének vizsgálatát.

1. Megvizsgáltuk, hogy az akut myeloid leukémiás sejtekben kimutathatók-e a FXIII alegységei.
2. Teszteltük a FXIII-A megjelenés specificitását és szenzitivitását az AML altípusaiban.
3. Vizsgáltuk, hogy leukémia-asszociált immunfenotípust (LAIP) jelent-e a FXIII-A pozitivitas és hogyan alkalmazható új markerként a leukémia differenciáldiagnosztikában.
4. Tanulmányoztuk a FXIII-A lehetséges prognosztikai szerepét akut promyelocytás leukémiában.

BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Klinikai és kontroll minták

Akut myeloid leukémiás betegek csontvelő és perifériás vér mintáit vizsgáltuk. 2000. és 2010. év között összesen 100 AML-es betegnél végeztünk szisztematikus áramlási citometriai analízist FXIII-A reakcióval összefüggésben. Hat krónikus myelomonocytá leukémiás (CMMoL) beteg perifériás vérmintáját is feldolgoztuk. Minden csontvelő minta esetén megtörtént a morfológiai, citokémiai és immunfenotípus vizsgálat.

Az akut myeloid leukémia promyelocytás szubtypusára (AML M3) fókuszálva további betegeket vontunk be a vizsgálatba. Így betegeink között 14 db újonnan diagnosztizált akut promyelocytás leukémiás (APL) beteg csontvelői és perifériás vér mintáját is analizáltuk. Esetükben a csontvelői kenetekben több, mint 70%-os blast arányt találtunk. Minden APL a hypergranuláris típusba tartozott és FISH technikával a jellegzetes t(15;17) volt detektálható. Normál promyelocyták tanulmányozásához négy vashiányos anémiában szenvedő beteg csontvelői mintáját vizsgáltuk meg.

A leukémiás minták újonnan felismert, kezelés előtt álló betegekből származtak.

Áramlási citometria alkalmazása immunfenotípus meghatározásra

Az immunfenotípus vizsgálat során fluoreszcens festékekkel jelölt monoklonális antitestekkel vizsgáltuk a sejtfelszíni és intracelluláris markereket.

Az áramlási citometria során zömmel a kereskedelmi forgalomban kapható, fluorokrómmal direkt konjugált monoklonális antitesteket alkalmaztuk 3-4 színű jelöléses panelben.

A FXIII alegységei ellen egerekben termeltetett monoklonális antitesteket FITC jelölő reagens kit segítségével konjugáltuk.

A mérések FACSCalibur áramlási citométeren történtek, minden mintánál azonos PMT beállítást alkalmazva. A *de novo* leukémiák esetén 10 000 sejt adatait gyűjtöttük be ún. list mode fájlalba és analizáltuk Cell Quest 3.2 szoftver segítségével.

A FXIII-A expressziót normál csontvelői promyelocytákon is vizsgáltuk. A mérés a három lézerrel rendelkező FACSCanto II áramlási citométeren zajlott.

Az analizálás során a pozitív sejtek százalékos arányát adtuk meg a vizsgált sejtpopuláción belül. Az eredmények értékelésekor figyelembe vettük a pozitív sejtek átlagos

fluoreszcencia intenzitását (MFI= mean fluorescence intensity) is, mely jellemezhet egyes kóros sejtcsoportokat.

Citogenetika és FISH vizsgálat

A hagyományos citogenetikai vizsgálatot minden APL-es beteg csontvelő mintáján elvégeztük. A karyotípusok leírása a Humán Cytogenetikai Nomenklátúra Nemzetközi Rendszerének (ISCN, 2009) megfelelően történt. A fluoreszcencia *in situ* hibridizáció (FISH) a kromoszóma preparátumokból származó sejt szuszpenziókon a PML-RARA transzlokációs próba gyári leírásának megfelelően zajlott.

A sejteken háttérfestésként DAPI-t alkalmaztunk, valamennyi esetben 200 interfázisú sejtet analizáltunk. Az értékelést Zeiss Axioplan2 fluoreszcens mikroszkóppal és ISIS szoftverrel végeztük.

A FXIII elleni antitestek FITC konjugálása

A FXIII ellenes antitestek konjugálása FluoroTag FITC konjugáló kittel történt (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Sejtenyésztés

A Mono-Mac6 sejteket Dr. Duda Ernő ajándékként kaptuk a Szegedi Biológiai Kutatóközponttól, a PLB-985 sejtvonal sejtjei az Országos Haematológiai és Immunológiai Intézetből származnak (Országos Gyógyintézeti Központ). A monocyta érési folyamatot 30 nM D₃-vitaminnal, a granulocyták érését 1 µmol all-trans-retinsavval és 1.25%-os dimetilsulfoxiddal indukáltuk. Három napon át minden nap analizáltuk bizonyos sejt felszíni markerek expresszióját.

FXIII-A vizsgálata ELISA módszerrel

A XIII-as faktor A alegységének vizsgálata akut promyelocita leukémiás minták sejtlizátumából történt az intézetünkben korábban Katona és munkatársai által közölt módszer alapján kis módosítással. A thrombocyta kontamináció elkerülése érdekében a promyelocita sejteket EDTA-t tartalmazó PBS-ben mostuk. A szerin és cisztein proteázok gátlására egy proteáz inhibitor koktélt adtunk a mosó pufferhez. A sejteket ultrahangos szonikálással tártuk fel, de előtte sejtszámot határoztunk meg, hogy pontosan kiszámolható

legyen az egy sejtre eső FXIII-A tartalom.

