

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

A VÉRLEMEZKÉK AKTIVÁCIÓS MARKEREINEK
VIZSGÁLATA „IN VITRO” KÍSÉRLETEKBEN ÉS
PROTROMBOTIKUS ÁLLAPOTOKBAN

Dr. Nagy Béla



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola
Trombózis, Hemosztázis és Vaszkuláris Biológia Program

Debrecen, 2009

Az értekezés címe:

A vérlemezkék aktivációs markereinek vizsgálata in vitro kísérletekben és protrombotikus állapotokban

Doktori Iskola:

Laki Kálmán Doktori Iskola, Trombózis, Hemosztázis és Vaszkuláris Biológia Program

Témavezető:

Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

Elnöke: Prof. Dr. Balla József, az MTA doktora

Tagok: Dr. Bodó Imre, Ph.D.
Dr. Soltész Pál, Ph.D.

A bíráló bizottság:

Elnöke: Prof. Dr. Balla József, az MTA doktora

Opponensek: Dr. Kiss Róbert Gábor, Ph.D.
Dr. Pfliegler György, Ph.D.

Tagok: Dr. Bodó Imre, Ph.D.
Dr. Soltész Pál, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja és helye:

2010. március 1. 14:00 óra, az I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

BEVEZETÉS

A vérlemezék aktiválódási folyamata és annak jelentősége

A vérlemezék 2-5 μm átmérőjű olyan sejttag nélküli véralkotó elemek, amelyek a csontvelőben található megakaryocyták citoplazmájából képződnek, és az érrendszer épségének fenntartásában játszanak kiemelkedő szerepet. Vannak olyan betegségek, mint a koronária betegségek, ischaemiás stroke, vagy 2-es típusú cukorbetegség, amelyekben az érlemezés és atherotrombózis kialakulásának igen nagy a kockázata. Ezek kórtörténetében a vérlemezék fokozott működése különféle protrombotikus állapotok kialakulásához vezethet, ami akár szöveti károsodással is együttjárhat a keringési elégtelenség miatt. A vérlemezék mind az artériás, mind a vénás trombózis kialakulásában fontos szerepet játszanak, de különösképpen az artériás típusúban. Aktiválódásuk fő kiváltó tényezője az ér endothelsejtjeinek károsodása miatt bekövetkező extracelluláris mátrix fehérjék expozíciója. Az endothelsejt-réteg alatti kollagén és von Willebrand faktor (vWF) szabaddá válik, és aktiválja a thrombocytákat különböző receptorain keresztül. Emellett az érfal-plakk ruptúra során kiszabaduló szöveti faktor is okozhat további vérlemezke aktiválódást, ami az érlemezés egyik veszélyes következménye. Az aktiválódási folyamat három, egymást részben átfedő fázisból áll. A kezdeti, ún. iniciációs fázisban a felszabadult kollagén és vWF megkötésén keresztül a thrombocyták egy rétegben kitapadnak az érfal-sérülés helyén. A különböző integrin receptorok fontos tényezői ezen folyamatoknak. Az $\alpha_2\beta_1$ integrin és a glikoprotein (GP) VI receptorok közvetlenül, míg a GPIIb és a GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) receptorok a vWF

rögzítésén keresztül kötődnek a kollagénhez. Ezek a folyamatok a vérlemezkéken belüli szignalizációs útvonalak beindulását, többek között az intracelluláris kalcium szintjének megemelkedését okozzák. A thrombocyták felszínén thrombin képződik a nagy mennyiségben expresszáldott foszfatidil-szerin jelenlétében. Mindez a koagulációs folyamatok beindulását, lezajlását segítik elő. A második, extenziós fázisban további thrombocyták aktiválódnak, majd kapcsolódnak össze egymással, amelynek során többek között adenozin-difoszfátot (ADP) szekretálnak a denz-granulumokból, valamint P-szelektint az α -granulumokból. A P-szelektin receptorok gyorsan expresszáldnak a sejtfelszínen, hogy többféle sejt-sejt interakció kialakításában vegyenek részt a vérlemezkék, a fehérvérsejtek és az endothelsejtek között. A szekretált ADP, valamint a képződött thromboxán A_2 és thrombin további vérlemezkéket aktivál, aminek eredményeképpen fokozott szekréció, illetve a GPIIb/IIIa fibrinogén receptor aktivációja következik be. Mindez teljes thrombocyta aggregációhoz, és végül a stabil vérrög kialakulásához vezet. A vérlemezkék felszínéről lefűződő 1 μ m-nél kisebb „sejtdarabkák”, a foszfatidil-szerin pozitív mikropartikulák fokozzák az alvadási folyamatot. A végső, ún. stabilizációs fázisban a vérlemezkék megerősítik a vérrögöt annak idő előtti szétesése érdekében úgy, hogy további adhézisos fehérjéket kibocsátva szoros kontaktusba kerülnek egymással. Végül az egész thrombus retrahálódik, ami elzárja az érfal-sérülés helyét.

Ezen ismeretek alapján, az aktiválódott thrombocyták kulcsszerepet töltenek be számos érrendszeri megbetegedésben (pl. myocardialis infarctus, angina, perifériás érbetegség, stb.) fellépő trombotikus folyamatok kialakulásában. Ugyanakkor más betegségekben,

mint a metabolikus szindrómában (obezitás vagy cukorbetegség), illetve invazív vaszkuláris terápia (pl. kardiológiai) beavatkozás során - így sztentbeültetéskor - aktiválódott vérlemezkék szintén kimutathatók a keringésből, amelyek további trombotikus és gyulladásos komplikációt okozhatnak. A thrombocyta részben a metabolikus eltérések (hiperglikémia, hiperkoleszterinémia) direkt hatása, részben pedig a leukocytákból és endothélsejtekből felszabaduló citokinek és adhéziós molekulák közvetett hatása miatt aktiválódnak. Az aktiválódott thrombocyta több biomarkert (pl. P-szelektin, CD40L, IL-1 β) szekretálva vagy expresszálva, valamint plazma fibrinogént megkötve és mikropartikulát képezve jelentősen befolyásolja az atherosclerotikus folyamatok prognózisát és az ezzel párhuzamosan kialakuló protrombotikus állapotok esetleges bekövetkezését.

Mindebből következően a vérlemezkék aktivációs markereinek gyors és hatékony vizsgálata - különböző módszerek alkalmazásával - kiemelkedő fontosságú a fokozott thrombocyta aktiváció rövid- és hosszútávú következményeinek kimutatásában és előrejelzésében. Ugyanakkor ezek a vizsgálatok - mint egyfajta szűrőteszt - a thrombocyta funkciót befolyásoló gyógyszerek monitorizálására is alkalmasak lehetnek.

