

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Sejtfelszíni receptorok expressziójának modulációja thrombocytákban és leukocytákban

Bekéné Debreceni Ildikó

Témavezető:

Dr. Kappelmayer János

egyetemi tanár



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2020

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
Thrombocytá sejt felszíni receptorok	6
A thrombocyták szerepe a hemostázisban és a gyulladásban.....	9
Thrombocytá alosztályok a hemostázisban: aggregáló és prokoaguláns vérelemek	12
A thrombocytá-leukocytá interakciót kialakító receptorok	13
Leukocytá adhéziós receptorok és azok szerepe különböző kórképekben.....	14
CÉLKITŰZÉS.....	17
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	18
Vérminták gyűjtése és minta előkészítés	18
<i>Thrombocytá receptor és funkció vizsgálatokhoz</i>	18
<i>Leukocytá receptor és funkció vizsgálatához</i>	18
LPS hatása a thrombocytá aktivációra	19
<i>Prokoaguláns aktivitás assay (PCA)</i>	19
<i>Re-LPS kötődés vizsgálata és CD40L expresszió</i>	19
<i>Thrombocytá aggregáció</i>	19
<i>Thrombocytá mikropartikula (PMP) analízis</i>	20
HIT antitestek thrombocytá aktiváló hatása.....	20
<i>Funkcionális HIT teszt</i>	20
Dasatinib hatása a GPVI receptoron keresztül vérelemek aktivációra.....	21
<i>Kollagén kiváltotta thrombocytá aggregáció és ATP felszabadulás mérés</i>	21
<i>Foszfatidil szerin (PS) expresszió meghatározása</i>	22
<i>Coated-platelet meghatározás</i>	22
<i>Thrombin képződés vizsgálata (TGT)</i>	22
<i>Aktivált GPIIb/IIIa konformáció detektálása PAC 1 kötődéssel</i>	23
<i>Alvadék retrakció vizsgálata</i>	24
<i>SFK-k vizsgálata Western blot-tal</i>	24
Leukocytá receptor, funkció és mechanizmus vizsgálatok	25
<i>Felszíni L-szelektin és TACE/ADAM17 meghatározása</i>	25
<i>Foszforilált p38MAPK meghatározása</i>	26
<i>Plazma L-szelektin mérés ELISA-val</i>	26
<i>Plazma L-szelektin kimutatás Western blot-tal</i>	26
<i>Foszfatáz aktivitás mérés</i>	27

<i>In vitro</i> kísérlet foszfatáz gátlóval és p38MAPK inhibitorral	27
<i>Statisztikai analízis</i>	27
EREDMÉNYEK	28
LPS hatása a thrombocytá aktivációra	29
HIT antitest (anti-PF4/heparin IgG) hatása a vérlemezke aktivációra és funkcióra.....	32
Dasatinib hatása a thrombocytá aktivációra és funkcióra	33
Foszfatáz aktivitás moduláló hatása az L-szelektin expresszióra.....	40
MEGBESZÉLÉS.....	48
ÖSSZEFOGLALÁS.....	54
SUMMARY	55
AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ EREDMÉNYEI, MEGÁLLAPÍTÁSAI, KLINIKAI JELENTŐSÉGE	56
IRODALOMJEGYZÉK.....	58
PUBLIKÁCIÓS LISTA	67
TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS	71
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	72
FÜGGELÉK.....	73

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC	antibody binding capacity, antitest-kötő kapacitás
ACS	acute coronary syndrome, akut koronária megbetegedések
ADP	adenosine diphosphate, adenzin difoszfát
ATP	adenosine triphosphate, adenzin trifoszfát
BCR-ABL	breakpoint cluster region- Abelson
BSA	bovine serum albumin, marha szérum albumin
CLA	calyculin A
CLL	chronic lymphocytic leukemia, krónikus limfocitás leukémia
CML	chronic myeloid leukemia, krónikus mieloid leukémia
DMSO	dimethyl sulfoxide, dimetil szulfoxid
ECL	enhanced chemiluminescence, fokozott kemilumineszcencia
ECM	extracellular matrix, extracelluláris mátrix
EDTA	ethylene diamine tetraacetate, etilén diamin tetraacetát
ELISA	enzym linked immunosorbent assay enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat
ETP	endogenous thrombin potential, endogén thrombin potenciál
FITC	fluorescein isothiocyanate, fluoreszcein-izotiocianát
Fng-PESA	fibrinogen- phycoerythrin-streptavidin, fibrinogén-fikoeritrin-streptavidin
FSC	forward scatter, előreszórt (fény)
GFP	gel filtered platelet, gél szűrt vérlemezke
GlyCAM 1	glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1 glikolizáció-függő sejt adhéziós molekula-1
GPVI	glycoprotein VI, glikoprotein VI
HEPES	4-2-hydroxyethyl-1-piperazine ethanesulfonic acid

	4-2-hidroxietyl-1-piperazin etánszulfonsav
HEV	high endothelial venules, magas endothelú venulák
HIT	heparin-induced thrombocytopenia, heparin indukált thrombocytopenia
ICAM	intercellular adhesion molecule, intracelluláris adhéziós molekula
LBP	Lipopolysaccharide binding protein, lipopoliszacharid kötő fehérje
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1, lymphocyta funkció- társított antigén 1
Mac-1	macrophage-1 antigen, makrofág-1 antigén
MFI	mean fluorescence intensity, átlagos fluoreszcencia intenzitás
NA	non-activated, nem aktivált
NET	neutrophil extracellular trap, neutrofil extracelluláris csapda
OD	optical density, optikai denzitás
p38MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase, p38 mitogén-aktivált protein kináz
PAF	platelet activating factor, thrombocyta aktiváló faktor
PAR-1	protease-activated receptor-1, proteáz aktivált receptor-1
PBMC	peripheral blood mononuclear cell, perifériás vér mononukleáris sejt
PBS	phosphate buffered saline, foszfát puffer
PCA	procoagulant activity, prokoaguláns aktivitás
PE	phycoerythrin
PECy5	phycoerythrin-cy5
PerCP	peridinin chlorophyll protein
PF4	platelet factor 4, thrombocyta 4-es faktor
PFA	paraformaldehyde, paraformaldehid
PFA-100	platelet function analyzer-100, thrombocyta funkció analizátor-100
PL	phospholipid, foszfolipid

PMN	polymorphonuclear, polymorphonukleáris
PMP	platelet microparticles, thrombocytá mikropartikula
PP1	protein phosphatase 1, protein foszfatáz 1
PP2A	protein phosphatase 2A, protein foszfatáz 2A
pp38MAPK	phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase foszforilált p38 mitogén-aktivált protein kináz
PPP	platelet poor plasma, thrombocytá szegény plazma
PRP	platelet rich plasma, thrombocytá dús plazma
PS	phosphatidylserine, foszfatidil szerin
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1, P-szelektin glikoprotein-1
Re-LPS	Re mutant (rough strain)-lipopolysaccharide, Re mutáns-lipopoliszacharid
RFI	relative fluorescence intensity, relatív fluoreszcencia intenzitás
RT	room temperature, szobahőmérséklet
SDS	sodium dodecyl sulfate, nátrium dodecyl szulfát
SFK	Sarcoma family kinases, szarkóma család kinázai
S-LPS	S (smooth strain)-lipopolysaccharide, S-lipopoliszacharid
SSC	side scatter, oldalra szórt (fény)
TACE	tumor necrosis factor- α -converting enzyme tumor nekrozis faktor- α konvertáló enzim
TCA	trichloro acetic acid, triklórecetsav
TF	tissue factor, szöveti faktor
TGT	thrombin generation test, thrombin generációs teszt
TKI	tyrosine kinase inhibitor, tirozin kináz inhibitor
TRAP	thrombin receptor activating peptide, thrombin receptor aktiváló peptid
TRIS	tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, tris-hidroximetil-aminometán

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A XIX. században Max Schultze és Giulio Bizzozero révén már ismertté vált, a 2-5 μm nagyságú, sejtmag nélküli vérlemezkéknek fontos szerepe a hemosztázisban, érsérülés esetén. Ekkor a vérlemezkék a vérárammal a sérülés helyére jutnak, ott az érfalhoz és egymáshoz tapadnak, majd a thrombus eléri azt a nagyságot, amivel kitölti az ér lumenét, megakadályozva a további vér kiáramlást (1). Későbbi tanulmányokban több komponenst és mechanizmust leírtak, melyek érzékenyebé teszik a vérlemezkéket a stimulációkra, valamint felismertek több olyan mechanizmust, mely által a vérlemezkék kontrollálatlan aktivációja veszélyezteti az érrendszer integritását (2,3). Napjainkban vezető halálokok között szerepelnek a szív- és érrendszeri, valamint a thrombotikus megbetegedések (4), melyek patogenezisében a vérlemezkék aktivációja és azok interakciói alapvető szerepet játszanak. A különbség a fiziológiás hemosztázis és patológiás trombotikus folyamatok kezdete között nagyon kicsi, ezért a folyamat állandó szabályozására van szükség (5). Számos tanulmány számolt be arról, hogy a vérlemezkéknek nem csak a hemosztázisban van szerepük, hanem az immun- és gyulladási folyamatokban (6,7), hozzájárulnak angiogén és fejlődési folyamatokhoz (8), a mikroorganizmusok közvetlen elpusztításához (9) és daganatos áttétek kialakulásához (10).

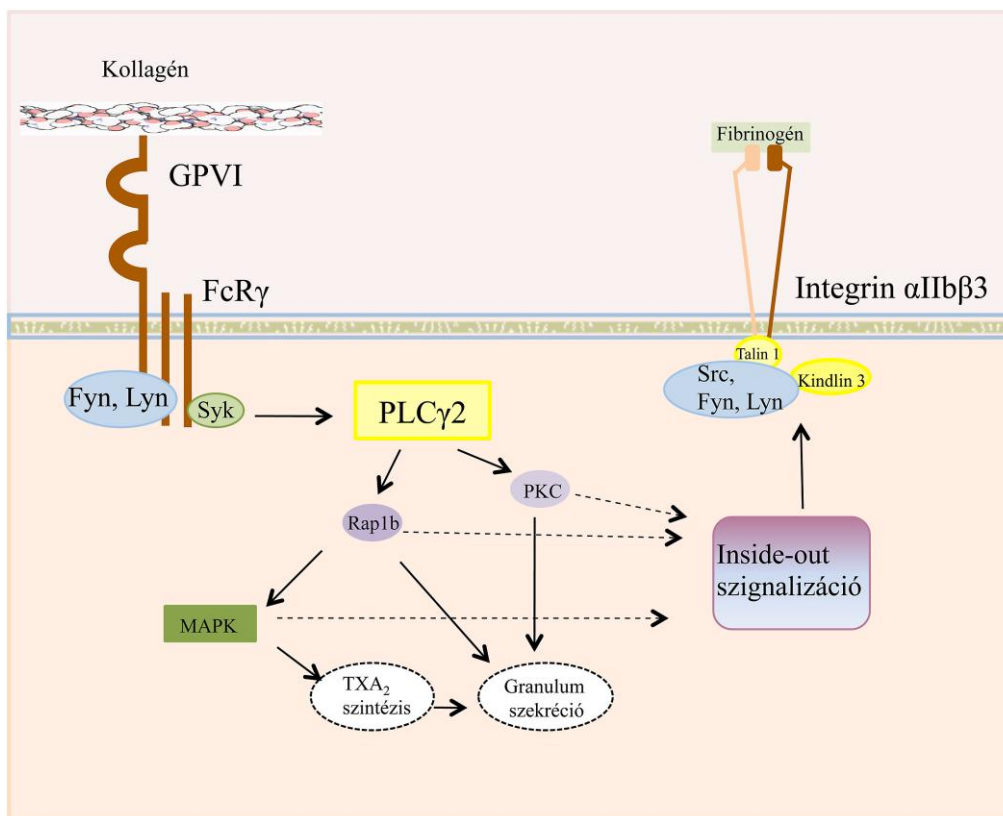
Tanulmányaink során a vérlemezkék immunreceptorain keresztüli aktivációt vizsgáltuk, amelyek hozzájárulhatnak a szív- és érrendszeri, valamint a thrombotikus megbetegedések kialakulásában. A tanulmányokat alapvetően kétféle megközelítéssel végeztük (i) egyrészt in vitro kísérleteket végeztünk (ii) másrészt különböző - vizsgálataink szempontjából releváns - kórképekből származó ex vivo mintákat vizsgáltunk meg. Ezen kísérletek során nem csak a sejtek aktivációs állapotát jellemeztük részben celluláris részben szolubilis markerek meghatározásával, hanem a tapasztalt eltérések háttérében álló pathomechanizmusokat is vizsgáltuk.

Thrombocyta sejtfelszíni receptorok

A vérlemezkék számos sejtfelszíni receptort expresszálnak, ezek közül az adhéziónak, a trombus képződést szabályozó receptorok és a purinerg receptorok főként a hemosztázis folyamatokban működnek szenzorként. Míg a mintázatokat, antigéneket vagy kemokineket felismerő és szialinsav-kötő receptorok az immunitásban játszanak fő szerepet. A

vérlemezkék legjobban karakterizált funkciója a hemosztázisban betöltött szerepük, ezért nem meglepő, hogy a publikációk többsége a receptoroknak a hemosztatikus folyamatokban betöltött szerepével foglalkozik. A receptorok egy része nemcsak a jelátvitelt végzi a sejtekben, hanem adhéziós molekulaként is gyakran kettős szerepet töltenek be és emellett meghatározzák a vérlemezkék reaktivitását „fenotípusát” is (11).

Az integrinek az adhéziós és szignalizációs molekulák fő osztálya, többségük konformációs változáson megy át vérlemezke aktiváció során, hogy növelje a ligandhoz való affinitását. Az érfal sérülésekor először a vérlemezke $\alpha 2\beta 1$ integrin (GPIa-IIa) kötődik a kollagénnel, majd a glikoprotein VI (GPVI) receptoron keresztül az adhézió fokozódik és aktiválódik a vérlemezke. Nagy nyírófeszültség mellett sem a $\alpha 2\beta 1$ sem a GPVI nem elegendő az adhézióhoz a vérlemezke GPIb és a plazma von Willebrand faktor (vWF) szükséges a vérlemezke kollagénnel történő kötődéshez. Az integrinek másik családjába tartozó $\alpha \text{IIb}\beta 3$ (GPIIb-IIIa) csak a vérlemezkéken expresszálódik, aktivációkor konformáció változáson megy át, az RGD-kötőhely felszínre kerülésével, nagy affinitással köti a fibrinogént, nélkülözhetetlen a vérlemezke adhézióban, aggregációban és emellett kulcsfontosságú az alvadék retrahálódásában. A vérlemezkéken a második legnagyobb számban jelenlévő adhéziós receptor a GPIb-IX-V komplex, mely a leucinban-gazdag ismétlődéseket tartalmazó családjába tartozik, és esszenciális szerepe van a vérlemezke adhézióban magas nyírófeszültségnél (5,11). Az immunglobulin szupercsaládba tartozó sejtadhéziós GPVI receptoron keresztüli kollagén kiváltotta vérlemezke aktiváció során a Sarcoma család kinázai (SFK) nevezetesen a Lyn és Fyn kinázok foszforilálják az FcR γ - lánc ITAM régióját, amely a Syk tirozin kináz foszforilációját váltja ki. Ezzel a lépéssel beindul egy downstream jelátviteli kaszkád, mely a foszfolipáz C $\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$) aktivációjával jár és bekövetkezik a vérlemezke aktiváció, mely során egy inside-out folyamat során aktiválódik a GPIIb/IIIa, amiben az SFK-k közé tartozó Lyn, Fyn kinázokon kívül az Src kináznak is jelentős szerepe van (12) (1. ábra).



1. ábra. GPVI receptoron keresztüli jelátviteli kaszkád

A GPVI receptoron keresztüli vérlemezke aktiváció során a Lyn és Fyn kinázok foszforilálják az FcR γ -lanc ITAM régióját, amely a Syk tirozin kináz foszforilációját váltja ki, majd a PLC γ 2 foszforilációján keresztül bekövetkezik a vérlemezke aktiváció, melynek eredményeként SFK-k közreműködésével a GPIIb/IIIa (integrin α IIb β 3) aktiválódik.

Syk: (spleen) tirozin kináz; Rap1 b: RAS-összefüggő fehérje 1b; MAPK: mitogén-aktivált protein kináz; PKC: protein kináz C

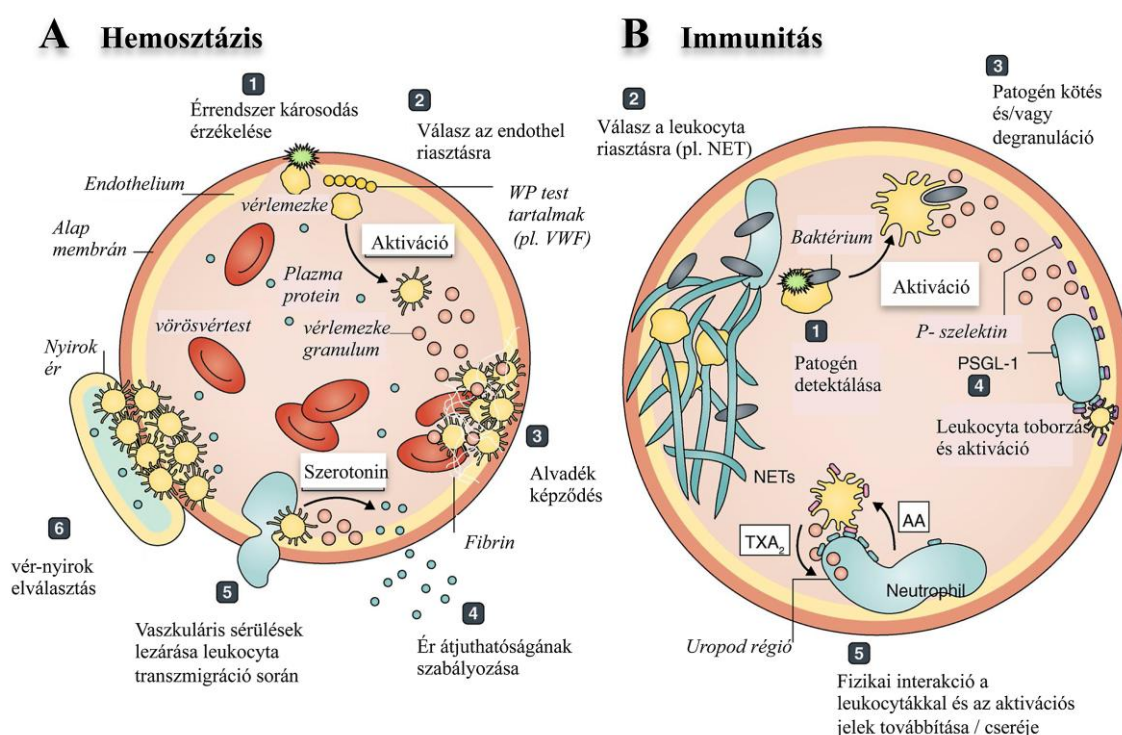
A vérlemezkék aktivációjakor a C-típusú lektin receptor családdhoz tartozó P-szelektin (CD62P) adhéziós receptor az α -granulumból kikerül a vérlemezkék felszínére és a legfontosabb társreceptorával, a PSGL-1 nevű mucinnal összekapcsolódva elősegíti a vérlemezke-fehérvérsejt közötti interakció kialakulását. A trombus képződést reguláló receptorok csoportjába tartoznak a proteáz aktivált receptorok (PAR) humán vérlemezkén a PAR1 és PAR4 található. A PAR-1 már alacsony thrombin koncentrációnál is gyors folyamatként aktív thrombin kötést biztosít, míg a PAR-4 magasabb thrombin koncentrációnál lassú folyamatként lép működésbe. A purinergreceptorok közül a P2Y $_1$, P2Y $_12$ -höz a denz- granulumból felszabaduló adenzin-difoszfáttal (ADP) és a P2X $_1$ -hez az adenzin-trifoszfát (ATP) kapcsolódik vérlemezke aktiváció során (13), ezzel fokozva annak aktiválódását.

A Toll-like receptorok (TLR) a mintázat felismerő receptorokhoz (Pattern recognition receptors; PRR) tartoznak, és fontos szerepük van az immunitásban és az immunválaszban. Infekciókor a baktériumok közvetlenül is kötődhetnek a vérlemezkékhez a TLR2 és TLR4 receptoron keresztül, aminek eredményeként ezek a receptorok upregulálódnak. Míg a TLR4 receptora Gram-negatív baktériumok alkotóelemét a lipopoliszacharidot (LPS) ismeri fel a TLR2 receptor a Gram-pozitív baktériumok peptidoglikánját köti, a ligand receptorhoz történő kapcsolódásakor fokozott vérlemezke adhéziót vált ki. (14). Az antigén felismerő receptorokhoz tartozó CD40L más nomenklatura szerint CD154 kis mennyiségben fellelhető a vérlemezkék felszínén, thrombocytá aktivációkor percekben belül a subcelluláris kompartmentekből a sejtfelszínre kerül majd az aktiváció során a felszínre került CD40L ezután lehasad a thrombocytáról, létrehozva a szolubilis formát (szolubilis CD40L vagy sCD40L). Mind a membránkötött, mind a szolubilis forma rendelkezhet prokoaguláns és proinflammatorikus aktivitással. A sCD40L nemcsak a CD40 receptorához, hanem a GPIIb/IIIa receptorhoz is kötődhet, ezzel thrombocytá aggregációt indukálva (15,16). Ugyancsak ehhez a csoporthoz tartozik az Fc γ receptor IIa (Fc γ RIIa), mely alacsony affinitású receptora az immunglobulin G (IgG) Fc doménjének és szerepet játszik a baktériumok, vírusok, paraziták elleni immunológiai védelemben. Különböző autoimmun és alloimmun betegségekben az Fc γ RIIa clustering vérlemezke aktivációt vált ki (5).

A thrombocyták szerepe a hemosztázisban és a gyulladásban

A hemosztatisz folyamatok legfontosabb feladata, hogy (i) érfalsérülés esetén rögzítődéssel megakadályozza a további vérvesztést, (ii) a vért folyékony állapotban tartsa, valamint (iii) eltávolítsa a képződött alvadékokat. A vérlemezkék normál élettani körülmények között inaktív formában keringenek a véráramban. Az érfal károsodása során az extracelluláris mátrix fehérjék szabaddá válnak, mely először a vérlemezkék adhéziójához, majd aktivációjához vezet (2. ábra). Az aktiválódási folyamat három, egymást részben átfedő fázisból áll. A kezdeti fázisban a vérlemezkék adhéziós receptoraikon keresztül kölcsönhatásba lépnek a szabaddá váló endothelsejt-réteg alatti kollagénnel és vWF-ral, ennek folytán a thrombocyták egy rétegben odatapadnak a sérült érfalhoz. Az α 2 β 1 integrin és a GPVI receptorok közvetlenül, míg a GPIIb α és a GPIIb/IIIa receptorok a vWF rögzítésén keresztül kötődnek a kollagénnel. Ezek a folyamatok szignalizációs útvonalak beindulását és a vérlemezkék aktivációját eredményezik. Aktiváció alatt az intracelluláris kalcium szint megemelkedik, ez együtt jár a foszfatidil szerin felszínre kerülésével, ami facilitálja a faktorok, faktorkomplexek (tenáz, protrombináz) működésének hatékonyságát, a koagulációs

folyamatok beindulását. A második, extenziós fázisban további thrombocyták aktiválódnak, majd kapcsolódnak össze egymással, amelynek során többek között ADP-t szekretálnak a denz-granulumokból, valamint P-szelektint az α -granulumokból. A P-szelektin receptorok fokozott expressziója a sejtfelszínen, többféle sejt-sejt interakció kialakulásához vezet a vérlemezkék, a fehérvérsejtek és az endothelsejtek között. A szekretált ADP, valamint a képződött thromboxán A₂ és thrombin további vérlemezkéket aktivál, aminek eredményeképpen fokozott szekréció, illetve a GPIIb/IIIa fibrinogén receptor aktivációja következik be. Mindez teljes thrombocytá aggregációhoz és végül a stabil vérrög kialakulásához vezet. A végső ún. stabilizációs fázisban a vérlemezkék megerősítik a vérrögöt és végül az egész thrombus retrahálódnak és elzárja az érfal-sérülés helyét (17, 18).



