

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Sejtfelszíni receptorok expressziójának modulációja
thrombocytákban és leukocytákban**

Bekéné Debreceni Ildikó

Témavezető: Dr. Kappelmayer János



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2020

**SEJTFELSZÍNI RECEPTOROK EXPRESSZIÓJÁNAK MODULÁCIÓJA
THROMBOCYTÁKBAN ÉS LEUKOCYTÁKBAN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Bekéné Debreceni Ildikó, okleveles klinikai laboratóriumi kutató

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológiai programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Demeter Judit, az MTA doktora

Dr. Fagyas Miklós, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora

Dr. Nagy Tamás, PhD

Az értekezés védésének (online formában) időpontja: 2020. december 11. 14:00 óra.

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a szildiko@med.unideb.hu e-mail címre a vitát megelőző nap (2020. december 10.) 12 óráig. A határidő lejáratát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

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. 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. Napjainkban vezető halálokok között szerepelnek a szív- és érrendszeri, valamint a thrombotikus megbetegedések, 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. Számos tanulmány számolt be arról, hogy a vérlemezkéknek nem csak a hemosztázisban van szerepük, hanem az immun- és gyulladásos folyamatokban, hozzájárulnak angiogén és fejlődési folyamatokhoz, a mikroorganizmusok közvetlen elpusztításához és daganatos áttétek kialakulásához.

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 hátterében álló pathomechanizmusokat is vizsgáltuk.

Thrombocyta sejt felszíni receptorok

A vérlemezkék számos sejt felszíni receptort expresszálnak, ezek közül az adhézión receptorok, a trombus képződést szabályozó receptorok és a purinerg receptorok főként a hemosztázis folyamatokban működnek szenzorként. Míg a mintázatokat, antigéneket vagy kemokineket felismerő és sztiálsav-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 hemostatikus 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 vérlemezék reaktivitását „fenotípusát” is.

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. 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 kaskád, 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.

A vérlemezék aktivációjakor a C-típusú lektin receptor családba tartozó P-szelektin (CD62P) adhéziós receptor az α -granulumból kikerül a vérlemezék 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 vérlemezken 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, 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 lipopoliszaharidot (LPS) ismeri fel a TLR2 receptor a Gram-pozitív baktériumok peptidoglikánját köti, a ligand receptorhoz történő kapcsolódásakor fokozott vérlemezke adhéziót vált ki.

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. 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.

A thrombocyták szerepe a hemosztázisban és a gyulladásban

A hemosztatisz folyamatok legfontosabb feladata, hogy (i) érfalsérülés esetén rögzéződéssel megakadályozza a további vérvesztést, (ii) a vért folyékony állapotban tartsa, valamint (iii) eltávolítsa a képződött alvadékot. 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. 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 retrahálódik és elzárja az érfal-sérülés helyét.

A thrombocyták a hemosztatikus folyamatokon kívül elősegítik a krónikus gyulladásos folyamatokat atherosclerosisban, modulálják az akut gyulladásos betegségeket, mint a szepszis és más fertőzések, és hozzájárulnak az autoimmun állapotok súlyosbodásához. A vérlemezkék fő élettani szerepe az endothelium barrier funkciójának megőrzése, azonban gyulladásos folyamatokban közreműködnek a barrier funkció zavarában, mely során növelik az endothelium permeabilitását. Fiziológias körülmények között a vérlemezkék nem adherálnak az endothel sejtekhez, azonban atherosclerosis kialakulásakor a vasculatura gyulladásának következtében a vérlemezkék aktiválódnak, majd adherálnak az endotheliumhoz és a továbbiakban szerepet játszanak a neutrophil és monocytá adhézióban, mediálják felhalmozódásukat és az endothélen keresztüli migrációjukat. 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. 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, így a vérlemezkék közreműködnek a nem fertőző immunbetegségekben is. Szepszisben a bakteriális eredetű lipopoliszaharid (LPS) a vérlemezkéken expresszálandó TLR4 receptoron keresztül aktiválja a vérlemezkéket, 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. Emellett a fokozott NET képződés az egyik mechanizmusa a vérlemezke indukált érkárosodásnak szepszisben. A GPVI receptoron keresztüli illetve LPS indukált vérlemezke aktiváció során a vérlemezkék felszínéről lefűződő mikropartikulák proinflatórikus és prothrombotikus faktorokat például CD40L-ot szállítanak 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, 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.

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.