A P-szelektin receptor szerepe

Már több mint két évtizede az áramlási citometriával jól vizsgálható P-szelektin receptor thrombocytafelszíni expresszióját az egyik legérzékenyebb, "gold standard" aktivációs markernek tekintjük. A receptor a szelektin receptorcsalád egyik 140 kDa-os glikoprotein tagja,

amely a legfontosabb társreceptorával, a PSGL-1 receptorral összekapcsolódva elősegíti a különböző sejtek közötti interakciók kialakulását. Az így képződött heterotipikus aggregátumok analízise szintén áramlási citométeren történik, amivel az egyes leukocyta típusok sejtfelszíni vizsgálatakor thrombocyta-specifikus markereket (pl. CD42a [GPIX]) detektálunk, ezáltal lemérve a különböző leukocyta-thrombocyta komplexek arányát. Egyes vélemények szerint ez a vizsgálat talán még érzékenyebb módszer a vérlemezkék aktiváltsági állapotának kimutatására, mint maga a P-szelektin expresszió analízise.

A legvizsgáltabb P-szelektin gén polimorfizmus (Thr715Pro) szerinti hetero- és homozigóta egészséges egyéneknél a plazma szolubilis P-szelektin mennyiségét szignifikánsan alacsonyabbnak találták a vad típusú személyek esetében mérhetőkhöz. Ugyanakkor a különböző protrombotikus állapottal együtt járó pl. kardiovaszkuláris betegségekben szenvedők körében a jelentőségét még vitatják, mivel korábban ellentmondó eredmények jelentek meg a P-szelektinre kifejtett hatásáról.

A mikropartikulák képződése

A mikropartikulák a vérlemezkék, a vörösvértestek, a leukocyták és az endothélsejtek aktivációja vagy apoptózisa során a sejtek membránjáról történő lefűződéssel képződnek. A mikropartikulák nagy része foszfatidil-szerin és szöveti faktor pozitív, amely biztosítja a sejtrészecskék prokoaguláns aktivitását. A foszfatidil-szerin expresszió kimutatása az Annexin V fehérje kalcium ionok jelenlétében bekövetkező kötődésének vizsgálatával lehetséges. A mikropartikulák számbeli vizsgálatakor csak az ilyen fenotípusú részecskéket értékeljük.

Szignifikánsan emelkedett mikropartikula mennyiséget találtak korábban számos vaszkuláris betegségben, így infarctusban és anginában. Ha ezeknek a betegségeknek a kezelése invazív módon történik, akkor a sztentelés által esetlegesen kiváltott thrombocyta aktiváció további mikropartikulaszint emelkedéssel járhat együtt, ami megnövelheti a korai vagy késői sztenttrombózisok kialakulásának valószínűségét.

A XIII-as véralvadási faktor (FXIII) és a vérlemezkék kapcsolata

A nem aktivált vérlemezkék számos biomarkert tartalmaznak nagy mennyiségben vagy a granulumjaik belsejében (P-szelektin: α -granulum; LAMP (CD63): lizoszóma), vagy citoplazmatikusan (CD40L; FXIII-A₂). Ezek közül a thrombocyta FXIII szerepe és működése nem kellően ismert. A FXIII egy protranszglutamináz, amely a hemosztázis fenntartásában játszik fontos szerepet, többek között mint a fibrinolízis egyik regulátora. Két formáját különböztetjük meg: a plazmában keringőt, amely két "A" és két "B" alegységből épül fel, és a cellulárisat, ami csak az "A" alegységekből áll. A plazma FXIII szerepe részletesen kivizsgált, míg a vérlemezkékben nagy mennyiségben megtalálható celluláris forma jelentősége egyelőre tisztázatlan.

A különböző thrombocyta aktivációs marker emelkedett szintjének egyidejű kimutatása egy szélesebb körű thrombocyta funkció kivizsgálást tesz lehetővé *in vitro* körülmények között agonisták által aktivált mintákban, illetve protrombotikus állapotokban *ex vivo* klinikai betegmintákból. Ezen túlmenően az ilyen jellegű kísérletek elősegíthetik újabb thrombocyta aktivációs marker vizsgálatának bevezetését, illetve a bonyolult aktiválódási folyamatok pontosabb megismerését.

CÉLKITŰZÉSEK

A disszertáció célja az volt, hogy megvizsgáljuk a thrombocyta aktiváció különböző markereit olyan betegségekben, amelyek protrombotikus állapotok kialakulására hajlamosíthatnak, továbbá *in vitro* körülmények között aktivált minták analízise során.

1. Megmértük a thrombocytafelszíni és szolubilis P-szelektin receptor mennyiségét obez és 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő betegekben, valamint egészséges egyéneknél, továbbá megvizsgáltuk, hogy a Thr715Pro P-szelektin receptor gén polimorfizmusnak van-e szignifikáns hatása a szolubilis P-szelektin plazma szintekre ezekben a betegcsoportokban és kontrollokban.
2. Megvizsgáltuk a fémszent implantáció thrombocyta aktiváló hatását a vérlemezke-eredetű mikropartikulák mennyiségének mérésével párhuzamosan más aktivációs markerrel (a P-szelektin két formája, heterotipikus aggregátumok) a sztentelés után egy korai (15. perces) időpontban vett mintából stabil anginas betegekben, és összevetettük olyan szintén anginaszó személyekkel, akik csak diagnosztikai katéterezésben részesültek.

3. Összehasonlítottuk *in vitro* körülmények között a FXIII kötődését teljes vérben az aktivált vérlemezkékhez, illetve mosott thrombocytákhoz thrombin-receptor aktiváló peptiddel (TRAP) végzett stimuláció után egészséges egyéneken, illetve egy súlyos, 1-es típusú Glanzmann thrombasthénia (GT) szenvedő betegben azáltal, hogy analizáltuk a sejtfelszíni FXIII-A pozitivitást.
4. Megvizsgáltuk továbbá, hogy vajon a plazma-eredetű nem aktivált FXIII közvetlenül kötődik-e az aktiválódott vérlemezkék felszínéhez a GPIIb/IIIa receptoron keresztül, vagy csak az ezekhez a receptorokhoz előzetesen kötődött γ' vagy γ A-láncú fibrinogénen keresztül, indirekt módon képes kapcsolódni.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Betegek és kontrollok

A P-szelektin gén polimorfizmusával kapcsolatos vizsgálatunkba egy, a DE OEC I. Belgyógyászati Klinika Ambulanciájának gondozása alatt álló 2-es típusú diabéteszes betegekből álló 119 fős betegcsoportot vontunk be, és hasonlítottuk össze 48 hasonló testtömeg-index (BMI)-vel rendelkező obez, de nem diabéteszes beteggel, illetve 57 egészséges kontroll személlyel.