2. ábra. Fő thrombocytá funkciók a hemosztázisban és immunitásban

A vérlemezkék különböző receptorokon keresztül érzékelik az érrendszer károsodását, a GPVI receptoron keresztül képesek kötődni a szubendotheliális kollagénnel. A károsodott vagy aktiválódott endothel sejtekből válaszként ADP vagy a Weibel-Palade testekből VWF szekretálódik. Thrombocytá aktivációkor a vérlemezkék beindítják a thrombus képződést, miközben szabályozzák az érfal permeabilitását. Ezen folyamatok mellett a vérlemezkék megakadályozzák a vörösvértestvesztést a fehérvérsejt migráció alatt, valamint a lymphangiogenesis során (A). A vérlemezkék mintázat felismerő receptorokon keresztül vagy indirekt úton a fehérvérsejt szignálok keresztül, úgymint a NET képződés vagy citokin felszabadulás képesek felismerni az immunrendszer támadóit. A thrombocyták kötődnek a patogénekhez és becsomagolják őket ezzel előidézve a degranulációjukat és patogének eliminációját, valamint a leukocytá toborzást. Ezek mellett a vérlemezkék kapcsolatba lépnek a fehérvérsejtekkel, hogy továbbítsák vagy megváltoztassák a szignált, amely aktív gyulladásához vezet, például felveszik a neutrophilokból felszabaduló arachidonsavat, hogy thromboxan A₂-t szintetizáljanak (B). Az ábra Li és munkatársainak közleménye alapján (11), annak módosításával készült.

A thrombocyták a hemosztatikus folyamatokon kívül elősegítik a krónikus gyulladással járó folyamatokat atherosclerosisban, modulálják az akut gyulladással járó betegségeket, mint a szepszis és más fertőzések, és hozzájárulnak az autoimmun állapotok súlyosbodásához (19). A vérlemezkék fő élettani szerepe az endothelium barrier funkciójának megőrzése, azonban gyulladással járó folyamatokban közreműködnek a barrier funkció zavarában, mely során növelik az endothelium permeabilitását. Fiziológiai körülmények között a vérlemezkék nem adherálnak az endothel sejtekhez, azonban atherosclerosis kialakulásakor a vasculatura gyulladással járó következtében a vérlemezkék aktiválódnak, majd adherálnak az endotheliumhoz és a továbbiakban szerepet játszanak a neutrophil és monocita adhézióban, mediálják felhalmozódásukat és az endotheliumon keresztüli migrációjukat (20). Ennek a folyamatnak az eredményeként a gyulladás helyén a vérlemezke-fehérvérsejt heterotipikus aggregátumok mennyisége megnő. Ezzel egyidőben a GPVI immunreceptoron keresztüli vérlemezke aktivációnak a következtében emelkedik az aktivált GPIIb/IIIa expresszió, az α -granulum szekréciója és vérlemezke mikropartikula képződés (21). A vérlemezkék, mint mikrobiális szenzorok a rajtuk expresszálandó TLR receptorokon keresztül felismernek endogén ligandokat és mikrobiális patogén-társított molekuláris mintázatokat (PAMP), ez felveti azt is, hogy a vérlemezkék reagálnak a veszély-társított molekuláris mintázatokra (DAMP) is, amelyek aktivált vagy nekrotikus sejtekből szabadulhatnak fel vagy szövetkárosodás után keletkeznek (22), így a vérlemezkék közreműködnek a nem fertőző immunbetegségekben is. Szepszisben a bakteriális eredetű lipopoliszaharid (LPS) a vérlemezkéken expresszálandó TLR4 receptoron keresztül aktiválja a vérlemezkeket (23, 24), melyek kötődnek a neutrophil granulocytákhoz és azok maganyagának felszabadulását váltják ki, neutrophil extracellular trap-ek (NET) képződését eredményezve. A NET-nek nemcsak antimikrobiális hatása van a baktériumok és egyéb patogének elfogásával és eliminálásával, hanem képesek katalizálni illetve fokozni a thrombus képződést a vérlemezkék aktivációjával, aggregációjával (25, 26). Emellett a fokozott NET képződés az egyik mechanizmusa a vérlemezke indukált érkárosodásnak szepszisben (27, 28). A GPVI receptoron keresztüli illetve LPS indukált vérlemezke aktiváció során a vérlemezkék felszínéről lefűződő mikropartikulák proinflammatorikus és prothrombotikus faktorokat például CD40L-ot szállítanak (29) így továbbítva a szignált a target sejthez, ezáltal a mikropartikulák szerepet játszanak a thrombózis kialakulásában és az érrendszer átalakításában. Az LPS direkt vérlemezke aktiváló hatása vitatott (30, 31), aminek hátterében állhat az, hogy a szepszist okozó Gram-negatív baktériumok felszínén változatos arányban található az LPS két formája

az S-LPS és az Re-LPS, ezek felépítésükben csak egy O- poliszacharid láncban különböznek egymástól (32).

Heparin - indukálta thrombocytopeniában (HIT), amely egy immunválasz mediált súlyos mellékhatása a heparinnal történő antikoaguláns terápiának, olyan IgG típusú autoantitestek képződnek, amelyek felismerik a vérlemezke faktor 4-et (PF4), mely köti a heparint. Az így képződő heparin/PF4/IgG immunkomplexek az Fc γ IIa receptorokon keresztül a thrombocyták aktivációját váltják ki, mely során újabb, nagy mennyiségű PF4 kerül a keringésbe, illetve thrombocytá aggregátumok képződnek. A thrombocytá aktiváció során prothrombotikus tulajdonsággal rendelkező mikropartikulák szabadulnak fel az aktiválódott vérlemezkékből (PMP), melyek foszfolipidekkel telített felszíne katalizálja a trombin képződést és végül ez a folyamat thrombocytopeniához és thrombus képződéshez vezet (33-35).

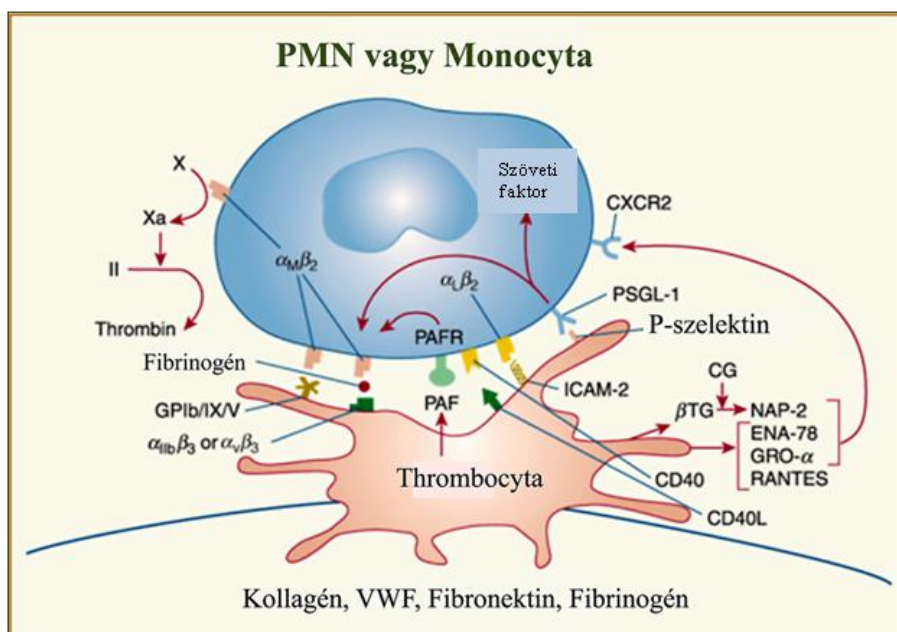
Thrombocytá alosztályok a hemosztázisban: aggregáló és prokoaguláns vérlemezkék

A vérlemezkéknek az adhézión, szekréción és aggregáción kívül szerepe van a vérárvadásban is, kontrollálják a thrombin generációt, támogatják a fibrinképződést és regulálják az alvadék retrakciót (36, 37). A vérlemezke aktiváció során a vérlemezkék eltérő aktivációs állapottal és ennek megfelelően eltérő felszíni tulajdonságokkal rendelkeznek. Ennek folytán a különböző vérlemezke alosztályok különböző feladatokat fognak ellátni (38). A prokoaguláns vérlemezkékben az intracelluláris kalcium szint megemelkedik, ennek hatására foszfatidil szerint (PS) fognak expresszálni és ezzel fokozzák a tenáz és prothrombináz komplexek aktivitását, regulálva a thrombin- és fibrinképződést (36, 39). A thrombus létrejötte során a prokoaguláns vérlemezkék a thrombus felszínére kerülnek a kontrakció folyamata alatt, ami nagyon kritikus a thrombin és fibrin képződés térbeli kontrollálása szempontjából (40). A PS-t expresszálo vérlemezkékhez hasonlóan a coated-vérlemezkék is erős agonista aktiváció hatására jönnek létre, úgymint a kollagén és thrombin, azonban a coated-vérlemezkékre jellemző, hogy a felszínükön nemcsak PS-t expresszálnak, hanem irreverzibilisen megkötik az aktiváció során az α -granulumból kikerülő fehérjéket, ezáltal fokozottabb prokoaguláns aktivitással rendelkeznek (41). Vérlemezkék esetében a GPVI receptoron keresztüli szignalizáció a prokoaguláns vérlemezkék létrejöttének a fő útvonala (42). A PS-t expresszálo vérlemezkéken a GPIIb/IIIa többnyire inaktív, míg az aggregáló vérlemezkék PS-t expressziót csak alig mutatnak, viszont a GPIIb/IIIa jelentős része aktív konformációban van jelen, így a fibrinogént nagy affinitással kötik, mely vérlemezke-vérlemezke, vérlemezke-fehérvérsejt aggregációhoz vezet. Az aggregáló

thrombocyták a vérlemezke-függő koaguláció során az alvadék retrakcióban vesznek részt (43).

A thrombocyt-leukocyt interakciót kialakító receptorok

A sejtfelszíni szelektinek és glükokonjugátok mediálják a fehérvérsejtek és vérlemezkek kihorgonyzódását és gördülésének folyamatát az érfelszínen (44). A vérlemezke-fehérvérsejt heterotipikus aggregátumok képződése a vérlemezke aktiváció szenzitív markere (45). A vérlemezke-fehérvérsejt aggregátumok emelkedett szintjét találták akut koronária megbetegedésekben (ACS), szepszisben és dialízis során (46-48). Heterotipikus aggregátumok képződésekor a vérlemezke aktivációkor sejtfelszínre kerülő P-szelektinhez nagy affinitással kötődik a neutrophilek, monocyták, és lymphocyták felszínén konstitutívan expresszálódó P-szelektin glikoprotein ligand-1 (PSGL-1). A folyamat során a P-szelektin és PSGL-1 alkotják a fő receptor-ligand párt a vérlemezkek és fehérvérsejtek között (3. ábra). Ez a kötés teszi lehetővé a hatékony fehérvérsejt toborzást érsérülés esetén (49, 50). A PSGL-1 P-szelektinnel történő ligációja egy szignalizációs kaszkádot indít be a fehérvérsejtekben, amely a fehérvérsejt integrinek macrophage-1 antigén (Mac-1, CD11b, integrin $\alpha_M\beta_2$) aktivációjához vezet, mely kötődik a vérlemezke GPIIb-hoz vagy indirekt módon a fibrinogénon keresztül a GPIIb/IIIa receptorhoz. Az aktivált vérlemezkek a vérlemezke aktiváló faktoron (PAF) keresztül, kötődnek a fehérvérsejtek felszínén a PAF receptorhoz, ami szintén Mac-1 aktivációhoz vezet. Mindezek mellett az aktivált vérlemezkek felszínén upregulálódó CD40L és a fehérvérsejtek felszínén jelenlévő CD40 játszik szerepet az aggregátumok létrejöttében. A vérlemezke kiváltott Mac-1 aktiváció a X-es alvadási faktor (FX) megkötéséhez, és aktivációjához vezet, így a vérlemezke-fehérvérsejt kapcsolat stimulálja a koagulációs kaszkádot (51).



3. ábra. Heterotipikus aggregátum képződést kialakító receptorok

Vérlemezke aktiváció során a felszínre kerülő P-szelektin a fehérvérsejteken konstitutívan expresszálandó PSGL-1 receptorral kötődve alakítja ki a fő kapcsolatot a vérlemezke-fehérvérsejt heterotipikus aggregátumok létrejöttében. Ez a ligáció egy szignalizációs kaszkádot indít be a fehérvérsejtekben, mely aktiválja az integrin $\alpha_M\beta_2$ -t (Mac-1), aminek az aktivációjához a PAF és receptorának kötődése is hozzájárul és a vérlemezke GPIIb/IX/V és $\alpha_{Ib}\beta_3$ receptorokon keresztül megerősíti ezt a kapcsolatot, amely végül hozzájárul a thrombin képződéshez. Az ábra Kenneth Kaushansky és Marcel Levi könyvéből (51), annak módosításával készült.

Leukocyta adhéziós receptorok és azok szerepe különböző kórképekben

Az adhéziós molekulák nélkülözhetetlenek a leukocyta-migrációban, a differenciálódásban, a sejt-sejt kölcsönhatások iniciálásában, valamint fenntartják a sejtmozgáshoz szükséges sejt-sejt és sejt-mátrix kölcsönhatásokat. Ezen folyamatok mellett jelző molekulaként is szolgálhatnak, mely során aktiválják a sejtfunkciókra kritikus útvonalakat. A leukocyta-migrációban, aktiválásban és differenciálódásban résztvevő fő adhéziós molekulacsaládok az integrinek, a szelektinek és az immunoglobulin szupercsalád tagjai (52). A leukocyták és az endothelium kölcsönhatásait több adhéziós molekulacsalád közvetíti, amelyek mindegyike részt vesz a folyamat egy-egy fázisában (53). Az integrinek feladata a sejtek extracelluláris mátrixhoz (ECM) történő lehorgonyozása, sejt-sejt adhéziós kölcsönhatás kialakítása, továbbá a két-irányú szignál átvitel. E tulajdonságaik alkalmassá teszik az integrineket olyan komplex mechanizmusok szabályozására, mint a sejtmigráció, szöveti differenciáció, osztódás, gyulladás és a vérárvadás. Az integrinek legtöbbje az RGD

(arginin-glicin-aszpartát) aminosav-szekvenciához kötődik. Ez a tripeptid nemcsak ECM makromolekulákban (kollagén, laminin, fibronectin, vitronektin) fordul elő, hanem megtalálható plazmafehérjékben is, úgymint a fibronectinben, fibrinogénben és a von Willebrand faktorban. A leukocita adhéziós kaszkád központi szereplői a β 2-integrin családból a Mac-1 (α M β 2-integrin; CD11b/CD18) és az LFA-1 (α L β 2-integrin; CD11a/CD18). A Mac-1 főleg makrofágokon jelen lévő fehérje tulajdonképpen komplement receptor ligand kötés hatására a makrofág fagocitózissal elpusztítja az immunrendszer által károsnak ítélt és a komplement-fragmentummal megjelölt (opszonizált) sejtet. Az LFA-1 fő feladata az érfal mentén gördülő leukocyták kikötése az endothel felszínhez. Ez az adhézió teszi lehetővé a fehérvérsejtek érpályából való kivándorlását, ezáltal a lokalizált szöveti gyulladásos reakció kialakulását (54-56). Leukocita integrinek kulcs molekulái az immunmediált és inflammatórikus folyamatoknak például asthma és atherosclerosis kialakulása során. Az LFA-1 adhéziós molekula kölcsönhatásainak blokkolása révén az asthma kiváltotta gyulladásos folyamatok gátlása érhető el (57, 58).

Az adhéziós fehérjék másik csoportja az immunglobulin szupercsalád, ezek közreműködnek a sejtek felismerésében, kötésében, rögzítésében, valamint a sejtek közötti kommunikációban. Idetartoznak az ICAM (intercelluláris adhéziós molekulák) csoport proteinjei, melyek főként endothelsejteken és fehérvérsejteken expresszálódnak. Az ICAM-2 kötődik a Mac-1-hez, LFA-1-hez és fibrinogénhez, ezzel elősegíti a fehérvérsejtek endothelen keresztüli transzmigrációját, olyan folyamatokban, mint az extravazáció és a gyulladásos válasz. E folyamaton kívül az immunválasz számos más eseményében is közreműködnek az ICAM fehérjék, így pl. az antigén-prezentáció folyamatában és a T-sejt proliferáció megindításában (59).

A szelektinekhez tartozó fehérvérsejteken konstitutívan expresszálódó L-szelektin mely CD62L-ként is ismert a „lymphocita-homing” receptora (60), szerepe a fehérvérsejtek lelassítása, részt vesz a sejtadhézióban, migrációban és szignál transdukcióban. A felszíni L-szelektin az extracelluláris domén metalloproteáz-függő sheddingje által szabályozódik. Ligandjai a limfoid szöveteken keresztül haladó erek endothel-rétegének glikozilált membránfehérjéi, pl. a nyirokcsomókban található HEV (magas endothelű venulák) endothelsejtjeinek GlyCAM1 glikoproteinje. Másrészt a PSGL-1-hez történő kötődése a kezdeti lépése a fehérvérsejt aggregációnak és a HEV-hez való kötődésnek, mely elindítja a transzmigrációt a lymphocita homing során (61-63). A szelektinek kulcsszerepet játszanak a daganatok kialakulásában és a metasztázis létrejöttében. Ennek a hátterében az áll, hogy a

szelektin ligandok nagy számban expreszálódnak az ér endothelen, potenciális belépési helyet teremtve a keringő tumorsejtek számára (64). Lymphoproliferatív betegségekben az adhéziós fehérjék szintje csökkent, ami a fehérvérsejtek romló transzendotheliális vándorlásával hozzájárul és összefüggésbe hozható a betegség kialakulásával (65, 66).

Az adhéziós molekulák a fehérvérsejt aktiváció eredményeként megjelenhetnek a plazmában, ezek vizsgálata információt adhat a betegség súlyosságáról. Szisztémás gyulladás során a neutrophilek aktivációja következtében a szolubilis L-szelektin emelkedett szintje detektálható (52).

CÉLKITŰZÉS

A disszertáció célja az volt, hogy tanulmányozzuk a thrombocyta és lymphocyta sejtfelszíni receptorok expressziójának modulációját gyulladásos stimulusok és immunmediátorok hatására bekövetkező sejtaktiváció után.

Célul tűztük ki, hogy:

1. In vitro kísérletekben megvizsgáljuk, hogy miként befolyásolja egy bakteriális endotoxin, az LPS és az anti-PF4/heparin ellenes autoantitest a thrombocyta receptor expressziót és funkciót.
2. Megvizsgáljuk egy második generációs tirozin kináz gátló, a dasatinib GPVI receptoron keresztüli thrombocyta aktivációra kifejtett gátló hatásának mechanizmusait.
3. Tanulmányozzuk, hogy az intracelluláris foszfatáz aktivitás hogyan regulálhatja felszíni receptor expressziót és funkciót lymphocyták esetén.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vérminták gyűjtése és minta előkészítés

Thrombocyta receptor és funkció vizsgálatokhoz

A vérmintákat egészséges önkéntes kontrolloktól gyűjtöttük 0,105M Na-citrátot tartalmazó csőbe (Becton Dickinson, San Jose, CA). A donorok Debreceni Egyetem (DE), Klinikai Központ (KK), Laboratóriumi Medicina Intézet (LMI) dolgozói közül kerültek beválogatásra és a vizsgálatokat megelőző 2 hétben gyógyszert nem szedtek. A TKI vizsgálatokba bevont személyek írásos beleegyezésüket adták adataik és mintáik felhasználásához. A kísérletek a Regionális- és Intézményi Kutatásetikai Bizottság (RKEB/IKEB 4875-2017) és az Egészségügyi Tudományos Tanács engedélyével készült. Thrombocyta dús plazma (PRP) készítése 10 percig 170 g-n 20 °C történő centrifugálással történt. Thrombocyta szegény plazma (PPP) készítésekor a vért 15 percig 1 500 g-n 20 °C-on centrifugáltuk. A gél filtrált thrombocytát (GFP) a korábbiak közöltek szerint (67) tisztítottuk.

Leukocyta receptor és funkció vizsgálatához

A vérmintákat krónikus lymphoid leukémiás (CLL) és egészséges önkéntes kontrolloktól gyűjtöttünk K₃EDTA-t tartalmazó csőbe (Becton Dickinson, San Jose, CA). A betegek a DE, KK, Belgyógyászati Intézet, Hematológia Tanszékén álltak gondozás alatt, betegségükkel kapcsolatosan kezelésben nem részesültek. A kontrollok DE, KK, LMI dolgozói voltak a vizsgálatokat megelőző 2 hétben gyógyszert nem szedtek. A vizsgálatokba bevont személyek írásos beleegyezésüket adták adataik és mintáik felhasználásához. A kísérletek a Regionális- és Intézményi Kutatásetikai Bizottság (RKEB/IKEB 4674-2016) és az Egészségügyi Tudományos Tanács engedélyével készült. A perifériás vérből először mononukleáris sejteket (PBMC) szeparáltunk Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) segítségével. B-sejt szeparáláshoz az előzőekben szeparált PBMC-t tovább tisztítottuk mágneses Dynabeads Untouched Humán B-sejt szeparáló kittel (Life Technologies, Oslo, Norvégia). Plazma készítéséhez a K₃EDTA-val alvadást gátolt vért 15 percig 1 500 g-n 20 °C-on centrifugáltuk.

LPS hatása a thrombocytá aktivációra

Prokoaguláns aktivitás assay (PCA)

Na-citráttal alvadásgátolt vért 4 órán keresztül 37°C-on inkubáltunk 10 µg/mL koncentrációban S-LPS-sel, Re-LPS-sel (Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA) vagy kontrollként HEPES pufferrel. Inkubáció után PBMC-t szeparáltunk, majd a sejteket szonikáltuk. A PCA tesztben 100 µL sejtlizátumot 100 µL normál plazmával 1 percig 37 °C-on inkubáltunk, majd 100 µL 25 mM-os CaCl₂ hozzáadásával indítottuk az alvadást. KC-1 koagulométerrel mértük a fibrin keletkezéséig eltelt időt.

Re-LPS kötődés vizsgálata és CD40L expresszió

Áramlási citométerrel ellenőriztük, hogy kötődik-e az Re-LPS a thrombocytákhoz. Na-citráttal alvadásgátolt vért jelöltünk 1 µg/mL végkoncentrációban FITC-cel konjugált Re-LPS-sel és CD42a PerCP antitesttel nem aktivált és 5 µM TRAP-pal (Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA) aktivált mintában 60 percen keresztül 37 °C-on sötétben. 1%-os PFA-val fixáltuk a mintákat 60 percig, majd PBS-sel történő mosás után FACScan áramlási citométeren mértük. Az eredményeket a jelöletlen Re-LPS-sel kezelt minta átlag fluoreszcencia intenzitásához hasonlítottuk.

A CD40L kimutatásához Na-citráttal alvadásgátolt vért 10µg/mL végkoncentrációban kezeltünk S-LPS-sel, Re-LPS-sel vagy 5 µM TRAP-pal és szimultán jelöltük a vérlemezkéket CD42a FITC és CD154 PE antitestekkel, amihez izotípus kontrollnak IgG1 PE –t használtunk. A mintákat inkubáltuk 60 percig 37 °C-on sötétben, ezt követően 1%-os PFA-val fixáltuk 60 percig, majd PBS-sel történő mosás után FACScan áramlási citométeren mértük és CellQuest szoftverrel analizáltuk (Becton Dickinson, Mansfield, MA, USA). Analízis során a thrombocytá markerre pozitív (CD42a+) eseményekre kapuztunk.

Thrombocytá aggregáció

A kontroll PRP thrombocytá számát beállítottuk 260 G/L-re PPP-vel. A vérlemezkéket stimuláltuk S-LPS-sel (10 µg/ml), Re-LPS-sel (10 µg/ml) vagy 5 µM TRAP-pal és Chrono-Log 700 lumiaggregométerrel (Chrono-Log Corp., Havertown, PA, USA) detektáltuk az

aggregáció mértékét. További vizsgálatainkban választ kerestünk arra, hogy, az S-LPS vagy az Re-LPS képes-e potenciózni 5 μ M TRAP vérlemezke aggregáló hatását.

Thrombocyta mikropartikula (PMP) analízis

Na-citráttal alvadásgátolt vért inkubáltunk 10 μ g/mL koncentrációban S-LPS-sel, Re-LPS-sel 5 μ M TRAP jelenlétében vagy anélkül 60 percig 37 °C-on, majd több egymást követő centrifugálással PMP-t szeparáltunk a következőkben leírtak szerint. A kezelt alvadásgátolt vérből először PPP-t szeparáltunk 1500 g-n 15 percig 20 °C-on történő centrifugálással, majd a PPP-t tovább fugáltuk 13 000 g-n 2 percig 20 °C-on, ezzel a lépéssel eltávolítottuk a mintánkban jelenlévő vérlemezke membrán fragmenteket. Majd a felülúszót tovább centrifugáltuk 16 000 g-n 30 percig 20 °C-on és a cső alján bedúsult PMP-eket egyszer mostuk BSCG pufferrel (129 mM NaCl, 1,6 mM KH₂PO₄, 14 mM Na-citrát, 11 mM glükóz, 10 mM NaH₂PO₄ pH: 7,30). Ezután egy újabb centrifugálás következett 16 000 g-n 30 percig 20 °C-on. A centrifugálás után a felülúszó térfogatának 90 %-át eltávolítottuk és a maradék 10 %-ból jelölést követően meghatároztuk a PMP-k számát. A PMP mintákat annexin V FITC és CD41a PeCy5 antitestekkel jelöltük és a mintákat FACScan áramlási citométeren mértük. A PMP-eket 30 másodpercig gyűjtöttük alacsony áramlási sebesség mellett analízis során a CD41a és annexin V pozitív eseményekre kapuztunk és az abszolút számot PMP/ μ L plazmában adtuk meg.