FXIII-A vizsgálata Western-blot módszerrel

A thrombocyta mentesített APL blast sejtek FXIII-A tartalmának meghatározása után a fennmaradó sejteket centrifugáltuk és 100 µL SDS PAGE minta pufferben vettük fel, majd a sejtuszpenziót 5 percig forraltuk. A mintákat 7,5%-os SDS poliakrilamid géltre vittük fel, és redukáló közegben elektroforetizáltuk, majd Immobilon P membránra blottoltuk. Az elsődleges antitest birka poliklonális anti-humán FXIII-A volt. Az immunreakcióhoz biotinált, nyúlban termelődött anti-birka IgG-t és avidin-biotinált peroxidáz komplexet alkalmaztunk, majd a reakció kialakulását elektro-kemilumineszcencia elve alapján detektáltuk. Annak demonstrálására, hogy a human neutrophil elasztáz (HNE) hasítja a FXIII-A fehérjét, tisztított FXIII-A₂-t és tisztított HNE enzimet inkubáltunk Ca²⁺ jelenlétében különböző ideig 37°C-on. A reakciót egyenlő mennyiségű SDS Laemmli pufferrel állítottuk le.

Thrombocyta mentes promyelocyta sejtizátumot két beteg perifériás véréből és a második beteg csontvelő mintájából állítottunk elő.

Konfokális mikroszkópia

APL-es betegmintákból cytospin preparátumot készítettünk. A FITC-el konjugált anti-FXIII monoklonális antitesteket, BSA-t és Triton X-100-at tartalmazó puffert a sejtekhez adva 30 percen át szobahőn inkubáltuk a mintákat, így permeabilizálva a sejtek membránját. Az inkubáció utolsó 5 percében propidium jodidot (PI) adtunk az oldathoz. Utolsó lépésként a mintákat Mowiol-al fedtük be. A konfokális mikroszkópia (CLMS=confocal laser scanning microscopy) Zeiss (Göttingen, Németország) LSM 510 rendszerrel és C-Apochromat 63×/1,25 NA vízimmerziós objektívvel történt.

Statisztikai módszerek

Az AML szubtypusaiban megtalálható pozitív sejtek arányának összehasonlításakor az adatok Gauss-eloszlást mutattak, így az eredményeket páros t-próbával elemeztük. A normál és leukémiás mintákban detektált pozitív sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitása (MFI) nem mutatott Gauss-eloszlást, ezért a páratlan Mann-Whitney U teszt alkalmaztunk

a statisztikai értékeléshez. A FXIII pozitív és FXIII negatív betegpopulációk túlélési idejének statisztikai összehasonlítását GraphPad Prism 4.0 szoftverrel végeztük.

EREDMÉNYEK

FXIII-A expresszió vizsgálata áramlási citometriával normál csontvelői és perifériás vérmintákon

A normál perifériás vérminták felszíni festése után analizáltuk a myeloid kapuban lévő sejteket. Itt a monocyták mutatták a rájuk jellemző CD14 pozitivitást, de FXIII-A és FXII-B pozitivitást nem találtunk.

Intrastain-el történő permeabilizálást követően minden myeloid sejt myeloperoxidáz (MPO) pozitivitást mutatott. A monocyta sejtcsoport megjelent, mint jellegzetes „dim” MPO populáció, amelyben FXIII-A is detektálható volt, míg FXIII-B-re teljesen negatív reakciót adott. Az MPO-bright populációt a polimorfonukleáris granulocyták (PMN) alkotják, melyek a FXIII mindkét alegységére negatívak.

A lymphocyták nem mutattak sejtfelszíni és intracelluláris FXIII-A jelölődést sem.

A normál csontvelői mintában a FXIII-A a myeloid kapuban két sejtpopulációban detektálható: a CD45-bright érett monocytákon és a CD45-dim monoblastokon.

Az eredményeink azt mutatják, hogy normál perifériás vér és csontvelő mintában a FXIII alegységei közül kizárólag az A alegység van jelen, ami intracellulárisan található meg a monocyta sejtvonal sejtjeiben.

A FXIII-A pozitívitás specificitásának, szenzitivitásának vizsgálata tenyésztett sejteken

A sejtenyésztés ideje alatt a CD33 és cyMPO myeloid, CD64 és CD14 monocyta, CD11b granulocyta markerek és a FXIII-A expressziójának megjelenését, időbeni változását vizsgáltuk. A Mono-Mac6 monoblast sejtvonal sejtjein már a tenyésztés 0. napján kimutatható volt a FXIII-A, ami egyformán magas pozitivitást mutatott végig a tenyésztés 3 napja alatt, akár a CD33. A felszíni CD14 kezdetben nem expresszálódott, majd a monocyta differenciációt indukáló D-vitamin hatására 24 óra múlva már detektálni tudtuk.

Az eredményeink szerint a FXIII-A expresszió intenzitása, ami a monocyta sejtek érésének kezdetén is magas, nem növekszik tovább a sejt érési folyamatának előrehaladásával, ellentétben a CD14 expresszióval. Mivel a CD14 éretlen monocytákon nem is detektálható,

így a FXIII-A korai markerként sokkal szenzitívebb a monocyta sejtvonalra, mint a később megjelenő felszíni CD14.