Thrombocytá alosztályok a hemosztázisban: aggregáló és prokoaguláns vérlemezkék

A vérlemezkéknek az adhézión, szekréción és aggregáción kívül szerepe van a vérárvadásban is, kontrollálják a trombin generációt, támogatják a fibrinképződést és regulálják az alvadék retrakciót. 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. 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 trombin- és fibrinképződést. A thrombus létrejötte során a prokoaguláns vérlemezkék a thrombus felszínére kerülnek a kontrakció folyamata alatt, ami nagyon kritikus a trombin és fibrin képződés térbeli kontrollálása szempontjából. A PS-t expresszázó vérlemezkékhez hasonlóan a coated-vérlemezkék is erős agonista aktiváció hatására jönnek létre, úgy mint a kollagén és trombin, 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. Vérlemezkék esetében a GPVI receptoron keresztüli szignalizáció a prokoaguláns vérlemezkék létrejöttének a fő útvonala. A PS-t expresszáló 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.

A thrombocyta-leukocyta interakciót kialakító receptorok

A sejtfelszíni szelektinek és glükokonjugátok mediálják a fehérvérsejtek és vérlemezkék kihorgonyozódását és gördülésének folyamatát az érfelszínen. A vérlemezke-fehérvérsejt heterotipikus aggregátumok képződése a vérlemezke aktiváció szenzitív markere. A vérlemezke-fehérvérsejt aggregátumok emelkedett szintjét találták akut koronária megbetegedésekben (ACS), szepszisben és dialízis során. 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 vérlemezkék és fehérvérsejtek között. Ez a kötés teszi lehetővé a hatékony fehérvérsejt toborzást érsérülés esetén. 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 α -hoz vagy indirekt módon a fibrinogénon keresztül a GPIIb/IIIa receptorhoz. Az aktivált vérlemezkék a vérlemezke aktiváló faktoron (PAF) keresztül, kötődnek a fehérvérsejtek felszínén a PAF receptorhoz, ami szintén Mac-1 aktivációhoz vezet. Mindezek mellett az aktivált vérlemezkék 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.

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 molekulákként 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. A leukocyták és az endothelium kölcsönhatásait több adhéziós molekulacsalád közvetíti, amelyek mindegyike részt vesz a folyamat egy-egy fázisában. Az integrinek feladata a sejtek extracelluláris mátrixhoz (ECM) történő lehorgonyzása, sejt-sejt adhéziós kölcsönhatás kialakítása, továbbá a két-irányú szignál átvitel. E tulajdonságaik alkalmassá teszik az integrineket olyan komplex mechanizmusok szabályozására, mint a sejt migráció, szöveti differenciáció, osztódás, gyulladás és a véralvadás. Az integrinek legtöbbje az RGD (arginin-glicin-aszpartát) aminosav-szekvenciához kötődik. Ez a tripeptid nemcsak ECM makromolekulákban (kollagén, laminin, fibronectin, vitronectin) fordul elő, hanem megtalálható plazmafehérjékben is, úgymint a fibronectinben, fibrinogénben és a von Willebrand faktorban. A leukocyta adhéziós kaszkád központi szereplői a β 2-integrincsaládból 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. Leukocyta integrinek kulcs molekulái az immun-mediált és inflammatórikus folyamatoknak például asthma és atherosclerosis kialakulása során. Az adhéziós fehérjék másik csoportja az immunoglobulin 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.

A szelektinekhez tartozó fehérvérsejteken konstitutívan expresszáldó L-szelektin mely CD62L-ként is ismert a „lymphocyta-homing” receptora, 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 lymphocyta homing során. A szelektinek kulcsszerepet játszanak a daganatok kialakulásában és a metasztázis létrejöttében. Ennek a hátterében az áll, hogy a szelektin ligandok nagy számban expresszáldnak az ér endothelen, potenciális belépési helyet teremtve a keringő tumorsejtek számára. Lymphoproliferatív betegségekben az adhézión fehérvérsejt szintje csökkent, ami a fehérvérsejtek romló transzendotheliális vándorlásával hozzájárul és összefüggésbe hozható a betegség kialakulásával.

Az adhézión molekulák a fehérvérsejt aktiváción eredményeként megjelenhetnek a plazmában, ezek vizsgálata információn adhat a betegség súlyosságáról. Szisztémás gyulladás során a neutrophilek aktiváción következtében a szolubilis L-szelektin emelkedett szintje detektálható.

CÉLKITŰZÉS

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

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 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 alvadásgátolt 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 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 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 5µM TRAP vérlemezke aggregáló hatását. Ennek megválaszolására kostimulációt végeztünk az aggregációs teszt során.