HIT antitestek thrombocyta aktiváló hatása

Funkcionális HIT teszt

A HIT diagnózis felállításához két laboratóriumi megközelítés használt: (i) szilárd-fázisú enzim immunoassay (ELISA), amellyel a PF4-heparin komplex ellen termelődött IgG-típusú antitestet mutatjuk ki és (ii) egy funkcionális teszt, mely során a HIT antitest thrombocyta aktiváló potenciálját vizsgáljuk. A funkcionális vizsgálatok közül az áramlási citometriával végzett teszt során a HIT antitestek aktiváló hatását vizsgáljuk egészséges kontroll egyén thrombocytáira terápiás koncentrációjú heparin jelenlétében. A teszt során meghatározzuk a beteg plazmájában jelenlévő antitest hatását a foszfátidil szerin expresszióra (68) és a vérlemezke mikropartikula képződésre.

A vizsgálatokhoz 10 μ L „0”-ás vércsoportú egészséges kontrolllok PRP-jéhez 10 μ L beteg plazmát és 25 μ L PBS-t adtunk, majd inkubáltuk 5 μ L Na-heparinnal (0,3 IU/mL vagy

100 IU/mL végkoncentrációban) 30 percig 27°C-on vízfürdőben. Incubáció után 5 µL kezelt PRP-t festettünk 5 µL CD41 PE (20x-ra hígított), 1 µL annexin V FITC és 39 µL annexin kötő puffer (0,02M HEPES, 2,5 mM CaCl₂ pH:7,30) jelenlétében 15 percig sötétben szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő lejártá után 400 µL annexin kötő pufferrel kiegészítettük és FACScan áramlási citométerrel 1 percig nagy áramlási sebesség mellett gyűjtöttük az eseményeket, majd CellQuest szoftverrel analizáltuk (Becton Dickinson, Mansfield, MA, USA). Analízis során a CD41 pozitív eseményekre kapuztunk és megadtuk a %-os arányát a PS-t expresszáló thrombocytáknak. A tesztet értékelhetőnek tekintettük, ha a PS expresszió <5 % volt abban a mintában, ahol kontroll PRP-hez csak 0,3 IU/mL heparint, de beteg plazmát nem adtunk. A tesztet pozitívnak értékeltük, ha (i) legalább 11%-a a vérlemezkéknek annexin V pozitív volt 0,3 IU/mL heparin kezelés után (ii) és az aránya az annexin V pozitív (%) vérlemezkéknek a 0,3 IU/mL és 100 IU/mL heparin jelenlétében több volt 1,5-nél.

Az aktivált vérlemezkéből képződő mikropartikulákat (PMP) a fényszórási tulajdonságok alapján határoztuk meg (FSC-SSC dot-ploton). A PMP-eket hányadossal értékeltük a 0,3 IU/mL heparin jelenlétében képződő PMP számát osztottuk a 100 IU/mL heparin jelenlétében képződő PMP számával. 1,5 fölötti hányados esetén pozitívnak tekintettük a tesztet.

Dasatinib hatása a GPVI receptoron keresztüli vérlemezke aktivációra

Kollagén kiváltotta thrombocyta aggregáció és ATP felszabadulás mérése

A vérlemezke funkció vizsgálata irányába PFA-100 (Siemens, Deerfield, IL, USA) záródási időt mértünk kollagén/epinefrin és kollagén/ADP patronnal a dasatinibbel vagy nilotinibbel előkezelt citráttal alvadésgátolt vérből. A vérlemezke aggregáció vizsgálatához kontroll PRP-t - melynek thrombocyta számát beállítottuk 260 G/L-re PPP-vel- előkezeltünk különböző koncentrációjú dasatinibbel (0, 5, 10, 50, 100, 150, 200 és 400 nM) vagy nilotinibbel (0, 125, 250, 1000, 2500, 5000 nM) 10 percig, 37°C-on vízfürdőben. Ezután vizsgáltuk a 1 µg/ml fibrilláris kollagén (Takeda, Linz, Ausztria) kiváltotta vérlemezke aggregációt és ATP szekréciót Chrono-Log 700 lumiaggregométerrel. Az aggregációt 8 percen keresztül detektáltuk és %-ban adtuk meg a fényáthaladás maximális változását (ΔT_{\max} %) az ATP felszabadulás (release) luciferin-luciferáz (Biotherma AB, Handen, Svédország) reagenssel került meghatározásra és µmol ATP/10¹¹ vérlemezke dimenzióban adtuk meg az eredményeket.

Foszfatidil szerin (PS) expresszió meghatározása

PRP-t konvulxinnal (12,5 ng/mL, 15 perc, 37°C, Pentapharm, Basel, Switzerland) történő aktiváció előtt előkezeltünk terápiás plazma koncentrációjú dasatinibbel (10 és 100 nM) vagy nilotinibbel (5000 nM) 10 percig, 37°C-on vízfürdőben, majd vizsgáltuk áramlási citométerrel a PS expressziót a következőkben leírtak szerint. 5 µL előkezelt, aktivált PRP-t inkubáltunk 5 µL CD41 PE, 5 µL annexin V FITC és 35 µL annexin kötő puffer (biztosítja a kalcium koncentrációt, ami az annexin kötődéshez szükséges) jelenlétében 15 percig sötétben RT-n. Az inkubációs idő letelte után 500 µL annexin kötő pufferrel kiegészítettük és FC500 áramlási citométeren mértük és Kaluza szoftverrel analizáltuk (Beckman Coulter, CA, USA). A CD41 pozitív kapuban lévő vérlemezkéket analizáltuk az annexin V pozitív vérlemezkék mennyiségét %-ban adtuk meg.

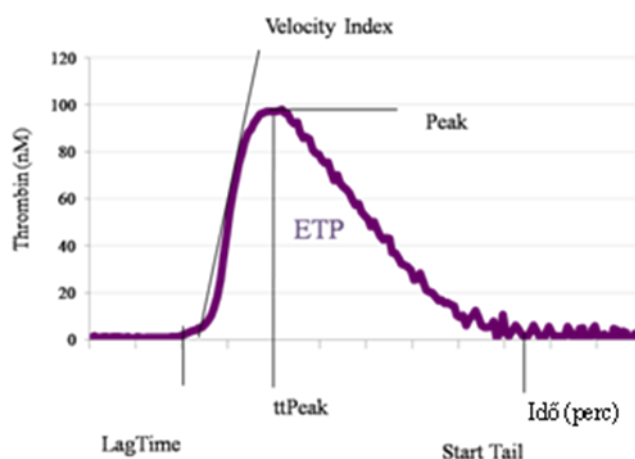
Coated-platelet meghatározás

GFP-t előkezeltünk dasatinibbel (0, 5, 10, 50, 100, 150, 200 és 400 nM) vagy nilotinibbel (0, 125, 250, 1000, 2500, 5000 nM) 10 percig, 37°C-on vízfürdőben. Ezután 10 µL GFP-t (thrombocytaszám: 40 G/L) aktiváltuk 10 percig 37°C-on 10 µL konvulxin-thrombin eleggyel (konvulxin végkoncentráció: 125 ng/ml, thrombin végkoncentráció: 0,5 U/L) 1 µL biotinált fibrinogén jelenlétében, a végtérfogatot 100 µL-re állítottuk Mix pufferrel (10 mM HEPES, 2,5 mM CaCl₂, 1,25 MgCl₂, 150 mM NaCl és 1 mg/mL BSA). Ezt követően az aktiváció leállítására és a minta fixálására 200 µL 1%-os PFA-val történt. Fixálás után 2,5 mL 1mg/mL BSA/PBS-sel mostuk és centrifugáltuk 1500 g-n 15 percig 20 °C-on. Majd a thrombocytákat reszuszpendáltuk 200 µL BSA/PBS-ben és festettük CD41a PE-Cy5 és Streptavidin PE jelenlétében 20 percig 20 °C-on sötétben. Jelölés után 2x mostuk PBS-sel, majd méréshez reszuszpendáltuk a thrombocytákat 500 µL PBS-ben. A minták mérése FACS-Canto II áramlási citométerrel történt, az adatokat FACSDiva 6.1.3 szoftverrel analizáltuk (Becton Dickinson, Mansfield, MA, USA). A coated-platelet mennyiségét a CD41a-ra pozitív kapuban lévő thrombocytá populáció %-ban adtuk meg.

Thrombin képződés vizsgálata (TGT)

PRP-t konvulxinnal (12,5 ng/mL, 15 perc, 37°C) történő aktivációja előtt előkezeltünk terápiás plazma koncentrációjú dasatinibbel (10 és 100 nM) vagy nilotinibbel (5000 nM) 10 percig, 37°C-on vízfürdőben. Majd ezekből a mintákból thrombin képződést mértünk a reagenst gyártó utasítása szerint. Fekete ELISA lemezbe 80 µL előkezelt és aktivált PRP-t és

20 μL PRP reagenst (1 pM tissue faktort tartalmaz)/ thrombin kalibrátort pipettáztunk. 10 perces 37°C -on történő inkubáció után a thrombin képződést 20 μL FluCa (fluoreszcens szubsztrát és kalcium) hozzáadásával indítottuk el. Hatvan perces időintervallum alatt a fluoreszcenciát folyamatosan detektáltuk Fluoroskan Ascent FL fluoriméterrel. Ezt követően a mérési idő elteltével a Thrombinoscope szoftver automatikusan kirajzolta a thrombogramot (thrombin képződés görbéje), ami a képződő thrombin mennyiségét mutatja az idő függvényében. A Thrombinoscope szoftver számszerűsíti a thrombogram (4. ábra) idő és mennyiségi paramétereit. A thrombin képződés kinetikáját a lagtime, time to peak míg a képződő thrombin mennyiségét a thrombin peak és endogén thrombin potenciál (ETP) jellemzi. A thrombin képződés detektálását Thrombinoscope reagensekkel és szoftverrel végeztük (Thrombinoscope BV, Maastricht, Hollandia).



4. ábra Thrombin képződés görbéje és jellemző paramétereit

A thrombin képződés sebességéről a lagtime, time to peak és start tail paraméterek, míg a képződött thrombin mennyiségéről a peak és ETP paraméterek adnak információt. A lagtime a thrombin képződés kezdetéig, a time to peak a legnagyobb thrombin mennyiség képződéséig, míg a start tail a thrombin képződés végéig eltelt idő percben kifejezve. A peak (csúcs) a legnagyobb képződött thrombin mennyiség (nM), az ETP a thrombogram alatti terület (nM x perc).

Aktivált GPIIb/IIIa konformáció detektálása PAC 1 kötődéssel

PRP-t konvulxinál (12,5 ng/mL, 15 perc, 37°C) történő aktiváció előtt előkezeltünk terápiás plazma koncentrációjú dasatinibbel (10 és 100 nM) vagy nilotinibbel (5000 nM) 10 percig, 37°C -on vízfürdőben. Aktiváció után 50 μL PRP-t festettünk 5 μL CD41a PEcy5-tel és 5 μL PAC 1 FITC antitestekkel 15 percig szobahőmérsékleten sötétben. Majd fixáltuk a mintákat 1 mL 1%-os PFA-val 60 percig. Ezt követően 2x mostuk PBS-sel, majd reszuszpendáltuk 500 μL PBS-ben ezután a mintákat FC500 áramlási citométeren mértük és

CXP szoftverrel analizáltuk (Beckman Coulter, CA, USA). Százalékosan értékeltük a PAC 1-et kötő és a CD41a pozitív kapuban lévő thrombocyták arányát.

Alvadék retrakció vizsgálata

Ezen kísérletekhez 900 μ L PRP-t előinkubáltunk 100 μ L dasatinibbel (10 és 100 nM) vagy nilotinibbel (5000 nM) 10 percig, 37°C-on vízfürdőben, majd aktiváltuk 100 μ L konvulxinnal (végkoncentráció:12,5 ng/mL) 15 percig 37°C-on. Ezután üvegcsőben 1000 μ L előkezelt majd aktivált PRP-t inkubáltunk 100 μ L 250 mM-os CaCl_2 -dal (végkoncentráció: 22,7 mM) 60 percig 37°C-on vízfürdőben. Az inkubációs idő elteltével mértük a térfogatát a kiszorított szérumnak.

SFK-k vizsgálata Western blot-tal

GFP-t előkezeltünk dasatinibbel (10 és 100 nM) vagy nilotinibbel (5000 nM) 10 percig, 37°C-on vízfürdőben, majd aktiváltuk konvulxinnal (végkoncentráció:12,5 ng/mL) 15 percig, 37°C-on. Minden minta esetén 4×10^7 thrombocytát lizáltunk. A lízis pufferhez 1% TritonX-100 és tirozin foszfatáz inhibitor koktél (Sigma, St. Louis, MO, USA) került felhasználásra PBS-ben oldva. A thrombocyta lizátumokat poliakrilamid gélen választottuk szét, majd Western blotot követően foszfo-specifikus antitestekkel (1. táblázat) és biotinált anti-rabbit IgG másodlagos antitesttel jelöltük. Avidin-biotin komplexel (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) történő inkubálás után a fehérje sávokat ECL (Millipore, Billerica, MA, USA) reagenssel tettük láthatóvá.

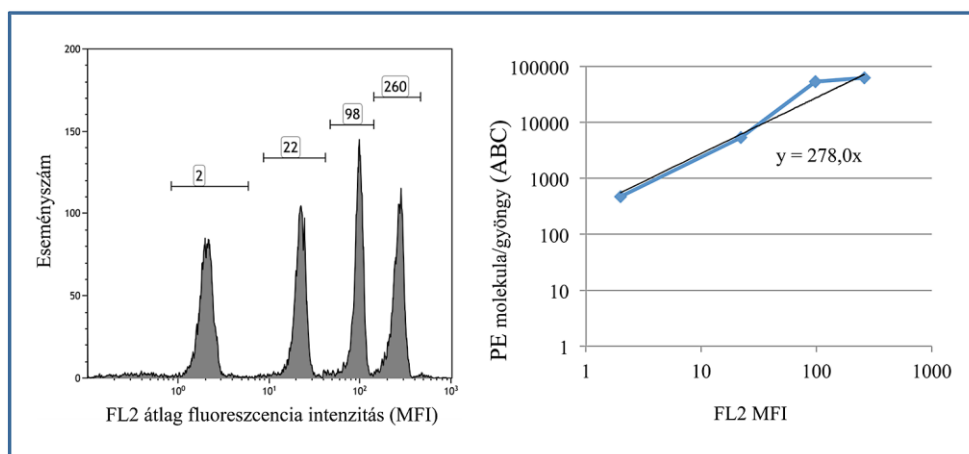
Tirozin foszforiláció helye	C-terminális	Aktivációs hurok
Foszforiláció hatása	Inhibitor hatású	Maximális aktivitást okoz
Lyn	p- Y507	p- Y396
Fyn	p- Y530	p- Y416
Src	p- Y529	p- Y418

1. táblázat Lyn, Fyn és Src kinázok vizsgált tirozin foszforilációi

Leukocita receptor, funkció és mechanizmus vizsgálatok

Felszíni L-szelektin és TACE/ADAM17 meghatározása

A kontrollok normál B-sejtjeinek és CLL-es betegek kóros B-sejtjeinek sejtfelszíni L-szelektin és TACE (Tumor necrosis alpha converting enzyme, CD156) expresszióját 4 színű jelöléssel áramlási citometriával vizsgáltuk. A kontrolloktól és CLL-es betegektől származó perifériás vért festettük CD19 PC7 (Beckman Coulter, Marseille, Franciaország), CD5 PerCPCy5.5 antitestekkel a T és B - sejtek beazonosítása céljából valamint, az L-szelektin expressziót CD62L PE és a TACE szintet CD156 FITC (RD Systems, Minneapolis, MN) antitestekkel vizsgáltuk. TACE vizsgálathoz egér IgG2a FITC-et használtunk izotípus kontrollként és a sejtfelszíni L-szelektin mennyiségi meghatározásához Quantibrite™ PE fluoreszcens gyöngyöket mértünk a mintákkal egyidőben. Az L-szelektin expressziót antitest - kötő kapacitásban (ABC) adtuk meg (5. ábra). A mintákat 30 percig festettük az antitestekkel szobahőmérsékleten 30 percig majd PBS-sel mostuk és 500 µL 1% PFA-ban fixáltuk. Majd FC500 áramlási citométerrel mértük és CXP szoftverrel analizáltuk (Beckman Coulter, CA, USA). Kontroll minták esetén a CD19+CD5-, míg CLL-es beteg minták esetében a CD19+CD5+ B-sejtekre kapztunk.



5. ábra. A sejtfelszíni L-szelektin mennyiségi meghatározása Quantibrite™ PE fluoreszcens gyöngyökkel

A mintákkal egyidőben Quantibrite™ PE fluoreszcens gyöngy mixet is mértünk, ezek felszínére eltérő mennyiségben PE molekulák vannak kötve. A CD62L PE jelölt sejtek FL2 csatornán mért átlag fluoreszcens intenzitásából számítottuk az antitestkötő kapacitást (ABC), a gyöngyök FL2 csatornán mért átlag fluoreszcens intenzitásából (MFI) és a gyöngyökön lévő PE molekulák számából.

Foszforilált p38MAPK meghatározása

A CLL-es betegtől és kontroll személytől származó PBMC-t festettük CD19 FITC sejtfelszíni markerrel, majd fixáltuk BD Phosflow™ Fix pufferrel 37 °C-os vízfürdőben 10 percig. Ezután a sejteket mostuk BD Phosflow™ Perm/Wash I. pufferrel. Centrifugálás után a BD Phosflow™ Perm/Wash I. pufferben reszuszpendált sejteket festettük pp38MAPK (pT180/pY182) PE antitesttel 30 percig sötétben. Mosás után a sejteket reszuszpendáltuk 1 mL BD Pharmingen™ Stain pufferben. Majd a mintákat FC500 áramlási citométeren mértük, és CXP szoftverrel analizáltuk, mely során a CD19+ kapuban lévő lymphocytákat pp38MAPK PE fluoreszcencia intenzitását értékeltük.

Áramlási citometriai mérésekhez az alábbi Becton Dickinson Biosciences (San José, CA, USA) antitestek, reagensek használtuk: Annexin V FITC, CD154 PE, CD19 FITC, CD41a Pcy5, CD42a FITC, CD42a PerCP, CD5 PerCPCy5.5, CD62L PE, IgG1 PE, PAC1 FITC, Streptavidin PE, BD Phosflow™ reagensek és a Quantibrite™ PE fluoreszcens gyöngyök.

Plazma L-szelektin mérés ELISA-val

A kontroll és CLL-es betegek K₃EDTA-val alvadásgátolt véréből szeparált plazmából (PPP) kereskedelmi forgalomba kapható ELISA kittel (Bender Med System, Houston, TX) mértük a szolubilis L-szelektin mennyiségét a gyártó instrukciói alapján.

Plazma L-szelektin kimutatás Western blot-tal

A CLL-es beteg plazmájából az Ig-okat Protein G Sepharose-zal 2 óra, 4 °C-os történő inkubációval eltávolítottuk. Majd centrifugálás után az Ig-mentes felülúszóból L-szelektin ellenes antitest és Protein G Sepharose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) segítségével 4°C-on egy éjszakán át tartó inkubációval immunprecipitáltuk az L-szelektint. Mosás és centrifugálás után a precipitátumot western blot mintapufferben (62 mM TRIS, 2% SDS, 10% glicerol, 0,025 % brómfenolkék) forraltuk 5 percig. Ezután 10 %-os SDS-PAGE segítségével a fehérjéket szétválasztottuk. Western blotot követően blokkoltuk a membránt 3% zselatinnal és biotinált L-szelektin ellenes antitesttel (RD Systems, Minneapolis, MN) majd avidin-biotin komplexel (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) inkubáltuk. A fehérje sávokat ECL reagenssel tettük láthatóvá.

Foszfatáz aktivitás mérés

Mágnesesen szeparált normál B-sejteket és CLL-es betegek B-sejtjeit (5×10^5) lízis pufferben (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% TritonX-100 és 0,5% proteáz inhibitor koktél, pH: 7,4) reszuszpendáltunk, szonikáltuk, majd 15 000g-n 4 °C-on 10 percig centrifugáltuk. A szupernatans foszfataz aktivitását 30 °C-on $1 \mu\text{M}$ ^{32}P -jelölt miozin könnyű lánc szubsztrát (^{32}P -MLC20) és PP1 inhibitor-2 (I-2, $2 \mu\text{M}$) jelenlétében vagy anélkül végeztük (69). A reakciót a szubsztrát hozzáadásával indítottuk majd 10 perc inkubáció után a reakciót leállítottuk 10% TCA-t és 6 mg/ml BSA hozzáadásával. Centrifugálás után a szupernatansból a $^{32}\text{P}_i$ szintet szcintillációs számlálóval (Perkin Elmer) mértük. Értékeléskor a normál B-sejtek össz foszfataz aktivitását 100%-nak vettük. A foszfataz aktivitás méréseket a DE, Orvosi Vegytani Intézetben Dr. Kónya Zoltán végezte.

In vitro kísérlet foszfataz gátlóval és p38MAPK inhibitorral

Mágnesesen szeparált normál B-sejteket és CLL-B sejteket inkubáltunk DMSO-val (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) vagy calyculin A (CLA, Merck-Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) foszfataz inhibitorral 30 percig 37 °C-on. Azokban a kísérletekben, ahol a p38MAPK-t akartuk gátolni a sejteket előkezeltük $5 \mu\text{M}$ SB203580-val (Tocris, Bristol, UK) - specifikus p38MAPK inhibitor- a CLA kezelés előtt. A kezeléseket után meghatároztuk a p38MAPK és sejt felszíni L-szelektin mennyiségét a korábban leírtak alapján.

Statisztikai analízis

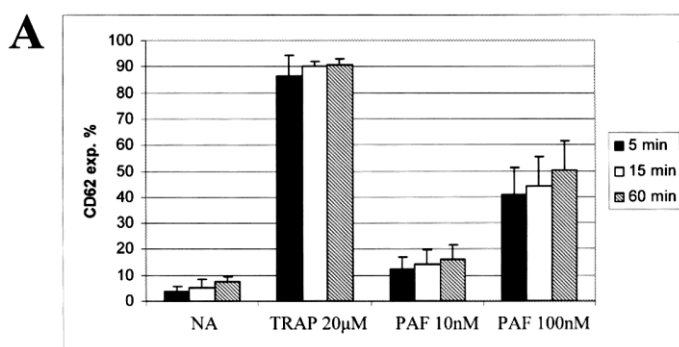
A statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism 4.0 szoftverrel végeztük. Az adatok eloszlásának elemzéséhez Kolmogorov-Smirnov tesztet használtunk. Két összetartozó csoport összehasonlítására, amennyiben a változó mindkét csoportban normál eloszlást mutatott, egymintás t-próbát (paired t-teszt), nem normál eloszlású változó esetén Wilcoxon signed rank tesztet (párosított Wilcoxon-teszt) alkalmaztunk. Két független csoport összehasonlítására nem párosított t-próbát (normál eloszlás) és Mann-Whitney tesztet (nem normál eloszlás) alkalmaztunk. Több független csoport összehasonlítására ANOVA és Bonferroni poszt teszt (Gaussi eloszlás) valamint Kruskal-Wallis és Dunn's poszt teszt (nem Gaussi eloszlás) segítségével történt. Jelentős különbségnek a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

EREDMÉNYEK

Gyulladásos folyamatok során az endothel sejtek thrombin vagy más inflammatórikus stimulus hatására gyulladásos citokineket például vérlemezke aktiváló faktort (platelet activating factort, PAF) szintetizálnak, az endothel sejtek mellett PAF szintézisre képes minden olyan sejt, amely a szervezet védelmében részt vesz így a thrombocyták, neutrophilek, monocyták és macrophagok (70). A gyulladásos válaszban a PAF főként a sejt-sejt interakciót irányítja, egyrészt aktiválja a polimorphonukleáris (PMN) sejteket és thrombocytá aktivációt, aggregációt vált ki.