A PBL-985 sejtvonal esetén egyáltalán nem tudtuk detektálni a FXIII-A expressziót a kezdeti szakaszban sem és a granulocyta irányú differenciálódást követő napokban sem. Ezen eredmények alapján a FXIII-A specifikusnak mutatkozik a monocyta sejtvonal sejtjeire.

A FXIII-A pozitivitás vizsgálata akut myeloid leukémiás mintákon

A FXIII-A expresszió vizsgálatát összesen 100 AML-es beteg csontvelő és perifériás vér mintáján végeztük el 3-színű majd 4-színű jelöléssel áramlási citométeren. Ezzel párhuzamosan 6 CMMoL-es beteg perifériás véréét is vizsgáltuk. Az eredményeink azt mutatták, hogy a myeloblast (M0, M1, M2) és az erythroblast (M6) eredetű leukémiás blast sejtek nem expresszálják FXIII-A-t vagy csak jelentéktelen mértékben. A pozitivitást egy adott markerre a 20%-os cut-off értéket meghaladó pozitív sejtarány jelentette. Az M4 és M5 AML esetekben a FXIII-A jelölődés megegyezett vagy nagyobb mértékű volt, mint a CD14 felszíni marker pozitivitás. Az eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a FXIII-A intracitoplazmatikus marker szenzitívebb, mint a felszíni CD14, így az AML M4 vagy M5 leukémia esetén akkor is azonosíthatók a monocyta sejtvonalhoz tartozó sejtek, amikor azok a CD14 monocyta markert még nem expresszálják.

FXIII-A és CD14 jelölődés összehasonlítása AML és CMML betegmintákon

Összehasonlítottuk az AML különböző szubtypusaiban kapott FXIII-A százalékos pozitivitás értékeket, valamint a FXIII-A és CD14 expresszió mértékét. Az AML M0, M1, M2 esetekben FXIII-A-t nem detektáltunk. Az AML M4 és M5 csoportban a FXIII-A pozitív sejtek átlagos aránya szignifikánsan magasabb volt, mint a CD14 jelölődést mutató sejteké ($p < 0.0001$). A FXIII-A expresszió kiemelkedően magas volt (átlag: 68%) azokban az esetekben, ahol az éretlen sejtek voltak túlsúlyban, így az M5a szubtypusban.

A 6 vizsgált krónikus myelomonocytás leukémiás betegnél azt találtuk, hogy a FXIII-A és CD14 pozitív sejtek aránya teljesen egyezik. Megállapíthatjuk, hogy az érett monocytákon a két marker ugyanolyan mértékben expresszálódik.

Az adatok alapján a FXIII-A marker jelölődés mérése myeloblastos és monoblastos leukémiák esetén 100%-os szenzitivitású és 95%-os specificitású volt a monocytás/monoblastos leukémiákra (M4, M5).

Összehasonlítottuk a normál monocyták és a leukémiás minták (AML M4, M5, CMMoL) monocytáinak átlagos fluoreszcencia intenzitás értékeit (MFI). Azt láttuk, hogy a FXIII-A jelölődés sokkal intenzívebb volt a leukémiás sejtekben, mint a normál monocytákban ($p < 0.05$).

A monocyta sejt vonal mellett megvizsgált akut leukémiás betegek körében néhány AML M3 esetében FXIII pozitivitást találtunk. Ez váratlan eredmény volt, mivel a neutrophil sejt sor prekurzoraiban nem volt FXIII-A kimutatható. Ennek a jelenségnek részletesebb vizsgálatát később minden de novo akut promyelocytás leukémia esetén elvégeztük és ezen leukémia-asszociált immunfenotípus (LAIP) valódiságát több módszerrel bizonyítottuk.

AML M3 leukémiás beteg minták áramlási citometriás vizsgálatának eredménye

A leukémiás promyelocyták citoplazmájukban számos granulummal rendelkező nagyméretű sejtek, melyek autofluoreszcenciája és oldal irányú fényszórása is nagymértékű. Ezeket a jellegzetességeket találtuk az általunk vizsgált beteg mintákon is. Tanulmányoztuk a myeloid markerek (MPO, CD13, CD33, CD14, CD15), a blast markerek (CD34, CD117), a HLA-DR és a FXIII-A expressziót.

A CD45-dim leukémiás promyelocyták MPO és CD33 markereket intenzíven expresszálnak. A CD117 blast marker detektálható a leukémiás promyelocytákon, viszont CD34-re negatívak. A CD117-dim sejtek a CD15 granulocyta markert sem hordozzák. A CD33-bright, MPO-bright és CD117-dim sejtek FXIII-A markerrel is jelölődnek, ez a koexpresszió pedig azt jelenti, hogy a kóros promyelocyták intracitoplazmatikusan FXIII-A-t hordoznak.

A FXIII-A detektálása APL sejtekben CLSM-val

A FXIII-A intracelluláris elhelyezkedését 3 promyelocytás leukémiás mintán vizsgáltuk konfokális lézer szkennig mikroszkóppal. A vizsgált sejtek nagy része FXIII-A pozitivitást mutat. A FXIII-A fehérjét a kóros promyelocyták citoplazmájában detektáltuk.