A sztentimplantáció thrombocytákat aktiváló hatását 25 stabil anginás betegen analizáltuk, akik a diagnosztikus katéterezés során kimutatott koronária szűkület miatt fém (de gyógyszerrel be nem vont) sztent beültetésben részesültek. Kontroll populációként egy 20 fős, életkor-illesztett, szintén stabil anginában szenvedő, nem sztentelt betegcsoportot használtunk, akikben a katéterezése során szűkületet vagy elzáródást nem találtak. Mindkét betegcsoport tagjait a DE OEC Kardiológiai Intézetében kezelték. Minden beteg a beavatkozás előtt kizárólag 100 mg/nap aspirint szedett. A beavatkozás során 100 U/ttskg Na-heparin bólust kaptak. Vérzési vagy trombotikus komplikáció egyik betegnél sem következett be a beavatkozástól számított 30 napig.

Egy súlyos, 1-es típusú Glanzmann trombasthénias (GPIIb receptorszám < 200/thrombocyta), a DE OEC Gyermekklinikán kezelt 8 éves kisfiú mintáit is megvizsgáltuk, hogy a plazma FXIII milyen mértékben képes kötődni a beteg thrombocytáihoz ilyen alacsony GPIIb receptorszám mellett. A beteg FXIII-A pozitivitási adatait összevetettük egészséges egyének mintáiból mért értékekkel.

Reagensek

A FXIII thrombocytafelszíni expressziójának vizsgálatához a következő reagenseket alkalmaztuk: apyrase, prosztaglandin E₁ (PGE₁), bovine serum albumin (BSA), thrombin-receptor aktiváló peptid (TRAP), tisztított normál humán plazma fibrinogén normál FXIII tartalommal (6.2 µg/mg fibrinogén), RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) tetrapeptid, paraformaldehid (PFA) és eptifibatide (Integrilin®). A humán FXIII-A₂B₂-t egészséges egyének plazmájából tisztítottuk. A humán plazma eredetű γA/γA és γA/γ' felépítésű fibrinogén variánsok tisztítása DEAE-cellulóz gradiens elúciós kromatográfián történt. A két fibrinogén variáns FXIII-t gyakorlatilag nem tartalmazott (<0.1 µg/mg fibrinogén). A különböző fibrinogén frakciók FXIII tartalmát egylépéses szendvics ELISA kittel végeztük el, amely specifikus a tetramer szerkezetű plazma FXIII-ra. A fluorescein-isothiocianat (FITC)-cel jelölt monoklonális egér anti-humán-FXIII-A antitestet Dr. Katona Éva készítette és ajánlotta fel (DE OEC Klinikai Kutató Központ). Az antitest specificitását Triton X-100-zal permeabilizált thrombocyta FXIII tartalmának intracelluláris jelölésével végeztük el. A phycoerythrin (PE)-nel jelölt anti-humán-P-szelektin (CD62) antitestet, a nem-immun típusú egér IgG₁ antitestet (izotípus kontroll) és a PerCP-vel jelölt GPIX-receptor ellenes (CD42a) antitestet az áramlási citometriai vizsgálatokhoz használtuk.

Mintavétel és előkészítés

Minden vérminta vételekor a perifériás vénás vért 0.105M Na-citrátot tartalmazó Vacutainer® csőbe vettük le. Az *ex vivo* klinikai minták esetén a teljes vérben vizsgált vérlemezkéket (40 µl mintát) a vérvételtől

számított 2 órán belül 1 ml 1% PFA-ban fixáltuk le, és tartottuk szobahőn min. 1 óra hosszat. Ezután a mintákat 1300 g-n 15 percig szobahőn lecentrifugáltuk. A “pellet”-et 1 ml PBS pufferben mostuk, majd a fenti körülmények közötti újabb centrifugálás után reszuszpendáltuk PBS-ben.

A thrombocyta-eredetű mikropartikulák mennyiségének vizsgálatakor a thrombocyta-szegény plazmát (PPP) Na-citrátos teljes vérből nyertük ki 1550 g-n 20 percig szobahőn történt centrifugálással. Ötszáz μ l PPP-t azután 13000 g-n 2 percig centrifugáltuk a vérlemezke törmelék eltávolítása érdekében, majd 16100 g-n 30 percig szobahőn végzett centrifugálás után izoláltuk a mikropartikulákat.

Az *in vitro* viszonyok között végrehajtott FXIII-kötődési kísérletekben a vénás vért ACD-t (38 mM citromsav, 75 mM Na-citrát, 136 mM glükóz) tartalmazó Vacutainer® csövekbe vettük le és 300 ng/ml PGE₁-t adtunk hozzá a vérlemezkék előzetes aktiválódásának megelőzése érdekében. A thrombocyta-gazdag plazmát centrifugálással nyertük 150 g-n 15 perces 37°C-os centrifugálással, majd tovább szedimentáltuk 1200 g-n 15 percig 37°C-on. A “pellet”-et háromszor mostuk módosított HEPES-Tyrode pufferben (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, 0,5 mM NaH₂PO₄, 0,1% glükóz, 0,36% BSA, 10 mM HEPES, pH 7,4) 1 U/ml apyrase és 300 ng/ml PGE₁ jelenlétében. A mosási lépések után végül reszuszpendáltuk a sejteket apyrase-t and PGE₁-t már nem tartalmazó HEPES-Tyrode pufferben.

A szolubilis P-szelektin plazma szintjét a kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kittel mértük meg. A mintákat a mintavétel után 30 percen belül 2000 g-n 15 percig szobahőn lecentrifugáltuk, majd az analízisig -70°C-on tároltuk.

Áramlási citometriai mérések

A vérlemezkék azonosítása és más sejtektől való elkülönítése a GPIX (CD42a) receptor ellenes monoklonális antitesttel való jelöléssel történt mind a klinikai, mind az *in vitro* minták esetén. A thrombocyták aktiváltsági állapotának detektálását P-szelektin (CD62) ellenes antitesttel végeztük. Az *in vitro* körülmények között vizsgált thrombocyták vizsgálatakor a minták aktiválása és jelölése egyidőben történt. Az *ex vivo* betegminták esetén pedig a vérlemezkéket miután fixáltuk, 20 percig inkubáltuk az antitestekkel sötétben, szobahőn. Izotípus kontrollként IgG₁ antitestet használtunk, és 10000 kettős jelölésű eseményszámot gyűjtöttünk be FACSCalibur citométeren CellQuest 3.2 program alkalmazásával.

A thrombocyta-leukocyta aggregátumok arányát teljes vérben mértük, amikor a különböző fehérvérsejt populációk felszíni analízisekor CD42a pozitivitást vizsgáltunk, így mérve indirekt módon a vérlemezkékkel való kapcsolódásukat. A mikropartikulák mennyiségi meghatározásához két típusú fluoreszcens gyöngykészítményt alkalmaztunk: a TruCOUNT[®]-ot és a CytoCount[®]-ot, amelyek standard mérettel és gyöngyszámmal rendelkeztek. A gyöngyöket nem adtuk közvetlenül hozzá a mintákhoz, mivel az előzetes vizsgálataink alapján a mikropartikulák kisebb mennyisége hozzátapadhatott a gyöngyök egy részéhez, ezáltal csökkentve azok valódi számát. Ennek megfelelően a gyöngyöket tartalmazó csöveket mértük le először, majd ezután a klinikai mintákat ugyanolyan begyűjtési idő (30 másodperc) alatt. A minták mikropartikulaszámát a begyűjtött gyöngyök eseményszámához viszonyítva állapítottuk meg. A minták feldolgozását a mintavétel után 120 perccel kezdtük el, amely időpont minden beteg esetében kivitelezhető

volt. A mikropartikulákat az előre szórt (FSC) és oldalra szórt (SSC) fény paraméterei alapján kapuztuk be, majd az Annexin V és CD41a pozitivitásuk szerint értékeltük ki. Az aktiváltsági állapotukat a P-szelektin expresszió mérésével határoztuk meg.

A Thr715Pro P-szelektin polimorfizmus genetikai vizsgálata

A betegek DNS-ét Na-citráttal alvadásgátolt teljes vérből nyertük ki QIAamp DNS kit használatával. A primereket a Primer3 programmal terveztük meg, és a P-szelektin gén 13. exonját amplifikáltuk azok segítségével. A primerek szekvenciája a következő volt: 5'-TTTCTGCAGCTGTGAAATGC-3', illetve 5'-ATTGTACCTTGGCAGGT TGG-3'. A PCR minták összterfogata 50 µl volt, ami 100 ng DNS-t, 10 pmol primert, 200 µM dNTP-t, 1,5 mM MgCl₂-t, 10% DMSO-t és 2 U Taq DNS polimerázt tartalmazott. A PCR során a kezdeti denaturáció 94°C-on 5 percig folyt, majd a 40 ciklusból álló amplifikáció következett 94°C-on 30 másodpercig, 60°C-on 60 másodpercig és 72°C-on 60 másodpercig, és a végső extenzió 72°C-on 10 percig tartott. A PCR termékeket (198 bázispár) Eco91I enzimmal emésztettük, majd 3%-os agaróz gélen futtattuk meg. A Pro715 allél jelenlétében egy új 163 bázispár nagyságú DNS terméket detektáltunk.

A FXIII kötődésének vizsgálata aktivált vérlemezkék felszínén

A FXIII vérlemezkékhez történő kötődésének analízisét teljes vérben és mosott thrombocyta szuszpenzióban is elvégeztük. A vérlemezkéket elsőként teljes vérben, különböző koncentrációjú (0-40 µM) TRAP-pal aktiváltuk 15 percig 37°C-on HEPES-Tyrodé pufferben, anti-

humán-FXIII-A antitestet jelenlétében. Annak érdekében, hogy kellő mértékben aktiváljuk a vérlemezkéket, de elkerüljük ugyanakkor a FXIII aktiválódását, a thrombin-receptort stimuláló TRAP szintetikus peptidet alkalmaztuk minden FXIII-kötődési kísérletünkben. Ez a peptid a természetes α -thrombin hatását képes helyettesíteni a fenti *in vitro* körülmények biztosítása érdekében. A thrombocyták vizsgálatát, aktiváltsági állapotuk lemerését a fentebb részletezett módon végeztük el.

Annak érdekében, hogy megállapítsuk, milyen eredetű a teljes vérben lévő thrombocytákhoz kötődő FXIII, mosott thrombocytákat is hasonló módon aktiváltunk és jelöltünk. Az eredményeket FXIII-A százalékos pozitivitás értékében fejeztük ki. Ezen túlmenően megmértük a különböző méretű thrombocyták FXIII-A és CD62 pozitivitás értékeit is azáltal, hogy a teljes vérlemezke populációt három, közel egyenlő részre osztottuk fel az FSC paramétereik alapján. A nagy, a közepes és a kis méretű thrombocyták egyenkénti analízise ugyanolyan fluoreszcencia intenzitás "cut-off" értéken történt.

GPIIb/IIIa receptor antagonisták hatása a plazma FXIII expresszióra

Megvizsgáltuk a GPIIb/IIIa receptor esetleges szerepét a plazma-eredetű FXIII expresszió folyamatában, és ehhez több módszert alkalmaztunk: kétféle antagonistával specifikusan blokkoltuk a receptort és a fibrinogén kötődését, illetve a receptor „hiányában” is megnéztük a FXIII expresszió mértékét (lásd alább). A GPIIb/IIIa receptor antagonista eptifibatide nagy specificitással blokkolja a fibrinogén kötődését ehhez a receptorhoz, ezáltal gátolva a thrombocyta aggregációt. Továbbá megvizsgáltuk az RGDS tetrapeptid hatását is, ami más módon,

közvetlenül a receptor-fibrinogén interakciót képes megakadályozni. A citrátos teljes vért tehát előinkubáltuk eptifibatide-del (2 µg/ml), vagy RGDS peptiddel (5 mM) 15 percig 37°C-on. Az inkubáció után különböző koncentrációjú TRAP-pal aktiváltuk a vérlemezkéket és áramlási citométeren analizáltuk a mintákat.

A FXIII kötődése Glanzmann thrombasthénias beteg vérlemezkéihez

Ahhoz, hogy megerősítsük a GPIIb/IIIa receptor szerepét a plazma FXIII expresszióban, egy súlyos, 1-es típusú GT beteg thrombocytáit is megvizsgáltuk teljes vérben nagyon alacsony GPIIb receptorszám mellett. A sejtek *in vitro* aktiválása, majd az ezt követő analízise ugyanolyan módon történt, mint a fenti, antagonistákkal végzett kísérletekben. A beteg eredményeit egészséges minták FXIII-A pozitivitásához hasonlítottuk.

A FXIII kötődésének mechanizmusa

Megvizsgáltuk, hogy a nem aktivált plazma-eredetű FXIII-A₂B₂ közvetlenül - a GPIIb/IIIa receptoron keresztül - képes-e kötődni az aktivált vérlemezkék felszínéhez, vagy kizárólag a receptor-kötötte fibrinogén molekulákon keresztül történik az expressziója. FXIII-A pozitivitást olyan mintákban mértünk, ahol a tisztított FXIII-A₂B₂ (25 µg/ml) és/vagy γA/γ' fibrinogén (2,5 mg/ml), vagy γA/γA fibrinogén (2,5 mg/ml) variáns volt hozzáadva a nem stimulált és a TRAP-pal (40 µM) aktivált mosott thrombocyta mintákhoz 15 percig 37°C-on 1 mM CaCl₂ jelenlétében. Normál FXIII tartalmú humán plazma fibrinogént használtunk a kísérletek pozitív kontroll mintájában. Az inkubáció után a

mintákat 1 % PFA-ban fixáltuk, majd egy PBS-ben történő mosás után a mintákat áramlási citométeren lemértük.

Statisztikai számítások

Az adatok átlag $\pm$ SEM formában voltak kifejezve és legtöbbször Student's t tesztet használtuk a különbségek kimutatására. Ha a p érték $<0,05$ volt, a különbséget szignifikánsnak értékeltük. A klinikai vizsgálatok során normalitásvizsgálatra Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk. Mivel a legtöbb paraméter nem normál eloszlású volt, log-traszfórmációt hajtottunk végre, majd ezután vizsgáltuk független Student's t tesztel. A betegcsoportok között a változó paraméterek közötti különbség mérésére ANOVA-t és chi-square tesztet is használtunk. Multiplex regressziós analízissel vizsgáltuk az összefüggést a demográfiai paraméterek és szolubilis P-szelektin szintek között. Egyváltozós variancia analízissel adjusztáltuk a szignifikáns változókat, és vetettük össze a szolubilis P-szelektin értékekkel a különböző genotípusok között. A számításokat a SPSS program 13.0 verzióján végeztük el.

EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

Szignifikánsan emelkedett thrombocytafelszíni és szolubilis P-szelektin szintek obese egyénekben és 2-es típusú cukorbetegekben

A betegcsoportok különféle demográfiai és mért laboreredményei között szignifikáns különbséget találtunk. A szolubilis P-szelektin plazma szintje és a sejtfelszíni P-szelektin százalékos pozitivitása szignifikánsan magasabb volt az obese és a cukorbeteg egyénekben összehasonlítva az egészséges kontrollokkal. Ezek az eredmények megfelelnek korábbi közlemények adataival, amelyek a vérlemezkék fokozott aktiváltsági állapotáról számoltak be, összefüggésbe hozva a betegségekre jellemző komplikációk, pl. az érbetegség pathomechanizmusával.

A Thr715Pro polimorfizmus kis mértékben befolyásolja a szolubilis P-szelektin szintet az egyes betegcsoportokban

A Thr715Pro genotípus aránya szignifikánsan nem különbözött a betegcsoportok között. Egészségesekben: 77,2% (AA, n=44), 22,8% (AC, n=13); obesekben: 81,3% (AA, n=39), 18,7% (AC, n=9); 2-es típusú diabéteszesekben: 74,8% (AA, n=89), 23,5% (AC, n=28), 1,7% (CC, n=2). Minden csoportban fennállt a Hardy-Weinberg equilibrium. Nem volt olyan betegünk, aki homozigóta (CC) genotípusú lett volna az egészségesek és az obesek között. Mivel a diabéteszes csoportban is elég alacsony volt a homozigóták aránya, ezeket a betegeket a heterozigóták (AC) csoportjába soroltuk a statisztikai számítások során. A cukorbetegek között a szignifikánsan emelkedett szolubilis P-szelektin szinteket nem befolyásolta a betegek genotípusa ($p=0,642$). Habár az egészséges Pro715

allél hordozók jelentősen alacsonyabb szolubilis P-szelektin szintet mutattak, ez a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns ($p=0,060$) szemben korábbi publikációk adataival. Az obese egyéneknél ez az aktivációs marker is jelentősen emelkedett volt, de nagy különbséget nem mutatott az AA és AC hordozók között ($p=0,777$).

A BMI jelentősége a szolubilis P-szelektin szintek alakulásában egészséges személyekben

Meghatároztuk a BMI és a szolubilis P-szelektin szintek kapcsolatát a különböző BMI-jű egészséges egyéneknél. A $<22,4 \text{ kg/m}^2$ BMI-vel rendelkező "C" allél hordozókban a szolubilis P-szelektin szint szignifikánsan ($p=0,004$) alacsonyabb volt, mint az AA genotípusúakban. Érdekes módon, nem volt jelentős eltérés a genotípus alapján azokban, akiknek a BMI-je $\geq 22,4 \text{ kg/m}^2$. Egy korábbi közlemény gyenge korrelációt mutatott ki a szolubilis P-szelektin szintek és a BMI között kizárólag egészséges egyéneknél, de nem volt ilyen jellegű összefüggés a kardiovaszkuláris betegekben.

A különböző változók hatása a szolubilis P-szelektin szintekre 2-es típusú diabéteszben

Korábbi publikációk szerint a szolubilis P-szelektin szintek alakulása kor- és nemfüggő, bár mások cukorbetegben ezt nem tudták egyértelműen megerősíteni. Betegcsoportunkban a kor jelentősen befolyásolta ennek az aktivációs markernek az értékét. Szignifikáns ($p<0,05$) különbség volt látható a szolubilis P-szelektin szintekben, amikor az idősebb (átlag életkor ≥ 54 év, $111,4 \pm 61,7 \text{ ng/ml}$) és a fiatalabb (átlag

életkor <54 év, $64,7 \pm 47,1$ ng/ml) alcsoportokba voltak a betegek besorolva, de a genotípus ekkor sem befolyásolta szignifikánsan a szolubilis P-szelektin értékeket. Mivel az életkor jelentősen kihatott rá, egy olyan életkor-illesztett diabéteszes alcsoportot is létrehoztunk, amivel a kontroll csoportot (össz. 57 párt) össze tudtuk hasonlítani. A szolubilis P-szelektin szintek szignifikánsan ($p < 0,001$) magasabbak voltak a diabéteszes alcsoportban (átlag: 79,4 ng/ml, quartilis: 39,7-121 ng/ml) összehasonlítva a korban megfelelő egészséges kontroll személyekhez (átlag: 46,6 ng/ml, quartilis: 33,2-57,6 ng/ml).

Nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a férfiak ($91,5 \pm 65,5$ ng/ml) és a nők ($86,4 \pm 44,6$ ng/ml) között, és nem volt genotípus szerinti eltérés sem. A szolubilis P-szelektin szinteket nem befolyásolta a dohányzási szokás, nem találtunk eltérést a nem-dohányzó cukorbeteg (87,8 $\pm$ 49,7 ng/ml) és a rendszeresen dohányzó betegek (90,9 $\pm$ 80 ng/ml) között. A genotípusnak ebben a vizsgálatban sem volt jelentősége. Előző vizsgálatok bár találtak összefüggést a Pro715 allél és az alacsonyabb szolubilis P-szelektin szintek között, ez a nem-dohányzó kardiovaszkuláris betegekre volt csak igaz. Mások viszont nem találtak ilyen kapcsolatot normál egyének között sem.