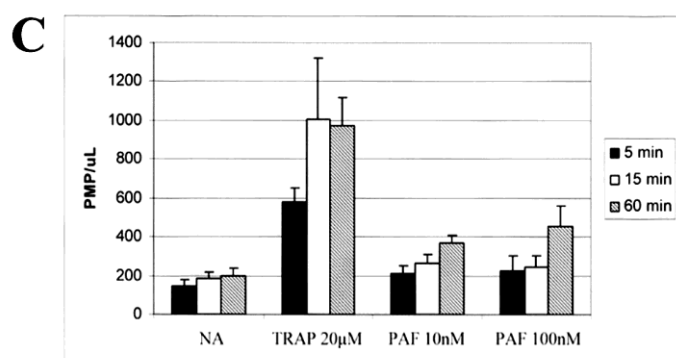
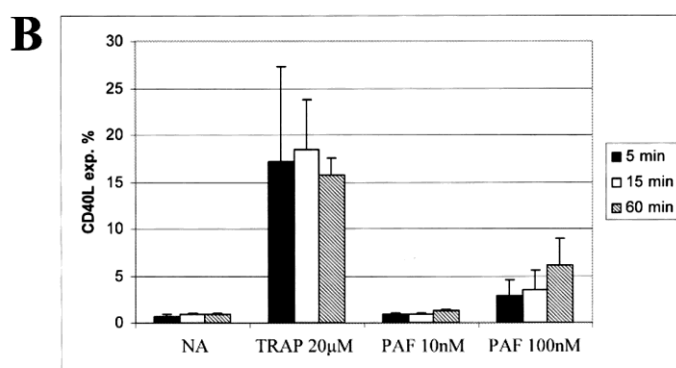
A thrombocyták aktivációja két fő szignálútvonalon keresztül valósulhat meg. Létezik az ún. „klasszikus” útvonal, amikor a kollagén, thrombin, ADP, adrenalin vagy a thromboxán A_2 mediálja az aktivációt. A másik jelátviteli folyamat esetén egyéb gyulladásos mediátorok, mint például a PAF vagy az LPS okoz vérlemezke aktivációt. A thrombocyták aktiváció során számos morfológiai és biokémiai változáson mennek keresztül. Ezek a változások lehetővé teszik, hogy a vérlemezkék betöltsék biológiai funkciójukat, amelyek különböző módszerekkel jól nyomomonkövethetők (71).

Korábbi *in vitro* kísérleteink során kontroll vérlemezkét aktiváltunk 20 μ M koncentrációban thrombin receptor aktiváló peptiddel (TRAP) vagy 10 és 100 nM PAF-fal különböző ideig. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a TRAP-pal történő aktiváció már igen rövid (5 perc) aktivációs idő alatt magas P-szelektin és CD40L expressziót és jelentős PMP szám emelkedést eredményezett. Ezekkel ellentétben az alacsonyabb koncentrációjú PAF (10 nM) szinte alig váltott ki vérlemezke aktivációt még 60 perces aktiváció után is, viszont 100 nM PAF időfüggő módon jelentős P-szelektin és mérsékelt CD40L expressziót eredményezett, ami a PMP-k számának emelkedésével járt (nem publikált eredmények, 6. ábra).



6. ábra PAF hatása a thrombocyta aktivációra

In vitro kísérleteink során kontroll vérlemezkét aktiváltunk TRAP –pal vagy 10 és 100 nM PAF-fal különböző ideig. Vizsgálataink során 100 nM PAF időfüggő módon jelentős P-szelektin (A) és mérsékelt CD40L expressziót eredményezett (B), ami a PMP-k számának emelkedésével járt (C). Adatok ábrázolása átlag+SD (n=3).

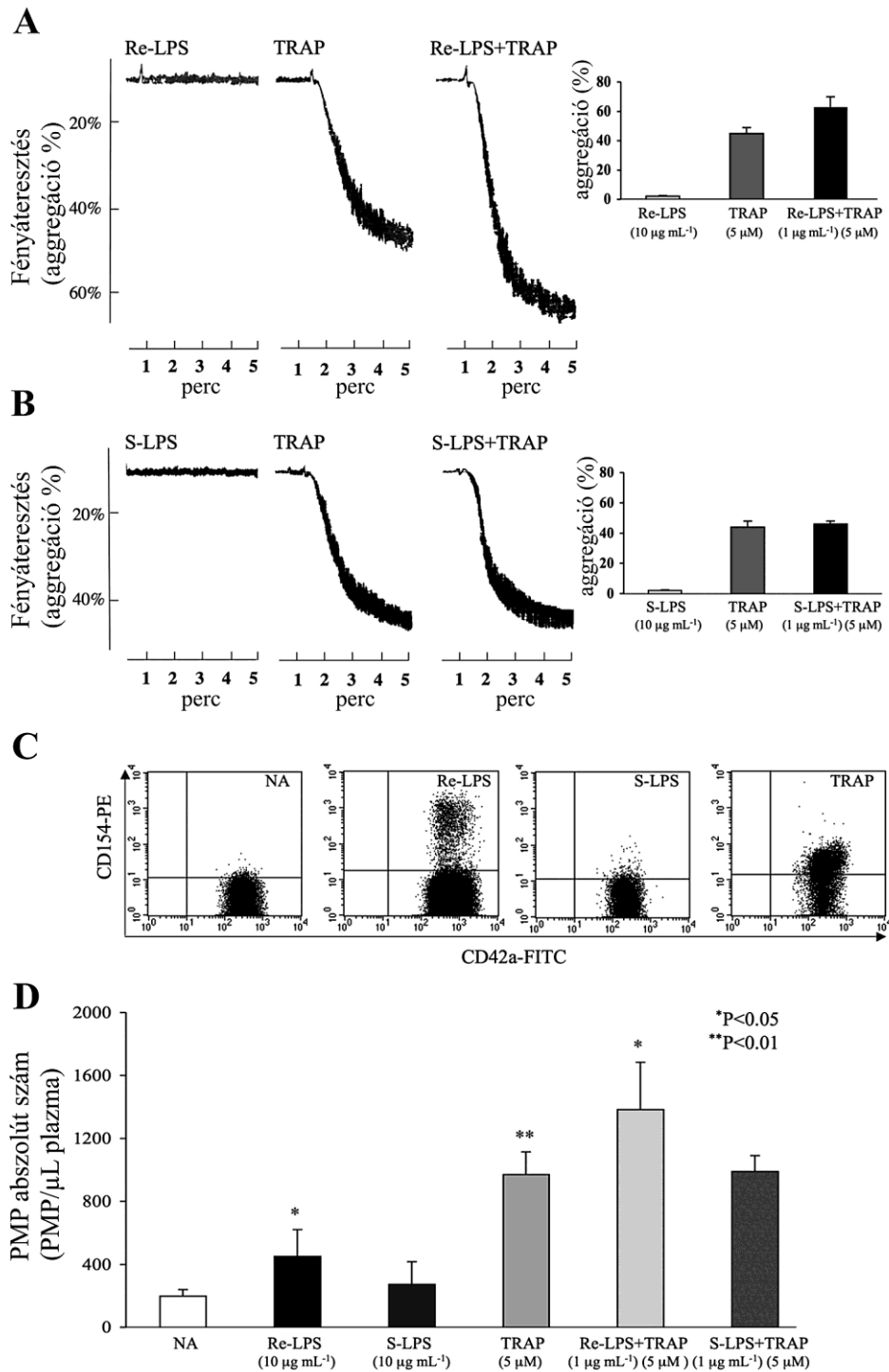


LPS hatása a thrombocyta aktivációra

Jelen tanulmányunkban az LPS - mint inflammatorikus stimulus - hatását vizsgáltuk a vérlemezke aktivációra és funkcióra. Először *in vitro* kísérletben teszteltük a biológiai aktivitását az S-LPS és Re-LPS-nek. Vizsgáltuk a prokoaguláns tulajdonságait rekalifikált, LPS-stimulált mononukleáris sejt (PBMC) szuszpenzióknak. Mindkét LPS-forma 10 µg/mL koncentrációban szignifikánsan csökkentette ($p < 0,05$) az átlag alvadási időt az LPS-sel nem kezelt mintához képest. Továbbá kimutattuk, hogy az Re-LPS képes kötődni a thrombocytákhoz, a FITC konjugált Re-LPS szignifikáns emelkedést ($p = 0,01$) mutatott az FL-1 átlag fluoreszcencia intenzitásában (MFI) a pozitív sejteken ($49,7 \pm 8,3$) a konjugátlan Re-LPS-hez ($10,2 \pm 2,4$) képest és ez az MFI értéket tovább emelkedett 10 µM TRAP kezelés hatására (ezeket az eredményeket nem ábrázoltuk). Ezt követően megvizsgáltuk, hogy

befolyásolja-e az Re-LPS és S-LPS a thrombocyta aggregációt. Önmagában egyik LPS forma sem váltott ki thrombocyta aggregációt 0,1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ koncentrációban. Azonban 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Re-LPS növelte a szubmaximális aktiváló hatást kiváltó TRAP (5 μM) vérlemezke aggregáló hatását, míg az S-LPS nem befolyásolta (7. A, B ábra).

Ezután, vizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a két LPS forma a vérlemezke aktiváció szenzitív markereit a CD62P és CD40L expressziót. Azt találtuk, hogy az egyik LPS forma sem okozott CD62P expresszió emelkedést 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ koncentrációban sem, az LPS-sel nem kezelt mintához képest ($9,0 \pm 4,0 \%$; $9,5 \pm 5,0 \%$ vs. $7,6 \pm 3,0 \%$; ezeket az adatokat nem ábrázoltuk). Ezzel ellentétben 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Re-LPS szignifikánsan nagyobb CD40L expressziót váltott ki ($2,7 \pm 1,9 \%$; $p < 0,05$) magasabb MFI értékkel ($172,5 \pm 80,0$; $P < 0,001$) a negatív kontrollhoz (NA) képest. Továbbá, a TRAP aktivált minta is lényeges emelkedést mutatott a CD40L expresszióban ($33,6 \pm 4,9 \%$; MFI= $33,6 \pm 4,7$). Ezekkel ellentétben az S-LPS semmilyen változást nem okozott a CD40L expresszióban (7. C ábra). Ezek mellett szignifikáns emelkedést találtunk ($p < 0,05$) az Re-LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) kiváltotta vérlemezke mikropartikulák (PMP) számában (450 ± 170 PMP/ μL plazma), azonban az S-LPS nem befolyásolta a PMP számot (273 ± 144 PMP/ μL plazma vs. 227 ± 95 PMP/ μL plazma a nem kezelt mintában) (7. D ábra). Megfigyeltük, hogy ezek a szintek mind alatta voltak az 5 μM TRAP kiváltott PMP számnak, ráadásul koaktiváció esetében már jóval kisebb koncentrációjú Re-LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) is szignifikánsan fokozta a TRAP PMP képződést kiváltó hatását (1384 ± 299 PMP/ μL plazma vs. 970 ± 145 PMP/ μL plazma; $p < 0,05$). Ezekkel ellentétben az S-LPS-sel történő koaktiváció nem befolyásolta a PMP szintet (983 ± 120 PMP/ μL plazma).

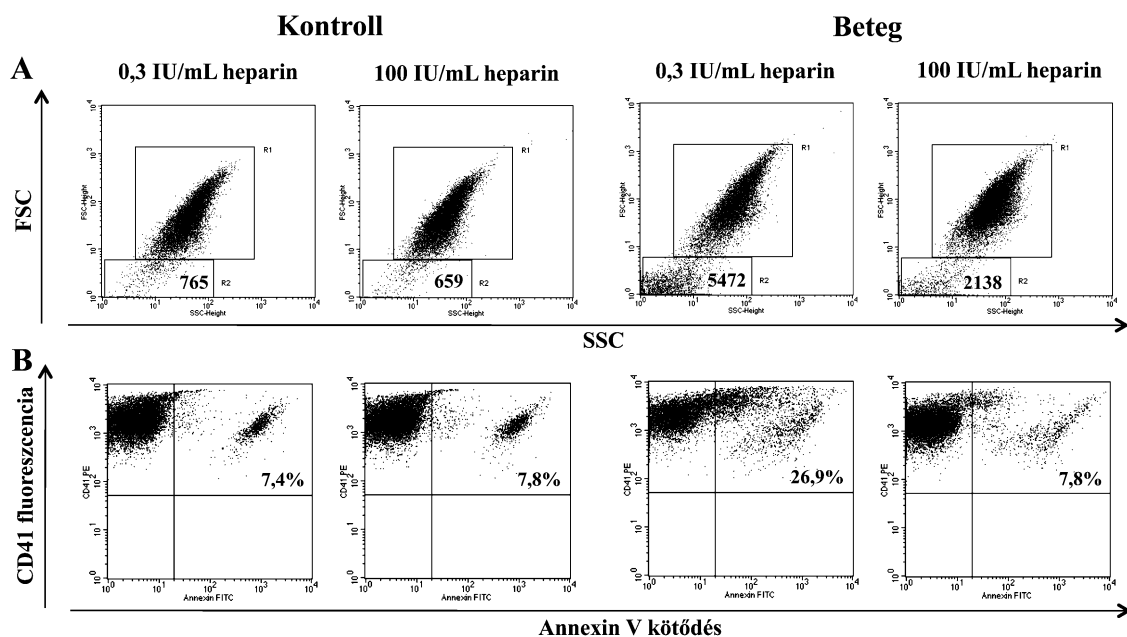


7. ábra LPS hatása a vérlemezke aktivációra

A két LPS forma vérlemezke aggregációt kiváltó potenciálját vizsgáltuk optikai aggregometriával. Reprezentatív aggregációs görbék és a diagramokon a maximális aggregációs értékek (%) mutatják önmagában az Re- LPS (A) és az S- LPS (B) hatását az aggregációra, valamint a potenciózó hatásukat a TRAP kiváltotta vérlemezke aggregációra. Reprezentatív áramlási citometriai dot-plotokon mutatjuk az LPS-ek hatását a CD40L expresszióra (C). Az Re- LPS-sel kezelt minták esetében emelkedett CD40L expressziót detektáltunk a nem kezelt mintákhoz képest, míg az S-LPS nem befolyásolta az expressziót. LPS stimuláció után a PMP-k mennyiségét áramlási citometriával mértük (D). Szignifikánsan magasabb ($p < 0,05$) PMP számot detektáltunk az Re- LPS kezelt mintában a nem kezelt mintához képest (NA) és az Re- LPS + TRAP aktivált mintában jelentősen magasabb PMP szintet mértünk ($p < 0,05$) a csak TRAP-pal aktivált mintához hasonlóan, míg az S- LPS a TRAP-pal történő koaktivációban nem potenciózta a TRAP hatását. Adataink 5 kísérlet adatait mutatják be, átlag \pm SEM.

HIT antitest (anti-PF4/heparin IgG) hatása a vérlemezke aktivációra és funkcióra

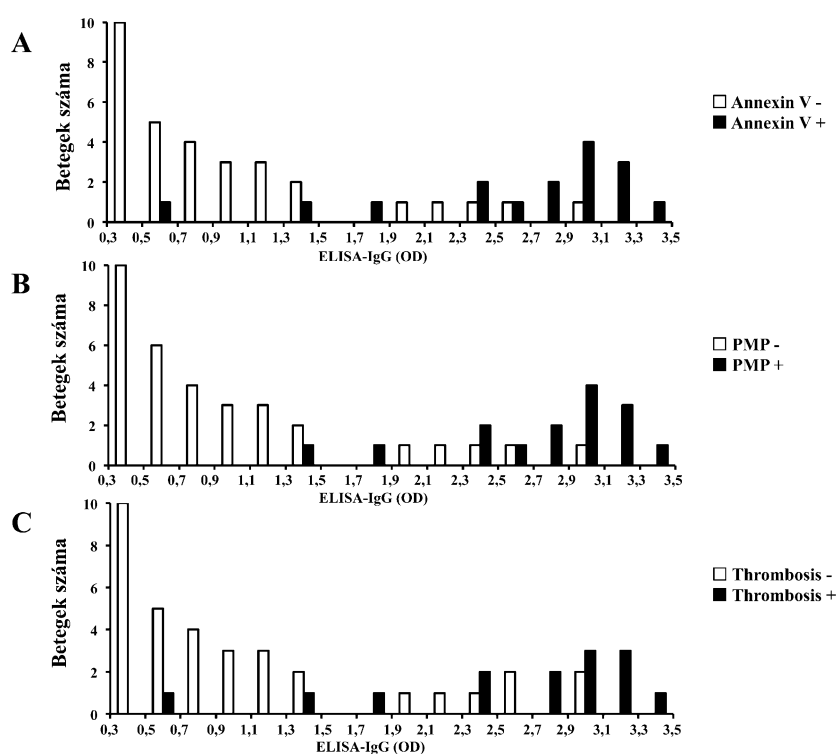
Összesen 40 olyan beteg plazmájának a vérlemezke aktiváló hatását teszteltük, akik az anti-PF4/heparin IgG típusú antitestre pozitívak voltak az ELISA teszttel ($OD > 0,5$), 11 olyan betegét, akiknek az ELISA teszttel az $OD = 0,3 - 0,5$ közötti határértéknek adódott és 40 beteget, akinek negatív lett ($OD < 0,3$) az ELISA tesztje. Azoknak a betegeknek, akiknek negatív vagy a határértéknek adódott az ELISA tesztje negatív lett a funkcionális tesztje is. 40 ELISA pozitív betegből 14 betegnek pozitív lett az annexin V kötő tesztje és 17 beteg a PMP tesztje. A 8. ábrán a két funkcionális teszt reprezentatív eredményét mutatjuk be egy HIT negatív (kontroll) és egy HIT pozitív beteg plazmájának vizsgálatakor. HIT negatív kontroll plazma nem aktiválta a kontroll egyén thrombocytáját, azonban a HIT pozitív beteg plazmája stimulálta a kontroll egyén thrombocytáját terápiás koncentrációjú heparin (0,3 IU/mL) jelenlétében. Magas heparin koncentráció (100 IU/mL) jelenlétében a vérlemezkek nem aktiválódtak vagy csak nagyon kis mértékben, ez bizonyítja azt, hogy a vérlemezke aktiváció heparin koncentráció függő, ugyanis a magas heparin koncentráció megakadályozza az immunkomplex létrejöttét, mely a vérlemezket aktiválná.



8. ábra Áramlási citometriai funkcionális assay HIT kimutatására

Egy HIT negatív és egy HIT pozitív beteg reprezentatív eredményei láthatóak az ábrán. Kontroll PRP-t inkubáltunk kontroll (HIT negatív) vagy HIT pozitív beteg plazmájával terápiás (0,3 IU/mL) vagy nagyon magas (100 IU/mL) koncentrációjú heparinnal. Vizsgáltuk a vérlemezke aktiváció során képződő PMP-k számát (A), melyeket a téglalapon elhelyezkedő események mutatnak, valamint a thrombocyták annexin V kötését (B). A HIT pozitív beteg plazma terápiás koncentrációjú heparin hatására jelentősen fokozta a PMP képződést és az annexin V pozitivitást a vérlemezkéken.

A továbbiakban megvizsgáltuk az összefüggést a ELISA OD érték és az annexin V kötő (9. A ábra) és a PMP teszt között (9. B ábra). Ennek során pozitív, szignifikáns összefüggést találtunk az ELISA OD érték és a funkcionális teszt pozitivitása között (annexin V kötés: $p=0,0001$, PMP: $p=0,0002$), ami azt jelenti, hogy minél magasabb az ELISA OD értéke, annál nagyobb a valószínűsége annak, hogy a funkcionális teszt pozitív értéket mutat. HIT-ben a legsúlyosabb mellékhatás a thrombosis, ezért megvizsgáltuk a kapcsolatot a heparin-függő antitest szint és a thrombotikus esemény gyakorisága között. 9.C ábra azt mutatja, hogy a magas heparin-függő antitest szint a thrombosis kialakulásának megnövekedett valószínűségével társítható.



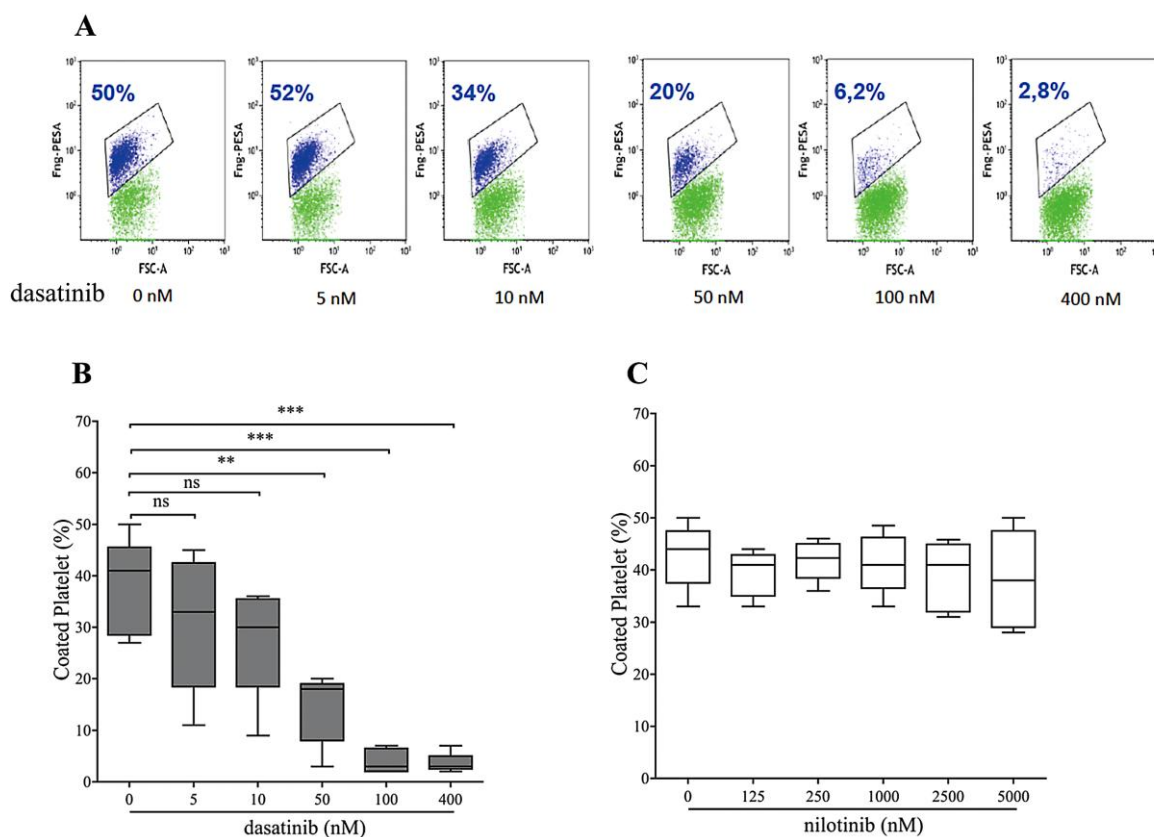
9. ábra Összefüggés az IgG-specifikus anti-PF4/heparin antitest titer és a vérlemezke aktiváció között

Az anti-PF4/heparin antitest ELISA-val mért optikai denzitása (OD) és a vérlemezkek annexin V pozitivitása (A), a PMP-k száma (B) és a thrombotikus esemény kialakulása (C) közötti összefüggés.

Dasatinib hatása a thrombocytá aktivációra és funkcióra

Egészséges egyének thrombocytáit előkezeltünk különböző koncentrációjú dasatinibbel vagy nilotinibbel, ezt követően vizsgáltuk a coated-platelet képződést, a PFA-100 záródási időt kollagén/epinefrin és kollagén/ADP patronnal és a kollagén kiváltotta

vérlemezké aggregációt és ATP szekréciót. Normál GFP dasatinibbel történő előinkubálása szignifikáns csökkenést váltott ki a coated-platelet képződésben már egészen alacsony terápiás tartományban is, például 50 nM dasatinib esetében $p \leq 0,01$, majd dózis-függő módon tovább csökkent (10. A-C. ábra)



10. ábra Dasatinib és nilotinib hatása a coated-platelet képződésre

Egészséges önkéntesektől származó GFP-t előkezeltünk különböző koncentrációban dasatinibbel vagy nilotinibbel 10 percig 37 °C-on és vizsgáltuk a coated-platelet képződést áramlási citometriával. Reprezentatív dot-plotok mutatják a dasatinibbel előkezelt vérlemezkék fibrinogén kötését a coated-plateletek képződése során (A). A coated-plateletek szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető már alacsony terápiás plazma koncentrációjú dasatinibnél ($n=5$, $p \leq 0,01$), mely dózis-függő módon tovább csökkent (B). A nilotinib előkezelés ($n=6$) nem befolyásolta a coated-plateletek képződését (C). Az FSC (forward scatter) rövidítés az előre szórt fény nagysága, mely a sejt mérettel arányos.