A vizsgált AML M3-as betegek immunfenotípus megoszlása

A klinikai minták esetén 30% volt az a cut-off érték, mely fölött pozitívnak tekintettük a marker expressziót. Az általunk vizsgált mind a 14 APL-es mintában MPO és CD33 pozitivitást detektáltunk, átlagosan 83%-ban (41%-99%) illetve 90%-ban (74%-99%), míg a CD13 átlagos pozitivitás ennél alacsonyabb, 59% volt. Egy kivétellel a minták CD117 pozitivitást mutattak, az átlag 63% volt (40%-96%). A 14-ből 1 esetben láttunk CD15 expressziót, 13 esetben a CD15 marker hiányzott (átlagos pozitivitás mindössze 8%). Egyik APL-es mintában sem volt kimutatható HLA-DR és CD34 jelölődés. A 14 APL-es mintából 10 esetben találtunk FXIII-A pozitivitást: az átlag jóval meghaladta a 30%-os határt. A négy negatív mintában nem érte el a cut-off értéket a FXIII-A pozitivitás.

Normál promyelocyták FXIII-A expressziójának vizsgálata áramlási citométerrel

Normál csontvelő mintákat analizáltunk 7-szín jelöléssel áramlási citométeren. A normál promyelocyták, melyek CD15, CD33, CD117-dim marker pozitívak és HLA-DR negatívak, vizsgálataink alapján nem expresszálnak FXIII-A markert.

Az eredményeink azt mutatják, hogy a FXIII-A kizárólag az akut promyelocytás leukémiás kóros sejtekben detektálható, a normál promyelocytákban nem.

A FXIII-A fehérje megjelenési formáinak és mennyiségének vizsgálata APL-ben

A kóros blast sejtek FXIII-A fehérjéjének vizsgálatára nagy érzékenységgű kemilumineszcens előhívó rendszerrel kombinált Western blot analízist alkalmaztunk. Vizsgáltuk egy beteg csontvelő és egy másik beteg csontvelő és perifériás vérmintáját.

Az APL-es betegek blast sejtjeiből származó FXIII-A pozitív sáv 82 kD-nál detektálható, ott ahol a pozitív kontroll FXIII-A fehérje is fut.

Összehasonlítottuk a betegek promyelocytá sejtizátumából származó FXIII-A hasítási termékei által adott sávokat a humán neutrophil elasztáz (HNE) által proteolízis útján hasított, tisztított FXIII-A₂-ből származó sávokkal. A Western blot képen a két sáv mintázata nagyfokú egyezést mutatott.

A fenti két beteg minta esetén ELISA módszerrel megmértük a sejtizátumokban található FXIII-A antigén mennyiségét. A minták több, mint 90% promyelocytát tartalmaztak és a diagnózis felállításakor sem áramlási citométerrel sem hematológiai analizátorral

monocyta sejteket kimutatni nem tudtunk. Így kizárható, hogy a FXIII-A monocyta eredetű lenne.

A két mintában az alábbi értékeket mértük: 29 és 80 fg/sejt. A promyelocytá leukémiás esetekben hasonló antigén mennyiséget mértünk, mint amit korábban thrombocytákban meghatároztak intézetünk munkatársai: 60 ± 10 fg/thrombocyta. Ezek az eredmények az áramlási citometriával kapott átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) értékekkel is korrelálnak.

Az akut promyelocytá leukémiás betegek túlélésének vizsgálata a FXIII-A expresszió tükrében

Az általunk vizsgálat APL-es betegek száma 14 volt. Közülük 10 esetén találtunk FXIII-A expressziót a kóros promyelocytákban, 4 beteg FXIII-A negatív volt. A betegek túlélési idejét követve azt láttuk, hogy szignifikáns különbség van a két betegcsoport között ($p < 0.0001$, logrank próbával). A FXIII-A negatív esetek kezelésre nem reagáltak vagy relapszus alakult ki. Az átlagos túlélés mindössze 1 hónap volt. A FXIII-A pozitív betegek a mai napig élnek.

MEGBESZÉLÉS

A leukémiák diagnosztikájában minőségi ugrást jelentett az áramlási citometria alkalmazása, mely ma már alapvető módszer a különböző leukémia típusok meghatározásában. A vizsgálat során a sejtek immunfenotípusát analizáljuk, ami a különböző sejtfelszíni és intracelluláris markerek detektálását jelenti. A korábban alkalmazott morfológiai és citokémiai eljárások során jóval kevesebb -maximum néhány száz- sejt került vizsgálatra és az értékelés is szubjektív volt. Az áramlási citométerrel *de novo* leukémiáknál általában 10-50 ezer, de követéses vizsgálatoknál több százezer sejt analizésére kerül sor, kezeléseket után a reziduális sejtek keresésekor. A kezdetben egy vagy két színnel történő jelölést később a 3-majd 4- színű jelölés követte, a diagnosztikában ma már a 6-10-színű jelölést is rutin módszerként alkalmazzák. A leukémia diagnosztikában egyik cél a sejtvonal meghatározása. Ez a sejtfelszíni markerek mellett elsősorban az intracitoplazmatikus markerek detektálásával lehetséges (cyCD3 - T-sejt, cy79a - B-sejt, MPO - myeloid sejtek). Az intracitoplazmatikus markerek a sejtek érettségi fokáról is

információt adnak. A markerek analízise során vizsgáljuk, hogy a látott expressziós mintázat kizárólag a kóros, leukémiás esetekre jellemző-e. Amennyiben igen, akkor leukémia-asszociált immunfenotípusról (LAIP) beszélünk.