Thrombocytá mikropartikula (PMP) analízis

Na-citráttal alvadásgátolt vért inkubáltunk 10 µg/mL koncentrációban S-LPS-sel, Re-LPS-sel 5 µM TRAP jelenlétében vagy anélkül 60 percig 37 °C-on, majd több egymást követő centrifugálással PMP-t szeparáltunk a következők szerint. A kezelt alvadásgátolt vérből először PPP-t szeparáltunk 1500 g-n 15 percig 20 °C-on történő centrifugálással, majd a PPP-t tovább centrifugáltuk 13 000 g-n 2 percig 20 °C-on, ezzel a lépéssel eltávolítottuk a mintánkban jelenlévő vérelemezek 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/µL plazmában adtuk meg.

HIT antitestek thrombocytá 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 thrombocytá 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 és a vérelemezek mikropartikula képződésre.

A vizsgálatokhoz 10 µL „0”-ás vércsoportú egészséges kontrollok PRP-jéhez 10 µL beteg plazmát és 25 µL PBS-t adtunk, majd inkubáltuk 5 µL 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 lejárta 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 alvadásgátolt 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 $\mu\text{mol ATP}/10^{11}$ vérlemezke dimenzióban adtuk meg az eredményeket.

Foszfatidil szerin (PS) expresszió meghatározása

PRP-t convulxinnal (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, 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) 1µL 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 leállítása és a minta fixálása 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 PECy5 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 (Becton Dickinson, Mansfield, MA, USA) áramlási citométerrel történt, az adatokat FACSDiva 6.1.3 szoftverrel analizáltuk. 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 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. Tíz 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).

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 és 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 µL PRP-t előinkubáltunk 100 µL dasatinibbel (10 és 100 nM) vagy nilotinibbel (5000 nM) 10 percig, 37°C-on vízfürdőben, majd aktiváltuk 100 µL konvulxinál (végkoncentráció:12,5 ng/mL) 15 percig 37°C-on. Ezután üvegcsőben 1000 µL előkezelt majd aktivált PRP-t inkubáltunk 100 µL 250 mM-os CaCl₂-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 konvulxinál (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 thrombocytá lizátumokat poliakrilamid gélen választottuk szét, majd Western blotot követően foszfo-specifikus antitestekkel (p-Y507 Lyn, p-Y396 Lyn,

p-Y530 Fyn, p-Y416 Fyn, p-Y529 Src, p-Y418 Src) és biotinált anti-rabbit IgG másodlagos antitesttel jelöltük. Avidin-biotin komplexxel (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) történő inkubálás után a fehérje sávokat ECL (Millipore, Billerica, MA, USA) reagenssel tettük láthatóvá.

Leukocyt 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) expresszióját 4 színű jelöléssel áramlási citometriával vizsgáltuk. A kontrolloktól és CLL-es betegektől származó perifériás vért festettük CD19 PC7, 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. 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 kapuztunk.

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 flureszcencia 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 (enhanced chemiluminescence) reagenssel tettük láthatóvá.

Foszfatáz aktivitás mérés

Mágnesessel 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 foszfátáz 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. 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 scintillációs számlálóval mértük. Értékeléskor a normál B-sejtek össz foszfátáz aktivitását 100%-nak vettük.

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 µM SB203580-val (Tocris, Bristol, UK) - specifikus p38MAPK inhibitor- a CLA kezelés előtt. A kezelések után meghatároztuk a pp38MAPK és sejtfelszíni 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 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 (Gaussi eloszlás) valamint Kruskal-Wallis 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 factor, 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. A gyulladásos válaszban a PAF főként a sejt-sejt interakciót irányítja, egyrészt aktiválja a polimorphonukleáris (PMN) sejteket és thrombocyta 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.

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.