* $p < 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,0001$

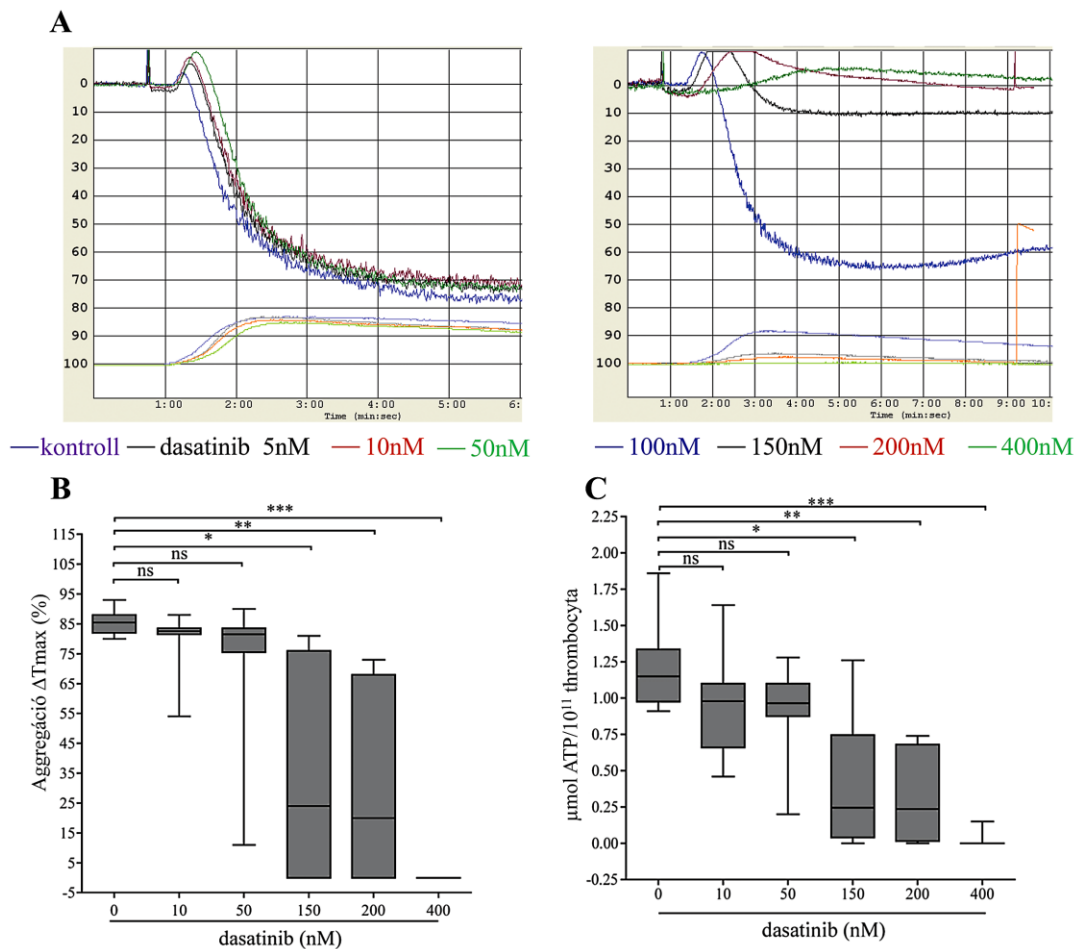
A dasatinib az általunk használt legnagyobb koncentrációban (400 nM) nyújtotta csak meg a záródási időt a kollagén/epinefrin patron esetében, míg a kollagén/ADP patronnal végzett PFA-100 vizsgálatot nem befolyásolta (2. táblázat).

Dasatinib (nM)	PFA100 kollagén/ADP (másodperc) normál érték: 55-118	PFA100 kollagén/epinefrin (másodperc) normál érték: 63-142
0	91	123
100	95	125
400	86	295

2. táblázat Dózisfüggő változások a PFA-100 záródási időben dasatinibbel előkezelt vérlemezkékben

Egészséges önkéntesektől származó Na₃-citráttal alvadésgátolt vért előkezeltünk 100 és 400 nM dasatinibbel 10 percig 37 °C-on., majd mértük a PFA-100 záródási időt kollagén/epinefrin és kollagén/ADP patronnal. Egy kísérlet reprezentatív eredményei láthatók a táblázatban. A dasatinib csak igen magas koncentrációban (400 nM) nyújtotta meg a záródási időt a kollagén/epinephrin patronnal, míg a kollagén/ADP patron esetében nem befolyásolta.

Előkísérleteinkben a kollagén kiváltotta vérlemezke aggregációt és ATP szekréciót a dasatinib 100 nM koncentrációig nem befolyásolta, ezért a további kísérletekben a 150 nM dasatinib előkezelést alkalmaztunk, mely szignifikánsan csökkentette ($p < 0,05$) mind az aggregációt mind az ATP szekréciót (11. A-C ábra). A kísérletek során negatív kontrollként használt nilotinib kezelés a coated-platelet képződést, a PFA-100 vizsgálatot és a thrombocytá aggregációt nem befolyásolta (ezeket az eredményeket nem mutatjuk be).



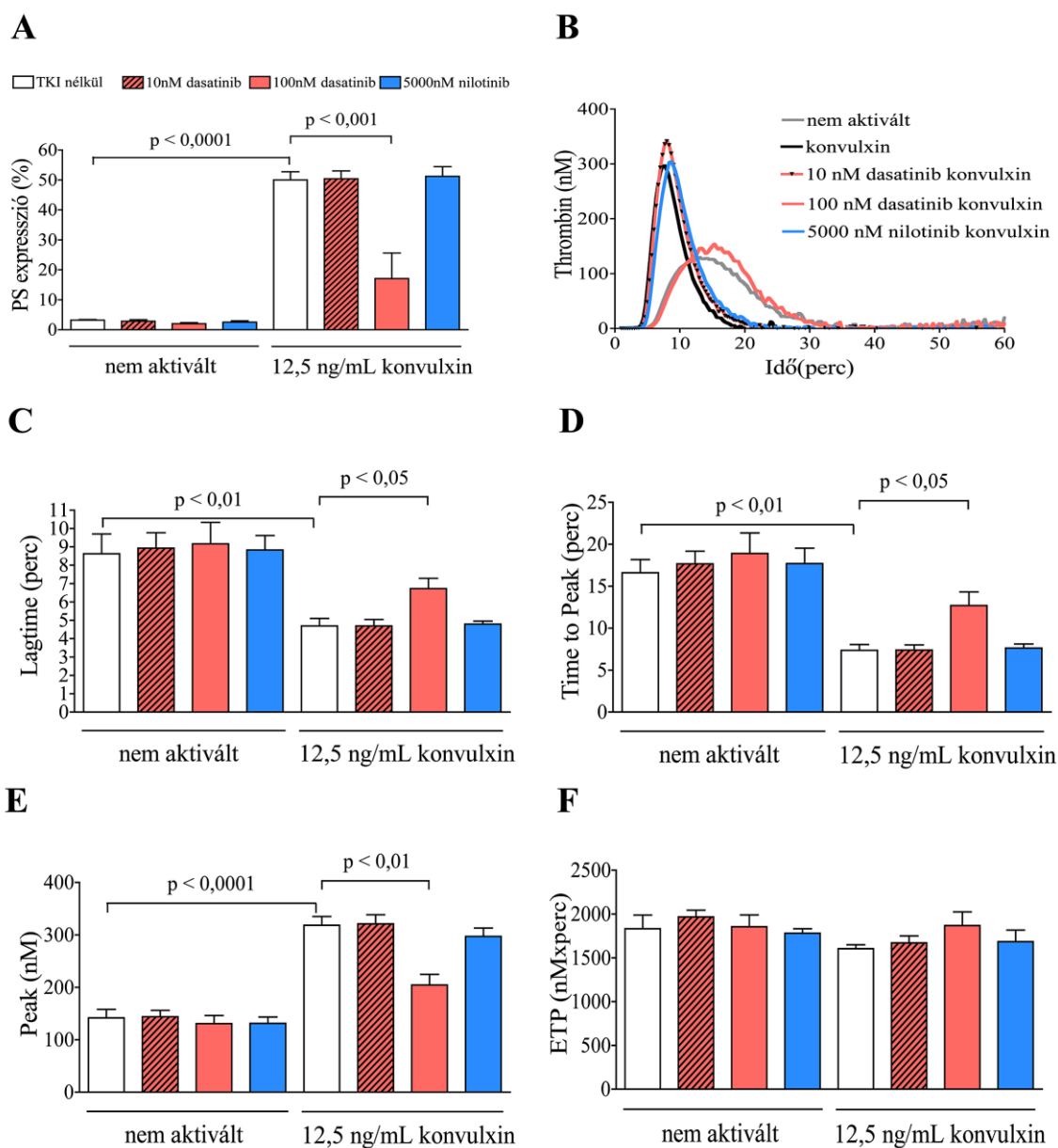
11. ábra Dasatinib hatása a kollagén kiváltotta vérlemezke aggregációra és ATP szekréción

Egészséges önkéntesektől származó PRP-t előkezeltünk különböző koncentrációban dasatinibbel 10 percig 37°C-on és vizsgáltuk a kollagén kiváltotta vérlemezke aggregációt és ATP szekréción. A dasatinib előkezelés 100 nM koncentrációig nem befolyásolta a kollagén kiváltotta vérlemezke aggregációt (A), viszont 150 nM dasatinib előkezelés már szignifikánsan alacsonyabb vérlemezke aggregációt (B) és ATP szekréción (C) eredményezett (n=8).

* $p < 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,0001$

Ezen vizsgálatok eredményei alapján felmerült bennünk a kérdés, hogy befolyásolhatja-e a dasatinib kezelés a vérlemezkek más funkcióját. Ennek kiderítése céljából normál vérlemezkéket előkezeltünk terápiás plazma koncentrációjú dasatinibbel (a C_0 közeli 10 nM és C_{max} : 100 nM koncentrációban) és nilotinibbel (C_{max} : 5000 nM), majd a minták egy részét aktiváltuk a GPVI receptor agonista, konvulxinnal, a másik részét a mintáknak nem aktiváltuk (nyugvó vérlemezkek). A kezeléseket után vizsgáltuk a nyugvó és az aktivált vérlemezkek prokoaguláns aktivitását PS expresszióval és vérlemezke-függő thrombin

képződés vizsgálattal, valamint az alvadék retraháló aktivitásukat alvadék retrakcióval és a GPIIb/IIIa aktív konformációjának vizsgálatával. Azt találtuk, hogy 100 nM dasatinib előkezelés szignifikánsan csökkentette a PS expressziót már a nem aktivált vérlemezkék esetében is. A konvulxin kifejezetten magas PS expressziót váltott ki a nem aktivált vérlemezkékhez képest és 100 nM dasatinib előkezelés nagymértékben meggátolta ($p < 0,01$) a konvulxin PS expresszióra kifejtett hatását (12. A ábra). Ugyanezekben a kísérletekben vizsgáltuk a dasatinib moduláló hatását a vérlemezke-függő thrombin képződésre. Ebben a kísérleti elrendezésben az aktivált vérlemezkék biztosítják a foszfolipidet (PL), a mérés során hozzáadott reagens pedig a szöveti faktor (tissue factor továbbiakban TF) a thrombin képződéshez. Az előzőekben leírt minták esetében vizsgáltuk a thrombin képződés kinetikáját, a lagtime, time to peak paraméterekkel és a képződött thrombin mennyiségét a thrombin peak és ETP-vel. Az 12. ábra B paneljén reprezentatív thrombin generációs görbék mutatják a konvulxinnak és dasatinibnek ill. nilotinibnek a hatását a vérlemezke-függő thrombin képződésre. A thrombin képződés gyorsabb volt a konvulxin aktivált mintában, ezt mutatja a lagtime és time to peak érték szignifikáns rövidülése (12. C, D. ábra). A konvulxinnal történő aktiváció növelte a peak thrombint, de nem befolyásolta az ETP értékét. Az idő paraméterek esetében a 100 nM dasatinib szignifikánsan késleltette a thrombin generációt a konvulxinnal aktivált mintában, de nem befolyásolta a nem aktivált mintában (12. E, F ábra). Továbbá, 100 nM dasatinib szintén szignifikánsan gyengítette a peak thrombint, de nem volt hatása az ETP értékre (12. E, F ábra) a konvulxinnal aktivált mintában. Tíz nM dasatinib és a nilotinib nem befolyásolta a thrombin képződés egyetlen paramétereit sem.

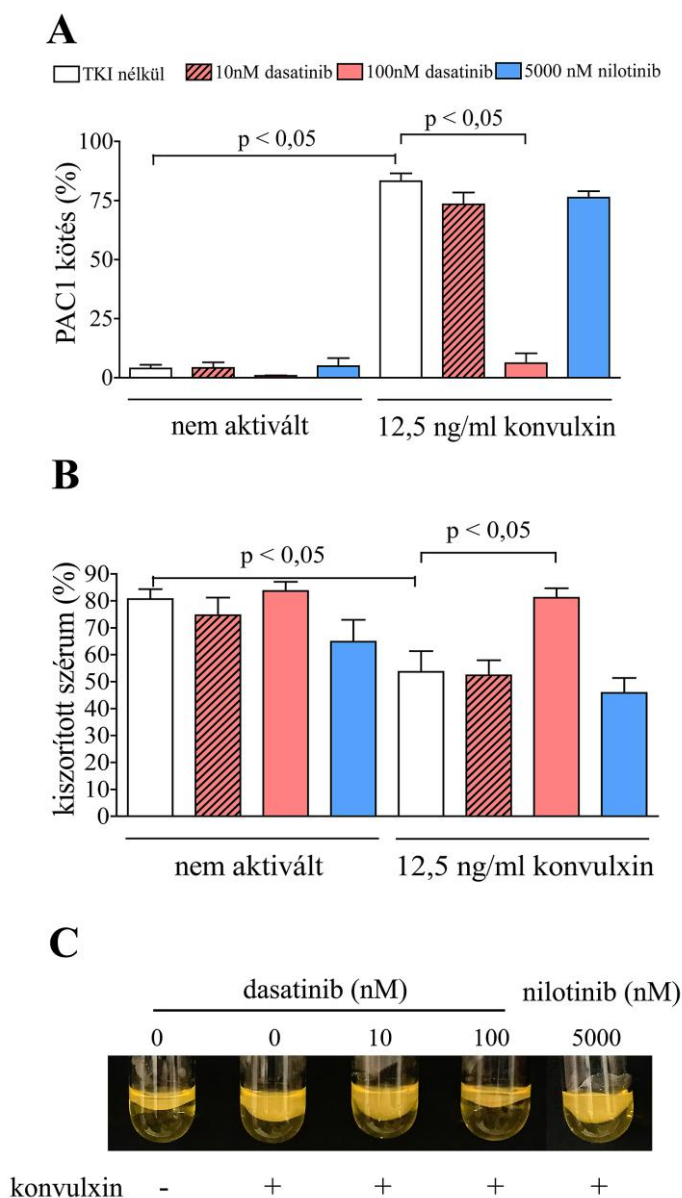


12. ábra A dasatinib gátolja a konvulxin kiváltotta PS expressziót és thrombin képződést

Egészséges önkéntesektől származó PRP-t előkezeltünk 10, 100 nM dasatinibbal vagy 5000 nM nilotinibbal 10 percig 37 °C-on, majd ezt követően aktiváltuk a vérelemezket 12,5 ng/mL koncentrációjú konvulxinnal 15 percig 37 °C-on. A PS expressziót annexin V kötődéssel vizsgáltuk (A). A histogram az annexin V-öt kötött vérelemezkek %-os arányát mutatja. A TKI előkezelt és konvulxinnal aktivált PRP-k reprezentatív thrombin generációs görbéi láthatóak a B ábrarészen. A Thrombogram lagtime (C), time to peak (D), peak thrombin (E) és ETP (F) paramétereit vizsgáltuk. A diagrammokon 5 különböző kísérlet átlag \pm SEM értékét mutatjuk be.

Ugyanezen mintákból áramlási citometriával vizsgáltuk a szintjét az aktivált GPIIb/IIIa-nak PAC1 kötődéssel, ahol 100 nM dasatinib szignifikánsan csökkentette a szintjét az aktivált integrinnek a nem aktivált mintában és erősen gátolta a konvulxin kiváltotta integrin aktivációt (13. A ábra). Alvadék retrakció vizsgálata során a 60 perces inkubációs idő letelte

után a nem aktivált minta intenzív alvadék retrakciót mutatott. Míg a konvulxinral aktivált mintában az alvadék retrakció kevésbé volt intenzív. Azonban, 100 nM dasatinib előkezelés szignifikánsan növelte a kiszorított szérum térfogatát a konvulxinral aktivált mintában (13. B, C ábra). A nilotinib és a 10 nM dasatinib előkezelés jelentősen nem befolyásolta sem az integrin aktivációt sem az alvadék retrakciót.

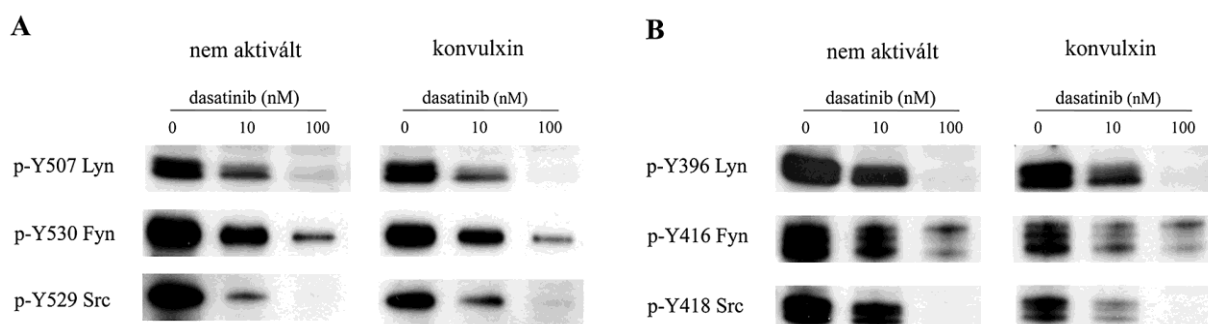


13. ábra A dasatinib gátló hatása a konvulxin-indukált α IIB β 3 integrin aktivációra és alvadék retrakcióra

Egészséges önkéntesektől származó PRP-t előkezeltünk 10, 100 nM dasatinibbal vagy 5000 nM nilotinibbal 10 percre 37 °C-on, majd ezt követően aktiváltuk a vérlemezkéket 12,5 ng/mL koncentrációjú konvulxinral 15 percre 37 °C-on. Az α IIB β 3 integrin aktív konformációját FITC konjugált PAC1 kötődésével vizsgáltuk és áramlási citométerrel detektáltuk. A PAC1-et kötött vérlemezkék mennyiségét %-ban adtuk meg (A). Az alvadék retrakciót nagy koncentrációjú kalciummal váltottuk ki a TKI-vel előkezelt, majd konvulxinral aktivált PRP-ben. A retrakció után mértük a kiszorított szérum térfogatát, amit az eredeti plazma térfogat %-os arányában

értékelünk (B). Az eredmények 5 különböző kísérlet átlag \pm SEM értékét reprezentálják. A C ábrarészen látható fotósorozat egy kísérlet mintáinak alvadék retrakcióját mutatja be.

A GPVI agonista konvulxinra adott csökkent válasz felveti azt, hogy a dasatinib a Sarcoma család kinázain (SFK) keresztül, befolyásolja a vérlemezke szignalizációt. Ezért kontroll GFP-t előkezelünk 0, 10 és 100 nM dasatinibbal, majd a vérlemezkéket aktiváltuk konvulxinnal. Abban az esetben, amikor a vérlemezkék nem voltak előinkubálva dasatinibbal (0 nM), de meg voltak aktiválva konvulxinnal csökkent az SFK-k foszforilált szintje a C-terminális részen (inaktív forma) és az aktivációs hurokban (maximálisan aktív forma). Az előző eredményekkel összhangban, 10 nM dasatinib előkezelés gyengítette a konvulxin hatását az SFK-ra és 100 nM dasatinib előkezelés pedig teljes mértékben megszüntette (14. ábra).

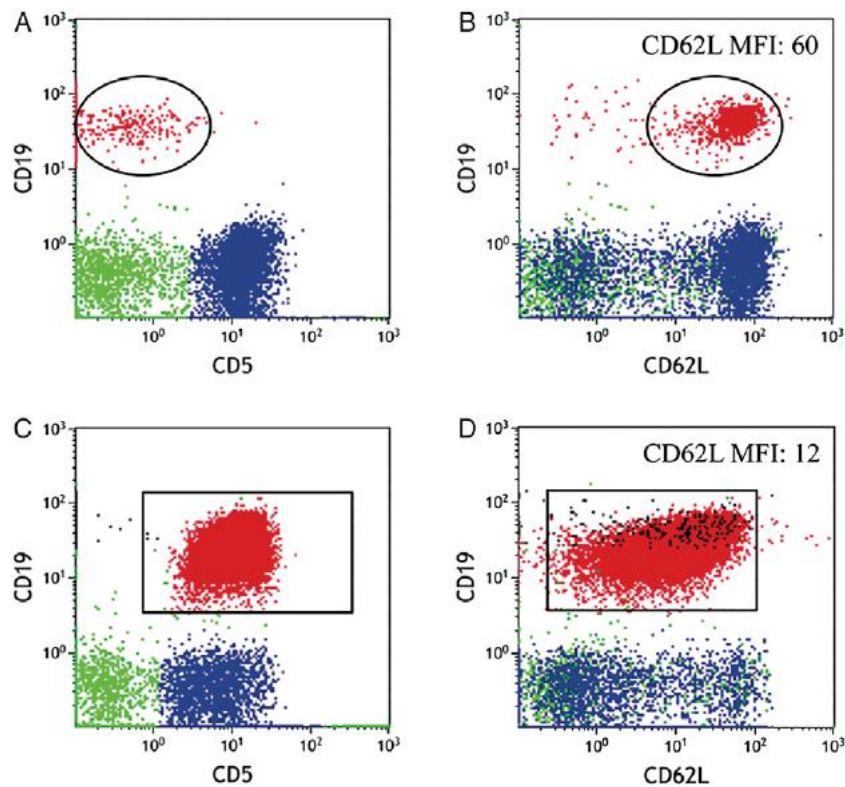


14. ábra Az SFK-k foszforilációs státusza dasatinib előkezelést követő konvulxinnal történő aktivációkor

Egészséges önkéntesektől származó GFP-t előkezelünk 10 és 100 nM dasatinibbal 10 percig 37 °C-on, majd a vérlemezkék egy részét aktiváltuk 12,5 ng/mL konvulxinnal 15 percig 37 °C-on, másik részét Hepes pufferben inkubáltuk. A vérlemezke lizátumokat elektroforézist követően immunoblotoltuk a Lyn, Fyn és Src kinázok inhibitor (A) és a teljes aktivitást kiváltó (B) foszforilációja elleni foszfospecifikus antitestekkel.

Foszfataz aktivitás moduláló hatása az L-szelektin expresszióra

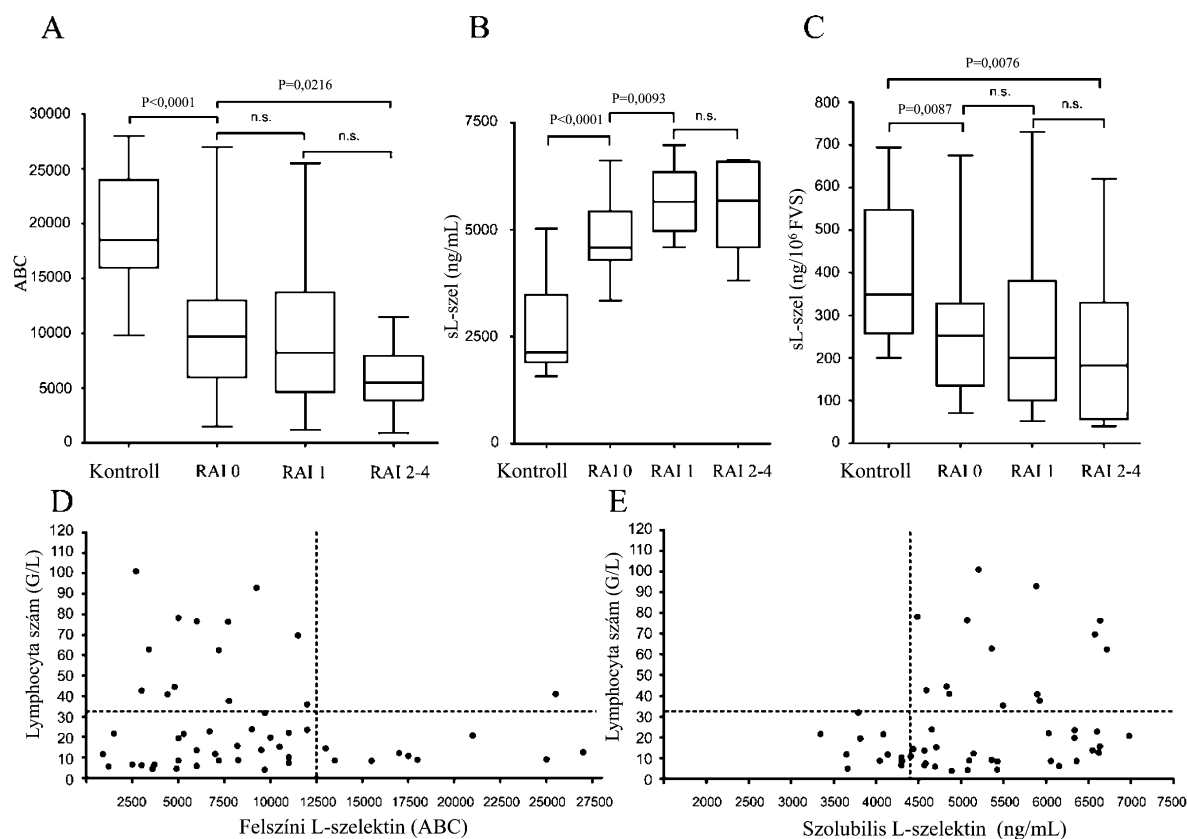
CLL-es betegek CD5+/CD19+ kóros B-sejtjein és a kontroll csoport CD5-/CD19+ normál B-sejtjein vizsgáltuk az L-szelektin expressziót. Egy kontroll minta és egy CLL-es beteg minta L-szelektin (CD62L) kifejeződését mutatjuk be a 15. ábrán. Kontroll minta normál B-sejtjei magas és homogén L-szelektin expressziót mutatnak (MFI:60), míg a CLL-es beteg kóros B-sejtjein az L-szelektin expresszió heterogén és jelentősen alacsonyabb (MFI:12).