Az akut leukémiák közül az akut lymphoid leukémia (ALL) került elsőként áramlási citometriás vizsgálat tárgyává. Immunfenotípus vizsgálattal az ALL szubtypusai beazonosíthatók, de gyakoriak az olyan marker kombinációk, amelyben myeloid antigéneket detektálunk (CD13, CD33). Elsőként intézetünk munkatársai azonosítottak olyan prekursor B-sejtes ALL eseteket, melyekben az intracelluláris FXIII-A marker detektálható. Bizonyították, hogy éretlen és érett normál B-sejtek sem expresszálják, de a B-ALL esetek 40%-ban megjelenik. Leukémia-asszociált immunfenotípusról van szó, melynek lehetséges prognosztikai jelentőségét jelenleg is vizsgálják.

Az akut myeloid leukémiák immunfenotípus vizsgálata során a myeloid sejtvonal azonosítása intracitoplazmatikus MPO markerrel történik. Az MPO a különböző myeloid eredetű sejtekben eltérő intenzitással van jelen. A polimorfonukleáris sejtekben intenzívebb, a monocytákban/monoblastokban gyengébb a jelölődés. A sejtvonal meghatározását követően vizsgáljuk azokat a további intracitoplazmatikus és sejtfelszíni markereket, amelyek detektálásával következtethetünk a sejtek érettségi fokára (blast markerek, kizárólag érett sejtekre jellemző markerek), és amelyek vizsgálatával az AML szubtypusai meghatározhatók.

A FAB (Franch-American-British) klasszifikáció szerinti szubtypusba történő besorolás alapját morfológiai jellemzők és citokémiai reakciók adták. Ez alapján az alábbi AML alcsoportok léteznek: M0-M4, M5a, M5b, M6-7. (M0: őssejtes M1: differenciáció nélküli, M2: differenciálódást mutató, M3: akut promyelocytás leukémia, M4: akut myelomonocytás, M5a, b: akut monoblastos, monocytás, M6: erythroleukaemia M7: megakaryocytás leukémia.)

A különböző szubtypusokba sorolásnak azért van jelentősége, mert a prognózis nem egyforma és a kezelés is eltérő lehet az egyes alcsoportokban. Az immunfenotípus vizsgálatokkal a sejtek marker expressziója detektálható, az így kapott marker expressziós mintázatok alapján megtörténik a szubtypusba való besorolás.

A WHO 2001-ben majd módosítva 2008-ban kiadott dokumentuma szerint az AML klasszifikációja genetika eltéréseken alapul. A 2001-es WHO klasszifikáció szerint az AML 50-60%-a a másképp nem specifikálható ún. AML-NOS (NOS = not otherwise

specified) kategóriába tartozott. Ezekben az esetekben normál karyotípust találtak. A 2008-as klasszifikációban a citogenetikai eltéréseken alapuló kategóriában szerepel három új kromoszóma eltérés: t(6;9), inv(3), t(1;22). Mindhárom eltérés ritkán előforduló forma, mégis fontos az azonosításuk, mert allogén őssejt transzplantáció nélkül a túlélési idő általában rövid. Felállítottak ezen kívül két új ideiglenesen kialakított alcsoportot: AML *NPM1* (nucleophosmin) és AML *CEBPA* (CCAT/enhancer kötő alfa protein) mutációval. Mindkettő zömmel normál karyotípussal jár.

Az AML-NOS csoportba tartozó esetek száma így kb. 30%-ra csökkent, ami azonban így is igen jelentős arány. A NOS kategóriában továbbra is a FAB klasszifikációhoz hasonló a beosztás.

Annak ellenére, hogy az AML klasszifikáció alapját a genetikai eltérések adják, a morfológiai vizsgálat és az immunfenotipizálás maradt az elsővonalbeli vizsgálati módszer. Az ilyen módon, rövid időn belül elkészült eredmények alapján célzott módon kereshető a genetikai eltérés.

Az AML diagnosztika során a marker expressziós mintázat alapján megállapítható, melyik alcsoportba tartozik a vizsgált leukémia. A sejtfelszíni és intracitoplazmatikus markerek megjelenése időbeni eltérést mutat. Az intracitoplazmatikus markerek a sejt érési folyamatának korábbi szakaszában jelenik meg, mint általában a sejtfelszíni markerek. A citoplazmatikus markerekkel többnyire akkor is azonosítható a sejtvonal, ha a sejt felszínén még nem expresszálódnak jellegzetes antigének.

Az immunfenotípus vizsgálatok során sokszor differenciál diagnosztikai problémát jelent a szubtypusba történő besorolás. Az M3 promyelocytás leukémia esetén a markerek hiányára alapozott diagnózis, az M4-M5 esetekben a monoblast eredet igazolása vagy kizárása és elkülönítése az M0-M2 típusoktól jelenthet nehézséget. A leukémiás blastok myeloid eredetét alátámasztó MPO pozitivitás mellett az M0-M2 és M4-M5 leukémiákat elkülönítheti a CD14 monocyta marker expressziója. A CD14 sejtfelszínen expresszálódik, így az érés során később jelenik meg a sejteken. Korábban már ismert volt, hogy a monocyta sejtvonal sejtjei FXIII-A fehérjét tartalmaznak. Az a feltevés, hogy a malignusan transzformálódott monoblastokban/monocytákban is kimutatható a FXIII-A, beigazolódott: immunmorfológiai módszerrel kimutatták a FXIII-A-t ezekben a sejtekben.

Munkám során elsőként vizsgáltuk áramlási citométerrel a FXIII-A jelenlétét AML-es csontvelő és perifériás vérmintákon.