A diabéteszes csoportban multiplex regressziós analízist használtunk szignifikáns összefüggések megállapítására a szolubilis P-szelektin értékek és a betegek változó adatai között. Egyedül az életkor mutatott szignifikáns hatást. Ezután ezt a paramétert illesztettük a többi változóra (pl. nem, vérnyomás, dohányzási szokás, stb.), de nem találtunk statisztikailag szignifikáns ($p = 0,204$) különbséget a szolubilis P-szelektinre vonatkozóan az AA és AC+CC genotípusú betegek között egyváltozós

variációs analízissel. További vizsgálatok szükségesek majd annak megállapítására, hogy ennek a genotípusnak más P-szelektin polimorfizmussal együtt van-e további jelentősége obezitasban és 2-es típusú cukorbetegségben.

Szignifikánsan emelkedett thrombocyta-eredetű mikropartikulaszint anginás betegekben sztentelést követően

A sztentek - beültetést követően - egy trombogén felszín képezhetnek az érben, ami akár thrombocyta aktivációt is okozhat. Korábbi tanulmányok a thrombocyta P-szelektin felszíni expressziójának mérését szenzitív módszernek találták ballonos tágítás (PTCA)-val kezelt betegek vérlemezkéinek vizsgálatára és a különböző clopidogrel terápia hatásának monitorizálására. Jelen tanulmányunkban a sztentbeültetés vérlemezke-aktiváló hatását vizsgáltuk thrombocyta-eredetű mikropartikulák mennyiségének mérésével, párhuzamosan más thrombocyta aktivációs markerrel együtt a beavatkozás utáni 15. percben vett mintából. Áramlási citometriát használtunk, mint az erre a célra a legszélesebb körben alkalmazott technikát. Annexin V-pozitív mikropartikulákat analizáltunk, és azon belül is a thrombocyta-eredetűeket, mivel ezt a típust tartják a legnagyobb (80-95%) populációnak. A többi sejt eredetű mikropartikulák jelentőségéről (pl. az endothélsejt-eredetűek) eltérnek a vélemények.

Korábban egyedül egy publikáció foglalkozott a thrombocyta-eredetű mikropartikuláknak a beavatkozás utáni, ilyen korai időpontban történő mérésével koronária betegségben szenvedő egyéneknél, amit ELISA-val határoztak meg. Szignifikáns növekedést ugyanakkor nem mutattak ki. Ezzel szemben vizsgálatunkban szignifikánsan ($p=0,031$)

megemelkedett mikropartikulaszintet ($557 \pm 83/\mu\text{l}$ vs. $325 \pm 42/\mu\text{l}$) mértünk sztentelés után 15 perccel, szemben olyan, szintén anginás betegekkel, akik csak diagnosztikai katéterezésen estek át.

A felszíni P-szelektin és a heterotipikus aggregátumok megemelkedett szintje sztentelt betegekben

A sztentelés művelete a vérlemezkék aktiválódásához vezetett, ami a felszíni P-szelektin szint ($2,7 \pm 0,3\%$ vs. $1,99 \pm 0,1\%$; $p=0,024$) megemelkedésében is megmutatkozott. Érdekes módon, a szolubilis forma ez esetben nem mutatott különbséget a két betegcsoport között (38 ± 12 ng/ml vs. 36 ± 11 ng/ml). Ez feltehetően a korai mintavételnek köszönhető, mivel kevés idő állhatott rendelkezésre ahhoz, hogy a felszíni forma lehasítódjon és a plazmába kerüljön. A mikropartikulák CD62 pozitivitása is jelentősen megnőtt a sztentelt betegekben, szemben a katéterezett egyéneknél mérhetővel.

Mindhárom thrombocyt-leukocyt komplex mennyisége növekvő tendenciát mutatott, de egyedül a monocyt-thrombocyt aggregátumok szintje nőtt szignifikánsan ($48 \pm 4\%$ vs. $38 \pm 3\%$; $p=0,044$). Releváns kontrollként szintén anginázó, ugyanolyan gyógyszeres terápiában részesülő betegeket használtunk, akik hasonló invazivitású beavatkozást (katéterezés) kaptak. Ezek a „kontroll-betegek” is mutattak valamilyen mértékű thrombocyt aktivációt viszonyítva a másik vizsgálatunkban megfigyelt egészséges kontrollokhoz. Más szerzők szerint, bár a sztentek használata thrombocyt aktiválódásra hajlamosíthatnak, a beavatkozás csökkentheti is kedvező módon a mikropartikulák szintjét a beavatkozás utáni 30. napra. Ezek alapján a thrombocyt-eredetű mikropartikulák

mennyiségi meghatározása egy korai érzékeny módszernek tekinthető az invazív kardiológiai terápia okozta thrombocyta aktiváció kimutatására, mely vizsgálat kiegészítheti olyan más aktivációs markerek analízisét, mint a sejtfelszíni CD63 expresszió, a szolubilis GPV, a szolubilis CD40L és a RANTES plazma szintek mérését. További kísérletek szükségesek annak megállapítására, hogy ezek a paraméterek egyúttal alkalmasak-e a protrombotikus állapotok kimutatására, illetve a gyógyszerrel bevont sztentek hatása különbözik-e a „sima” fémsztentekétől.

A nem aktivált FXIII is kötődik az aktivált thrombocytákhoz

A FXIII kötődését elsőként TRAP-pal stimulált thrombocyták teljes vérben való vizsgálatával végeztük. A FXIII-A pozitivitást a CD62 pozitivitással párhuzamosan mértük. Nem aktivált mintákban a FXIII nem kötődött a vérlemezkékhez. Ugyanakkor a FXIII-A pozitivitas fokozatosan nőtt a TRAP koncentrációjának növelésével és 40 μ M agonista koncentrációnál érte el a maximális szintjét a 90%-os CD62 pozitivitásnál. A FXIII-A és a P-szelektin koexpressziót mutatott az aktivált mintákon. A FXIII tehát kizárólag aktivált vérlemezkéken expresszálódik. Korábban egy specifikus thrombin-aktiválta FXIII kötődést írtak le thrombin-stimulált vérlemezkéken.

A vérlemezke populáció méret szerinti felosztása után azt tapasztaltuk, hogy a nagyméretű sejtek mutatták a legnagyobb FXIII-A pozitivitást, amíg a legkisebbek a legalacsonyabb szintet. A P-szelektin pozitivitasban nem volt különbség. Ezek alapján olyan kötőhelyekhez kapcsolódhat a FXIII, aminek száma arányos a vérlemezke méretével.

A thrombocyták plazma eredetű, és nem intracelluláris FXIII-t kötnek a felszínükön

A korábbi irodalmi adatok alapján nem volt tisztázott, hogy aktivált mintákban az intracelluláris FXIII képes-e expresszálni a sejtfelszínen. Régebbi közlések többsége ugyan arról számolt be, hogy a FXIII a thrombocytákban marad és nem jut ki onnan. Mások viszont leírták a gél-filtrált, egyidőben kollagénnel és thrombinnal stimulált vérlemezkék FXIII expresszióját külső faktor hozzáadása nélkül. Megvizsgáltuk tehát, hogy az általunk detektált FXIII-A pozitivitást az intracelluláris vagy a plazma eredetű FXIII kötődése jelenti. Ennek érdekében mosott és teljes vérben lévő thrombocytákat aktiváltunk a fenti körülmények között. Az aktivált mosott thrombocytá szuszpenzióban nem találtunk FXIII-A pozitívítást emelkedést szemben a teljes vérben végzett kísérletekkel. Ugyanakkor a CD62 pozitívítást fokozatosan nőtt mindkét mintatípusban. Ez alapján a plazma eredetű FXIII kötődik a vérlemezkékhez teljes vérben, de az intracelluláris forma nem expresszálnodik.

Az eptifibatide és az RGDS tetrapeptid szignifikánsan csökkentette a FXIII-A pozitívítást mértékét

Megvizsgáltuk a GPIIb/IIIa receptornak a FXIII kötődésében játszott esetleges szerepét tekintettel arra, hogy egy nagyszámú thrombocytá receptorról van szó, ami elsősorban a thrombocytá aggregáció mechanizmusában játszik fontos szerepet. Ehhez specifikus GPIIb/IIIa receptor antagonistát, eptifibatide-t használtuk olyan koncentrációban (2 µg/ml), amit a sürgősségi kardiológiában alkalmaznak betegekből. A FXIII kötődésének 55 %-át blokkolta a sejtek eptifibatide-kezelése, szemben a

nem kezelt kontroll mintához ($p < 0,05$). Amikor a vérlemezkéket RGDS tetrapeptiddel gátoltuk, a fibrinogén kötődés megelőzése révén tovább csökkent a FXIII-A pozitivitás, ami így 73%-kal volt alacsonyabb, mint a kontrollé. Ennek megfelelően a GPIIb/IIIa receptornak és az általa megkötött fibrinogénnek nagy jelentősége van a nem aktivált FXIII vérlemezkékhez való kötődésében. Régebbi közlemények erről a jelenségről ellentétes adatokat közöltek. Voltak olyanok, amelyek kizárták a GPIIb/IIIa receptor és a fibrin(ogén) szerepét, ugyanakkor mások később a thrombin-aktivált FXIII GPIIb/IIIa receptoron keresztüli expresszióját detektálták thrombin-stimulált trombocytákon. Hangsúlyozni szeretnénk, hogy a kísérleteinkben bemutatott FXIII kötődési folyamat nem egyezik meg az irodalomban már közölt aktivált FXIII expressziójával. Az aktivált, thrombin-hasított faktor kizárólag "A" alegységet tartalmaz, míg a nem aktivált, plazma eredetű FXIII A₂B₂-komplexből épül fel, így a két forma bizonyára más kötőhelyen keresztül képes expresszálni az aktivált trombocyták felszínén.

Minimális plazma FXIII kötődés a GT vérlemezkéken

A GT beteg vérlemezkéinek vizsgálatával sikerült megerősíteni azt a hipotézist, miszerint a GPIIb/IIIa receptor nagy jelentőséggel bír a plazma FXIII kötődésében. Ugyanolyan TRAP agonista koncentrációval végzett aktiválási körülmények között a GT trombocyták rendkívül alacsony, szinte elhanyagolható szintű FXIII-A pozitivitást mutattak, mint az egészséges kontrolloké. A kiinduló pozitivitási értékekben különbséget nem tapasztaltunk. A P-szelektin pozitivitásban nem volt eltérés, ami a vérlemezkék egységes, megfelelő szintű aktiváltsági állapotát jelezték.

Ezen kísérletek tovább erősítették a korábbi vizsgálataink helyességét a GPIIb/IIIa receptor szerepét illetően. Érdekes módon, az aktivált FXIII normál mértékben kötődött két súlyos GT beteg vérlemezkéihez egy korábbi közlés szerint.

A FXIII-A₂B₂ kötődéséhez γ' -láncú fibrinogén szükséges

A FXIII kötődés mechanizmusának pontosabb megismerése érdekében kétféle, eltérő láncokból álló fibrinogén variánst adtunk mosott thrombocyta populációhoz. A keringésben a fibrinogén molekulák kétféle szerkezetű, 3 (A α , B β és γ) polipeptid láncból épülnek fel. A γ -lánc hasítás utáni formája a γ' -lánc, amely a fibrinogén molekulák csak kb. 15%-ában van jelen, amely képes megkötni a FXIII-t a "B" alegységen keresztül. A pozitív kontrollban használt normál FXIII tartalmú plazma fibrinogén jelenlétében a vérlemezkék felszínén a FXIII-A pozitivitás szignifikánsan ($p < 0,01$) magasabb volt a negatív kontrollhoz képest. A TRAP-aktivált vérlemezkék csak enyhe FXIII-A pozitivitás növekedést mutattak, amikor a hozzáadott plazma FXIII-A₂B₂ fibrinogén nélkül, vagy valamelyik fibrinogén variáns ($\gamma A/\gamma A$ vagy $\gamma A/\gamma'$) önmagában volt a mintában. Ugyanakkor a $\gamma A/\gamma'$ fibrinogén a tisztított FXIII-A₂B₂ jelenlétében szignifikánsan ($p < 0,05$) megemelte a FXIII-kötődés mértéket a TRAP-stimulált vérlemezkék felszínén, szemben a nem aktivált kontrollal, illetve a kizárólag $\gamma A/\gamma'$ fibrinogénnel ellátott mintával szemben. A $\gamma A/\gamma A$ fibrinogén a FXIII-A₂B₂ jelenlétében ugyanakkor nem tudta növelni a FXIII-A pozitivitást összehasonlítva olyan thrombocyta mintával, amely csak $\gamma A/\gamma A$ fibrinogént tartalmazott ($p = 0,302$). Ezek az adatok egyértelműen alátámasztják a γ' -láncú, a GPIIb/IIIa receptorhoz már

előzetesen kapcsolódott fibrinogén molekulák szerepét a plazmából bekötődő, nem aktivált FXIII-A₂B₂ expressziójában. Ugyanakkor azt is megállapíthatjuk, hogy a FXIII nem képes direkt módon, fibrinogén nélkül, kizárólag thrombocyta receptorhoz kapcsolódva az aktivált vérlemezékhez kötődni.