LPS hatása a thrombocyta aktivációra

Jelen tanulmányunkban az LPS - mint inflammatórikus 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 rekalcifikált, LPS-stimulált mononukleáris sejt (PBMC) szuszpenzióknak. Mindkét LPS-forma 10 μ g/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 konjugálatlan

Re-LPS-hez ($10,2 \pm 2,4$) képest és ez az MFI értéket tovább emelkedett $10 \mu\text{M}$ TRAP kezelés hatására (ezeket az eredményeket nem ábrázoltuk). Ezt követően megvizsgáltuk, hogy befolyásolja-e az Re-LPS és S-LPS a thrombocytá aggregációt. Önmagában egyik LPS forma sem váltott ki thrombocytá aggregációt $0,1-10 \mu\text{g/mL}$ koncentrációban. Azonban $1 \mu\text{g/mL}$ Re-LPS növelte a szubmaximális aktiváló hatást kiváltó TRAP ($5 \mu\text{M}$) vérlemezke aggregáló hatását, míg az S-LPS nem befolyásolta. 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 $10 \mu\text{g/mL}$ 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 $10 \mu\text{g/mL}$ 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. Ezek mellett szignifikáns emelkedést találtunk ($p < 0,05$) az Re-LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) kiváltotta vérlemezke mikropartikulák (PMP) számában ($450 \pm 170 \text{ PMP}/\mu\text{L}$ plazma), azonban az S-LPS nem befolyásolta a PMP számot ($273 \pm 144 \text{ PMP}/\mu\text{L}$ plazma vs. $227 \pm 95 \text{ PMP}/\mu\text{L}$ plazma a nem kezelt mintában). Megfigyeltük, hogy ezek a szintek mind alatta voltak az $5 \mu\text{M}$ TRAP kiváltott PMP számnak, ráadásul koaktiváció esetében már jóval kisebb koncentrációjú Re-LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) is szignifikánsan fokozta a TRAP PMP képződést kiváltó hatását ($1384 \pm 299 \text{ PMP}/\mu\text{L}$ plazma vs. $970 \pm 145 \text{ PMP}/\mu\text{L}$ plazma; $p < 0,05$). Ezekkel ellentétben az S-LPS-sel történő koaktiváció nem befolyásolta a PMP szintet ($983 \pm 120 \text{ PMP}/\mu\text{L}$ plazma).

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 ($\text{OD} > 0,5$), 11 olyan betegét, akiknek az ELISA teszttel az $\text{OD} = 0,3-0,5$ közötti határértéknek adódott és 40 beteget, akinek negatív lett ($\text{OD} < 0,3$) az ELISA tesztje. Azoknak a betegeknek, akiknek negatív vagy a határértéknek adódott az ELISA tesztje negatív lett a funkcionális tesztje is. Negyven ELISA pozitív betegből 14 betegnek pozitív lett az annexin V kötő tesztje és 17 beteg a PMP tesztje. HIT negatív kontroll plazma nem aktiválta a kontroll egyén thrombocytáját, azonban a HIT pozitív beteg plazmája stimulálta a kontroll egyén thrombocytáját terápiás koncentrációjú heparin ($0,3 \text{ IU/mL}$) jelenlétében. Magas heparin koncentráció (100 IU/mL) jelenlétében a

vérlemezkék 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 vérlemezkét aktiválná.

A továbbiakban megvizsgáltuk az összefüggést a ELISA OD érték és az annexin V kötő és a PMP teszt között. 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. A magas heparin-függő antitest szint a thrombosis kialakulásának megnövekedett valószínűségével társítható.

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 vérlemezke 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.

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.

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. A kísérletek során negatív kontrollként használt nilotinib kezelés a coated-platelet képződést, a PFA-100 vizsgálatot és a thrombocytá aggregációt nem befolyásolta.

Ezen vizsgálatok eredményei alapján felmerült bennünk a kérdés, hogy befolyásolhatja-e a dasatinib kezelés a vérlemezkék 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 egyik részét aktiváltuk a GPVI receptor agonista, konvulxinallal, a másik részét nem aktiváltuk

(nyugvó vérlemezkék). A kezelések után vizsgáltuk a nyugvó és az aktivált vérlemezkék 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. 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. A thrombin képződés gyorsabb volt a konvulxin aktivált mintában, ezt mutatja a lagtime és time to peak érték szignifikáns rövidülése. 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. Továbbá, 100 nM dasatinib szintén szignifikánsan gyengítette a peak thrombint, de nem volt hatása az ETP értékre a konvulxinnal aktivált mintában. Tíz nM dasatinib és a nilotinib nem befolyásolta a thrombin képződés egyetlen paraméterét sem.

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. Alvadék retrakció vizsgálata során a 60 perces inkubációs idő letelte után a nem aktivált minta intenzív alvadék retrakciót mutatott. Míg a konvulxinnal aktivált mintában az alvadék retrakció kevésbé volt intenzív. Azonban, 100 nM dasatinib előkezelés szignifikánsan növelte a kiszorított szérum térfogatát a konvulxinnal aktivált mintában. A nilotinib és a 10 nM dasatinib előkezelés jelentősen nem befolyásolta sem az integrin aktivációt sem az alvadék retrakciót.

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 előkezeltünk 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.

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). 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. Ezzel egyidőben a CLL-es betegek plazmájából mért L-szelektin szint szignifikánsan magasabbnak adódott, de amikor a plazma L-szelektin szintet normáltuk 10^6 fehérvérsejtszámra a szolubilis L-szelektin érték alacsonyabbnak adódott a CLL-es betegekben. Azoknál a betegeknél, ahol az abszolút lymphocyták 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.

A CLL-es betegek T-sejtjein is alacsonyabb volt az L-szelektin expresszió, de a különbség kevésbé volt hangsúlyozott. Az L-szelektin szolubilis formája származhat a lymphocyták és neutrophilek felszínéről is. 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.

A továbbiakban olyan vizsgálatokat végeztünk, amelyek hozzásegítenek 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.

Ezután megmértük az össz és PP1 inhibitorral a PP2A foszfataz 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.

Ezt követően *in vitro* kísérletekben CLL-es betegek B-sejtjeit és normál B-sejteket előkezeltünk calyculin A (CLA) foszfatáz 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. 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.

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. Hasonlóan ezekhez a változásokhoz, 5 nM CLA által kiváltott L-szelektin csökkenés kisebb mértékű volt a p38MAPK inhibitorral történő előkezelés után.

MEGBESZÉLÉS

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

A patológiás folyamatokhoz hozzájáruló thrombocyták karakterizálásához és a folyamatokban betöltött komplex szerepük jobb megértéséhez technikailag és metodológiailag megfelelően kidolgozott laboratóriumi funkcionális tesztekre van szükség. A thrombocyta aktiváció eredményezhet „klasszikus” aktivációt, mely a vérlemezke aggregációt az alvadék retrakciót és bizonyos aktivációs markerek többek között a P-szelektin, CD40L (CD154) és az aktivált GPIIb/IIIa expresszió emelkedését jelenti. Az „alternatív” biomarkerek a thrombocyta 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.

Kutatásainkban gyulladáso- és immunmediátorok mellett tirozin kináz inhibitorok (TKI) hatását vizsgáltuk a vérlemezke receptorokra, szignalizációra és funkcióra, valamint leukocytákon az L-szelektin adhézios receptor modulációját tanulmányoztuk CLL-ben.

In vitro tanulmányunkban két LPS forma, az Re-LPS (*Salmonella minnesota, Re595*) és az S-LPS (*Escherichia coli, O111:B4*) hatását vizsgáltuk a vérlemezke aktivációra és funkcióra. Kísérleteink hátterében 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. 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,

azonban az LPS nagyon magas koncentrációban (100 µg/mL) fokozza a P-szelektin expressziót. Eredményeinkkel ellentétben Vallance és munkatársai kimutatták, hogy a *S. minnesota* LPS 2 µg/mL szuprafiziológias 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.

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.

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 vérlemezkét, ami thrombocytophenia 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 szignifikáns pozitív összefüggést találtunk az ELISA OD érték és a funkcionális teszt pozitivitása között mindkét vizsgált aktivációs marker vizsgálata esetén. 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, 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 hemorragias komplikációk kialakulásához vezethet, mely túlnyomó részt gastrointestinalis vérzés, míg a nilotinib aktiválja a vérlemezkéket és az endotheliumot, ezáltal potenciálja a thrombocyta adhéziót és a thrombus képződést.

In vitro tanulmányunkban klinikailag releváns koncentrációjú dasatinib és nilotinib hatását vizsgáltuk a vérlemezke aktivációra és funkcióra. Korábbi in vitro tanulmányok eredményeivel összhangban 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. Ezen vérlemezke funkcionális vizsgálatok mellett, melyek a thrombocyták elsődleges hemosztázisban betöltött szerepéről nyújtanak információt, 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 ezidáig semmilyen adatot nem közöltek, ezért következő in vitro tanulmányunkban klinikailag releváns koncentrációjú TKI hatását vizsgáltuk a prokoaguláns vérlemezke képződésre. A kísérleti eredményeink tisztán mutatták, hogy a magasabb terápiás tartományban (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. 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.

A dasatinib a BCR-ABL tirozin kinázon kívül gátolhatja az SFK közül a Lyn, Fyn és Src kinázokat, melyek regulátorai a GPVI receptoron keresztül véralémezke szignalizációnak és aktivációnak. Azonban ezekből az adatokból nem lehet azt következtetni levonni, hogy a dasatinib az SFK-k gátlásán keresztül fejt ki gátló hatását a véralémezke funkciókra. Ezen kérdés tisztázására Western blottal vizsgáltuk az SFK-k foszforilációs státuszát dasatinib előkezelte és konvulxinallal aktivált véralémezkekben. Korábbi közleményekkel összhangban 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. A PS expresszióra kifejtett hatással összhangban, amikor a véralémezkek 10 nM dasatinibbal voltak előkezelve a konvulxin képes volt kifejteni aktiváló hatását a véralémezkekre, azonban 100 nM dasatinib teljesen megszüntette ezt a hatást. Ez a hatás teljesen megegyezett azzal, amit a PS expresszióval megfigyeltünk.

Régóta megfigyelt, hogy CML-ben a dasatinib terápia vérzéses tünetekhez vezethet, aminek a hátterében különböző okok állhatnak. A dasatinib kezelés thrombocytopéniához és -eredményeinkből is látjuk - véralémezke diszfunkcióhoz vezet, de nem találtak összefüggést a romló thrombocyta funkció és a vérzéses tünetek között ugyanakkor megállapították, hogy a vérzéses komplikációk kialakulását in vitro véralémezke aggregációs tesztekkel nem lehet előre jelezni. A dasatinib a véralémezkeken kívül a keringésben más sejtekre is kifejtheti hatását az endothel sejteken keresztül átmeneti vaszkuláris szivárgáshoz és eryptosishoz vezethet, ami PS expresszió emelkedésével jár. 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 véralémezke funkciókra és feltártunk egy mechanizmust, ami a megfigyelt jelenséghez vezethet. A dasatinib előkezelés gátolta a GPVI receptoron keresztül véralémezke 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. 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 expresszáldó 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 adhézións 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), 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. CLL-ben a betegség lefolyását a leukémiás sejtek felszínén expresszáldó adhézións 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 ex vivo beteg minták vizsgálata során azt találtuk, hogy a kóros B-sejtek felszínén az L-szelektin expresszió csökkent, amihez emelkedett szolubilis L-szelektin szint társult. A felszíni L-szelektin expresszió korrelált a CLL-es beteg állapotával, amit a Rai stadiumba 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. CLL-ben alkalmazott prognosztikai markerek a lymphocytá kettőződési idő, CD38 és ZAP70 expresszió az IGHV státusz és bizonyos citogenetikai eltérések. Shanafelt és csoportja CLL-ben a CD49d adhézións fehérje expresszióját az általános túlélés (OS) független előrejelzőjének és emellett jobb prognosztikai faktornak találta, mint a ZAP-70, IGHV státusz vagy a citogenetikai eltérések. A CD49+ CLL-es sejtek proliferációs képessége magasabb, mint a CD49- sejteké, tehát a CD49 mintázat ismerete javíthatja ezen biomarker prognosztikai jelentőségét. 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. 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. 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 adhéziós fehérje downregulációjához vezethet.

ÖSSZEFOGLALÁS

Patológiás 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 kaszkádot, melynek eredménye a megváltozott thrombocyta aktiváció. Ezen folyamatok 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 patológiás folyamat illetve gyógyszeres kezelés során vérlemezkeken és fehérvérsejteken egyaránt.

Tanulmányainkban különböző LPS formák, anti-PF4/heparin autoantitest és TKI-k hatását vizsgáltuk az immunreceptorokon keresztüli vérlemezke aktivációra és funkcióra, valamint meghatároztuk a fehérvérsejteken expresszálandó 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 TRAP 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 pp38MAPK szintet és csökkent L-szelektin expressziót eredményezett.

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 hozzájárulhat a dasatinibet szedő betegek vérzéses tüneteinek, emellett felvethetik a gyógyszer felfüggesztésének szükségességét invazív beavatkozás esetén, míg 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 foszfátáz 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.



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

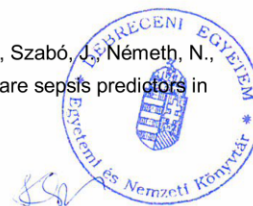
1. Mezei, G., **Bekéné Debreceni, I.**, Kerényi, A., Reményi, G., Szász, R., Illés, Á., Kappelmayer, J., Batár, P.: Dasatinib inhibits coated-platelet generation in patients with chronic myeloid leukemia.
Platelets. 30 (7), 836-843, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/09537104.2018.1501470>
IF: 3.106 (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. Misztó-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 érkezők alapján 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.