Megállapítottuk, hogy a korábbi leírásoknak megfelelően a FXIII alegységei közül kizárólag az A alegység található meg a perifériás vér és csontvelői sejteken, a FXIII-B nem expresszálódik. A FXIII-A pozitivitást csak a sejtek permeabilizálása után észleltünk, tehát az elhelyezkedés intracelluláris, a sejtek felszínén nem található meg. A sejtek közül a MPO-dim pozitív és CD14 monocyta marker koexpressziót mutató monocyták esetén detektáltuk kizárólag a FXIII-A markert, granulocytákon nem. Csontvelő mintában a CD45-bright monocytákon és CD45-dim monoblastokon is pozitivitást láttunk. Az eredményeink azt jelentik, hogy a FXIII-A ideális marker a granulocyta és monocyta sejt típusok elkülönítésére.

Granulocyta irányú érést és monocyta irányú érést mutató sejtvonalakon vizsgáltuk a FXIII-A időbeni megjelenését. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a granulocyta érési folyamat során az érés egyik szakaszában sem jelenik meg a FXIII-A. A monocyta érés vizsgálata folyamán viszont azt tapasztaltuk, hogy a FXIII-A a kezdetektől kimutatható erős intenzitással, míg a CD14 sejtfelszíni marker csak az érés későbbi szakaszában detektálható. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a FXIII-A igen korai markere a monocyta sejtvonálnak, akkor is igazolható a monocyta eredet, ha a CD14 marker még nem expresszálódik a sejtek felszínén.

Az eredményeink tükrében vizsgáltuk AML-es mintákon a FXIII-A pozitivitást áramlási citométerrel. Az M0, M1, M2, M3, M6 szubtypusokban két kivétellel nem találtunk pozitivitást. Az M4 és M5 AML esetekben a FXIII-A jelölődés megegyezett vagy nagyobb mértékű volt, mint a CD14 felszíni marker pozitivitás. Sok esetben jelentős különbség volt a két marker százalékos pozitivitása között: sokkal több sejt mutatott FXIII-A, mint CD14 jelölődést. Az átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) adatokból az is megállapítható, hogy a FXIII-A más intracitoplazmatikus markertől abban is különbözik, hogy a malignus sejtekben nagyobb intenzitással van jelen, mint a normál sejtpopulációban. AML M4, M5 esetekkel párhuzamosan CMMoL-ás betegek mintáit is vizsgáltuk, amelyekben a FXIII-A MFI értékei szintén szignifikánsan magasabbak voltak, mint a normál monocytákban.

Az eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a FXIII-A intracitoplazmatikus marker szenzitívebb, mint a felszíni CD14. Így az AML M4 vagy M5 leukémia esetén akkor is azonosíthatók a monocyta sejtvonalhoz tartozó sejtek, amikor azok a CD14 monocyta markert még nem expresszálják.

Az AML M7 altípus klasszifikációjában szintén hasznos marker a FXIII-A, hiszen a thrombocyta/megakaryocita sejtvonal sejtjeiben kimutatták a jelenlétét korábban és a vizsgálataink alapján is igen erős FXIII-A fluoreszcencia detektálható a kóros megakaryocita sejtvonal sejtjeiben.

Az AML esetén számos esetben megfigyelhető szokatlan marker expressziós kép. A szokatlan marker mintázatnak, a leukémia-asszociált immunfenotípusnak (LAIP) különösen a kezelést követő minimális reziduális betegség keresésekor van igen nagy jelentősége, hiszen a diagnóziskor talált kóros sejtpopuláció detektálására így lesz mód a beteg későbbi mintáiból. A LAIP alapján tudjuk megkülönböztetni a leukémiás blastokat a normál hemopoietikus progenitor sejtectől.

Az aberráns fenotípusnak több megnyilvánulási formája létezik: bilinearitás, cross-lineage antigén expresszió, antigén overexpresszió, aszinkron antigén expresszió, aberráns fényszórási kép.

A bifenotípusos akut leukémiák (BAL) esetén a sejtvonal egyértelműen nem állapítható meg, mert több olyan antigén expresszió detektálható, melyek egynél több sejtvonalra jellemző. A WHO 2008-as ajánlásában a BAL elnevezést felváltotta a kevert-fenotípusú akut leukémia (MPAL=mixed-phenotype acute leukemia) terminus.

A LAIP jelentősége az AML-ek prognosztikájával kapcsolatban is felmerült. Bár a prognosztika szempontjából a citogenetikai eltérés a leginkább elfogadott független rizikófaktor, ismert, hogy az AML-ek kb. felében nincs kromoszóma eltérés. Számos retrospektív analízis készült, melyben több száz AML-es beteg marker expressziós képét vetették össze a terápiára adott válasszal, a komplett remisszió és relapszus arányával. Az eredmények változatosak. Összefüggést a myeloid markerek (CD13, CD33, CD117) és a prognózis között legtöbb esetben nem találtak.

A felnőttkori AML-ek többsége még ma is viszonylag kedvezőtlen kimenetelű, az átlagos túlélés mindössze az esetek 24,5%-ban éri el az 5 évet (www.seer.cancer.gov). Mivel az esetek felében nincs citogenetikai eltérés, egyéb alternatív prognosztikai faktorok kutatása is előtérbe került. Többek között multidrog rezisztenciát okozó két transzmembrán fehérje: a P-glikoprotein és az FLT3 tirozin kináz. A kemoterápia hatástalansága szignifikánsan rövidebb túlélést, rossz prognózist jelent.