ÖSSZEFOGLALÁS

A kardio- és cerebrovaszkuláris betegségeket napjaikban is vezető halálokként tartjuk számon a fejlett országokban. Az aktiválódott vérlemezkék alapvető szerepet játszanak ezekben a betegségeken bekövetkező trombotikus komplikációk pathomechanizmusában. Ezért van olyan nagy jelentősége az ily módon megváltozott vérlemezkék kimutatásának a napi rutindiagnosztikában.

Vizsgálatainkban 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő betegekben, illetve túlsúlyos egyéneknél a vérlemezkék felszíni P-szelektin, valamint annak szolubilis formájának mennyiségét szignifikánsan emelkedettnek találtuk szemben az egészséges kontroll személyekben mért értékekkel. A legjelentősebb P-szelektin gén polimorfizmus (Thr715Pro) egyik betegcsoportban sem befolyásolta szignifikánsan a szolubilis P-szelektin plazma szintjét. A cukorbeteg esetén a különböző demográfiai paraméterek alapján kialakított alcsoportokban a szolubilis P-szelektin szintje - a genotípus alapján - továbbra sem különbözött jelentős mértékben.

Stabil anginában szenvedő betegekben szignifikánsan megemelkedett a vérlemezke-eredetű mikropartikulák mennyisége, a thrombocyták felszíni P-szelektin szintje és a vérlemezke-monocytá aggregátumok aránya ellentétben olyan, szintén anginázó betegekkel, akik "csak" diagnosztikai katéterezéssel estek át elzáródás vagy szűkület hiányában. Ugyanakkor a szolubilis P-szelektin mérése jelentős különbséget nem mutatott a két betegcsoport között. Ezek alapján a thrombocytá-eredetű mikropartikulák vizsgálata egy érzékeny korai

vérlemezke aktivációs markernek tekinthető az invazív kardiológiai beavatkozásokkor aktiválódott vérlemezkek vizsgálatára.

In vitro kísérleteinkben, a thrombocytákban intracitoplazmatikusan található FXIII-A₂ nem expresszáldott a TRAP agonistával aktivált mosott thrombocyták felszínén. A teljes vérben vizsgált aktivált vérlemezkekhez kötődő nem aktivált FXIII ezek alapján plazma eredetű. A γ A/ γ ' szerkezetű fibrinogén jelenléte szignifikánsan növelte a tisztított nem aktivált FXIII kötődését az aktivált mosott vérlemezkekhez. A FXIII-A pozitivitás ugyanakkor nem volt mérhető a γ A/ γ ' fibrinogén hiányában, vagy olyan fibrinogénnel, aminek csak γ A lánc volt, illetve önmagában a FXIII-A₂B₂-vel sem. Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy a plazma eredetű nem aktivált FXIII nem képes közvetlenül kötődni az aktiválódott vérlemezkekhez, és jelentős FXIII kötődés csak a GPIIb/IIIa receptorhoz előzetesen kötődött fibrinogén γ '-láncán keresztül lehetséges. A FXIII kötődésének vizsgálata a továbbiakban egy újabb thrombocyta aktivációs marker lehetőségét vetheti fel.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Nagy B Jr, Csongrádi É, Bhattoa HP, Balogh I, Blaskó G, Paragh G, Kappelmayer J, Káplár M. The lack of association between Thr715Pro P-selectin gene polymorphism and soluble P-selectin levels in type 2 diabetes mellitus. *Thromb Haemost* 2007; 98: 186-191.

Impakt faktor: 3.501

Nagy B Jr, Simon Z, Bagoly Z, Muszbek L, Kappelmayer J. Binding of plasma factor XIII to thrombin-receptor activated human platelets. *Thromb Haemost* 2009; 102: 83-89.

Impakt faktor: 3.803

Nagy B Jr, Szűk T, Debreceni IB, Kappelmayer J. Platelet-derived microparticle levels are significantly elevated in patients treated by elective stenting compared to subjects with diagnostic catheterization alone. *Platelets* 2009; (közlésre elfogadva)

Impakt faktor: 2.271

Kappelmayer J, **Nagy B Jr**, Miszti-Blasius K, Hevessy Z, Setiadi H. The emerging value of P-selectin as a disease marker. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 475-486.

Impakt faktor: 1.685

Nagy B Jr, Veszprémi A, Kiss F, Miszti-Blasius K, Kappelmayer J. Thrombocytá aktivációs markerek összehasonlító elemzése áramlási citometriával in vitro aktiváció során. *Klin Kísérl Lab Med* 2003; 30: 46-54.

Az értekezés elkészítéséhez felhasznált közlemények összesített impakt faktora: 11.26

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Hevessy Z, **Nagy B Jr**, Kiss F, Kiss A, Kappelmayer J. Mean fluorescence intensity rate is a useful marker in the detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 919-923.

Impakt faktor: 1.918

Szűk T, **Nagy B Jr**, Bereczky Z, Kőszegi Z, Édes I, Kappelmayer J. Effects of "ad hoc" clopidogrel loading versus pre-treatment on P-selectin after coronary stent implantation. *Platelets* 2006; 17: 344-346.

Impakt faktor: 1.679

Nagy B Jr, Bhavaraju K, Getz T, Bynagari YS, Kim S, Kunapuli SP. Impaired activation of platelets lacking protein kinase C-theta isoform. *Blood* 2009; 113: 2557-2567.

Impakt faktor: 10.432

Chari R, Getz T, **Nagy B Jr**, Bhavaraju K, Mao Y, Bynagari YS, Murugappan S, Nakayama K, Kunapuli SP. Protein kinase C delta differentially regulates platelet functional responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 699-705.

Impakt faktor: 6.858

Bynagari YS, **Nagy B Jr**, Tuluc F, Bhavaraju K, Kim S, Vijayan KV, Kunapuli SP. Mechanism of activation and functional role of protein kinase C eta in human platelets. *J Biol Chem* 2009; 284: 13413-13421.

Impakt faktor: 5.520

Kappelmayer J, **Nagy B Jr**, Losonczy G. Thrombocyták rendellenességeinek vizsgálata áramlási citométerrel. *Modern sejtanalitikai módszerek, ISBN 963 472 810 3* 2004; 45-48.

Hevessy Z, **Nagy B Jr**, Kiss F, Kiss Sziráki V, Kiss A, Reményi G, Kappelmayer J. Paroxysmalis nocturnalis haemoglobinuria laboratóriumi diagnosztikája. *Klin Kísérl Lab Med* 2004; 31: 66-76.

Schlamadinger Á, Tóth J, **Nagy B Jr**, Fazakas F, Hársfalvi J, Kappelmayer J, Muszbek L, Radványi G, Boda Z. Bernard-Soulier-szindróma: a hereditær thrombocytopéniák ritka oka. *Hemat Transzf* 2007; 40: 40-46.

Összesített impakt faktor: 37.667

Összesített nemzetközi citációk száma: 36