15. ábra Felszíni L-szelektin expresszió normál B-sejten és CLL-es beteg B-sejtjein

Áramlási citometriai dot-plotok egészséges kontroll (A, B) és CLL-es beteg (C, D) perifériás vér lymphocytáiról. Az A és B ábrarészen ellipszis alakú kapuban lévő CD19+/CD5- normál B-sejtek magas és homogén CD62L expressziót mutatnak, ezzel szemben C és D ábrarészen a téglalap alakú kapuban látható CD19+/CD5+ CLL-es lymphocyták sokkal alacsonyabb és heterogén CD62L expressziót mutatnak. A fekete pontok a D panelen a CLL-es beteg reziduális normál B-sejtjei.

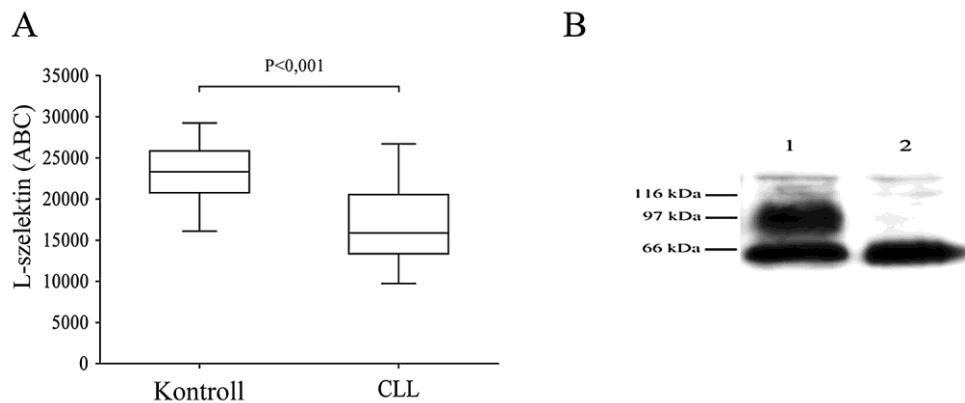
További minták vizsgálata során azt találtuk, hogy a felszíni L-szelektin expresszió szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,0001$) a legkedvezőbb lefolyású Rai 0 stádiumú CLL-es betegek B-sejtjein is a normál B-sejtekhez viszonyítva (16. A ábra). Ezzel egyidőben a CLL-es betegek plazmájából mért L-szelektin szint szignifikánsan magasabbnak adódott (16. B ábra), de amikor a plazma L-szelektin szintet normáltuk 10⁶ fehérvérsejtszámra a szolubilis L-szelektin érték alacsonyabbnak adódott a CLL-es betegekben (16. C ábra). Azoknál a betegeknél, ahol az abszolút lymphocytá szám 32 G/L fölött volt a kóros B-sejtek felszínén az L-szelektin expresszió alacsonyabbnak, míg ugyanezen betegek plazmájából mért szolubilis L-szelektin szint pedig magasabbnak adódott (16. D, E ábra).



16. ábra CLL-es betegek mintáinak sejtfelszíni és szolubilis L-szelektin analízise

Az L-szelektin szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,0001$) a CLL-es betegek kóros B-sejtjein a kontroll B-sejtekhez képest, és az L-szelektin ABC a legalacsonyabb az előrehaladott esetekben volt (A). A betegszámok a különböző Rai csoportokban a következőképpen alakultak: Rai 0: 27, Rai 1: 12 és a Rai 2-4 csoportokat puloztuk az alacsony esetszám miatt: 12. Ellentétben a felszíni L-szelektinnel a szolubilis L-szelektin szignifikánsan magasabb volt a CLL-es betegek plazmájában (B), de amikor ezt az értéket normaltáltuk a fehérvérsejtszámra a CLL-es betegekben alacsonyabbnak adódott a szolubilis L-szelektin (C). Azok a betegek, akiknek az abszolút lymphocytaszámja 32 G/L fölött volt alacsony felszíni L-szelektin expressziót és magas szolubilis L-szelektin szintet mutattak (D, E).

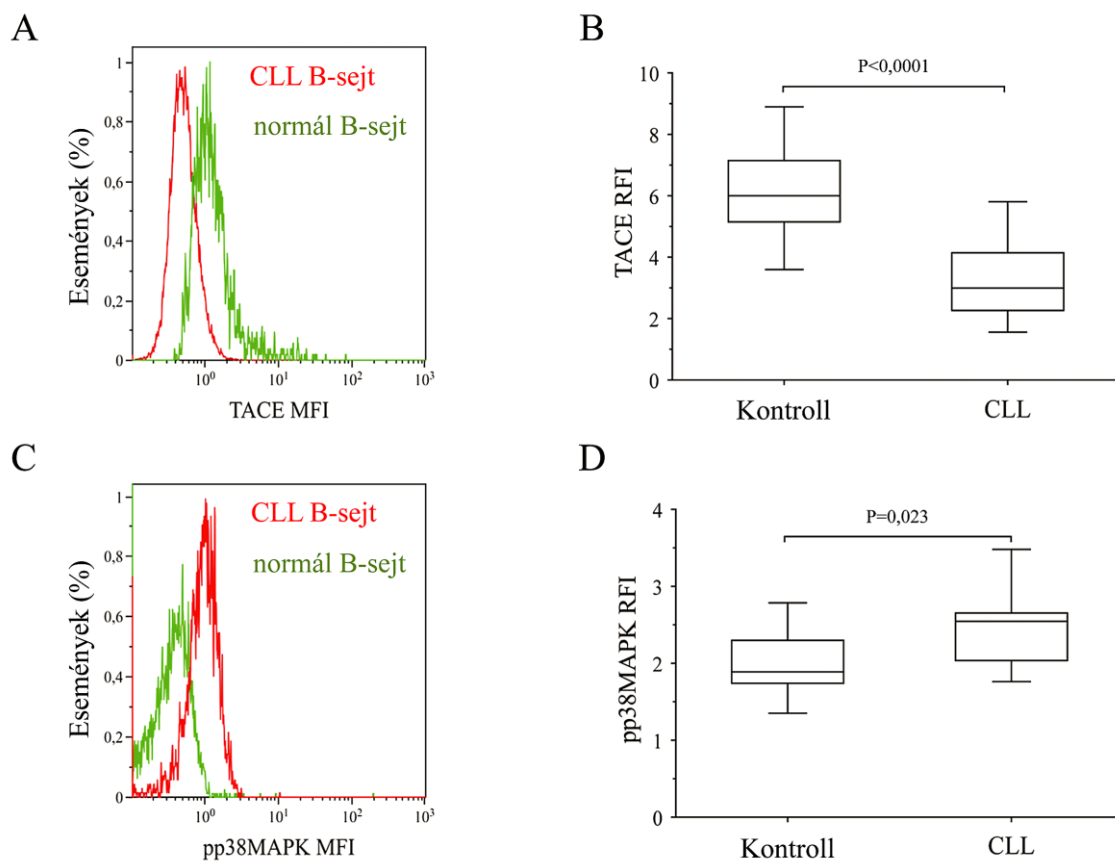
A CLL-es betegek T-sejtjein is alacsonyabb volt az L-szelektin expresszió, de a különbség kevésbé volt hangsúlyozott (17. A ábra). Az L-szelektin szolubilis formája származhat a lymphocyták és neutrophilek felszínéről is (17. B ábra). Azonban az átlag neutrophil szám (4,5 G/L) a vizsgált betegekben elhanyagolható volt az átlag abszolút lymphocytaszámhoz (43,6 G/L) képest és emellett áramlási citométerrel vizsgálva a lymphocyták 78%-a kóros B-sejt volt, ezek alapján a szolubilis L-szelektin főként a B-CLL-es sejtekről került a plazmába.



17. ábra L- szelektin expresszió T-sejteken és CLL-es betegek plazmájában

CLL-es betegek (n= 28) T-sejtjei szignifikánsan alacsonyabb L-szelektin expressziót mutattak a kontrollok T-sejtjeihez (n= 15) képest (A). Az L-szelektin szolubilis formája származhat a lymphocyták és neutrophilek felszínéről is. A Western blot kép két CLL-es betegminta szolubilis L-szelektinjét mutatja be (B). Az első minta olyan CLL-es betegtől származik, akinek a vérmintája 55 % CLL-B-sejtet és 42 % neutrophilt tartalmazott (a felső sáv a neutrophilekből az alsó sáv a lymphocytákból származó L-szelektin). A második minta, olyan betegnek a szolubilis L-szelektinjét mutatja, akinek 89 % CLL-B-sejtje és 5 % neutrophilje volt.

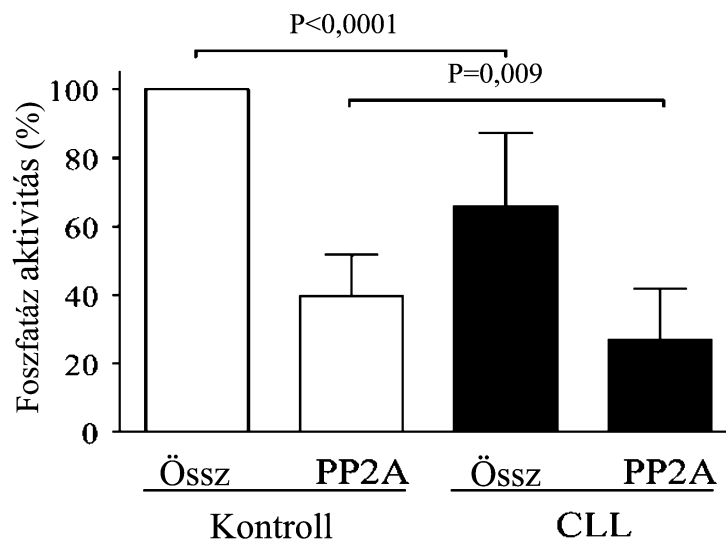
A továbbiakban olyan vizsgálatokat végeztünk, amelyek hozzásegítenek minket az L-szelektin csökkenés mechanizmusának megértéséhez. A CD5+/CD19+ kóros B-sejtek felszínén a vizsgált TACE expresszió szignifikánsan alacsonyabb a sejtekben a foszforilált p38MAPK (pp38MAPK) szint pedig szignifikánsan magasabb volt a normál B-sejtekhez viszonyítva (18. A-D ábra).



18. ábra Sejtfelszíni TACE és foszforilált p38MAPK expresszió

A sejtfelszíni TACE expressziót áramlási citometriával vizsgáltuk, reprezentatív histogramok kontroll egyén normál B-sejtjének és CLL-es beteg kóros B-sejtjének TACE expresszióját mutatják (A). A TACE expressziót relatív fluoreszcencia intenzitásban fejeztük ki (RFI) kontrollok (n= 18) és CLL-es betegek (n= 30) mintájában (B). A CLL-es minták esetén a TACE RFI szignifikánsan alacsonyabbnak ($p < 0,0001$) adódott a kontrollokhoz hasonlítva. A pp38MAPK vizsgálata permeabilizált sejtekben áramlási citometriával történt, a histogramok normál B-sejtek és CLL-es beteg kóros B-sejtjeinek pp38MAPK expresszióját mutatják (C). A malignus B-sejtek szignifikánsan magasabb ($p = 0,023$) pp38MAPK szintet mutattak a normál B-sejtekhez képest (D).

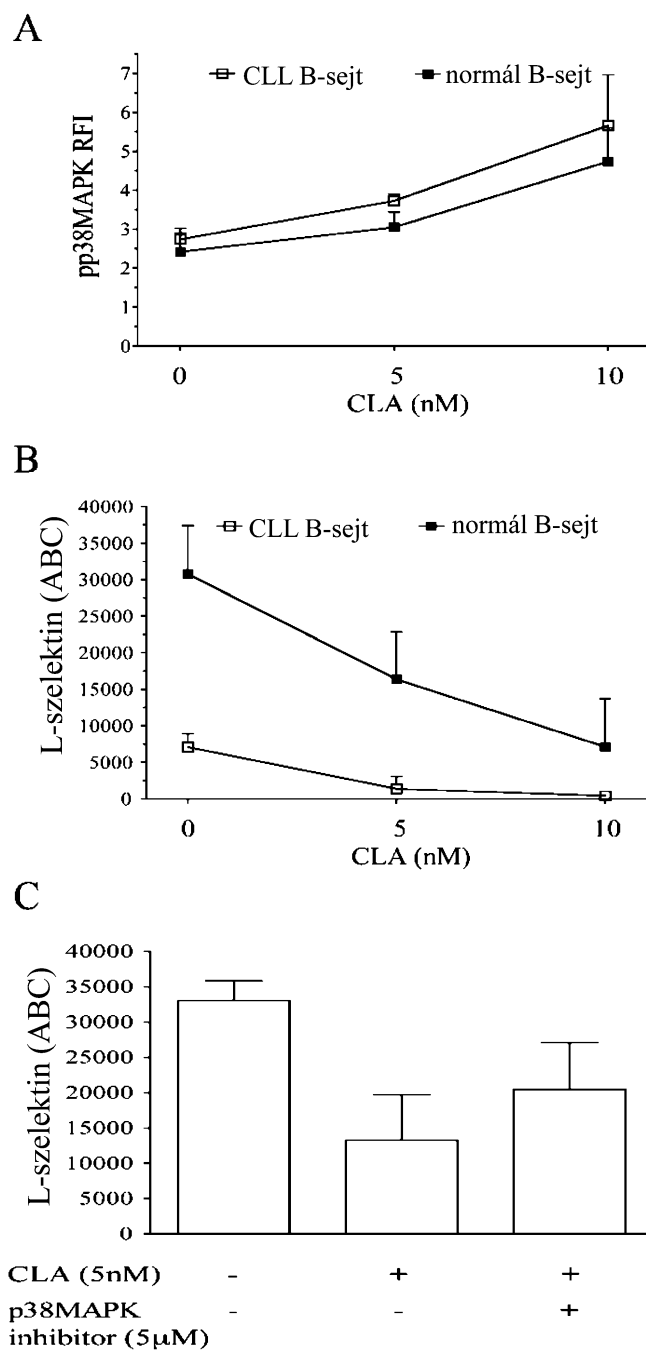
Ezután megmértük az össz és PP1 inhibitorral a PP2A foszfatáz aktivitást a B-CLL és normál B-sejtekben. Azt találtuk, hogy az össz és PP2A aktivitás is szignifikánsan alacsonyabb a kóros B-sejtekben a normál B-sejtekhez képest (19. ábra).



19. ábra Normál B-sejtek és kóros B-sejtek protein foszfataz aktivitása

A B-sejt lizátumok foszfataz aktivitását (PA) ³²P- MLC20 szubsztráttal vizsgáltuk és mértük a felszabaduló ³²Pi mennyiségét. A minták össz foszfataz és PP2A aktivitását határoztuk meg és az eredményeket a sejtszámra normalizáltuk. Normál B-sejtekben az össz foszfataz aktivitást 100 %-nak vettük (n= 9). Az össz foszfataz és a PP2A aktivitás is szignifikánsan alacsonyabbnak adódott a B-CLL-es sejtekben (n= 24) a kontroll normál B-sejtekhez hasonlítva. Az ábrán az eredmények átlaga és szórása van megjelenítve. A foszfataz aktivitás meghatározást a DE, Orvosi Vegytani Intézet munkatársa végezte.

Ezt követően in vitro kísérletekben CLL-es betegek B-sejtjeit és normál B-sejteket előkezeltünk calyculin A (CLA) foszfataz inhibitorral, ezután vizsgáltuk a felszíni L-szelektin expressziót és a pp38MAPK szintet. A leukémiás B-sejtekben a pp38MAPK szint magasabb volt a normál B-sejtekhez viszonyítva, ami CLA kezelés után koncentráció-függő módon megemelkedett mindkét csoportban, de a CLL-es betegek B-sejtjeiben mindig magasabb volt mindkét CLA koncentráció esetében (20. A ábra). Ugyanezen mintákban a felszíni L-szelektin gyors csökkenése volt megfigyelhető mindkét csoportban bár eltérő kinetikával, 10 nM CLA hatására a kóros B-sejtek felszínéről szinte teljes egészében eltűnt az L-szelektin (20. B ábra).



20. ábra Foszfataz (CLA) és MAPK inhibitor (SB203580) hatása a p38MAPK foszforilációra és az L-szelektin expresszióra

A szerin/treonin foszfatazok CLA-val történő gátlása a pp38MAPK szintjének emelkedését váltotta ki CLA-koncentráció függő módon. A foszforiláció mértéke kismértékben magasabb volt a CLL-es B-sejtekben a normál B-sejtekhez hasonlítva (A). Ezek az intracelluláris változások a sejt felszíni L-szelektin csökkenéséhez vezettek (B). In vitro kísérletekben kontroll PBMC-t előkezeltünk MAPK inhibitorral a CLA kezelés előtt, ennek eredményeként a p38MAPK inhibitor gyengítette a CLA L-szelektin csökkentő hatását (C). Ábránkon három kísérlet átlag \pm SD eredményét mutatjuk be.

Ezek után normál B-sejteket a CLA kezelés előtt előinkubáltunk p38MAPK inhibitorral (SB203580) 5 μ M koncentrációban. A p38MAPK gátolt sejtek csökkent pp38MAPK szintet mutattak a CLA kezelés után, 5 μ M p38MAPK inhibitor szinte teljes egészében meggátolta az 5 nM CLA által kiváltott p38MAPK foszforilációt (ezt az adatot nem mutatjuk be). Hasonlóan ezekhez a változásokhoz, 5 nM CLA által kiváltott L-szelektin csökkenés kisebb mértékű volt a p38MAPK inhibitorral történő előkezelés után (20. C ábra).

MEGBESZÉLÉS

A vérlemezkékről ismert, hogy komplex funkciójuk van, a celluláris hemosztatikus folyamatok fő regulátorai, hozzájárulnak a hemosztatikus dugó képződéshez és akcelerálják a koagulációs rendszert. Ezen folyamatok során a thrombocyták kapcsolatba kerülnek különböző sejttípusokkal, monocytákkal, neutrophilekkel, endothel sejtekkel és sima izom sejtekkel és hozzájárulnak az atherosclerosis, vaszkuláris inflammáció és más inflammáció-mediált betegségek például a szepszis patogeneziséhez (72-74). Ezen kórképek mellett infékción során a vérlemezkék kapcsolatba kerülnek mikroorganizmusokkal és neutrophilekkel és NET-ek képződnek, melyek egyrészt védelmet biztosítanak a patogének inváziója ellen, másrészt résztvesznek az infékción-mediált thrombosis kialakulásában (75).

A patológiás folyamatokhoz hozzájáruló thrombocyták karakterizálásához és a folyamatokban betöltött komplex szerepük jobb megértéséhez technikailag és metodológiailag megfelelően kidolgozott laboratóriumi funkcionális tesztekre van szükség (76). A thrombocytá aktiváció eredményezhet „klasszikus” aktivációt, mely a vérlemezke aggregációt az alvadék retrakciót és bizonyos aktivációs markerek többek között a P-szelektin, CD40L és az aktivált GPIIb/IIIa expresszió emelkedését jelenti. Az „alternatív” biomarkerek a thrombocytá aktiváció során képződő PMP-k, heterotipikus aggregátumok, PS expresszió és a funkcionális tesztek közül a HIT teszt, a coated-platelet képződés és a vérlemezke-függő thrombin képződés vizsgálata (71).

Kutatásainkban gyulladáshos- és immunmediátorok mellett TKI-k hatását vizsgáltuk a vérlemezke receptorokra, szignalizációra és funkcióra, valamint leukocytákon az L-szelektin adhéziós receptor modulációját tanulmányoztuk CLL-ben.

In vitro tanulmányunkban két LPS forma, az Re-LPS (*Salmonella minnesota, Re595*) és az S-LPS (*Escherichia coli, 0111:B4*) hatását vizsgáltuk a vérlemezke aktivációra és funkcióra. Kísérleteink háttérében az LPS vérlemezke aktiváló hatásának tulajdonított korábban publikált, egymásnak ellentmondó vizsgálati eredmények állnak. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy 1 µg/mL koncentrációjú Re-LPS és S-LPS önmagában nem vált ki klasszikus vérlemezke aktivációt, de az Re-LPS képes potenciózni a szubmaximális koncentrációjú TRAP vérlemezke aggregáló és PMP generáló hatását és csak igen magas (10 µg/mL) koncentrációban vált ki CD40L expresszió emelkedést és PMP képződést (77). Eredményeink összhangban állnak olyan korábbi tanulmánnyal, melyben kimutatták, hogy különböző baktérium törzsekből származó eltérő struktúrájú LPS formák 10 µg/mL koncentráció alatt nem képesek önmagukban klasszikus vérlemezke aktivációt kiváltani (78),

azonban az LPS nagyon magas koncentrációban (100 µg/mL) fokozza a P-szelektin expressziót (79). Eredményeinkkel ellentétben Vallance és munkatársai kimutatták, hogy a *S.minnesota* LPS 2 µg/mL szuprafiziológiás koncentrációban egy eltérő receptoron keresztül történő szimultán stimulációban GPVI receptor agonistával azt találta, hogy 0,5 µg/mL CRP-XL (collagen related peptide-XL), P-szelektin expressziót csökkenését eredményezi (80).

Összefoglalva, kimutattuk, hogy a vérlemezkék az LPS különböző formáira eltérő módon reagálnak, mely egyrészt az LPS O-antigén régiójának eltérő strukturájának a következménye. Másrészt, a strukturális eltérés mellett a TLR4 és a szolubilis plazma fehérjék, mint a CD14 és LBP (lipopolysaccharide-binding protein; lipopoliszaharid-kötő fehérje) közötti kapcsolat szükségessége (81).

Következő tanulmányunkban IgG-típusú HIT antitestek hatását vizsgáltuk a vérlemezke aktivációra. A heparin terápia mellékhatása lehet, hogy immunreakciót indukál, melynek során olyan IgG-típusú antitestek keletkeznek a véráramban, amelyek kötik a heparin-PF4 komplexet. Az így létrejövő heparin/PF4/antitest komplex az antitest Fc részével kötődik az FcγRIIa-hoz és aktiválja a vérlemezkéket, ami thrombocytopenia kialakulása mellett egy hypercoagulábilis állapothoz vezet, aminek eredményeként thrombosis alakulhat ki. In vitro tanulmányunkban egy funkcionális teszttel vizsgáltuk HIT gyanús betegek plazmájában jelenlévő HIT antitestek hatását kontroll vérlemezkék prokoaguláns potenciáljára és a PMP képződésre terápiás koncentrációjú heparin jelenlétében. Majd az áramlási citometriai funkcionális teszt eredményeit összehasonlítottuk az ELISA módszerrel meghatározott HIT antitest OD-értékekkel. Warkentin és munkacsoportjához hasonlóan (82) szignifikáns pozitív összefüggést találtunk az ELISA OD érték és a funkcionális teszt pozitivitása között mindkét vizsgált aktivációs marker vizsgálata esetén (83). Emellett kimutattuk, hogy a magas antitest titer (OD értékben kifejezve) szignifikáns pozitív összefüggést mutat a thrombosis kialakulásának lehetőségével. Ez a megállapításunk összhangban állt az irodalomban közölt adatokkal, mely szerint az ELISA és SRA (Serotonin Release Assay) teszttel pozitív betegek 69 %-nál alakult ki thrombosis (84), míg a mi általunk végzett ELISA és annexin V kötő teszttel pozitív eseteknél a betegek 71 %-nak volt thrombotikus eseménye.