A munkánk során vizsgált FXIII-A pozitív AML-es eseteink között kettő volt, melyeket az M4, M5 és M7 szubtipusok közül egyikbe sem tudtunk besorolni az immunfenotípus

eredmények alapján. Az egyik M0, a másik M3 típusú leukémiának bizonyult. Az M0 leukémia esetén nem túl meglepő a FXIII-A pozitívítás, mert kóros, differenciálatlan blastok sok esetben myeloid, B-sejt vagy T-sejt markereket együttesen is expresszálhatnak. Az M3, akut promyelocytás leukémia esetén szokatlan volt az eredményül kapott FXIII-A pozitívítás, így további APL-es betegmintákat vizsgáltunk meg.

14 de novo APL-es beteg közül 10 beteg mintáinak áramlási citometriás vizsgálata során mutattuk ki a FXIII-A antigént a leukémiás promyelocyta sejtekben. A leukémiás sejtek immunfenotípusa a jellegzetes, marker hiányon alapuló képet mutatta: CD34-/CD15- és HLA-DR negativitás. A CD45-dim sejtek intenzív autofluoreszcenciát, MPO, CD33 és CD117-dim pozitívítást mutattak. A konfokális mikroszkóppal végzett vizsgálataink is alátámasztották a FXIII-A jelenlétét a sejtekben. A sejten belül intracitoplazmatikus lokalizációt detektáltunk.

A különböző sejtek FXIII-A fehérje tartalma eltérő. A vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a FXIII-A pozitív kóros promyelocyta sejtekben a fehérje tartalom nagy mennyiségű, a thrombocyta FXIII-A tartalmához hasonló és 10x több, mint pl. leukémiás lymphoblastokban.

Az A alegység sejten belüli struktúráját vizsgálták thrombocytákban és kimutatták, hogy A₂ dimer formában található meg. Feltételezhető, hogy más sejt típusokban is ebben a formában van jelen.

A FXIII aktivációjának folyamata a plazma és celluláris FXIII esetén különbözik. A plazmában thrombin és Ca²⁺ hatására proteolitikus úton lehasad az aktivációs peptid és kialakul a FXIIIa forma. A celluláris aktiváció sokkal lassúbb folyamat, nem szükséges proteolízis, a Ca²⁺ hatására alakul ki az aktív forma.

Az inaktiváció során nem ismertünk olyan mechanizmust, amely szabályozná a folyamatot. Munkatársaink nemrég bizonyították, hogy a humán neutrophil elasztáz (HNE) szerepet játszik az inaktivációban.

Az APL-es mintáinkban Western blot analízissel vizsgáltuk a FXIII-A fehérje megjelenési formáit. A Western blot képen a betegek promyelocyta sejtlizátumából származó, FXIII-A-nak megfelelő sávot detektáltunk 82 kD-nál, valamint több, kisebb tömegű fehérjének megfelelő sávot. Összehasonlítva a hasítási termékek által adott sávokat a HNE által proteolízis útján hasított, tisztított FXIIIa₂-ből származó sávokkal, egyező mintázatot kaptunk. Így arra következtettünk, hogy az APL-es mintákban talált FXIII-A-ból származó

kisebbségi fehérje molekulák a HNE által végzett intracelluláris proteolízis következtében jönnek létre. A betegek kezelését követő sejtlízis FXIII-A felszabadulással jár, az így létrejövő FXIII-A aktivitás nagymértékben függhet a HNE általi degradáció mértékétől.

Azok a vizsgálatok, melyeket sejtvonalakon végeztünk, azt bizonyítják, hogy a myeloblast eredetű sejtek az érés egyik stádiumában sem expresszálnak FXIII-A antigént. A normál promyelocytákat vizsgálva is azt tapasztaltuk, hogy FXIII-A nem detektálható a sejtekben. Mindebből megállapíthatjuk, hogy a leukémiás promyelocytákban expresszálódó FXIII-A leukémia-asszociált immunfenotípust jelent.

Az APL a 2008-as WHO klasszifikáció alapján önálló entitás a jellegzetes t(15;17) transzlokációval. Az APL sejtek eredete nem teljesen tisztázott. Korábban már detektáltak monocytákon is megjelenő markereket a sejteken, pl. CD9 vagy CD68 markert, de CD14 markert nem. A csak APL-ben pozitív markerek megtalálása azért lenne jelentős, mert jelenleg az immunfenotípus vizsgálatok eredménye marker negativitásokon alapul, nem pedig jól meghatározott, pozitív markerek detektálásán. Az általunk vizsgált viszonylag alacsony betegszám miatt nem ítéltük meg, hogy vajon létezik-e kapcsolat a FXIII-A expresszió és az APL-ben sokszor kialakuló disszeminált intravaszkuláris koaguláció (DIC) és vérzéses folyamatok között. A vérzés többféle ok következménye, az egyik az elasztáz enzim. A súlyos vérzéses folyamathoz sok esetben hozzájárul a betegek kifejezett thrombocytopeniája.

A betegeink állapotát követve megfigyeltük, hogy azoknál, akik nem reagáltak a kezelésre vagy relapszus alakult ki, a FXIII-A markert nem detektáltuk. Esetükben az átlagos túlélési idő 1 hónap volt. A FXIII-A markert expresszáló betegek pedig a mai napig életben vannak.

Eredményeink szerint az AML differenciál diagnosztikai problémák megoldásában és MRD keresése esetén is rendkívül hasznosnak bizonyul a FXIII-A marker vizsgálata. AML M3 esetén pedig a FXIII-A marker leukémia-asszociált immunfenotípust jelent, ami a prognózissal is összefüggést mutathat.

ÖSSZEFOGLALÁS

A véralvadás XIII-as faktora egy protranszglutamináz, melynek aktív formája a véralvadás utolsó fázisában kialakuló fibrinhálót stabilizálja. A vérplazmában heterotetramer (A₂B₂) formában kering, a sejtekben két A alegységből álló homodimerként (A₂) van jelen.

A csontvelői és perifériás vér sejtek közül a megakaryocyt/thrombocyt és monocyt/macrophag rendszer sejtjeiben található meg a FXIII-A, valamint ezen sejtvonalakhoz tartozó sejtek malignusan transzformálódott alakjai is expresszálják.

A véralvadás XIII-as faktorának megjelenését vizsgáltuk akut myeloid leukémiás sejtekben. Az alábbiakban összefoglalom azokat a megállapításokat és következtetéseket, melyek a munkám során kapott eredményeken alapulnak.

- A FXIII A és B alegységei ellenes, fluoreszcens festékkel jelölt monoklonális antitestek és áramlási citométer alkalmazásával megállapítottuk, hogy normál perifériás vér és csontvelő mintában a FXIII alegységei közül kizárólag az A alegység van jelen, ami intracellulárisan található meg a monocyt sejt vonal sejtjeiben.
- Sejt vonalakat vizsgálva azt találtuk, hogy a granulocyt irányú érés során egyik fázisban sem detektálható FXIII, a monocyt irányú érés során a kezdetektől kimutatható a FXIII-A, a CD14 később detektálható a sejt felszínen. Az érés során a sejtekre jellemző antigének közül az intracelluláris markerek hamarabb expresszálódnak, mint a sejt felszíni markerek.
- Akut myeloid leukémiás minták esetén az M4 (myelomonocytás) és M5 monoblastos/monocytás) altípusokban a FXIII-A alapján akkor is azonosíthatók a monocyt sejt vonalhoz tartozó sejtek, amikor azok felszínükön még nem expresszálnak CD14 monocyt markert. Mindez megkönnyíti a differenciál diagnózist.

- Vizsgálataink során FXIII-A antigént találtunk akut promyelocytás leukémia sejtekben. Sejten belül a citoplazmában helyezkedik el és az intakt fehérjén kívül hasítási termékei is azonosíthatók.
- Normál promyelocytákban FXIII-A nem expresszálódik, így a FXIII-A pozitivitás leukémia-asszociált immunfenotípusnak bizonyult. Az APL diagnosztika immunfenotípus vizsgálattal korábban egyes markerek negativitásán alapult, a FXIII-A új markerként alkalmazható a leukémia differenciáldiagnosztikában.
- A FXIII-A+ APL-es betegek kedvezőbb túlélése kapcsán a FXIII-A prognosztikai jelentősége is felmerül, melynek kutatása jelenleg folyamatban van.

Iktatószám: DEENKÉTK/253/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Simon Ágnes
Neptun kód: ASA63K
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Simon, Á.**, Bagoly, Z., Hevessy, Z., Csáthy, L., Katona, É., Vereb, G., Ujfalusi, A., Szerafin, L., Muszbek, L., Kappelmayer, J.: Expression of coagulation factor XIII subunit A in acute promyelocytic leukemia.
Cytom. Part B. Clin. Cytom. 82B (4), 209-216, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.21019>
IF:2.525 (2011)
2. Kappelmayer, J., **Simon, Á.**, Katona, É., Szántó, A., Nagy, L., Kiss, A., Kiss, C., Muszbek, L.: Coagulation factor XIII-A. A flow cytometric intracellular marker in the classification of acute myeloid leukemias.
Thromb. Haemost. 94 (2), 454-459, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1160/TH05-03-0206>
IF:3.056



További Közlemények

3. Kiss, F., **Simon, Á.**, Csáthy, L., Hevessy, Z., Katona, É., Kiss, C., Kappelmayer, J.: A coagulation factor becomes useful in the study of acute leukemias: Studies with blood coagulation factor XIII.
Cytometry A. 73A (3), 194-201, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20485>
IF:3.259
4. Jakó, J., Szerafin, L., Nagy, P., **Simon, Á.**, Kappelmayer, J.: Familial Malignant Blood Diseases: Lessons Learned from a 20-year Period.
Leuk. Lymphoma. 45 (1), 109-111, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/1042819031000149359>
IF:1.147
5. Kappelmayer, J., **Simon, Á.**, Kiss, F., Hevessy, Z.: Progress in defining multidrug resistance in leukemia.
Expert Rev. Mol. Diagn. 4 (2), 209-217, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1586/14737159.4.2.209>
6. Szegezdi, É., Kiss, I., **Simon, Á.**, Blaskó, B., Reichert, U., Michel, S., Sándor, M., Fésüs, L., Szondy, Z.: Negative Selection of Thymocytes by Inhibiting Ligation of Retinoic Acid Receptor a Regulates both DNA Binding of nur77 and Synthesis of Bim.
J. Immunol. 170, 3014-3022, 2003.
IF:6.702

Összesített impakt faktor: 16,689

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 5,581

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.07.31