Összefoglalva, eredményeink alapján az annexin V kötődést és PMP képződést detektáló funkcionális áramlási citometriai HIT teszt megbízhatóan képes előrejelezni a heparin kezelés mellékhatásának klinikai kimenetelét.

A BCR-ABL tirozin kináz inhibitorok bevezetése a krónikus mieloid leukémiás betegek kezelésébe jelentősen javította a betegek túlélési esélyeit. Azonban ezeknek a gyógyszereknek a hosszú távú használata különböző mellékhatásokat eredményezhet. A második generációs TKI-k közül a dasatinib hemorrhagias komplikációk kialakulásához vezethet, mely túlnyomó részt gastrointestinalis vérzés (85, 86), míg a nilotinib aktiválja a vérlemezkéket és az endotheliumot, ezáltal potenciálja a thrombocytá adhéziót és a thrombus képződést (87).

In vitro tanulmányunkban klinikailag releváns koncentrációjú dasatinib és nilotinib hatását vizsgáltuk a vérlemezke aktivációra és funkcióra. Korábbi in vitro tanulmányok eredményeivel összhangban (88, 89) azt találtuk, hogy a dasatinib dózis-függő módon gyengítette a vérlemezke aktivációt és a terápiás plazma koncentrációhoz (C_{max}) közeli koncentrációban (150 nM) a dasatinib szignifikánsan gátolta a kollagén kiváltotta vérlemezke aggregációt, valamint ATP szekréciót és csak igen magas (400 nM) koncentrációban nyújtotta meg a kollagén/adrenalin patronnal a PFA-100 záródási időt (90). Ezen vérlemezke funkcionális vizsgálatok mellett, melyek a thrombocyták elsődleges hemosztázisban betöltött szerepéről szolgálnak információul az ugyancsak funkcionális tesztnek tekintett vérlemezke diagnosztikában nem használatos coated-plateletek képződését is vizsgáltuk. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy már 50 nM dasatinib előkezelés szignifikánsan kevesebb coated-platelet képződést eredményezett, ez alapján arra következtettünk, hogy a coated-platelet vizsgálat szenzitívebb, mint a lumi-aggregometria a dasatinib gátló hatásának vizsgálatára a GPVI receptoron keresztül indukált vérlemezke aktiváció során.

A thrombocyták a primer hemosztázisban betöltött szerepük mellett a vérlemezke-függő thrombin képződés folyamatán keresztül, modulálják a koagulációt. Ennek kapcsán arra kerestük a választ, hogy a dasatinib az aggregáló thrombocytákon kívül befolyásolja-e a PS-t expresszáló prokoaguláns vérlemezkék képződését illetve funkcióját. Ennek a kérdésnek a megválaszolására a szakirodalomban eddig semmilyen adatot nem közöltek, ezért következő in vitro tanulmányunkban klinikailag releváns koncentrációjú TKI hatását vizsgáltuk (91) a prokoaguláns vérlemezke képződésre. A kísérleti eredményeink tisztán mutatták, hogy a terápiás tartomány magasabb vége (C_{max}), 100 nM dasatinib előkezelés szignifikánsan csökkentette a PS expressziót a nem aktivált vérlemezkék esetében, de a gátló hatás markánsabbnak bizonyult a konvulxin-indukált aktivációs válasz esetén minden vizsgált tesztnél, PS expresszió, thrombin képződés, integrin aktiváció és alvadék retrakció. Ellenben a terápiás koncentrációjú nilotinib nem befolyásolta a vérlemezke funkciókat egyik teszt esetében sem (92). Ezek az eredményeink megerősítést nyertek egy későbbi 2020-as

publikáció eredményei által, ahol a szerzők azt találták, hogy a dasatinib gátolja a prokoaguláns vérlemezkék képződését és a mitokondrium membrán depolarizációt, valamint a kollagén receptoron keresztül kiváltott GPIIb/IIIa aktivációt (93).

A dasatinib a BCR-ABL tirozin kinázon kívül gátolhatja az SFK közül a Lyn, Fyn és Src kinázokat, melyek regulátorai a GPVI receptoron keresztüli vérlemezke szignalizációnak és aktivációnak. Azonban ezekből az adatokból nem lehet azt a következtetést levonni, hogy a dasatinib az SFK-k gátlásán keresztül fejt ki gátló hatását a vérlemezke funkciókra. Ezen kérdés tisztázására Western blotlalt vizsgáltuk az SFK-k foszforilációs státuszát dasatinib előkezelt és konvulxinallal aktivált vérlemezkékben. Korábbi közleményekkel összhagban azt találtuk, hogy a dasatinib gátolja mindhárom kináz inaktív és aktív formáját már igen alacsony dasatinib koncentráció (10 nM) esetén is a konvulxinallal nem aktivált mintában és a magas terápiás (100 nM) koncentrációjú dasatinib az SFK-kat teljes mértékben legátolta (94-96). A PS expresszióra kifejtett hatással összhagban, amikor a vérlemezkék 10 nM dasatinibbal voltak előkezelve a konvulxin képes volt kifejteni aktiváló hatását a vérlemezkékre, azonban 100 nM dasatinib teljesen megszüntette ezt a hatást. Ez a hatás teljesen megegyezett azzal, amit a PS expressziónál megfigyeltünk.

Régóta megfigyelt, hogy CML-ben a dasatinib terápia vérzéses tünetekhez vezethet, aminek a hátterében különböző okok állhatnak. A dasatinib kezelés thrombocytopeniához és -eredményeinkből is látjuk - vérlemezke diszfunkcióhoz vezet, de nem találtak összefüggést a romló thrombocyta funkció és a vérzéses tünetek között ugyanakkor megállapították, hogy a vérzéses komplikációk kialakulást in vitro vérlemezke aggregációs tesztekkel nem lehet előre jelezni (97). A dasatinib a vérlemezkéken kívül a keringésben más sejtekre is kifejtheti hatását az endothel sejteken keresztül átmeneti vaszkuláris szivárgáshoz és eryptosisához vezethet, ami PS expresszió emelkedésével jár (98, 99). Tehát a dasatinib hatása a cirkulációra komplex és a vérzés, mint a kezelés klinikai kimenetele függ attól, hogy melyik hatás hangsúlyosabb pl. a PS expresszió gátlása vagy annak fokozása a különböző típusú sejtek esetében.

Összefoglalva, munkánkkal bemutattuk a dasatinib off-target hatásait a vérlemezke funkciókra és feltártunk egy mechanizmust, ami a megfigyelt jelenséghez vezethet. A dasatinib előkezelés gátolta a GPVI receptoron keresztüli vérlemezke aggregációt és prokoaguláns aktivitást. Ezek a hatások hozzájárulhatnak a dasatinibbal kezelt betegek hemorrhagias következményeihez az endothelium rendellenességein vagy károsodásán keresztül, amikor a GPVI agonista szubendothelialis kollagén szabaddá válik.

Érsérülés kapcsán és ettől függetlenül is számos inflammatórikus folyamatban vagy malignus megbetegedések során a thrombotikus kórképek egyik kiváló markere a

thrombocyta-fehérvérsejt heterotipus aggregátumok létrejötte (45). A leukocyták közül valamennyi expresszál adhéziós receptort. Minden fehérvérsejten meglévő adhéziós receptor az L-szelektin, melynek felépítése nagyon hasonló a thrombocyta P-szelektinhez, de azzal ellentétben egy konstitutíven expresszálódó protein.

A következő tanulmányunkban a vérlemezkékkel thrombotikus folyamatok során kapcsolatba lépő fehérvérsejteken vizsgáltunk az L-szelektin expressziót, normál és patológiás mintákon. A kórkép, amelyben ezt tanulmányoztuk a leggyakoribb felnőttkori leukémia a krónikus lymphocytás leukémia volt. Feltételezésünk az volt, hogy ebben a kórképben melynek morfológiai megjelenése homogén, de klinikai képe és lefolyása rendkívül változékony, az adhéziós receptorok összefüggést mutathatnak a betegség klinikai stádiumaival.

Számos hematológiai malignus megbetegedésben megfigyelt az onkogén kinázok állandó aktivációja, melyek további kinázok konstitutív aktiválását vagy az antionkogén foszfatázok inaktiválását váltják ki. Régóta ismert, a SET onkoprotein emelkedett mennyisége krónikus lymphoid leukémiába (CLL) (100), mely főként az antionkogén protein foszfatáz 2A (PP2A) gátlásán keresztül okozza a rosszindulatú daganatok kialakulását, ebben a folyamatban a Lyn tirozin kináz fokozza a SET-mediált PP2A gátlást (101). CLL-ben a betegség lefolyását a leukémiás sejtek felszínén expresszálódó adhéziós receptorok mediálják. A fő célunk ebben a munkánkban az volt, hogy felvázoljunk egy mechanizmust, amely meghatározza a felszíni L-szelektin expressziót lymphocytákon CLL-ben. Korábbi tanulmányokhoz hasonlóan (102) ex vivo beteg minták vizsgálata során azt találtuk, hogy a kóros B-sejtek felszínén az L-szelektin expresszió csökkent (103), amihez emelkedett szolubilis L-szelektin szint társult. A felszíni L-szelektin expresszió korrelált a CLL-es beteg állapotával, amit a Rai stádiumba való besorolás mutat. Tehát minél alacsonyabb volt a felszíni L-szelektin expresszió, annál súlyosabb lefolyású Rai csoportba tartozott a beteg. Ez a megfigyelésünk összhangban volt korábbi eredménnyel, ahol az alacsony sejtfelszíni L-szelektin expresszió a kóros CLL-es sejteken negatív prognosztikai értékűnek bizonyult (104). CLL-ben alkalmazott prognosztikai markerek a lymphocyta kettőződési idő, CD38 és ZAP70 expresszió az IGHV státusz és bizonyos citogenetikai eltérések. Shanafelt és csoportja CLL-ben a CD49d adhéziós fehérje expresszióját az általános túlélés (OS) független előrejelzőjének és emellett jobb prognosztikai faktornak találta, mint a ZAP-70, IGHV státusz vagy a citogenetikai eltérések (105). A CD49+ CLL-es sejtek proliferációs képessége magasabb, mint a CD49- sejteké, tehát a CD49 mintázat ismerete javíthatja a prognosztikai jelentőségét ennek a biomarkernek (106). Sopper és munkatársai leukémiás betegek egy

másik csoportjában a T-sejteken csökkent L-szelektin expressziót és emellett emelkedett plazma L-szelektin szintet detektáltak, ez a fenomenom csökkentette a tirozin kináz inhibitor kezelés hatékonyságát CML-ben (107). Tanulmányunkban a sejtfelszíni L-szelektin csökkenése mellett CLL-es B-sejtekben csökkent foszfatáz aktivitást (össz és PP2A), emelkedett foszforilált p38MAPK szintet és a felszíni L-szelektin lehasításáért felelős sejtfelszíni TACE csökkent szintjét detektáltuk (108). In vitro kísérleteinkben a foszfatáz inhibitor CLA a p38MAPK foszforilációját és a sejtfelszíni L-szelektin downregulációját váltotta ki, a p38MAPK inhibitor a CLA kiváltott L-szelektin sheddinget gyengítette.

Összefoglalva, vizsgálatainkkal kimutattuk az L-szelektin expressziójának eltérő mértékű csökkenését a különböző súlyosságú CLL-es betegcsoportokban és felvázoltunk egy lehetséges molekuláris mechanizmust, mely az adhézis fehérje downregulációjához vezethet.

ÖSSZEFOGLALÁS

Patológias folyamatok során kialakuló thrombotikus vagy hemorrhágiás történések mögött fokozott vagy csökkent vérlemezke funkció állhat, melyek kezdeti lépése a ligand-receptor kapcsolat, ami beindít egy szignalizációs folyamatot, melynek eredménye a megváltozott thrombocyta aktiváció. E folyamat során a vérlemezkek különböző receptorokon keresztül kapcsolatba kerülnek egymással és a cirkuláció más sejtjes elemeivel pl. fehérvérsejtekkel. Ezekben a sejtjes kapcsolatokban jelentős szerepe van a sejtfelszíni receptoroknak, melyek mennyisége megváltozhat egy patológias folyamat illetve gyógyszeres kezelés során vérlemezkeken és fehérvérsejteken egyaránt.

Tanulmányainkban különböző lipopoliszacharid (LPS) formák, anti-PF4/heparin autoantitest és tirozin kináz inhibitorok (TKI) hatását vizsgáltuk az immunreceptorokon keresztüli vérlemezke aktivációra és funkcióra, valamint meghatároztuk a fehérvérsejteken expresszálódó adhéziós receptor, L-szelektin mennyiségét és modulációját CLL-ben.

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a különböző LPS formák közül önmagában csak az Re-LPS aktiválta a vérlemezkéket és kostimulációban potenciózta a trombin receptor aktiváló peptid vérlemezke aktiváló hatását. Áramlási citometriai funkcionális tesztünk azt mutatta, hogy a HIT során képződő anti-PF4/heparin autoantitest heparin függő módon fokozza a prokoaguláns vérlemezkek képződését. Kimutattuk, hogy a TKI-k közül a dasatinib gátolja a GPVI receptoron keresztüli vérlemezke aktivációt, míg a nilotinib nem befolyásolja, valamint rávilágítottunk arra, hogy ez a folyamat a Lyn, Fyn és Src kinázok gátlásán keresztül regulálódik. CLL-ben a kóros B-sejteken csökkent L-szelektin expressziót detektáltunk, aminek a mennyisége a betegség súlyosságával tovább csökkent. In vitro kísérleteink eredményeivel rávilágítottunk egy molekuláris mechanizmusra, melyben a csökkent foszfatázaktivitás, emelkedett foszforilált p38MAPK szintet és csökkent L-szelektin expressziót eredményezett.

SUMMARY

Thrombotic or hemorrhagic events that occur during pathological processes may be due to increased or attenuated platelet function. The initial step of these processes is the ligand-receptor relationship, this provokes a signaling process that results in altered platelet activation. During this process, platelets come into contact with each other or further cellular elements in the circulation e.g. white blood cells, via different receptors. Cell surface receptors play an important role in these cellular relationships, the amount of receptors can change during a pathological process or during drug treatment on both platelets and white blood cells.

In our studies, we examined the effect of different forms of LPS, anti-PF4 / heparin autoantibody and tyrosine kinase inhibitors (TKIs) through immune receptors mediated platelet activation and function and we determined the quantity and the modulation of an adhesion receptor, L-selectin on white blood cells in CLL.

In these studies we found that out of the various forms of LPS only Re-LPS activated platelets and it potentiated the platelet activating effect of thrombin receptor activating peptide in the costimulation. Our flow cytometric functional test showed, the anti-PF4/heparin autoantibody that formed during HIT enhances procoagulant platelet formation in a heparin-dependent manner. We verified that among TKIs, dasatinib inhibited platelet activation through the GPVI receptor, while nilotinib had no such effect and we highlighted that the process is regulated by inhibition of Lyn, Fyn, and Src kinases. In CLL we detected decreased L-selectin expression on malignant B cells, this value further decreased with the progression of the disease. We highlighted a molecular mechanism with the results of our in vitro experiments where lower phosphatase activity resulted in elevated pp38MAPK levels and decreased L-selectin expression.

AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ EREDMÉNYEI, MEGÁLLAPÍTÁSAI, KLINIKAI JELENTŐSÉGE

- Az Re-LPS képes aktiválni a vérlemezkéket és potenciózni a PAR-1 agonista vérlemezke aktiváló hatását, ezek a megfigyelések hozzájárulnak a Gram-negatív baktériumok által okozott szepszis során kialakuló hyperkoagulábilis állapot létrejöttéhez.
- Az anti-PF4/heparin autoantitest heparin függő módon fokozták a vérlemezkék prokoaguláns aktivitását az in vitro funkcionális tesztben, mely pozitív, szignifikáns összefüggést mutatott a HIT-es betegek antitesttiterével, mely pozitív, szignifikáns összefüggést mutatott a trombosis kialakulásának megnövekedett valószínűségével. Az áramlási citometriai funkcionális teszt megbízhatóan jelzi a HIT klinikai kimenetelét.
- Terápiás koncentrációjú dasatinib gátolta a GPVI receptoron keresztüli aktivációt, mely a kollagén kiváltotta vérlemezke aggregáció, ATP szekréció és a coated-platelet képződés csökkenésével járt.
- A dasatinib az aggregáló vérlemezkék mellett gátolta a GPVI agonista hatására képződő prokoaguláns vérlemezkéket és az alvadék retrakciót.
- A dasatinib a Lyn, Fyn, Src tirozin kinázok gátlásán keresztül fejt ki hatását a vérlemezke funkcióra.
- A dasatinib vérlemezke diszfunkciót kiváltó hatása szerepet játszhatnak a dasatinibet szedő betegek vérzéses tüneteinek, emellett felvethetik a gyógyszer felfüggesztésének szükségességét invazív beavatkozás esetén.
- A nilotinib nem befolyásolta a vérlemezke funkciókat.
- CLL-ben a malignus B-sejteken az L-szelektin expresszió alacsonyabb, míg a szolubilis L-szelektin szint magasabb a kontrollhoz hasonlítva. CLL-ben a malignus B-sejtek L-szelektin expressziója ill. a szolubilis L-szelektin szintje és a betegség klinikai stádiuma közt korreláció állapítható meg.
- Kóros B-sejtekben kontroll B-sejtekhez képest alacsonyabb össz és PP2A aktivitást és magasabb pp38MAPK szintet detektáltuk, amihez alacsonyabb sejtfelszíni TACE expresszió társult.

- In vitro kísérleteinkben a foszfatáz inhibitorral (CLA) történő előkezelés során a malignus és kontroll B-sejtek p38MAPK szintje nőtt, mely a sejtfelszíni L-szelektin csökkenésével járt. A p38MAPK inhibitor gyengítette a CLA kiváltotta L-szelektin csökkenést kontroll B-sejtek esetén.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Brewer DB. Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *Br J Haematol.* 2006; 133: 251-258.
2. Nurden AT, Caen JP. Specific roles for platelet surface glycoproteins in platelet function. *Nature.* 1975; 255: 720-722.
3. Jenkins CS, Clemetson KJ. Membrane glycoproteins in normal and pathological platelets. *Bibl Haematol.* 1978; 45: 14-21.
4. Jackson SP. Arterial thrombosis-insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med.* 2011; 17: 1423-1436.
5. Michaelson AD. :Platelets (3rd edition). USA, Academic Press, 2012.
6. Weyrich AS, Zimmerman GA, Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol.* 2004; 25: 489-495
7. Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Sem Immunopathol.* 2012; 34: 5-30.
8. Klement GL, Yip TT, Cassiola F, Kikuchi L, Cervi D, Podust V, Italiano JE, Wheatley E, Abou-Slaybi A, Bender E, Almog N, Kieran MW, Folkman J. Platelets actively sequester angiogenesis regulators. *Blood.* 2009; 113: 2835-2842.
9. Yeaman MR. The role of platelets in antimicrobial host defense. *Clin Infect Dis.* 1997; 25: 951-968.
10. Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11: 123-134.
11. Li JJJ, Zarbock A, Hidalgo A. Platelets as autonomous drones for hemostatic and immune surveillance. *J Exp Med.* 2017; 214: 2193-2204.
12. Senis YA, Mazharian A, Mori J. Src family kinases: At the forefront of platelet activation. *Blood.* 2014;124:2013-2024.
13. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: Physiology and biochemistry. *Sem Thromb Hem.* 2005; 31: 381-392.
14. Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KV, Patel KD, Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood.* 2005; 106, 2417-2423.
15. Prasad KSS, Andre P, He M, Bao M, Manganello J, Phillips DR. Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100, 12367-12371.
16. Andre P, Prasad KS, Denis CV, et al. CD40L stabilizes arterial thrombi by β 3 integrin-dependent mechanism. *Nat Med.* 2002; 8: 247-252.

17. Yun SH, Sim EH, Goh RJ, Park JI and Han JY. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *BioMed Res Int*. 2016; 2016: 9060143.
18. Clemetson KJ. Platelets and primary hemostasis. *Thromb Res*. 2012;129, 220-224.
19. Duerschmied D, Bode C, Ahrens I. Immune functions of platelets. *Thromb Haemost*. 2014; 112: 678-691.
20. Day HJ, Rao AK. Evaluation of platelet function. *Semin Hematol*.1986; 23: 89-101.
21. Monté D, Groux H, Raharinivo B, Plouvier B, Dewulf J, Clavel T, Grangette C, Torpier G, Auriault C, Capron A. Productive human immunodeficiency virus-1 infection of megakaryocytic cells is enhanced by tumor necrosis factor-alpha. *Blood*. 1992; 79: 2670-2679.
22. Spika JS, Peterson PK, Wilkinson BJ, Hammerschmidt DE, Verbrugh HA, Verhoef J, Quie PG. Role of peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* in leukopenia thrombocytopenia and complement activation associated with bacteremia. *J Infect Dis*. 1982; 146:227-234.
23. de Stoppelaar SF, van't Veer C, van der Poll T. The roll of platelets in sepsis. *Thromb Haemost*. 2014; 112: 666-677.
24. Cox D, Kerrigan SW, Watson SP. Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *J Thromb Haemost*. 2011; 9: 1097-1107.
25. Esmon CT, Molecular circuits in thrombosis and inflammation. *Thromb Haemost*. 2013; 109: 416-420.
26. Pfeiler S, Stark K, Massberg S, Engelmann B. Propagation of thrombosis by neutrophils and extracellular nucleosome networks. *Haematologica*. 2017; 102: 206-213.
27. Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol*. 2006; 4: 445-457.
28. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107: 15880-15885.
29. Colman RW. Receptors that activate platelets. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1991; 197: 242-248.
30. Zhang G, Han J, Welch Ej, Ye RD, Vozno-Yasenetskaya TA, Malik AB, Du X, Li Z. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol*. 2009; 182: 7997-8004.
31. Ward JR, Bingle L, Judge HM, Brown SB, Storey RF, Whyte MK, Dower SK, Buttle Dj, Sabroe I. Agonists of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are unable to modulate platelet activation by adenosine diphosphate and platelet activating factor. *Thromb Haemost*. 2005; 94: 931-838.

32. Huber M, Kalis C, Keck S, Jiang Z, George P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S, Beutler B, Galanos C, Freudenberg MA. R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2- positive cells. *Eur J Immunol.* 2006; 36: 701-711.
33. Warkentin TE. Heparin induced thrombocytopenia: IgG-mediated platelet activation, platelet microparticle generation and altered procoagulant/anticoagulant balance in the pathogenesis of thrombosis and venous limb gangrene complicating heparin-induced thrombocytopenia. *Transfus Med Rev.* 1996; 10: 249-258.
34. Greinacher A, Juhl D, Strobel U, Wessel A, Lubenow N, Selleng K, Eichler P, Warkentin TE. Heparin induced thrombocytopenia: A prospective study on the incidence, platelet-activating capacity and clinical significance of antiplatelet factor 4/heparin antibodies of the IgG, IgM and IgA classes. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 1666-1673.
35. Warkentin TE, Sheppard JI. Generation of platelet-derived microparticles and procoagulant activity by heparin-induced thrombocytopenia IgG/serum and other IgG platelet agonists: a comparison with standard platelet agonists. *Platelets.* 1999; 10(5): 319-326.
36. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost.* 2002; 88: 186-193.
37. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 1381-1389.
38. Heemskerk JW, Mattheij NJ, Cossemans ME. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost.* 2013; 11: 2-16.
39. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Platelet procoagulant activity, physiological significance and mechanisms of exposure. *Blood Rev.* 1991; 5: 146-154.
40. Nechipurenko DY, Receveur N, Yakimenko AO, Shepelyuk TO, Yakusheva AA, Kerimov RR, Obydenyy SI, Eckly A, Léon C, Gachet C, Grishchuk EL, Ataulakhanov FI, Mangin PH, Panteleev MA. Clot contraction drives the translocation of procoagulant platelets to thrombus surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019; 39: 37-47.
41. Dale GL. Coated-platelets: an emergent component of the procoagulant response. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 2185-2192.
42. Agbani EO, Poole AW. Procoagulant platelets: generation, function and therapeutic targeting in thrombosis. *Blood.* 2017; 130: 2171-2179.
43. Hantgan RR, Mousa SA. Inhibition of platelet-mediated clot retraction by integrin antagonists. *Thromb Res.* 1998; 89 : 271-279.
44. McEver RP. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol.* 2002; 14: 581-586.
45. Michaelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Conolly RJ, Losalzo J, Valeri CR. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets

- rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:11877-11882.
46. Brambilla M, Camera M, Coinago D, Marenzi G, De Metrio M, Giesen PL, Balduini A, Veglia F, Gertow K, Bigliolo P, Tremoli E. Tissue factor in patients with acute coronary syndromes: expression in platelets, leukocytes, and platelet-leukocytes aggregates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28: 947-953.
 47. McDonald B, Davis RP, Kim SJ, Tse M, Esmon CT, Kolacykowska E, Jenne CN, Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood*. 2017; 129: 1357-1367.
 48. Becs G, Hudák R, Fejes Zs, Beke Debreceni I, Bhattoa HP, Balla J, Kappelmayer J. Haemodiafiltration elicits less platelet activation compared to haemodialysis. *BMC Nephrology*. 2016; 17:147.
 49. Smyth SS, Reis ED, Zhang W, Fallon JT, Gordon RE, Collier BS. Beta (3)-integrin deficient mice but not P-selectin deficient mice develop intimal hyperplasia after vascular injury: correlation with leukocyte recruitment to adherent platelets 1 hour after injury. *Circulation*. 2001; 103: 2501-2507.
 50. Fernandes LS, Conde ID, Wayne Smith C, Kansas GS, Snapp KR, Bennet N, Ballantyne C, McIntire LV, O'Brian Smith E, Klem JA, Mathew S, Frangogiannis N, Turner NA, Maresh KJ, Kleiman NS. Platelet- monocyte complex formation: effect of blocking PSGL-1 alone, and in combination with alphaIIb beta3 and alphaM beta2, in coronary stenting. *Thromb Res*. 2003; 111: 171-177.
 51. Kaushansky K, Levi MM.: Williams Hematology Hemostasis and thrombosis. USA, McGraw-Hill Education, 2018.
 52. Wayne Smith C. Adhesion molecules and receptors. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121: S375-S379.
 53. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* 2014; 41:694-707.
 54. Lefort CT, Ley K. Neutrophil arrest by LFA-1 activation. *Front Immunol*. 2012; 3: 157. doi: 10.3389/fimmu.2012.00157.
 55. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol*. 2003; 24: 327-334.
 56. Mitroulis I, Alexaki VI, Kourtzelis I, Ziogas A, Hajishengallis G, Chavakis T. Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacol Ther*. 2015; 147: 123-135.
 57. Yonekawa K, Harlan JM. Targeting leukocyte integrins in human diseases. *J Leukoc Biol*. 2005; 77: 129-140.
 58. Gauvreau GM, Becker AB, Boulet LP, Chakir J, Fick RB, Greene WL, Killian KJ, O'byrne PM, Reid JK, Cockcroft DW. The effects of an anti-CD11a mAb, efalizumab, on allergen-induced airway responses and airway inflammation in subjects with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 112: 331-338.

59. Lebedeva T, Dustin ML, Sykulev Y. ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation. *Curr Opin Immunol*. 2005; 17: 251-258.
60. Salmi M, Jalkanen S. Regulation of L-selectin expression on cultured bone marrow leukocytes and their precursors. *Eur J Immunol*. 1992; 22: 835-843.
61. McEver RP. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res*. 2015; 107: 331-339.
62. Stadtmann A, Germena G, Block H, Boras M, Rossaint J, Sundd P, Lefort C, Fisher CI, Buscher K, Gelschefarth B, Urzainqui A, Gerke V, Ley K, Zarbock A. The PSGL-1-L-selectin signaling complex regulates neutrophil adhesion under flow. *J Exp Med*. 2013; 210: 2171-2180.
63. Ivetic A, Hoskins Green HL, Hart SJ. L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling. *Front Immunol*. 2019; 10: 1068.doi: 10.3389/fimmu.2019.01068.
64. Bendas G, Borsig L. Cancer cell adhesion and metastasis: Selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *Int. J. Cell Biol*. 2012; 2012: 676731 doi: 10.1155/2012/676731.
65. Lúcio PJ, Faria MT, Pinto AM, da Silva MR, Correia Júnior ME, da Costa RJ, Parreira AB. Expression of adhesion molecules in chronic B-cell lymphoproliferative disorders. *Haematologica*. 1998; 83: 104-111.
66. Gu B, Dao LP, Wiley J. Impaired Transendothelial migration of B-CLL lymphocytes: A defect linked to low L-selectin expression. *Leuk Lymphoma*. 2001; 42: 5-12.
67. Reményi Gy, Szász R, Beke Debreceni I, Szarvas M, Batár P, Nagy BJr, Kappelmayer J and Udvardy M. Comparison of coated-platelet levels in patients with essential thrombocythemia with and without hydroxyurea treatment. *Platelets*. 2013; 24: 486-492.
68. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995; 184: 39-51.
69. Dedinszki D, Kiss A, Markasz L, Marton A, Toth E, Szekely I, Erdodi F. Inhibition of protei phosphatase-1 and -2A decreases the chemosensitivity of leukemic cells to chemotherapeutic drugs. *Cell Signal*. 2015; 27: 363-372.
70. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem*. 2000; 69: 419-445.
71. Nagy B Jr, Beke Debreceni I, kappelmayer J. Flow cytometric investigation of classical and alternative platelet activation markers. *EJIFCC*. 2013; 23: 124-134.
72. Nofer JR, Brodde MF, Kehrel BE. High-density lipoproteins, platelets and the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacolo Physiol*. 2010; 37: 726-735.

73. Projahn D, Koenen RR. Platelets: key players in vascular inflammation. *J Leukoc Biol.* 2012; 92: 1167-1175.
74. Katz JN, Kolappa KP, Becker RC. Beyond Thrombosis: the versatile platelet in critical illness. *Chest.* 2011; 139: 658-668.
75. Ma AC, Kubes P. Platelets, neutrophils and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *J Thromb Haemost.* 2008; 6: 415-420.
76. Kehrel BE, Brodde MF. State of the art in platelet function testing. *Transfus Med Hemother.* 2013; 40: 73-86.
77. Kappelmayer J, Beke Debreceni I, Vida A, Antal-Szalmás P, Clemetson KJ, Nagy B Jr. Distinct effects of Re- and S-forms of LPS on modulating platelet activation. *J Thromb Haemost.* 2013; 11: 1-4.
78. Claushuis TAM, Van Der Veen AIP, Horn J, Schultz MJ, Houtcooper RH, Van T Veer C, Van Der Poll T. Platelet Toll-like receptor expression and activation induced by lipopolysaccharide and sepsis. *Platelets.* 2019; 30: 296-304.
79. Hally KE, La Flamme AC, Larsen PD, Harding SA. Platelet Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated platelet activation in acute myocardial infarction. *Thromb Res.* 2017; 158: 8-15.
80. Vallance TM, Ravishankar D, Albadawi DAI, Layfield H, Sheard J, Vaiyapuri R, Dash P, Patel K, Widera D, Vaiyapuri S. Effect of ultrapure lipopolysaccharides derived from diverse bacterial species on the modulation of platelet activation. *Sci Rep.* 2019; 9: 18258. doi: 10.1038/s41598-019-54617-w
81. Berthet J, Damien P, Hamzeh- Cognasse H, Arthaud CA, Eyraud MA, Zeni F, Pozzetto B, McNicol A, Garraud O, Cognasse F. Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. *Clin Immunol.* 2012; 145: 189-200.
82. Warkentin TE, Sheppard JI, Moore JC, Sigouin CS, Kelton G. Quantitative interpretation of optical density measurements using PF4-dependent enzyme-immunoassays. *J Thromb Haemost.* 2008; 6: 1304-1312.
83. Kerényi A, Beke Debreceni I, Oláh Zs, Ilonczai P, Bereczky Zs, Nagy B Jr, Muszbek L, Kappelmayer J. Evaluation of flow cytometric HIT assay in relation to an IgG-specific immunoassay and clinical outcome. *Cytometry B Clin Cytom.* 2017; 92: 389-397.
84. Lo GK, Sigouin CS, Warkentin TE. What is the potential for overdiagnosis of heparin-induced thrombocytopenia? *Am J Hematol.* 2007; 82: 1037-1043.
85. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Ravandi F, O'Brien S, Thomas D, Vidal-Senmache G, Wierda W, Kornblau S, Cortes J. Bleeding diathesis in patients with chronic myelogenous leukemia receiving dasatinib therapy. *Cancer.* 2009; 115: 2482-2490.
86. Yim E, Choi YG, Nam YJ, Lee J, Kim JA. Dasatinib induces severe hemorrhagic colitis in a patient with accelerated phase of chronic myelogenous leukemia. *Korean J Intern Med.* 2017; 69: 308-311.

87. Alhawiti N, Burbury KL, Kwa FA, O'Malley CJ, Shuttleworth P, Alzard M, Hamadi A, Grigg AP, Jackson DE. The tyrosine kinase inhibitor, nilotinib potentiates a prothrombotic state. *Thromb Res.* 2016; 145: 54-64.
88. Quintas-Cardama A, Han X, Kantarjian H, Cortes J. Tyrosine kinase inhibitor-induced platelet dysfunction in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 2009; 114: 261-263.
89. Levade M, Severin S, Gratacap MP, Ysebaert L, Payrastre B. Targeting kinases in cancer therapies: adverse effects on blood platelets. *Curr Pharm Des.* 2016; 22: 2315-2322.
90. Mezei G, Beke Debreceni I, Kerényi A, Remenyi Gy, Szasz R, Illes A, Kappelmayer J, Batar P. Dasatinib inhibits coated-platelet generation in patients with chronic myeloid leukemia. *Platelets.* 2019; 30: 836-843.
91. Miura M. Therapeutic drug monitoring of imatinib, nilotinib and dasatinib for patients with chronic myeloid leukemia. *Biol Pharm Bull.* 2015; 38: 645-654.
92. Beke Debreceni I, Mezei G, Batár P, Illés Á, Kappelmayer J. Dasatinib Inhibits Procoagulant and Clot Retracting Activities of Human Platelets. *Int J Mol Sci.* 2019; 20:5430. doi: 10.3390/ijms20215430.
93. Deb S, Boknäs N, Sjöström C, Tharmakulanathan A, Lotfi K, Ramström S. Varying effects of tyrosine kinase inhibitors on platelet function-A need for individualized CML treatment to minimize the risk for hemostatic and thrombotic complications? *Cancer Med.* 2020; 9: 313-323.
94. Kitagawa D, Yokota K, Gouda M, Narumi Y, Ohmoto H, Nishiwaki E, Akita K, Kirii Y. Activity-based kinase profiling of approved tyrosine kinase inhibitors. *Genes Cells.* 2013; 18: 110-122.
95. Schmaier AA, Zou Z, Kazlauskas A, Emert-Sedlak L, Fong KP, Neeves KB, Maloney SF, Diamond SL, Kunapuli SP, Ware J, Brass LF, Smithgall TE, Saksela K, Kahn ML. Molecular priming of Lyn by GPVI enables an immune receptor to adopt a hemostatic role. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 21167-21172.
96. Mattheij NJ, Gilio K, van Kruchten R, Jobe SM, Wieschhaus AJ, Chishti AH, Collins P, Heemskerk JW, Cosemans JM. Dual mechanism of integrin α IIb β 3 closure in procoagulant platelets. *J Biol Chem.* 2013; 288: 13325-13336.
97. Sener Y, Okay M, Aydin S, Buyukasik Y, Akbiyik F, Dikmen ZG. TKI-Related Platelet Dysfunction Does Not Correlate With Bleeding in Patients With Chronic Phase-Chronic Myeloid Leukemia With Complete Hematological Response. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2019; 25: 1-6.
98. Kreutzman A, Colom-Fernández B, Jiménez AM, Ilander M, Cuesta-Mateos C, Pérez-García Y, Arévalo CD, Brück O, Hakanen H, Saarela J, Ortega-Carrión A, de Rosendo A, Juanes-García A, Steegmann JL, Mustjoki S, Vicente-Manzanares M, Muñoz-Calleja C. Dasatinib Reversibly Disrupts Endothelial Vascular Integrity by Increasing Non-Muscle Myosin II Contractility in a ROCK-Dependent Manner. *Clin Cancer Res.* 2017; 23:6697-6707.

99. Chan WY, Lau PM, Yeung KW, Kong SK. The second generation tyrosine kinase inhibitor dasatinib induced eryptosis in human erythrocytes-An in vitro study. *Toxicol Lett.* 2018; 295:10-21.
100. Christensen DJ, Chen Y, Oddo J, Matta KM, Neil J, Davis ED, Volkheimer AD, Lanasa MC, Friedman DR, Goodman BK, Gockerman JP, Diehl LF, de Castro CM, Moore JO, Vitek MP, Weinberg JB. SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood.* 2011; 118: 4150-4158.
101. Chen W, Possemato R, Campbell KT, Plattner CA, Pallas DC, Hahn WC. Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. *Cancer Cell.* 2004; 5:127-36.
102. Chen JR, Gu BJ, Dao LP, Bradley CJ, Mulligan SP, Wiley JS. Transendothelial migration of lymphocytes in chronic lymphocytic leukaemia is impaired and involved down-regulation of both L-selectin and CD23. *Br J Haematol.* 1999; 105: 181-189.
103. Beke Debreceni I, Szász R, Kónya Z, Erdódi F, Kiss F, Kappelmayer J. L-Selectin expression is influenced by phosphatase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2019; 96: 149-157.
104. Zucchetto A, Bomben R, Dal Bo M, Sonogo P, Nanni P, Rupolo M, Bulian P, Dal Maso L, Del Poeta G, Del Principe MI, Degan M, Gattei V. A scoring system based on the expression of six surface molecules allows the identification of three prognostic risk groups in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J Cell Physiol.* 2006; 207: 354-63.
105. Shanafelt TD, Geyer SM, Bone ND, Tschumper RC, Witzig TE, Nowakowski GS, Zent CS, Call TG, Laplant B, Dewald GW, Jelinek DF, Kay NE. CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *Br J Haematol.* 2008; 140: 537-46.
106. Tissino E, Pozzo F, Benedetti D, Caldana C, Bittolo T, Rossi FM, Bomben R, Nanni P, Chivilò H, Cattarossi I, Zaina E, Norris K, Polesel J, Gentile M, Tripepi G, Moia R, Santinelli E, Innocenti I, Olivieri J, D'Arena G, Laurenti L, Zaja F, Pozzato G, Chiarenza A, Di Raimondo F, Rossi D, Pepper C, Hartmann TN, Gaidano G, Del Poeta G, Gattei V, Zucchetto A. CD49d promotes disease progression in chronic lymphocytic leukemia: new insights from CD49d bimodal expression. *Blood.* 2020; 135 :1244-1254.
107. Sopper S, Mustjoki S, White D, Hughes T, Valent P, Burchert A, Gjertsen BT, Gastl G, Baldauf M, Trajanoski Z, Giles F, Hochhaus A, Ernst T, Schenk T, Janssen JJ, Ossenkoppele GJ, Porkka K, Wolf D. Reduced CD62L Expression on T Cells and Increased Soluble CD62L Levels Predict Molecular Response to Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Early Chronic-Phase Chronic Myelogenous Leukemia. *J Clin Oncol.* 2017; 35: 175-184.

108. Killock DJ, Ivetić A. The cytoplasmic domains of TNFalpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) and L-selectin are regulated differently by p38 MAPK and PKC to promote ectodomain shedding. *Biochem J.* 2010; 428: 293-304.

PUBLIKÁCIÓS LISTA



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/154/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bekéné Debreceni Ildikó
Neptun kód: ASB88C
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Mezei, G., **Bekéné Debreceni, I.**, Kerényi, A., Reményi, G., Szász, R., Illés, Á., Kappelmayer, J., Batár, P.: Dasatinib inhibits coated-platelet generation in patients with chronic myeloid leukemia.
Platelets. 30 (7), 836-843, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/09537104.2018.1501470>
IF: 3.106 (2018)
2. **Bekéné Debreceni, I.**, Mezei, G., Batár, P., Illés, Á., Kappelmayer, J.: Dasatinib Inhibits Procoagulant and Clot Retracting Activities of Human Platelets.
Int. J. Mol. Sci. 20 (21), 1-14, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20215430>
IF: 4.183 (2018)
3. **Bekéné Debreceni, I.**, Szász, R., Kónya, Z., Erdődi, F., Kiss, F., Kappelmayer, J.: L-Selectin Expression Is Influenced by Phosphatase Activity in Chronic Lymphocytic Leukemia.
Cytom. Part B-Clin. Cytom. 96 (2), 149-157, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.21771>
IF: 2.938 (2018)
4. Kerényi, A., **Bekéné Debreceni, I.**, Oláh, Z., Ilonczai, P., Bereczky, Z., Nagy, B. J., Muszbek, L., Kappelmayer, J.: Evaluation of flow cytometric HIT assays in relation to an IgG-specific immunoassay and clinical outcome.
Cytom. Part B-Clin. Cytom. 92 (5), 389-397, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.21362>
IF: 2.757
5. Kappelmayer, J., **Bekéné Debreceni, I.**, Vida, A., Antal-Szalmás, P., Clemetson, K. J., Nagy, B. J.: Distinct effects of Re- and S-forms of LPS on modulating platelet activation.
J. Thromb. Haemost. 11 (4), 775-778, 2013.
IF: 5.55





További közlemények

6. Orosz, Z. Z., Bárdos, H., Shemirani, A. H., **Bekéné Debreceni, I.**, Lassila, R., Riikonen, A. S., Kremer Hovinga, J. A., Seiler, T. G., van Dorland, H. A., Schroeder, V., Boda, Z., Nemes, L., Fröh Eppstein, B., Nagy, B., Facskó, A., Kappelmayer, J., Muszbek, L.: Cellular Factor XIII, a Transglutaminase in Human Corneal Keratocytes.
Int. J. Mol. Sci. 20 (23), 5963, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20235963>
IF: 4.183 (2018)
7. Gyöngyösi, A., Szóke, K., Fenyvesi, F., Fejes, Z., **Bekéné Debreceni, I.**, Nagy, B. J., Tósaki, Á., Lekli, I.: Inhibited autophagy may contribute to heme toxicity in cardiomyoblast cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 511 (4), 732-738, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.140>
IF: 2.705 (2018)
8. Tóth, J., **Bekéné Debreceni, I.**, Deák, Á., Pető, K., Berhész, M., Hajdu, E., Szabó, J., Németh, N., Fülesdi, B., Kappelmayer, J.: Characteristics of thrombin generation in a fulminant in a fulminant porcine sepsis model.
Thromb. Res. 158, 25-34, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2017.07.030>
IF: 2.779
9. Fejes, Z., Pólska, S., Czimmerer, Z., Káplár, M., Penyige, A., Gál Szabó, G., **Bekéné Debreceni, I.**, Kunapuli, S. P., Kappelmayer, J., Nagy, B. J.: Hyperglycemia suppresses microRNA expression in platelets to increase P2RY12 and SELP levels in type 2 diabetes mellitus.
Thromb. Haemost. 117 (3), 529-542, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1160/TH16-04-0322>
IF: 4.952
10. Hudák, R., **Bekéné Debreceni, I.**, Deák, I., Gál Szabó, G., Hevessy, Z., Antal-Szalmás, P., Osterud, B., Kappelmayer, J.: Laboratory characterization of leukemic cell procoagulants.
Clin. Chem. Lab. Med. 55 (8), 1215-1223, 2017.
IF: 3.556
11. Tóth, J., **Bekéné Debreceni, I.**, Berhész, M., Hajdu, E., Deák, Á., Pető, K., Szabó, J., Németh, N., Fülesdi, B., Kappelmayer, J.: Red blood cell and platelet parameters are sepsis predictors in an Escherichia coli induced lethal porcine model.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 66 (3), 249-259, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-170271>
IF: 1.914





12. Hudák, R., Vincze, J., Csernoch, L., **Bekéné Debreceni, I.**, Oláh, T., Erdődi, F., Clemetson, K. J., Kappelmayer, J.: The phosphatase inhibitor calyculin-A impairs clot retraction, platelet activation and thrombin generation. *Biomed Res. Int.* 2017, 1-10, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/9795271>
IF: 2.583
13. Becs, G., Hudák, R., Fejes, Z., **Bekéné Debreceni, I.**, Bhattoa, H. P., Balla, J., Kappelmayer, J.: Haemodiafiltration elicits less platelet activation compared to haemodialysis. *BMC Nephrol.* 17 (1), 147, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12882-016-0364-x>
IF: 2.289
14. Szűk, T., Fejes, Z., **Bekéné Debreceni, I.**, Kerényi, A., Édes, I. F., Kappelmayer, J., Nagy, B. J.: Integrity bare-metal coronary stent-induced platelet and endothelial cell activation results in a higher risk of restenosis compared to Xience everolimus-eluting stents in stable angina patients. *Platelets.* 27 (5), 410-419, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/09537104.2015.1112368>
IF: 2.465
15. Reményi, G., Szász, R., **Bekéné Debreceni, I.**, Szarvas, M., Batár, P., Nagy, B. J., Kappelmayer, J., Udvardy, M.: Comparison of coated-platelet levels in patients with essential thrombocythemia with and without hydroxyurea treatment. *Platelets.* 24 (6), 486-492, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/09537104.2012.731112>
IF: 2.627
16. Nagy, B. J., **Bekéné Debreceni, I.**, Kappelmayer, J.: Flow cytometric investigation of classical and alternative platelet activation markers. *EJIFCC.* 23 (4), 124-134, 2013.
17. Antal-Szalmás, P., Nagy, B. J., **Bekéné Debreceni, I.**, Kappelmayer, J.: Measurement of soluble biomarkers by flow cytometry. *EJIFCC.* 23 (4), [1-8], 2013.
18. Miszti-Blasius, K., **Bekéné Debreceni, I.**, Felszeghy, S. B., Dezső, B., Kappelmayer, J.: Lack of P-selectin glycoprotein ligand-1 protects mice from thrombosis after collagen/epinephrine challenge. *Thromb. Res.* 127 (3), 228-234, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2010.11.022>
IF: 2.44





19. Nagy, B. J., Szűk, T., **Bekéné Debreceni, I.**, Kappelmayer, J.: Platelet-derived microparticle levels are significantly elevated in patients treated by elective stenting compared to subjects with diagnostic catheterization alone.
Platelets. 21 (2), 147-151, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/09537100903477582>
IF: 2.117
20. Simon, Z., Kiss, A., Erdődi, F., Setiadi, H., **Bekéné Debreceni, I.**, Nagy, B. J., Kappelmayer, J.: Protein phosphatase inhibitor calyculin-A modulates activation markers in TRAP-stimulated human platelets.
Platelets. 21 (7), 555-562, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/09537104.2010.499156>
IF: 2.117
21. Ivády, G., **Bekéné Debreceni, I.**, Kissné, S. V., Hevessy, Z., Kappelmayer, J.: A timidin kináz aktivitás összehasonlító elemzése egyéb prognosztikai markerekkel krónikus lymphocytás leukémiában.
Klin. Kísér. Lab. Med. 33 (2), 7-11, 2008.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 55,261

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az érkekezés alapjául szolgáló közleményekre):
18,534

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.05.28.



TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS

inflammatorikus- és immunmediátorok

inflammatory and immune mediators

vérlemezke és fehérvérsejt receptorok

receptors of platelet and leukocytes

thrombocyta aktiváció

platelet activation

aggregáló- és prokoaguláns thrombocyták

aggregating and procoagulant platelets

tirozin kináz gátlók

tyrosine kinase inhibitors

thrombocyta működési zavar

platelet dysfunction

L-szelektin shedding

L-selectin shedding

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Kappelmayer János professzor úrnak a folyamatos ösztönzésért és támogatásért, aki szakmai céljaim elérésében egy évtizeden keresztül mellettem állt. Emellett szeretném neki megköszönni, hogy a közös kutatásaink során megtanított az eredményes kutató munkához nélkülözhetetlen gondolkodásmódra.

Köszönet illeti Dr. Mezei Gabriellát, Dr. Batár Pétert, Dr. Szász Róbertet, Dr Erdődi Ferenc professzor urat és Dr. Kónya Zoltánt a gyümölcsöző közös munkáért.

Hálásan köszönöm Dr. Kerényi Adriennek és Dr. Nagy Bélának, hogy szakértelmükkel, tanácsaikkal segítették a közös munkánkat.

Köszönöm a Laboratóriumi Medicina Intézet minden munkatársának a segítségét. Szeretném külön megköszönni a Hemosztázis és a Hematológia Részlegen dolgozó kolléganők áldozatos munkáját.

Köszönettel tartozom Dr. Hársfalvi Jolán tanárnőnek, aki pályám elején a kutatás világába bevezetett.

Köszönöm Antal Csabának a közlemények ábráinak elkészítésében nyújtott segítséget.

Végezetül nagyon köszönöm családomnak, férjemnek és gyermekeimnek, hogy szeretetükkel és biztatásukkal mindvégig támogattak. Az ő támogatásuk és türelmük nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg.

FÜGGELÉK

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények.