

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A P-Szelektin Glikoprotein Ligand-1 szerepének
vizsgálata sejt-sejt interakcióban**

Dr. Miszti-Blasius Kornél

Témavezető: Dr. Kappelmayer János



Debreceni Egyetem

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2014

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	4
2. Bevezetés.....	6
3. Irodalmi áttekintés.....	8
3.1. A szelektin család.....	8
3.1.1. Történeti áttekintés.....	8
3.1.2. A szelektinek szerkezete és funkciója.....	9
3.2. A PSGL-1 molekula.....	11
3.2.1. A PSGL-1 szerkezete és szerepe áramlási körülmények között.....	10
3.2.2. Adhéziós molekulák szerepe thrombosisban és gyulladásban.....	12
3.2.3. A P-szelektin és a PSGL-1 szerepe egyéb betegségekben.....	13
3.2.4. A P-szelektin és a PSGL-1 kapcsolódásának blokkolása.....	15
3.3. Thrombosis modellek.....	16
3.3.1. Egér thrombosis modell.....	16
3.3.2. Antitrombin (AT) deficiens heterozigóta egerek vizsgálata.....	17
3.3.3. Vas-klorid (FeCl ₃) kezelés hatása.....	17
3.3.4. Laser-indukált thrombosis modell.....	18
3.4.1. Csontvelői sejtek mobilizálása.....	18
3.4.2. Hemopoetikus őssejtek mobilizációja állatkísérletes modellben.....	21
3.4.3. Hemopoetikus őssejtek mobilizációja a klinikai gyakorlatban.....	21
4. Célkitűzések.....	23
5. Anyagok és módszerek.....	24
5.1. A kísérleti állatok jellemzése.....	24
5.2. Thrombosis kiváltása egerekben.....	24
5.3. Vérvétel és sejtszám meghatározás.....	24
5.4. Fibrin meghatározás a tüdőben.....	25
5.5. A szövetek feldolgozása hisztológiai és immunhisztokémiai vizsgálatokhoz.....	25
5.6. Thrombocytá-fehérvérsejt aggregátumok detektálása.....	26
5.7. Indukált citopéniát követő sejtmobilizáció G-CSF hatására.....	26

5.8. A PSGL-1 expresszió kvantitatív vizsgálata.....	27
5.9. Immunhisztokémiai vizsgálatok femur metszeteken	28
5.10.1. Mononukleáris sejteket tartalmazó sejtsuszpenzió készítése perifériás vérből.....	29
5.10.2. Sejtsuszpenzió készítése femorális csontvelőből	29
5.10.3. Kolónia esszé.....	29
5.11. Statisztikai elemzések.....	30
6. Eredmények.....	31
6.1. A PSGL-1 hiány protektív hatása a thrombosist kiváltó stimulusokkal szemben	31
6.2. Fibrin lerakódás a tüdőben	33
6.3. A thrombusok morfológiai elemzése	34
6.4. Heterotipikus aggregátumok keletkezése.....	35
6.5. Fehérvérsejtek eliminációja a keringésből indukált citopénia során.....	36
6.6. Spontán és G-CSF indukált fehérvérsejt mobilizáció	38
6.7. A G-CSF hatása a PSGL-1 expresszióra.....	40
6.8. CFU-GM vizsgálat a perifériás vérben és a csontvelőben	40
6.9. Óssejtek vizsgálata perifériás vérben és csontvelőben.....	43
7. Megbeszélés	45
8. Összefoglalás.....	51
9. Summary	52
10. A disszertáció új eredményei, megállapításai, klinikai jelentősége	53
11. Irodalomjegyzék.....	54
12. Publikációs lista.....	71
13. Tárgyszavak/Keywords	74
14. Köszönetnyilvánítás	75
15. Támogatások	76
16. Függelék.....	77

1. Rövidítések jegyzéke

ABC	Antibody binding capacity
ACD	Acid citrate dextrose
ANOVA	Analysis of variance
APC	Allophycocyanin
AT	Antithrombin
BSA	Bovine serum albumin
CD	Cluster of differentiation
CFU	Colony forming unit
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
Cy	Cyclophosphamide
EDTA	Ethylene diamine tetra-acetate
EGF	Epidermal growth factor
EP	Erythropoietin
FITC	Fluorescein isothiocyanate
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GMP-140	Granule membrane protein 140
HPC	Hematopoietic progenitor cell
HSC	Hematopoietic stem cell
HSPC	Hematopoietic stem and progenitor cells
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
MMP9	Matrix metalloproteáz-9
NE	Neutrophil elastase
PADGEM	Platelet activation dependent granule-external membrane protein
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll protein complex

PMN	Polymorphonuclear (granulocyte)
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand 1
SD	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TP	Thrombopoietin
TRAP	Thrombin receptor activating peptide
U/L	Unit/Liter
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	Very late antigen-4
WT	Wild-type

2. Bevezetés

A P-Szelektin Glicoprotein Ligand-1 (PSGL-1) a myeloid sejtek felszínén konstitutív módon expresszálandó glikoprotein. Szerkezetét tekintve egy dimer mucin, melynek citoplazmatikus doménje a sejten belüli citoskeletális hálózathoz kapcsolódik, az extracelluláris része pedig a P-, E-, és L-szelektin közös ligandja. A P-szelektin (P=platelet) az aktivált vérlemezkék és endothel sejteken található, az E-szelektin (E=endothel) csak az aktivált endothel sejtek felszínén jelenik meg, míg az L-szelektin (L=leukocytá) folyamatosan jelen van a fehérvérsejtek felszínén.

A P-szelektin és PSGL-1 összekapcsolódása segíti a myeloid sejtek kötődését az aktivált endothelsejtekhez, ezáltal áramlási körülmények között a mozgásuk lelassul, a fehérvérsejtek elkezdenek gördülni (rolling) és ezzel kezdetét veszi az érpályából történő kilépésük folyamata, melyben további adhéziós molekulák (integrinek) is szerepet játszanak. A szelektinek és ligandjuk kapcsolódása fontos szerepet tölt be a myeloid sejtek és a vérlemezkék közti „heterotipikus aggregátumok” kialakulásában, valamint ezen vegyes aggregátumoknak az aktivált endothel sejtekhez való kapcsolódásukban is érelmeszesedés, illetve thrombosis során. A heterotipikus aggregátumok jelenléte érzékeny markere a vérlemezke aggregációnak. Megfelelő aktiváció után a Th-1 lymphocyták felszínén is megjelenhet a PSGL-1, mely segíti ezen lymphocyták eljutását a nyirokcsomókba.

Tumoros megbetegedésben az áttét-képződés gyakorisága (és ezáltal a prognózis súlyossága) arányos a tumorsejtek felszínén található adhéziós molekulák mennyiségével. A tumorsejt-vérlemezke-fehérvérsejt komplexből álló embólus könnyebben megtapad távoli szervekben és növeli a metasztázisok számát.

A P-szelektin és PSGL-1 kapcsolódásának nemcsak a fehérvérsejteknek az érpályából történő kijutásában, hanem a csontvelőből történő mobilizációjában is fontos szerepe van, ugyanis a hemopoetikus őssejteknek (HSC) a csontvelői extracelluláris mátrixhoz történő rögzítését is meghatározza ezen kötődés erőssége. Amikor a csontvelőből gyorsabb fehérvérsejt mobilizációra van szükség (fertőzések során, citosztatikus kezelések után), a granulocytá kolóniastimuláló faktor (G-CSF) hatására gyorsul a hemopoetikus őssejtek kijutása a perifériás vérbe. A G-CSF serkenti azoknak az enzimeknek (neutrophyl elasztáz, katepszin G, mátrix-metalloproteáz-9) az aktivitását, melyek a HSC és az extracelluláris mátrix „horgonyzó molekulák” (beleértve a P-szelektin és PSGL-1 közti rögzítést) közti kapcsolódást bontják.

A kísérleteink során az volt a hipotézisünk, hogy a szelektinek és a PSGL-1 közötti kapcsolódás hiányában, állatkísérletes modellben megváltozhat bizonyos thrombotikus stimulusok hatására az állatok túlélése és a vérrög-képződés mértéke.

Egy másik tanulmányban pedig arra kerestünk választ, hogy indukált citopénia hatására hogyan csökken a fehérvérsejtek száma az eliminációs fázisban, valamint spontán módon, illetve exogén G-CSF adagolásával milyen sebességgel és milyen mértékben mobilizálódnak a fehérvérsejtek a csontvelőből. Azt feltételeztük, hogy az eliminációt és a prekursor sejtek felszabadulását a PSGL-1 hiány modulálhatja.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A szelektin család

3.1.1. Történeti áttekintés

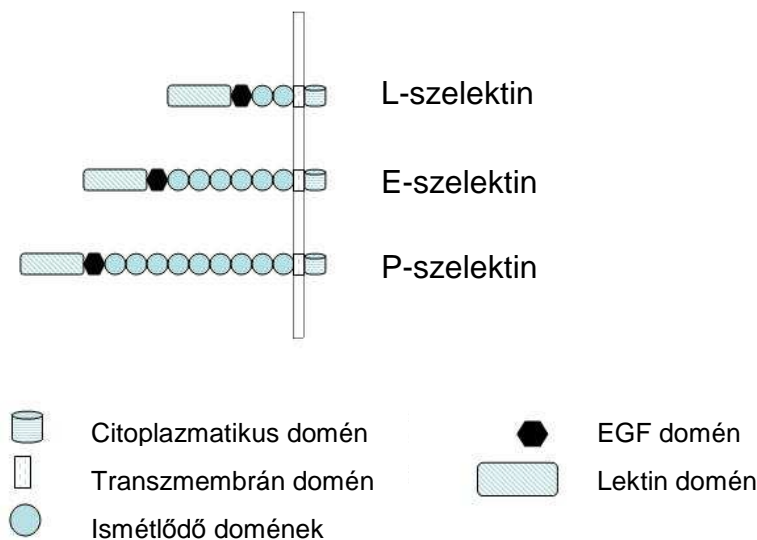
A P-szelektint 1984-ben két kutatócsoport egymástól függetlenül írta le. McEver munkacsoportja beszámolt egy monoklonális antitestről (S12), mely csak aktivált thrombocytákhoz kötődik (McEver et al. 1984). Ezzel párhuzamosan Furie munkacsoportja is azonosított egy thrombocytá felszíni receptort egy antitesttel (KC4) a thrombin-aktivált vérlemezkéken (Hsu-Lin et al. 1984), mely a PADGEM (platelet activation dependent granule-external membrane protein) nevet kapta. Egy évvel később bebizonyosodott, hogy a két munkacsoport ugyanazt a fehérjét azonosította. Ez egy 140 kDa tömegű transzmembrán glikoprotein, melyet ekkor GMP-140 (Granule Membrane Protein 140) molekulának neveztek el. Az 1990-es évek elejétől az irodalomban egyre inkább P-szelektin néven említik (McEver 1991).

A P-szelektin a szelektin család (P-, E-, L-szelektin) egyik tagja, melyet emberben és egerekben az 1-es kromoszómán található gén kódol (Watson et al. 1990).

A P-szelektin biológiai funkciója sokáig nem volt tisztázott, de később felismerték, hogy az aktivált vérlemezkék és myeloid sejtek közti interakcióban kulcsszerepet játszik (Larsen et al. 1989, Hamburger et al. 1990). Még ugyanebben az évben leírták, hogy az aktivált endothel sejtek és a neutrophyl granulocyták közti kapcsolódásban a P-szelektin játszik közre (Geng et al. 1990). Ezek után már csak arra kellett választ találni, hogy mi a ligandja az aktivált thrombocytáknak és aktivált endothel sejteknek. McEver munkacsoportja 1991-ben egy lektin-szerű ligand lehetőségét írta le (Moore et al. 1991), de pl. Larsen kutatócsoportja inkább a CD15 sejt felszíni antigént tartotta felelősnek a sejtek közti interakcióért (Larsen et al. 1990). Végül Moore azonosította először a myeloid sejtek felszínén a P-szelektin ligandját, a P-szelektin glikoprotein ligand-1 (PSGL-1) molekulát (Moore et al. 1992), melyet hamarosan meg is klónoztak (Sako et al. 1993).

3.1.2. A szelektinek szerkezete és funkciója

A lektinek több csoportra oszthatók a kapcsolódó partner kémiai tulajdonsága alapján, melyek az alábbiak: S-típusú (szabad tiol csoport), P-típusú (mannóz-foszfát), I-típusú (immunglobulin) és C-típusú (Calcium). A szelektinek a C-típusú lektinek alcsoportjába tartoznak és a vérlemezkék, illetve myeloid sejtek érfalhoz (és egymáshoz) történő kapcsolódását segítik (Kappelmayer et al. 2004). Minden szelektin tartalmaz egy lektin, egy epidermális növekedési faktor (EGF) domént, változó számú ismétlődő szakaszt, egy membránon átívelő - transzmembrán - szakaszt és egy citoplazmatikus részt (Ushiyama et al. 1993) (1. ábra).

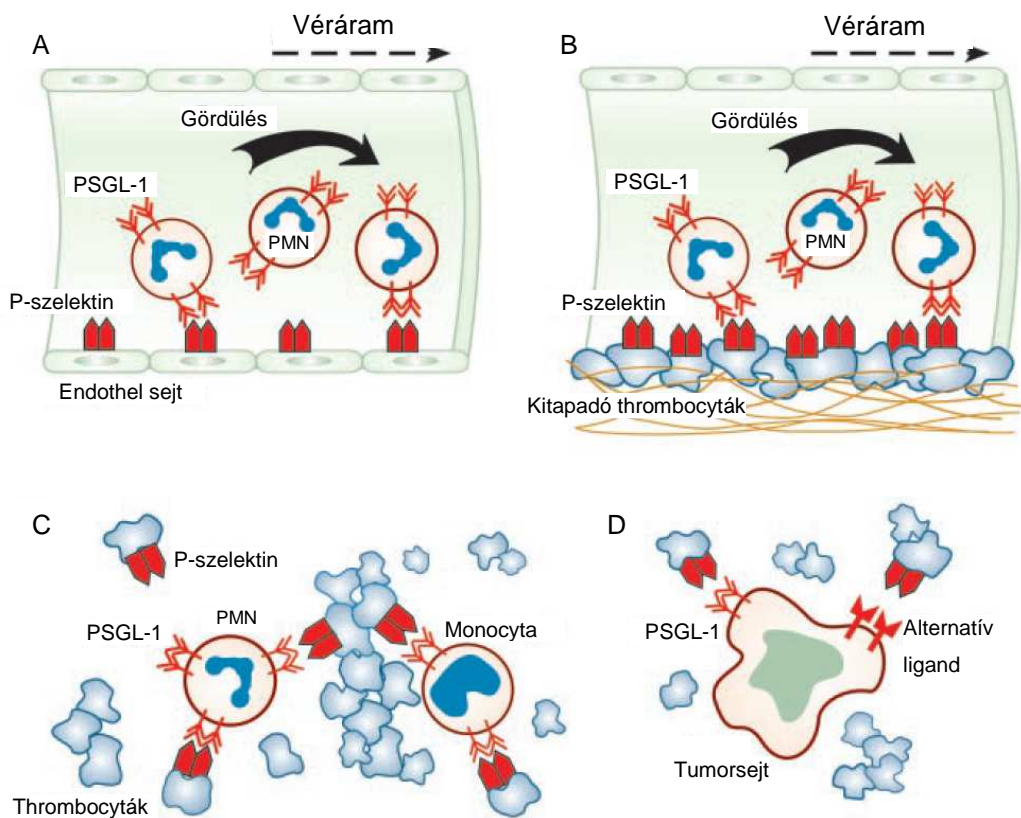


1. ábra. A szelektinek szerkezete. A szelektinek szerkezete nagyon hasonló: egy rövid intracelluláris doménből, transzmembrán doménből, változó számú ismétlődő egységből, egy EGF szakaszból és egy lektin részből állnak. (Az ábra Kappelmayer és munkatársai (2004) ábrája alapján, annak módosításával készült).

Az L-szelektin folyamatosan jelen van a fehérvérsejtek felszínén, bár a sejtfelszíni sűrűsége változhat agonisták és antagonisták hatására (Salmi et al. 1992). Az E-szelektin csak az aktivált endothel sejtek felszínén jelenik meg (egyébként a Weibel-Palade testekben raktározódik) (Bonfanti et al. 1989, da Costa Martins et al. 2007, McEver et al. 1989). A P-szelektin pedig az aktivált vérlemezkék felszínén és endothel sejteken található (Yao et al. 1999).

A szelektinek kölcsönhatásba léphetnek a ligandjukkal a nyirokerek, az endothel sejtek és fehérvérsejtek felszínén, így változatos sejt-sejt interakciókban játszanak központi szerepet (Cerletti et al. 2012, Klinkhardt et al. 2005, Mayadas et al. 1993).

Mindhárom szelektin közös ligandja a PSGL-1 (CD162). A lektinek és receptoraik között gyorsan és reverzibilis módon alakulnak ki a kapcsolatok, ezzel megfelelő körülményeket teremtenek a fehérvérsejteknek az áramló vérben fellépő nyíróerők mellett a lelassuláshoz, gördüléshez („rolling”) és érpályából történő kilépéshez (Eto et al. 2005, Figueiredo et al. 2013, Miner et al. 2008, Sundt et al. 2013) (2. ábra).



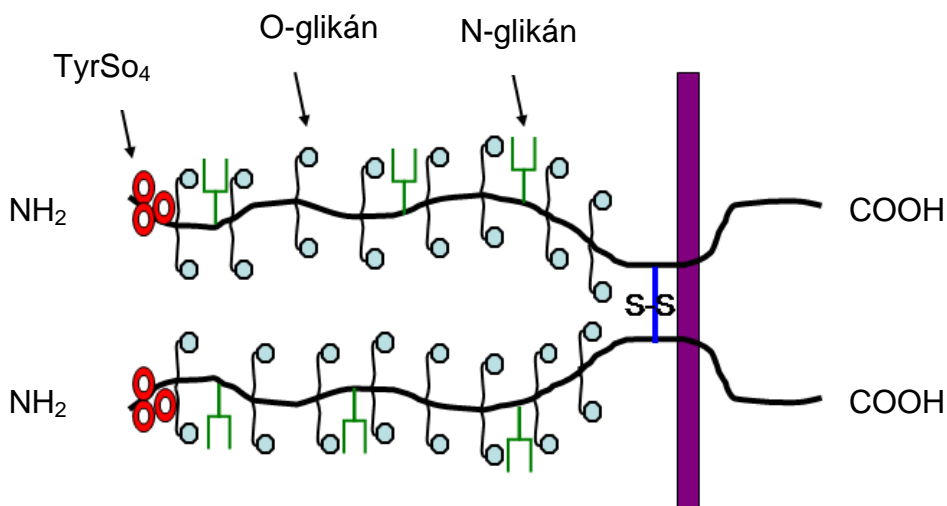
2. ábra. P-szelektin és PSGL-1 mediált sejt-sejt interakciók. A P-szelektin és PSGL-1 összekapcsolódása segíti a myeloid sejteknek az aktivált endothel sejtekhez (A), vagy aktivált thrombocytákhoz (B) történő kötődését, mozgásuk lelassulását (rolling). A P-szelektin és PSGL-1 kapcsolódása segíti a thrombocyták adhézióját a neutrophyl granulocytákhoz (PMN) és ezáltal jönnek létre a heterotipikus aggregátumok (C). A tumorsejtek áttét-képzésében is szerepet játszanak a sejt-sejt interakciók, amikor a tumorsejtek felszínéhez hozzákapcsolódnak a vérlemezkék, vagy a fehérvérsejtek és ezáltal „elfedik” a kóros sejtek felszíni antigénjeit (D). (Az ábra Zimmerman (2001) ábrája alapján, annak módosításával készült).

3.2. A PSGL-1 molekula

3.2.1. A PSGL-1 szerkezete és szerepe áramlási körülmények között

A P-Szelektin Glikoprotein Ligand-1 egy glikoprotein (szialomucin), mely egérben az 5-ös, emberben a 12-es kromoszómán lokalizált gén terméke (Yang et al. 1996, Veldman et al. 1995). Konstitutív módon a myeloid sejtek felszínén expresszálódik (Zarbock et al. 2009). Szerkezetét tekintve egy dimer mucin (3. ábra), melynek citoplazmatikus doménje a sejt belüli citoskeletális hálózathoz kapcsolódik (Baïsse et al. 2007).

A szénhidrátláncok megfelelő elrendeződése és szulfatációja elengedhetetlen a P- és L-szelektinhez történő kapcsolódáshoz (Li et al. 1996, Ramachandran et al. 1999). Az E-szelektinhez való kötődéshez kevésbé fontosak ezek a poszttranszlációs módosítások (Khan et al. 2003, Li et al. 1996, Vestweber et al. 1999). A PSGL-1 O-glikozilációját az N-acetilgalaktózamin transzferáz (ppGalNAcT) enzim végzi, melynek hiányában in vitro körülmények között a fehérvérsejtek kevésbé kötődnek a P- és E-szelektinhez (Lo et al. 2013, Tenno et al. 2007, Zarbock et al. 2011).



3. ábra. A PSGL-1 molekula szerkezete. A két 120 kDa tömegű polipeptidláncot egy diszulfid híd köti össze. Az O-kötött glikánoknak fukoziláción és szializáción kell átesniük ahhoz, hogy megfelelő módon kötődni tudjanak a receptoraikhoz. (McEver RP 2001 közleménye alapján).

PSGL-1^{-/-} (knockout, röviden KO) egereken végzett kísérletek azt mutatták, hogy a perifériás vérben magasabb a neutrophyl granulocyták száma mint a kontroll populációban. Patkányban termelt P-szelektin IgM kiméra antitestek nem kötődtek a KO egerek neutrophyl granulocytáinak felszínéhez. Az E-szelektin IgM kiméra antitestek hozzákötődtek a PSGL-1^{-/-} egerek neutrophyl granulocytáihoz, de 70%-kal kevesebb mennyiségben mint a PSGL-1^{+/+} állatoknál. Áramlási körülmények között szignifikánsan kevesebb neutrophyl granulocytá lassult le és kezdett „gördülő” mozgást a KO törzsben. A neutrophyl granulocyták a vad típusú egerekben láncokban, csoportokban helyezkedtek el, míg a KO állatoknál egyenként tapadtak ki a kísérleti modellben. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy a PSGL-1 molekulának a neutrophyl granulocyták extravasziója során a kezdeti fázisban, a lelassulásban van nagyobb szerepe és nem a kikötődésben (Xia et al. 2002).

3.2.2. Adhéziós molekulák szerepe thrombosisban és gyulladásban

A fejlett világban vezető halálokok között szerepelnek a szív- és érrendszeri, valamint a thrombotikus megbetegedések (Jackson 2011), melyek patogenezisében a vérlemezkék aktivációja és azok interakciói alapvető szerepet játszanak.

A vérlemezkék több útvonalon keresztül aktiválhatók állatkísérletekben egészen addig, amíg az ereket elzáró thrombus létrejön (Théorêt et al. 2006). A subendothelialis kollagénnel történő érintkezés játszik legtöbbször közre a trombocyták aktiválásában és thrombotikus megbetegedésekben, olyan (fiziológiásan is jelenlévő) anyagokkal közreműködve, mint az adrenalin, ADP, vagy trombin (Renné et al. 2005).

Az aktivált vérlemezkékben gyorsan mobilizálódik az alfa-granulumokból a P-szelektin, mellyel a neutrophyl granulocytákhoz tudnak kapcsolódni (Leon et al. 2004, Li et al. 2004).

Az érlemezés kezdeti lépései szoros összefüggésben állnak az endothel sejtek károsodásával, miáltal fokozódik a hajlam a vérrögképződésre. A vérlemezkék és endothel sejtek közti kommunikációban a P-szelektin és a PSGL-1 molekula közti interakció központi szerepet játszik. Az aktivált endothel sejtekhez nagyobb affinitással kapcsolódnak a vérlemezkék és a fehérvérsejtek (Matsukawa et al. 2002, Slotta et al. 2009). Ennek következménye egy folyamatosan fennálló gyulladás, mely további fehérvérsejteket vonz a gyulladás helyszínére, melyekből újabb gyulladást mediátorok szabadulnak fel és ezáltal egy önmagát erősítő folyamat jön létre (Cambien et al. 2004, Myers et al. 2003, Tsakiris et al. 1999). Bizonyos körülmények között az aktivált lymphocyták felszínén is megjelenhet a PSGL-1.

Borges és munkatársai nyirokcsomói lymphocytákat izoláltak és IL-12-t, IFN- γ -t adtak a sejt kultúrához, elősegítve a Th1 sejtekké történő differenciálódást. (IL-4 hozzáadásakor Th2 sejtekké differenciálódtak a lymphocyták). Azt tapasztalták, hogy a Th1 sejtek felszínén megjelenik a PSGL-1, ami hozzá tud kötődni a P-szelektinhez és ez a kötődés PSGL-1 ellenes antitesttel blokkolható (Borges et al. 1997).

A thrombocytá-monocytá, illetve a thrombocytá-neutrophyl granulocytá aggregátumok a vérlemezke aktiváció érzékeny markerei egérkísérletben (Michelson et al. 2001) és az emberi megbetegedésekben (Kaplar et al. 2001).

Ischaemias stroke-ban szenvedő betegeknél azt találták, hogy a thrombocyták aktiváltsági állapotát jellemző P-szelektin mennyisége 2-2,5-szer magasabb volt, mint a kontroll populációban (Marquardt et al. 2002). Összességében a P-szelektin és a PSGL-1 közti interakció az artériás thrombosisban játszik elsősorban szerepet.

3.2.3. A P-szelektin és a PSGL-1 szerepe egyéb betegségekben

Diabetes mellitusban szenvedő betegeknél szintén magasabb volt a szolubilis P-szelektin mennyisége, mely utalhat a betegség súlyosságára (Tschoepe 1995). Az aktivált endothel sejtek és az aktivált vérlemezkék felszínén megjelenik a P-szelektin, melyhez a myeloid sejtek a PSGL-1 molekulán keresztül kapcsolódnak. Ha több thrombocytá aktiválódik, akkor nagyobb az esélye a thrombocytá-monocytá heterotipikus aggregátumok kialakulásának (Sobol et al. 2000). A fehérvérsejt-vérlemezke vegyes aggregátumok prokoaguláns hatásúak, oxidatív és mitogén anyagokat szabadítanak fel, valamint mikroembólusokat hozhatnak létre. Diabetes mellitusban szenvedő betegekben a vérlemezkéknek a neutrophyl granulocytákkal, vagy lymphocytákkal alkotott heterotipikus aggregátumainak a mennyisége nem különbözik az egészséges emberektől, de a monocytákkal alkotott aggregátumok száma szignifikánsan magasabb (Kaplar et al. 2001). A heterotipikus aggregátumok kialakulásában a PSGL-1 és a P-szelektin közti kapcsolódás alapvető jelentőségű.

Elhízott betegekben, diabetes mellitusban a thrombocytá P-szelektin és a szolubilis P-szelektin (a thrombocyták aktivációjának markere) mennyisége szignifikánsan magasabb, mint egészségesekben és a testtömeg-indexszel (BMI) jól korrelál (Csongrádi et al. 2011).

Tumoros megbetegedésekben a prognózis súlyossága és az áttét-képződés gyakorisága arányos a tumorsejtek által termelt mucin mennyiségével. A metasztázis képződést elősegíti a tumorsejt-vérlemezke-fehérvérsejt komplexből álló embólus kialakulása és ennek interakciója az endothel sejtekkel távoli szövetekben.

A P-szelektin kölcsönhatásba kerül a PSGL-1 molekulával és ez az interakció segíti a tumorsejtek megtapadását (Barthel et al. 2007, Fischer et al. 1999, Shao et al. 2011). Ezt PSGL-1 hiányos egereken végzett tanulmányokban is alátámasztották: subcutan beültetett humán colon carcinoma sejtekből álló tumor lassabban növekedett, illetve ha intravénásan juttatták be a tumorsejteket, akkor kevesebb tüdőáttét alakult ki a kontrollhoz képest (Kim et al. 1998). Yamaoka és munkatársai PSGL-1, E-szelektin, illetve P-szelektin hiányos egereknél vizsgálata a tumor metasztázis és az adhézis molekulák kapcsolatát. B16 melanoma sejtvonalat juttattak be subcutan az egerek bőre alá és vizsgálták a primertumor növekedését és a metasztázisképzést. A melanoma sejtek subcutan helyi növekedését segítette a PSGL-1, a P-szelektin, vagy az E-szelektin hiánya. A tüdőmetasztázisok számát csökkentette az E-szelektin hiánya. A primer tumor növekedését elősegítette az NK (Natural Killer) sejtek és a CD8+ T-sejtek csökkent felszaporodása, míg a csökkent metasztázisképzés hátterében a CD8+ T-sejtek „megmaradása” állhatott a perifériás vérben (Yamaoka et al. 2011).

Az aktivált endothel sejtek felszínén nagy mennyiségben jelenik meg a P-szelektin, melyhez a neutrophyl granulocyták nagy affinitással kapcsolódnak. A felhalmozódó neutrophyl granulocyták felszínén szintén nagy mennyiségben van jelen a P-szelektin (mely valószínűleg az aktivált thrombocyták és endothel sejtekről hasadt le), melynek kóroki szerepe lehet a felnőttkori respirációs distressz szindróma, akut tüdőelégtelenség, Gram-negatív baktériumok okozta szepszis és rheumatoid arthritis kialakulásában (Ehrhardt et al. 2004).

A rheumatoid arthritis (RA) kezdeti fázisára jellemző a hiperpláziás synovium, melyben a gyulladós sejtek proinflammatorikus citokineket szekretálnak, pl. tumor nekrozis faktort (TNF- α) és interleukin 1-t (IL-1). Állatkísérletes modellben a rheumatoid arthritist II.-típusú kollagén (CII) szisztémás adagolásával szokták modellezni (Collagen-Induced Arthritis: CIA). A RA-hez hasonlóan CIA-re is a gyors kezdet, az ízületi porc és csont gyors károsodása jellemző. A TNF és az IL-1 az ízületi folyadékban felszaporodó gyulladós sejtekből származik. Rekombináns PSGL-1 immunglobulin kimérát (rPSGL-1-Ig) alkalmazva az állatok fizikális állapota is javult és a szövettani képen is a gyulladás csökkenését figyelték meg. (Sumariwalla et al. 2004). A folyamat hátterében az állhat, hogy a PSGL-1-P-szelektin kapcsolat blokkolása által a gyulladós sejtek nehezebben tudnak eljutni az ízületekbe, kevesebb citokin halmozódik fel az ízületi folyadékban és ez kisebb kemotaktikus ingert jelent az érpályából amúgy is lassabban átjutó sejteknek.

Szeptikus tüdőgyulladásban az arteriolákban és venulákban a PSGL-1 a domináns molekula, mely közrejátszik a fehérvérsejtek gördülésében (rolling) (Asaduzzaman et al. 2008, Roller et al. 2013).

Sclerosis multiplexben is felmerült, hogy a PSGL-1 expresszióinak jelentősége lehet az autoimmun folyamat kialakulásában. A CD4 PSGL-1+ T-sejtek könnyebben átjutnak a vér-agy gáton és közrejátszhatnak az agykárosodásban (Bahbouhi et al. 2009, Engelhardt 2009).

Állatkísérletes modellben mesterséges epeúti elzáródást kiváltva megfigyelték, hogy a PSGL-1 blokkolásával csökken a májsejtkárosodás mértéke, mert kevesebb leukocytá jut el a májsejtekhez (Dold et al. 2010).

Endothel sejtek felszínén bizonyos kóros körülmények között megjelenhet a PSGL-1 molekula, például prosztata jóindulatú megnagyobbodásában, vagy az emlő fibrocisztás elváltozásában (Laszik et al. 1996).

3.2.4. A P-szelektin és a PSGL-1 kapcsolódásának blokkolása

A hagyományos thrombocytá-funkció gátló kezelések (ciklooxygenáz gátló, ADP-receptor antagonistá) széles körben elterjedtek, de bizonyos esetekben az alkalmazásuk korlátozott („non-responder” személyek, vérzésveszély). Ilyen esetekben alternatív vérlemezke aggregáció gátló kezeléseket lehetne alkalmazni, például a P-szelektin, vagy a PSGL-1 blokkolásával (He et al. 1998, Mocco et al. 2002). Jelenleg ezek a szerek kipróbálás alatt állnak (1. táblázat), a magas költségük és az alacsony hatékonyságuk miatt nem terjedtek el a mindennapi gyakorlatban (Nagy et al. 2012).

Rekombináns PSGL-1 immunglobulin kimérát (rPSGL-1-Ig) úgy állítottak elő, hogy a PSGL-1 N-terminális, 47 aminosavat tartalmazó részét fúzionálták a humán IgG₁ antitest kapcsolási régiójával. Ez a kiméra főleg a P- és E-szelektinhez kapcsolódik, de kisebb mértékben az L-szelektinhez is. P-szelektin antagonistaként két területen vizsgálták a hatását: ischaemia-reperfusio, illetve szervtranszplantáció során. Sertésekbe vénásan bejuttatva a rPSGL-1-Ig kimérát, angioplasztika során szignifikánsan csökkentette a vérlemezkék és a neutrophyl granulocyták kitapadását a sérült érfalhoz, illetve a koszorúér későbbi elzáródását (Bienvenu et al. 2001, Tanguay et al. 2004, Hansen et al. 2004). Más munkacsoportok humán vizsgálatok során nem találtak különbséget a kiméra alkalmazásakor a kontrollcsoportéhoz képest (Mertens et al. 2006). Vesetranszplantáció során nem észleltek káros mellékhatást (Gaber et al. 2011), májtranszplantációnál szignifikáns májfunkció javulásról számoltak be (Busuttill et al. 2011) a rPSGL-1-Ig alkalmazásakor.

Egerekben végzett kísérletek során azt tapasztalták, hogy ha a bélrendszer vérellátását átmenetileg felfüggesztik, akkor a keringés visszaállásakor kevesebb neutrophyl granulocytá és T-lymphocytá vándorol a szövetekbe a blokkoló antitest alkalmazásakor (Farmer et al. 2005). Egerekben a kollagén-indukált ízületi gyulladás előrehaladását sikerült visszاسzorítani az ízületi folyadékba történő fehérvérsejt beáramlás blokkolása által (Sumariwalla et al. 2004).

Vizsgált faj	Kipróbálás fázisa	Indikáció	Irodalmi hivatkozás
sertés	preklinikai	angioplasztika	Bienvenu et al. 2001
sertés	preklinikai	koszorúér stent beültetés	Tanguay et al. 2004
sertés	preklinikai	ischaemia-reperfusio	Hansen et al. 2004
humán	leállítva	szívinfarktus	Mertens et al. 2006
humán	klinikai II	vesetranszplantáció	Gaber et al. 2011
humán	klinikai II	májtranszplantáció	Busuttil et al. 2011
egér	preklinikai	ischaemia-reperfusio	Farmer et al. 2005
egér	preklinikai	ízületi gyulladás	Sumariwalla et al. 2004

1. táblázat. Rekombináns PSGL-1 immunglobulinokkal (rPSGL-1-Ig) végzett kísérletek összefoglalása. (A táblázat Nagy és munkatársai 2012 közleménye alapján készült).

3.3. Thrombosis modellek

A technológia fejlődésével és a thrombosis mechanizmusának részletesebb megismerésével párhuzamosan a thrombosis kiváltásának módja és mértéke is egyre pontosabb lett. Míg a huszadik század második felében kollagénnel és adrenalinval egy teljes testre kiterjedő választ értek el, addig a huszonegyedik század elejére sikerült kidolgozni olyan módszereket, melyekben laser segítségével egy érben lehetett szelektíven thrombosit kiváltani.

3.3.1. Egér thrombosis modell

Egerek farokvénájába történő kollagén (15 µg/egér) és adrenalin (1,8 µg/egér) együttes beadásakor az egerek 94% -a elpusztult, vagy megbénult (a központi idegrendszerben bekövetkező ischaemia miatt).

Ha a kísérlet előtt 1 órával intraperitonealisan 20 mg/kg aspirint adtak az állatoknak, akkor csak az egerek 40%-a pusztult el. Ha az OKY-1581 vegyületet (thromboxan szintetáz inhibitor) alkalmazták 30 mg/kg dózisban, akkor az egerek 50%-a pusztult csak el, míg 2 mg/kg etanol előzetes adagolásával az egerek 35%-a pusztult el. Ha heparint juttattak a szervezetbe (150 U/kg dózisban) akkor annak nem volt hatása a túlélésre. Ezen modellel sikerült egy olcsó és relatíve egyszerű módszert kidolgozni, mely alkalmas a különböző antithrombotikus szerek hatásának összehasonlítására (DiMinno et al. 1983).

3.3.2. Antitrombin (AT) deficiens heterozigóta egerek vizsgálata

Az antitrombin^{-/-} (homozigóta) egerek már a méhen belül elpusztulnak, ezért a kísérletek során antitrombin^{+/-} (heterozigóta) egereken végeztek kutatásokat. Ezek az állatok nem mutatnak spontán hajlamot a thrombosisra, de a legkisebb thrombotikus stimulus hatására is vérrögök rakódnak le a szívben és a vesében. Yanada és munkatársai 2002-ben fibrin lerakódást (és thrombusokat) figyeltek meg antitrombin deficiens egereknél, ha intraperitonealisan lipopolysaccharidot (LPS) (Wang 2008) fecskendeztek be, vagy immobilizálták az állatokat (20 órán keresztül egy kis edényben tartották az egereket, amiben nem tudtak mozogni). Mindkét esetben kialakultak fibrin lerakódások (a heterozigóta állatoknál sokkal kifejezettebb), de ha a stimulus előtt 30 perccel tisztított humán antitrombint adtak be az egerek vénájába, akkor annak védő hatása volt (Yanada et al. 2002). Összefoglalva: az AT^{+/-} egereken végzett kísérletek hasznosnak bizonyultak a környezeti és genetikai rizikófaktorok vizsgálatában, mivel a homozigóta forma emberben is legtöbbször méhen belüli elhalással jár, illetve a heterozigótáknak fokozott thrombosishajlama van.

3.3.3. Vas-klorid (FeCl₃) kezelés hatása

Barry S. Coller és munkacsoportja 2001-ben β3-integrin-deficiens egerek nyaki erét kipreparálta és vas-kloridot juttatott be. Ezeknél az egereknél nem alakult ki thrombosis, míg a vad típusú egereknél átlag 6,7 perc alatt elzáródott az ér (Smyth et al. 2001). Az érelzáródást úgy tudták detektálni, hogy folyamatosan mérték az ér (és ezáltal a benne áramló vér) hőmérsékletét. Amikor a hőmérséklet elkezdett csökkenni, az arra utalt, hogy már nem áramlik a vér az érben.

A vas-klorid egy olcsó, könnyen használható thrombosit kiváltó anyag, de a hatás detektálásához bonyolult mikrosebészeti műtétre van szükség.

3.3.4. Laser-indukált thrombosis modell

Egerek cremaster izmára fókuszált laser fény hatására thrombusok keletkeznek, melyeket két antitest kombinációjával detektált Falati munkacsoportja 2002-ben. A patkányban termelt primer antitest az egér vérlemezkén lévő CD41 molekulához kapcsolódott, majd ehhez kötődött a csirkében termelt Alexa 488 konjugált patkány ellenes szekunder antitest.

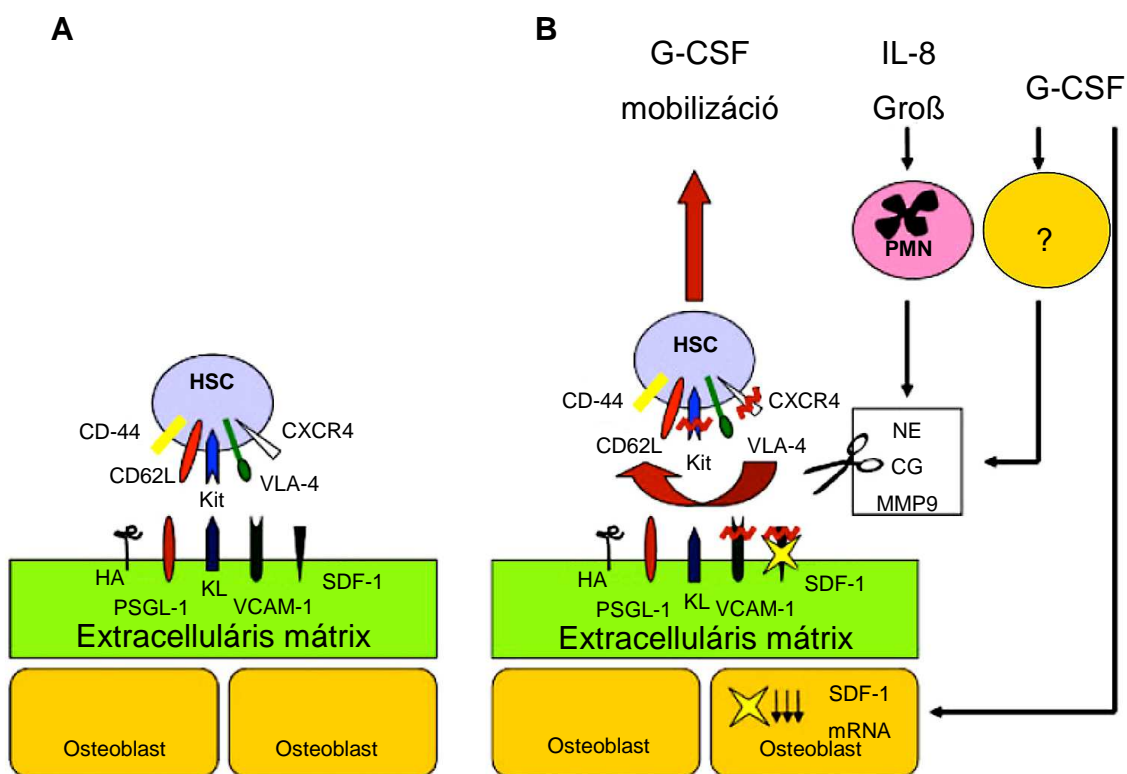
Konfokális mikroszkóppal valós időben nyomon lehet követni a trombocyták és a fibrin felszaporodását. Kimutatták, hogy PSGL-1 hiányos egerekben (vagy a vad típusú egerek PSGL-1 receptorának antitesttel történő blokkolásakor) kevesebb szöveti faktor és fibrin szaporodik fel a thrombusban (Falati et al. 2002).

3.4.1. Csontvelői sejtek mobilizálása

1962-ben sikerült egér perifériás vérből őssejtet izolálni (Goodman et al. 1962). 1971-ben három munkacsoport kimutatta, hogy emberi perifériás vérben kolónia-képző őssejtek mutathatók ki (Chervenick et al. 1971, Kurnick et al. 1971, McCredie et al. 1971). Később beigazolódott, hogy kemoterápia után több őssejt jelenik meg a keringésben (Richman et al. 1976), illetve bakteriális endotoxin hatására is megemelkedik a keringő őssejtek száma (Cline et al. 1977). Az 1980-as évek elején dokumentálták az első autológ csontvelő transzplantációt, melyben őssejteket gyűjtöttek aferezissel (Kessinger et al. 1986). Kezdetben az őssejtek mobilizációjához kemoterápiás szereket használtak, de a G-CSF felfedezése és humán alkalmazásban való elterjedése után ez utóbbi egyre inkább kiszorítja a korábbi (sok nem kívánt mellékhatással járó) gyógyszereket (Welte et al. 1985). Manapság a citosztatikus kezelés inkább csak az autológ őssejt-gyűjtéshez szükséges mobilizációs kezelés része. A csontvelőben a hemopoetikus őssejteket az extracellularis mátrixhoz több „horgonyzó” fehérje rögzíti. Ezek közül kiemelt jelentősége van a PSGL-1 – P-szelektin kapcsolódásának. Ennek a kötésnek a blokkolása, vagy hiánya gyorsabb mobilizációt tesz lehetővé (4. ábra).

A hemopoetikus őssejtek felszínén számos sejtadhéziós fehérje található: CXCR4 (chemokine (C-X-C motif) receptor 4), VLA-4 (Very Late Antigen-4), c-kit (tyrosine-protein kinase Kit, CD117), CD62L (L-szelektin) és CD44. A csontvelői stróma sejteken ezekkel komplementer receptorok találhatóak: SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), KL (kit ligand), PSGL-1, és HA (hyaluronsav) (4. A ábra).

Citokin indukált hemopoetikus őssejt (HSC) mobilizáció során (4. B ábra) a G-CSF egy ismeretlen mechanizmuson keresztül (az ábrán „?” jellel) a csontvelőben számos proteázt aktivál (NE- neutrophyl elasztáz, CG - Katepszin G , MMP9 - Mátrix metalloproteáz-9). Az IL-8 (interleukin-8) és a GroB (growth-regulated oncogene) ugyanezeket az enzimeket szabadítja fel a neutrophyl granulocytákon és a monocytákon keresztül. Ezek az enzimek számos receptor-ligand kötést (köztük az L-szelektin – PSGL-1 kapcsolatot) hasítanak (az ábrán az olló jelképezi) és ezáltal elősegítik, gyorsítják a HSC bekerülését a perifériás vérbe. A G-CSF kezelés gátolja az osteoblastok SDF-1 szintézisét (az mRNS szintézis csökkentése által), mely tovább serkenti az őssejtek csontvelőből történő kikerülését (Nervi et al. 2004).



4. ábra. Hemopoetikus őssejtek (HSC) mobilizációja G-CSF hatására. Hemopoetikus őssejtek több „horgonyzó” molekulán keresztül kapcsolódnak az extracelluláris mátrixhoz (A ábra). Őssejt mobilizáció során különböző proteázok hasítják el ezeket a kapcsolatokat (B ábra). (Az ábra Nervi és munkatársai 2006-ban megjelent közleményének ábrája alapján, annak módosításával készült).

E-szelektin hiányos egereknél leukocytosist, lép-megnagyobbodást és több keringő hemopoetikus progenitor sejtet (HPC) találtak, mely arra utal, hogy a szelektineknek fontos szerepe van a HPC csontvelőből történő kijutásában (Bullard et al. 1996, Frenette et al. 2000).

A HPC mobilizációját két független kutatócsoport is vizsgálta fukoidánnal (egy szulfatált glikánnal, mely *in vivo* gátolja a szelektinek működését) (Frenette és Weiss 2000, Sweeney et al. 2000). Mindkét tanulmány azt mutatta, hogy a fukoidán hatására szignifikáns HPC mobilizáció következik be (magasabb lesz a perifériás vérben a progenitor sejtek száma) még akkor is, ha az egerekben hiányzott az L-, E-, vagy P-szelektin. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy a fukoidán nem az ismert szelektinek blokkolásán keresztül fejt ki a hatását.

Csontvelő transzplantáció során a hemopoetikus őssejteknek valamint progenitor sejteknek (HSPC) a csontvelőbe történő eljutása („homing”) nagyon hasonló az érett fehérvérsejteknek a gyulladás területére történő eljutásához, illetve az egészséges lymphocyták recirkulációjához (Laird et al. 2008, Ley et al. 2007). Az E-szelektin, vagy a P-szelektin jelenléte önmagában elegendő, hogy a halálos dózisu besugárzást kapott egerek csontvelő transzplantáció után túléljenek. Ha a sejtek felszínén jelen volt vagy a P-szelektin, vagy az E-szelektin, akkor az egerek túléltek a besugárzást, ha korlátozott számú csontvelői sejtet kaptak. Ezzel szemben, ha mindkét szelektin hiányzott, akkor az egerek túlélése szignifikánsan romlott (Nabors et al. 2013).

A P-szelektin és PSGL-1 közötti kapcsolat a HPC-k thymusba történő vándorlásában is központi szerepet játszik. A hemopoetikus sejtek felszínén a PSGL-1 molekula kis mennyiségben van jelen, de megsokszorozódik a mennyisége azoknak a sejteknek a felszínén, melyeken jelen vannak egyéb „homing” molekulák, melyek segítik a thymusba történő vándorlást (Rossi et al. 2005, Sultana et al. 2012). A csecsemőmirigyben az endothelsejtek felszínén a P-szelektin periodikusan jelenik meg (Goldschneider 2006). Korlátozott számú progenitor sejt periodikusan tud belépni a thymusba, ráadásul a thymocytá progenitorok csontvelőből történő mobilizációja ciklikus folyamat, mely egybeesik a thymusnak a sejtek befogadására képes állapotával („open gate”). Feltételezések szerint ezeket az eseményeket egy thymus-csontvelő „feedback loop” kordinálja, melyben a CD3- CD4- CD8- thymocyták kölcsönhatásba lépnek a thymus cortex stroma sejtjeivel, minek következtében citokinek szabadulnak fel, melyek szabályozzák a thymocyták termelődését, mobilizációját és érését. A ciklikus folyamat jelentősége egyelőre kevésbé ismert. Egérkísérletes modellek alapján azt gondolják, hogy a T-sejtek megfelelő fejlődése érdekében alakult ki ez a periodikus működés. A thymusnak a progenitor T-sejt befogadóképessége függ a T-sejtek felszínén található PSGL-1 molekula sűrűségétől, de nem függ a vérben keringő progenitor T-sejtek számától. A PSGL-1^{-/-} egerekben kevesebb a korai progenitor T-sejtek száma, de normális a csecsemőmirigy cellularitása, mert a thymuson belüli proliferáció kompenzálja a korai progenitor T-sejtek számának a hiányát (Gossens et al. 2009).

3.4.2. Hemopoetikus őssejtek mobilizációja állatkísérletes modellben

Lord és munkatársai a filgrastim (G-CSF) molekulát és a polietilén-glikollal módosított formáját (filgrastim SD/01, PEG-r-metHu G-CSF) vizsgálták egérkísérletes modellben (Lord et al. 2001). A filgrastimnak az a hátránya, hogy rövid a felezési ideje (9,7 óra egy citosztatikus kezelésben nem részesülő egérben).

A molekula polietilén-glikollal történő módosítása csökkenti a vesén keresztül történő kiürülést és ezáltal hosszabb felezési időt biztosít (13,7 óra egy citosztatikus kezelésben nem részesülő egérben). A hosszabb felezési időnek az az előnye, hogy a betegeknek ritkábban kell a bőr alá injektálva adagolni, de hátránya, hogy a hatását is lassabban lehet felfüggeszteni.

Ellefson és munkatársai citopéniát váltottak ki (150 mg/kg Fluorouracillal) egerekben, majd két nappal később 50 µg/kg dózisú Neupogent és angiotenzint (1-200 µg/kg) adagoltak. Azt találták, hogy az angiotenzin és a G-CSF együttesen adagolva szinergikus hatást vált ki, ezáltal csökkenteni lehetne a malignus hematológiai betegségekben az alkalmazott filgrastim mennyiségét (Ellefson et al. 2004). A klinikai gyakorlatban ez a módszer nem terjedt el.

3.4.3. Hemopoetikus őssejtek mobilizációja a klinikai gyakorlatban

A különböző mobilizáló ágensek (gyógyszerek, antitestek) eltérő módon és sebességgel mobilizálják a csontvelőből az őssejteket (Lord et al. 2001). A leggyakrabban használt anyag a G-CSF (filgrastim), vagy egy elnyújtott hatású változata a pegfilgrastim (Fenk et al. 2006, Gertz 2010). A GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) több CD34+ sejtet mobilizál, mint a G-CSF (Lane et al. 1995). Humán gyakorlatban az 5 napon keresztül 10 µg/kg/nap dózisban adagolt filgrastim a betegeknél testtömeg-kilogrammonként általában 5×10^6 CD34+ sejtet mobilizál (Henon et al. 1992, Schmitz et al. 1996), de igen nagy egyéni különbségek is előfordulhatnak a betegek életkorától, fizikai állapotától és kísérőbetegségeiktől függően.

A citosztatikumok citokinekkal (G-CSF, GM-CSF) kombinálva gyorsítják a HSC mobilizációt és csökkentik az esélyét annak, hogy malignus sejtek is begyűjtésre kerüljenek. Bizonyos esetekben több ciklusban kell citosztatikumot és/vagy citokint adagolni, hogy elérjük a kellő CD34+ sejtszámot, de ilyenkor megnő a súlyos neutropenia és a fertőzések veszélye (Bensinger et al. 1995, Ravagnani et al. 1990).

A fejlesztés és klinikai kipróbálások során jelenleg egy bicyclam típusú vegyület (AMD3100, Plerixafor) tűnik az egyik legígéretesebb mobilizáló anyagnak (2. táblázat), mely a klinikai gyakorlatban is hozzáférhető. Nehezen, vagy csak önmagában G-CSF alkalmazásával nem mobilizálható betegek esetében segítheti a sikeres őssejt-gyűjtést. Az AMD3100 reverzibilisen és specifikusan blokkolja az SDF-1 kötődését a CXCR4-hez (Broxmeyer et al. 2005, Paganesi et al. 2011). Ha kombinációban alkalmazzák a filgrastimmal, akkor több CD34+ sejtet lehet és hamarabb mobilizálni, mintha csak G-CSF kezelést kaptak volna a betegek, így több betegnél lehet autolog őssejt transzplantációt végezni (Dugan et al. 2010, Michallef et al. 2009, Pelus 2008).

Mobilizálási forma	Példák	A mobilizáció sebessége
Kemoterápia	Cytosan, 5-fluorouracil	1-3 hét
Növekedési faktorok	G-CSF, GM-CSF, SCF, TP, EPO, GH, IL-3, IL-17, PTH, VEGF, angiopoietin-1	4-6 nap
Antitestek	anti- VLA-4, anti-VCAM-1	1-2 nap
Polyanionok	Fukoidán, dextrán szulfát	1-2 óra
Kemokinek	GRO β , MIP1 α , Met-SDF-1 β	15-120 perc
Receptor antagonisták/ szignalizációs útvonal gátlók	AMD3100, Rho GTP-áz inhibitor, β 2-agonisták	1-6 óra

2. táblázat. Hemopoetikus őssejtek mobilizációjában használható anyagok. G-CSF: granulocytá kolónia stimuláló faktor, GM-CSF: granulocytá-makrofág kolónia stimuláló faktor, IL: interleukin, SCF: stem cell faktor, TP: trombopoietin, EPO: erythropoietin, GH: növekedési hormon, PTH: parathormon, VEGF: vascular endothelial growth factor, VLA-4: very late antigen-4, GRO β (CXCL2): chemokin ligand, MIP: macrophage inflammatory protein, SDF: stromal cell-derived factor. A GH, EPO, TP, SCF kezelésnek inkább az állatkísérletekben van jelentősége, a humán gyakorlatban nem alkalmazzák. (A táblázat Pelus 2008 közleménye alapján készült).

A filgrastim adagolása a különböző hematológiai betegségekből eltérő, de mindig az adott betegre kell megállapítani, mert nagy az individuális különbség. Kemoterápia utáni myeloszuppresszió kezelésére 5 μ g/kg, csontvelő transzplantációban és perifériás őssejt gyűjtésekor 10 μ g/kg, súlyos krónikus neutropeniában 6 μ g/kg dózist ajánl a termék gyártója (Amgen, Thousand Oaks CA). A hazai ajánlás (Országos Gyógyszerészeti Intézet) megegyezik a gyártó előírásaival (OGYI-T-1763/02).

4. Célkitűzések

A PSGL-1 szerepe a thrombosisban

A szelektinek és a PSGL-1 közti interakció fontos szerepet tölt be a thrombosis kialakulásában. Az aktivált thrombocyták felszínén megjelenik a P-szelektin és ezáltal könnyebben tudnak kapcsolódni a neutrophyl granulocytákhoz és az endothel sejtekhez. Ha ezt a kötődést blokkolni lehetne, akkor feltételezhetően kisebb valószínűséggel alakulna ki thrombosis, vagy kisebb lenne a kiterjedése.

Munkánk első részében célunk volt egy állatkísérletes modellben mesterségesen thrombosit kiváltani és figyelni a PSGL-1 hiányos egerek túlélését a kontroll populációval szemben. A thrombotikus stimulust olyan mértékben kellett alkalmaznunk, hogy ne egy mindent elfedő, maximális választ kapjunk, hanem olyat, amelyben a két egértörzs közti különbség megfigyelhető, mert ezzel lehet a PSGL-1 jelenlétének, vagy hiányának a hatását modellezni. Ezen vizsgálatok során két kérdésre kerestük a választ:

- a PSGL-1 hiányának van-e hatása az egerek túlélésére thrombotikus stimulus hatására
- a PSGL-1 hiányában a heterotipikus aggregátumok száma, illetve a thrombusokkal, embolusokkal elzáródott erek száma különbözik-e a kontroll állatoktól

A PSGL-1 szerepe a fehérvérsejt mobilizációban

A P-szelektin-PSGL-1 kapcsolódásának a hemopoetikus őssejtek csontvelői extracelluláris matrixhoz való kötődésében és myeloid sejtek ér pályából történő kilépésében is szerepe van. Munkánk második felében a PSGL-1 molekulának a myeloid sejteknek a csontvelőből történő mobilizációjában és az ér pályából történő kilépésében játszott szerepét vizsgáltuk egerekben:

- arra kerestük a választ, hogy PSGL-1 hiányában indukált citopénia hatására milyen gyorsan kerülnek ki a myeloid sejtek az ér pályából (fehérvérsejt elimináció)
- megvizsgáltuk, hogy indukált citopénia után spontán módon, illetve exogén G-CSF adagolásával milyen kinetikával mobilizálódnak a fehérvérsejtek

5. Anyagok és módszerek

5.1. A kísérleti állatok jellemzése

C57B6/126 PSGL-1 vad típusú (WT-Wild Type) és knockout (KO) egereket az anyjuktól 4 hetes korukban választottuk le. Az állatok a számukra ideális 12 óra sötét – 12 óra világos napi ciklusban 21°C-os körülmények közt éltek. Standard rágcsáló eledelt (VRF1 Charles River, Németország) és vizet korlátlanul fogyaszthattak. A kísérletek során 12-16 hetes állatokat használtunk fel, a vonatkozó jogszabályokat végig betartva. A kísérleti engedélyünk száma az alábbi volt: 1/2006 DE MÁB, 8/2011 DE MÁB.

5.2. Thrombosis kiváltása egerekben

Altatás után az egerek farokvénájába 15 µg kollagént (Collagen reagent Horm, Nycomed München, Németország) 3 µg adrenallinnal (Tonogen, Richter-Gedeon Budapest) együtt juttattunk be („teljes” dózisú kísérlet). A műveletet „fél” dózisú kollagén-adrenalin beadásával is megismételtük. A harmadik percben az állatok retro-orbitalis vénájából vért vettünk és a 30. percig figyeltük az egerek túlélését. Utána az állatokat cervicalis dislocatioival elpusztítottuk.

5.3. Vérvétel és sejtszám meghatározás

150 mg/kg dózisú intraperitonealis ketaminnal (Calypsol, Richter-Gedeon, Budapest) történő altatás után

200 µL vért vettünk 40 µL ACD-t (Acid Citrate Dextrose) tartalmazó csőbe. Az ACD-t Vacutainer (Becton Dickinson Diagnostics-Preanalytical Systems Franklin Lakes, NJ) csőből pipettáztuk ki. A vérvétel az egerek retro-orbitalis plexusából történt 30 mm hosszú K₂-ETDA-val bevont üvegapillárisal (Palicz et al. 2013). A mintákat Siemens Advia-120 (Deerfield, IL) hematológiai automatával a Multi Species program használatával mértük le (Diaz-Ricart et al. 2010).

5.4. Fibrin meghatározás a tüdőben

A tüdőket az eltávolításuk után 4°C-os extrakciós pufferbe helyeztük, melynek összetétele: 150 mM NaCl, 10 mM EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav), 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (Sigma), 10 U/mL aprotinin (Richter, Hungary), 100 U/mL heparin (Merckle GmbH, Ulm, Germany), 0,1 M epszilon-aminokapronsav (Pannonpharma, Pécsvárad, Hungary) és 10 mM Tris/HCl, pH 7,4. A mintákat folyékony nitrogénnel gyorsan lefagyasztottuk, majd -20°C-on tároltuk kis tartályokban a felhasználásig. A feldolgozás során a szöveteket 5 percre 37°C-os vízfürdőbe helyeztük, majd a kiolvadt szövetet 10 percre extrakciós pufferbe tettük (0,5 mL puffer/100 mg szövet) és utána mechanikailag homogenizáltuk. Ezután 4 órára jégre helyeztük a mintákat. A következő lépésben 4°C-on 30 percen keresztül centrifugáltuk (16 000 g), kétszer mostuk és 200 µL pufferben „felvettük”. Ezután 18 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk a mintát, majd szobahőn 30 percen keresztül centrifugáltuk (16 000 g). A felülúszóhoz (mely a kivont fibrint tartalmazta) 5% merkaptotetanolt, 0,1% brómfenol kéket adtunk és 7,5%-os SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) poliakrilamid gél elektroforézis segítségével elválasztottuk az összetevőket és átvittük Immobilon P Transfer membránra (Millipore, Bedford, MA) az immunoblot vizsgálatokhoz. A fibrin(ogén) kimutatása során nyúlban termelt anti-humán fibrinogént (DAKO, Glostrup, Denmark) alkalmaztunk (mely keresztreakál az egér fibrin(ogén)-nel) 1:2 000 hígításban, majd ezt követően torna-peroxidáz jelölt anti-nyúl (R and D Systems, Minneapolis) antitestet. A sávokat kemilumineszcens reakcióval tettük láthatóvá (Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare, Milwaukee). A fibrinogén és fibrin kvantálásánál egyenlő tömegű tüdőszövet optikai denzitását vizsgáltuk úgy, hogy a denzitométer által detektált jel erősségét a különböző minták aktin-tartalmára normalizáltuk.

5.5. A szövetek feldolgozása hisztológiai és immunhisztokémiai vizsgálatokhoz

A fénymikroszkópos vizsgálatokhoz a szöveteket Sainte-Marie oldatban (95 mL abszolút etanol + 5 mL desztillált víz) fixáltuk, paraffinba ágyasztuk és megfestettük hematoxilin-eozin, valamint Masson-trichrom festékekkel. Immunhisztokémiai vizsgálatokhoz az 5 mikrométer vastagságú metszeteket deparaffináltuk, rehidráltuk és antigén feltárást végeztünk nagy nyomáson kuktában (120 °C 3 perc) antigén feltáró oldattal (pH 6,0, DAKO, Glostrup, Denmark).

Ezután következett szobahőn az endogén peroxidáz blokkolása 1%-os H₂O₂ -t tartalmazó metanol oldattal 30 percre. Három százalékos tejet tartalmazó háttérfestést csökkentő oldattal (background reducing solution, DAKO) történő kezelés után 1:40 hígítású mAB350 (American Diagnostica, Stamford, CT) fibrin-specifikus antitesttel inkubáltuk a szöveteket egy óráig szobahőn. Foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS: Phosphate Buffered Saline) történő mosás után a reakció előhívása biotin-mentes EnVision detection kit (DAKO) felhasználásával történt. A trombin lerakódását a tüdőszövetben úgy kvantitáltuk, hogy minden csoportban 4 egérenél, 40-szeres nagyítású objektívvel 12 véletlenszerűen kiválasztott látótérben megszámoltuk az elzáródott erek számát.

A Masson-festés során deparaffináltuk a metszeteket, majd végeztünk egy magfestést hematoxilinnal. Ezután savas fuxinnal (A-oldat) megfestettük a citoplazmát, majd a ferrikloridból (B-oldat) és foszfomolibdénsavból (C-oldat) álló festékekkel a kollagént és a fibrin(ogén)t.

5.6. Thrombocytá- és fehérvérsejt aggregátumok detektálása

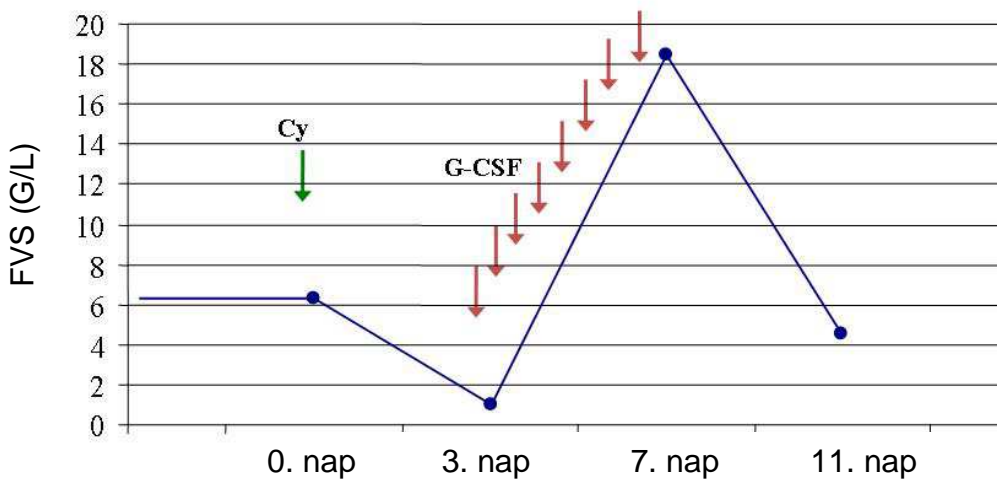
Áramlási citometriai mérések során 50 µL ACD-vel antikoagulált vért jelöltünk patkányból származó anti-egér CD14 PE (fikoeritrin) és CD41 FITC (fluorescein-izotiocianát) antitesttel (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA). A CD41 a vérlemezkék, míg a CD14 elsősorban a monocyták azonosítására szolgál. A fehérvérsejt populációkat az SSC-FL2 fényszórás alapján különítettük el és a heterotipikus aggregátumokat a CD41 fluoreszcens jel alapján azonosítottuk. A heterotipikus aggregátumok kialakulását 15 perces, 37°C-os 10 µmol/L koncentrációjú TRAP (thrombin receptor activating peptide) kezeléssel serkentettük. Az aggregátum-képződést blokkoló kísérletben a mintákat 2 µg/mL patkányban termelt egér PSGL-1 ellenes antitest alkalmazásával vizsgáltuk. A méréseket BD FACSCalibur áramlási citométerrel végeztük és az adatokat CELLQuest 3.2 (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA) programmal elemeztük.

5.7. Indukált citopeniát követő sejtmobilizáció G-CSF kezelés hatására

Vad típusú és PSGL hiányos hím (Nemeth et al. 2010), 12-16 hetes egereket Halothannal (Sigma-Aldrich, St Louis) elaltattunk és 250 mg/kg ciklofoszfamidot (Endoxan, Baxter, Illinois) adtuk be intraperitonealisán, hogy elérjük a citopeniát.

Ezután naponta kétszer subcutan 7,8 µg/kg dózisú G-CSF (Neupogen, Amgen, Thousand Oaks, CA) kezelést indítottunk négy napon keresztül (5. ábra). A mobilizált őssejtek perifériás vérben történő megjelenését patkányban termelt egér CD34/CD162/CD45 és CD34/CD117/CD45 ellenes antitestekkel detektáltuk.

A CD162 és CD117 ellenes antitest R-fikoeritrinnel (R-PE), a CD34 fluoreszcein izotiocianáttal (FITC), a CD45 peridinín-klorofill fehérje (PerCP) fluorofórral volt jelölve és a BD Pharmingen-től (Becton Dickinson, Franklin Lakes) származott. A méréseket BD FACSCalibur áramlási citométerrel végeztük és az adatokat CELLQuest 3.2 (Becton Dickinson, Franklin Lakes) programmal elemeztük.



5. ábra. Citopénia indukció és sejtmobilizálás menete. Egyszeri dózisú ciklofoszfamid (Cy, zöld nyíl) injekcióval citopéniát idéztünk elő, majd a harmadik naptól kezdődően nyolc alkalommal G-CSF (piros nyíl) beadásával mobilizáltuk a fehérvérsejteket. A kék körök jelképezik a vérvételek időpontját (kiindulási, 3. nap, közvetlenül az utolsó G-CSF beadása utáni és négy nappal az utolsó G-CSF injekció utáni nap).

5.8. A PSGL-1 expresszió kvantitatív vizsgálata

Emberi és egér myeloid sejteken vizsgáltuk a PSGL-1 expresszió mértékét és figyeztük az in vitro adott G-CSF hatására bekövetkező változását. R-PE konjugált egérben termelt anti-humán CD162 (PSGL-1) és patkányban termelt anti-egér CD162 (PSGL-1) antitestet használtunk (Becton Dickinson, Franklin Lakes).

Az áramlási citometriai vizsgálatok során a mintákban tapasztalt átlagos fluoreszcencia intenzitásokat (Mean Fluorescence Intensity - MFI) hasonlítottuk össze a QuantiBRITE-PE (Becton Dickinson, Franklin Lakes) gyöngyökkel végzett kalibrációs görbe értékeivel. Ezáltal antitest-kötő kapacitásban (Antibody Binding Capacity - ABC) is ki tudtuk fejezni a PSGL-1 expresszió mértékét (Kappelmayer et al. 2001).

5.9. Immunhisztokémiai vizsgálatok femur metszeteken

A kísérleti állatokból eltávolítottuk a femurt az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz. A combcsontokat 1 napos Sainte-Marie oldattal történő fixálás után 10%-os EDTA (pH 7,2) (Solon, Ohio) oldatban tároltuk két hétig. A dekalcifikált és dehidratált szöveteket 54 °C-os paraffinba ágyztuk és 5–6 µm vastagságú metszeteket készítettünk (Microm HM335E, Microm International GmbH, Walldorf, Germany), melyeket zselatinnal bevont tárgylemezre helyeztünk és egy éjszakán át 37 °C –on hagytunk.

A CD34+ sejtek azonosításához a metszeteket deparaffináltuk xilollal és hidráltuk leszálló alkoholsorban. A metszetek rehidrációját követően mintáinkat 0,5% H₂O₂ –t tartalmazó abszolút metanollal kezeltük az endogén peroxidáz aktivitás blokkolása végett. PBS-sel történő mosás után a metszeteket 2%-os BSA-t tartalmazó PBS oldatban inkubáltuk 37 °C-on 30 percig nedveskamrában, hogy minimalizáljuk a nonspecifikus festődést. Ezután következett az 1:75 hígítású nyúlban termelt egér CD34 ellenes antitesttel (Chemicon, Temecula, CA) történő jelölés egy órán keresztül 37 °C-on. PBS-sel történő rövid mosás után a mintákat egy órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten az 1:200 hígítású (0,1% BSA-t tartalmazó PBS-sel) biotin-konjugált nyúl ellenes szekunder antitesttel (Vectastain Elite ABC Kit, Vector, Burlingame, CA). Ezután a metszeteket 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk streptavidin-biotin peroxidáz komplex-szel (Vectastain Elite ABC Kit, Vector). PBS-sel történő mosás után a reakciót a Vector Peroxidase Substrat Kit-tel tettük láthatóvá. PBS-sel történő mosás után a metszeteket desztillált vízzel leöblítettük és AquaMount (Thermo Scientific, Rockford, IL) médiummal lefedtük.

A negatív kontroll vizsgálat elvégzésénél hasonló módon jártunk el, csak az első antitest helyett egy non-immun IgG-t használtunk (IgG2a, Sigma, St. Louis, MO), illetve egy másik kísérletben non-immun nyúl szérumot használtunk. Egyik kontroll kísérletben sem látszott jelölődés. A metszeteket digitális fényképezőgéppel (Olympus DP50, Tokyo, Japan) fotóztuk le, mely egy Nikon Eclipse 800 (Nikon, Tokyo, Japan) mikroszkóphoz volt kapcsolva.

5.10.1. Mononukleáris sejteket tartalmazó sejtszuspenzió készítése perifériás vérből

A granulocyták és macrophagok közös előalakjai morfológiai vizsgálatokkal nem azonosíthatók, így kimutatásukra funkcionális kolónia esszé módszert alkalmazunk. Az egerek retro-orbitális plexusából nyert vérére 50 IU heparint tartalmazó Eppendorf-csőbe gyűjtöttük, majd PBS-sel kétszeresére hígítottuk.

Ezt követően azonos térfogatú Ficoll-ra (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden) rétegeztük és 15 percig 400 g-n centrifugáltuk. A sűrűség gradiens alapján elkülönülő mononukleáris sejteket tartalmazó gyűrűt leszívtuk, a sejteket PBS-sel átmostuk (10 perc centrifugálás 400g-n). A felülúszót eltávolítottuk, és a sejteket 1 ml McCoy's 5A médiumba (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) felvettük.

5.10.2. Sejtszuspenzió készítése femorális csontvelőből

Exterminációt követően az egerek combcsontját aseptikus körülmények között eltávolítottuk, majd a csontvelőt steril injekciós tű és fecskendő segítségével 1ml McCoy's 5A médiummal egy kémcsőbe kimostuk, majd az előbbieket szerint Ficoll gradiens segítségével szeparáltuk a mononukleáris sejteket.

5.10.3. Kolónia esszé

A tenyészetek összeállítása a korábbiakban leírtak szerint történt (Benko et al. 1999; Benko et al. 2001; Géresi et al. 2012). Perifériás vérből szeparált sejtek esetén 6×10^5 /mL sejtet, csontvelőből származó sejtek esetén 1×10^5 /mL sejtet szélesztettünk egy-egy Petri-csészébe (Greiner, Nürtingen, Germany). A progenitor sejtek McCoy's 5A médiumban növekedtek, mely aminosavakat, Na-piruvátot, NaHCO_3 -ot, antibiotikumot (streptomycin, penicillin) és 20% borjú szérumot tartalmazott. A granulocytá-macrophag progenitorok túlélését és proliferációját in vitro a G-CSF, GM-CSF és interleukin-3 citokineket nagy mennyiségben tartalmazó WEHI-3B kondicionált médium hozzáadásával értük el. A lágy gél közeget az 1,2%-os metilcellulóz (Methocel, FLUKA, Buchs, Switzerland) biztosította. A sejt kultúrák duplikátumban 7 napon keresztül CO_2 termosztátban 37°C -on, 100%-os páratartalom mellett 5% szén-dioxidot tartalmazó légkörben növekedtek. A tenyésztési idő végére a GM-CFU progenitorsejtek szaporodásuk során - a lágy gél közegnek köszönhetően - leánysejtjeikkel együttmaradva kolóniákat képeznek.

Kolóniának tekintettünk minden olyan sejtcsoportot, mely sztereomikroszkóp alatt vizsgálva (Olympus, Hamburg, Germany) legalább 50 sejtből állt.

A tenyészetek kolóniaszáma a GM-CFU előfordulási gyakoriságát határozta meg. Perifériás vér esetében értelemszerűen a tenyészetek kolóniaszáma a 6×10^5 mononukleáris vérsejtben található mobilizált granulocyta-macrophag progenitor sejtszámot adja meg, míg a csontvelőtenyészetek kolóniaszáma a 10^5 csontvelői sejtben található GM-CFU számot.

A csontvelő funkcionális vizsgálata során a cellularitást, a GM-CFU előfordulási gyakoriságát és a femorális csontvelő teljes GM-CFU tartalmát határoztuk meg.

A cellularitás a femoralis csontvelő teljes magvas sejtszámát jelenti. Ehhez a csontvelőből nyert sejtszuspenzió egységnyi térfogatban mért abszolút sejtszámát (Türk oldatot használva) megszoroztuk a femorális csontvelő teljes kimosásával nyert sejtszuspenzió térfogatával. A cellularitás és a GM-CFU előfordulási gyakoriságának szorzata a femoralis csontvelő teljes GM-CFU tartalmát fejezi ki.

5.11. Statisztikai elemzések

Az egerek thrombotikus stimulus hatására bekövetkező elhullásánál Chi-négyzet tesztet, az elzáródott erek számánál egyszempontos ANOVA elemzést, a sejtszám meghatározásnál Student-féle t-tesztet használtunk.

A sejtmobilizációs kísérleteknél a Gaussi-eloszlást mutató adatoknál a Student-féle t-tesztet, a nem parametrikus eloszlás esetén a Mann Whitney-tesztet alkalmaztuk a GraphPad Prism 4.0 program (La Jolla, CA) segítségével.

6. Eredmények

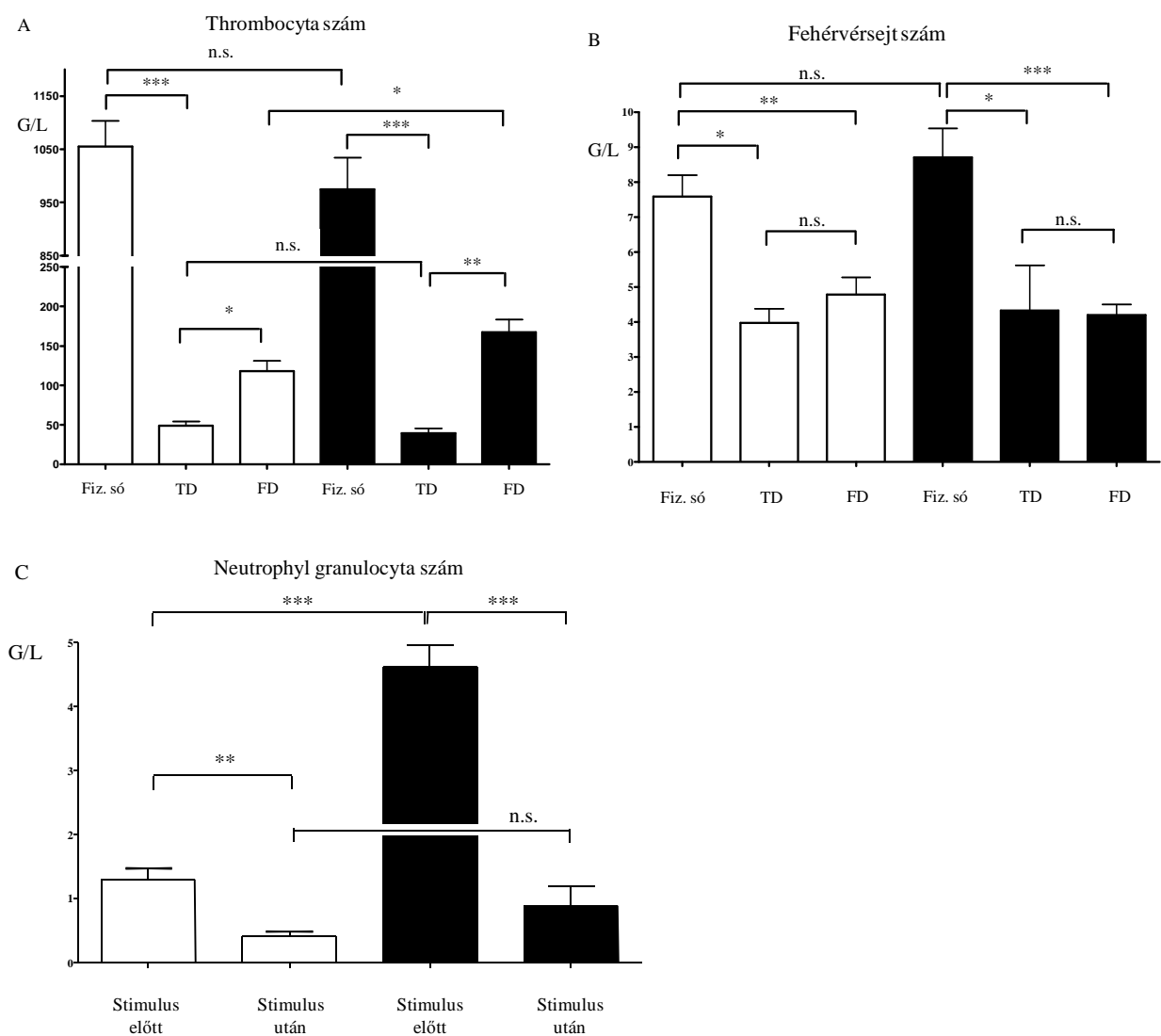
6.1. A PSGL-1 hiány protektív hatása a thrombosit kiváltó stimulusokkal szemben

Összesen 87 egérenél vizsgáltuk a 30 perces túlélést a thrombosit kiváltó stimulus hatására. Teljes dózisú kollagén (15 μg) és adrenalin (3 μg) beadásakor 13 vad típusú egérből 8 (62%), illetve a KO törzsből 15 egérből 7 (47%) pusztult el 30 perc alatt ($p=0,476$). Felére csökkentett dózisú kollagén (7,5 μg) és adrenalin (1,5 μg) hatására sokkal markánsabb különbség jelentkezett a túlélésben (6. ábra): a vad típusú állatoknál 30 egérből 15 pusztult el (50%), míg a KO törzs esetén 29-ből csupán 3 (10%) ($p=0,002$).



6. ábra. Vad típusú (világos oszlop) és KO egerek (sötét oszlop) elhullási aránya 30 perccel a csökkentett „fél” dózisú és teljes dózisú thrombotikus stimulus után. * $p<0,05$

A kollagén és adrenalin együttes beadása dózisfüggő citopéniát okozott. Teljes dózis alkalmazásakor mindkét egértörzsben szignifikáns thrombocytaszám csökkenést lehetett megfigyelni ($p<0,0001$) és a két csoport között nem volt különbség ($p=0,261$). Ezzel ellentétben „fél-dózisú” thrombotikus stimulus alkalmazásakor a PSGL^{-/-} törzsben a vérlemezkeszám csökkenés szignifikánsan kisebb volt ($p=0,0325$) a kiindulási értékhez képest (7. A ábra). A fehérvérsejtszám csökkenés hasonló mértékű volt a két törzsnél és függetlennek bizonyult az alkalmazott kollagén és adrenalin dózisától (7. B ábra). Mivel a perifériás vérben a PSGL-1 hiányában az abszolút neutrophyl szám emelkedett, megvizsgáltuk 6 vad típusú és 9 KO egérenél a jelenséget thrombotikus stimulus hatására. Kezelés előtt a KO egereknél háromszor magasabb volt az abszolút neutrophyl granulocytá szám, de a csökkenés mértékében nem volt különbség (7. C ábra).



7. ábra. Sejtszámok változása különböző mértékű thrombotikus stimulusok hatására.

A: Thrombocyták számának változása teljes dózisu (TD) kollagén (15 µg) és adrenalin (3 µg), valamint „fél” dózisu (FD) kollagén (7,5 µg) és adrenalin (1,5 µg) beadása után. A kontroll csoport egyedei fiziológisu sóoldatot (fiz. só) kaptak. A vérlemezke számok dózisufüggő módon szignifikánsan csökkentek. Vad típusú egereknél (világos oszlop) a kísérletnél használt állatok száma: fiziológisu sóoldat n=25, TD n=7, FD n=20. A KO törzsben mért számok sötét oszloppal vannak megjelölve: fiziológisu sóoldat n=24, TD n=8, FD n=28.

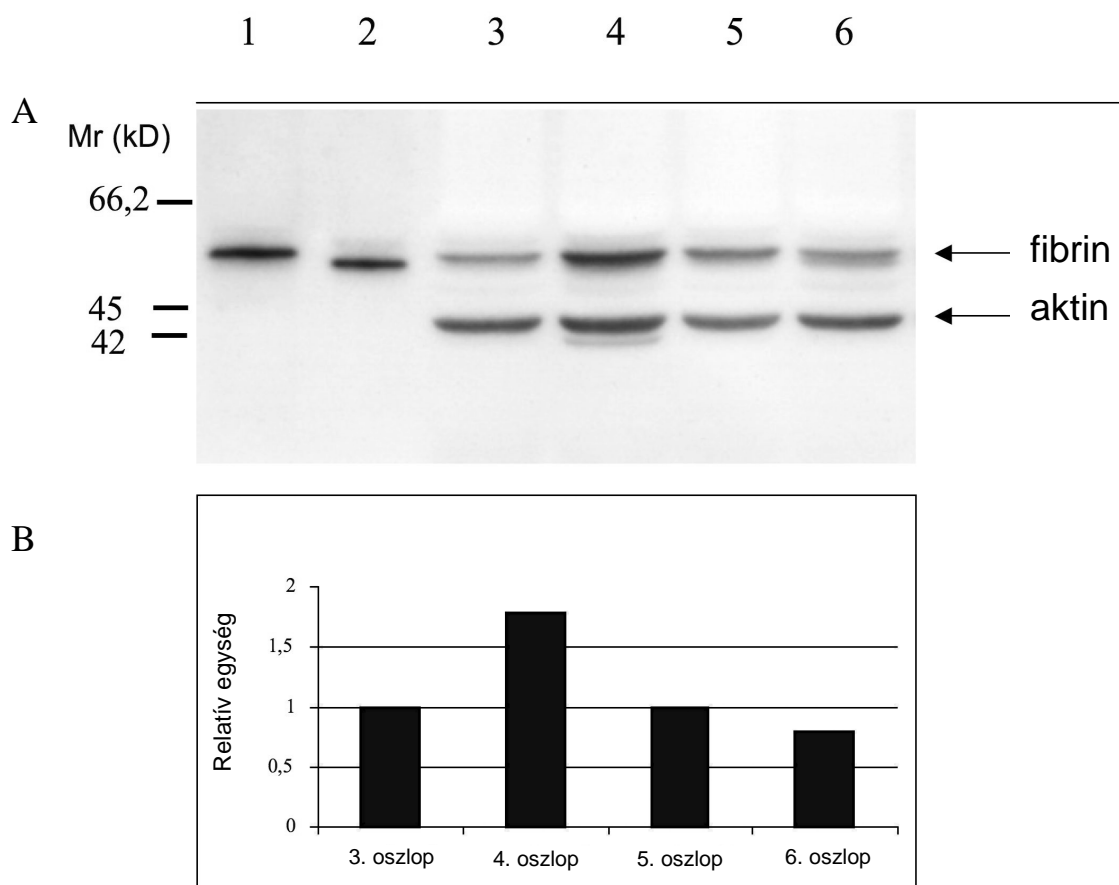
B: Fehérvérsejt számok (10⁹/L) alakulása thrombotikus stimulus hatására. A vad típusú (fehér oszlop) és a KO egereknél (fekete oszlop) a kísérletben felhasznált állatok száma megegyezik az „A” pontban leírtakkal.

C: Neutrophyl granulocyták számának változása thrombotikus stimulus hatására. A neutrophyl granulocyták abszolút számának csökkenése hasonló volt az összes fehérvérsejtszám csökkenéséhez és nem különbözött a két törzsben (9 vad típusú – fehér oszlop - és 6 KO – fekete oszlop - egernél végzett kísérlet fél dózisu kollagénnel).

Az ábrán az átlagértékeket és standard hibát tüntettük fel. *p<0,05, **p<0,001, ***p<0,0001.

6.2. Fibrin lerakódás a tüdőben

Szisztémás thrombosis során a tüdőben fibrin rakódik le, melyet Western-blot analízissel vizsgáltunk. Ehhez az egér fibrin(ogén)nel keresztreakciót adó poliklonális anti-humán antitestet használtunk, mely a fibrinogént és a fibrint is kimutatja. A 8. ábrán látható, hogy thrombotikus stimulus hatására több fibrin rakódik le a vad típusú egértörzs egyedeiben, mint a KO egerekben.



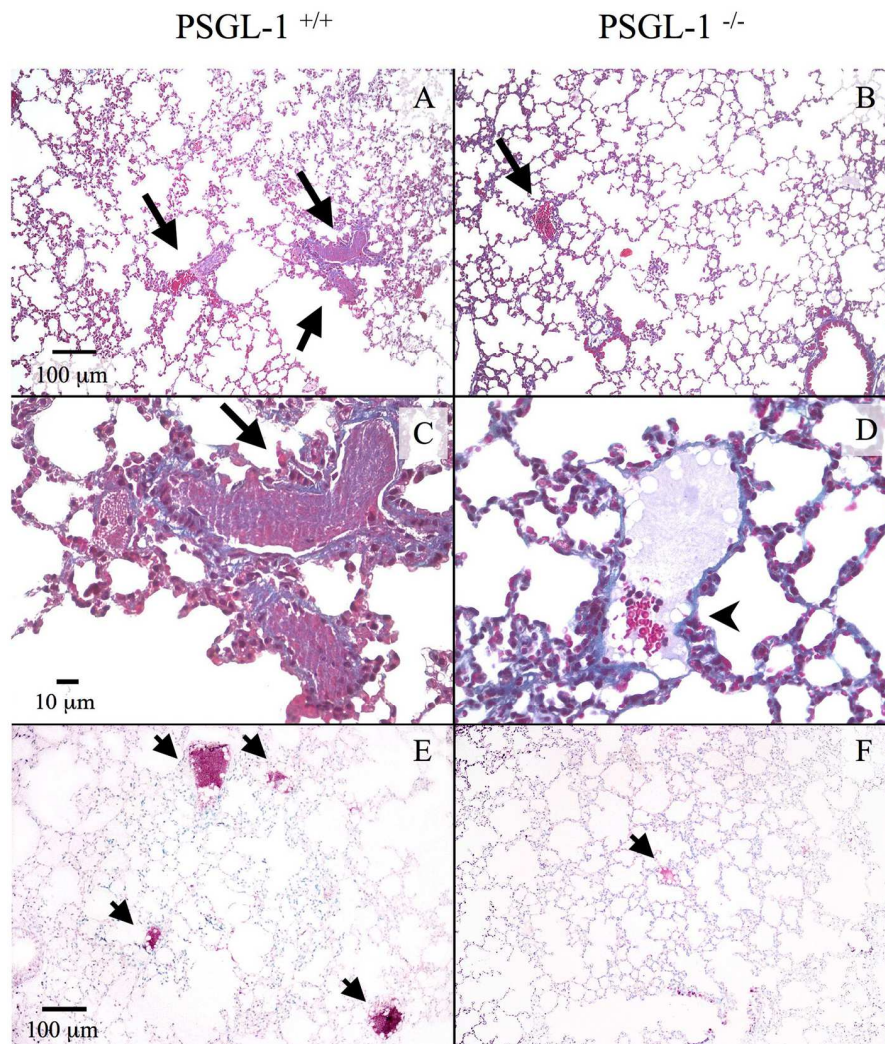
8. ábra. Tüdő-extraktum Western-blot analízise. 7,5%-os SDS polyacrylamid gél elektroforézise után immunoblot vizsgálatot végeztünk anti-humán fibrin(ogén) antitesttel, mely keresztreakciót ad az egér fibrin(ogén)nel.

A: 1. oszlop: fibrinogén standard, 2. oszlop: fibrin standard, 3. oszlop: PSGL-1^{+/+} fiziológiás sóoldat, 4. oszlop: PSGL-1^{+/+} kollagén+adrenalin, 5. oszlop: PSGL-1^{-/-} fiziológiás sóoldat, 6. oszlop: PSGL-1^{-/-} kollagén+adrenalin.

B: Thrombosis kiváltásakor kétszer annyi fibrin rakódik le a PSGL-1^{+/+} egerek tüdőszövetében (n=7) mint a PSGL-1^{-/-} egerek tüdejében (n=8). 1 Relatív egység= fiziológiás sóoldattal injektált (kontroll) egerek tüdejében lerakódott fibrin optikai denzitása.

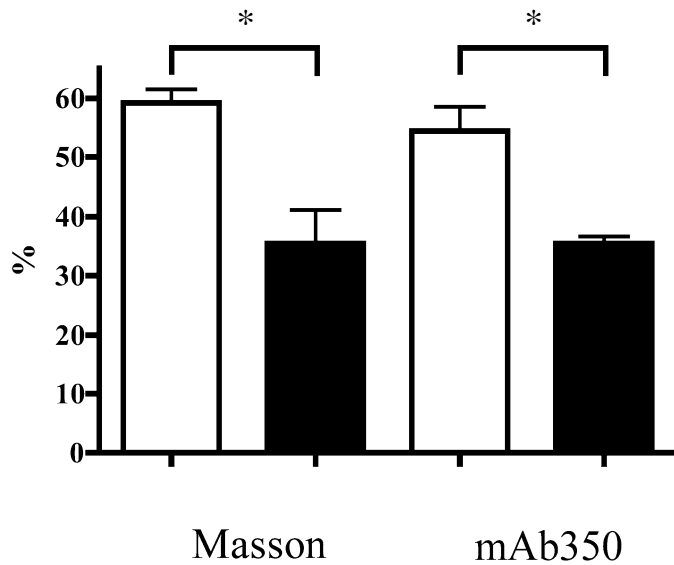
6.3. A thrombusok morfológiai elemzése

Immunhisztokémiai (IHC) vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a tüdő érhalózatában számos thrombus keletkezett, illetve akadt el a thrombotikus stimulus után. Először Masson-trichrom festéssel vizsgáltuk a thrombusokat az erekben. A vad típusú egértörzsben sokkal több elzáródott eret találtunk, valamint a thrombusok mérete is nagyobb volt. (9. ábra A, C). A PSGL-1^{-/-} egereknél kevesebb és az ereket kevésbé kitöltő thrombust találtunk (9. ábra B, D). Immunhisztokémiai vizsgálatokkal az érrögökben fibrint mutattunk ki az mAb350 jelű antitesttel (Smyth et al. 2001), mely csak a (keresztkötött) fibrint mutatja ki és a fibrinogént nem (9. ábra E, F). Ezzel a vizsgálattal is nagyobb volt az elzáródott erek aránya a PSGL-1^{+/+} törzsben. (10. ábra).



9. ábra. Tüdő szövettani képe „fél” dózisú thrombotikus stimulus után.

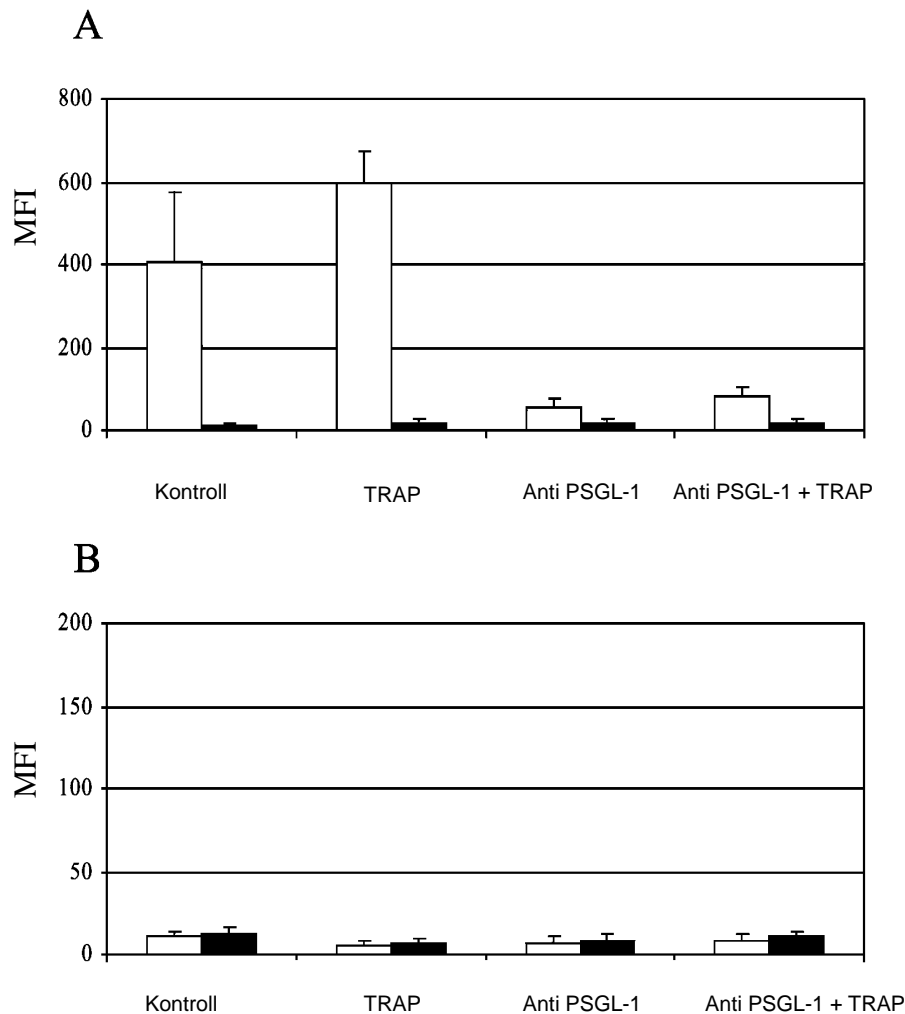
Az 5 μm vastag metszeteket hematoxinil-eozin (A, B), illetve Masson (C, D) módszerrel festettük meg. A nyilak a trombin jelenlétét mutatják a tüdőerekben. A PSGL-1^{-/-} egerek mintáiban kevesebb trombin látható. A nyílhegy egy majdnem teljesen elzáródott eret mutat a D ábrán. Az egér fibrinnel keresztreakciót adó monoklonális anti-humán fibrin ellenes antitest (mAb350) mutatja a lerakódott fibrint az erekben (E, F).



10. ábra. Elzáródott erek százalékos aránya a tüdőszövetben. A thrombotizált erek arányát Masson festéssel és mAb350 jelöléssel mutattuk ki. 12 látótérben (40x objektívvel) számoltuk meg 3-4 állat mintájában az elzáródott ereket és az átlag, illetve a standard deviatio értékeit tüntettük fel az ábrán. Mindkét módszerrel szignifikánsan kevesebb elzáródott ér látható a KO egértörzsben. A világos oszlop a WT, a sötét oszlop a KO egerek eredményét jelképezi.

6.4. Heterotipikus aggregátumok keletkezése

A vad típusú egerek neutrophyl granulocytái magas CD41 (Platelet Glycoprotein IIb) fluoreszcencia intenzitást mutattak TRAP stimuláció hatására, mert a vérlemezkék (vagy vérlemezke eredetű mikropartikulák) hozzájuk tapadtak. Ezt a hatást teljes mértékben gátolni lehetett anti-PSGL-1 blokkoló antitest használatával (ekkor a TRAP hatására nem emelkedett meg a neutrophyl granulocyták CD41 fluoreszcencia intenzitása). A monocytáknál hasonló jelenséget lehetett tapasztalni, míg a lymphocytáknál semmiféle változás nem következett be TRAP hatására. A KO egértörzsben egyetlen fehérvérsejt populáció CD41 fluoreszcencia intenzitása sem változott meg TRAP hatására (11. ábra).

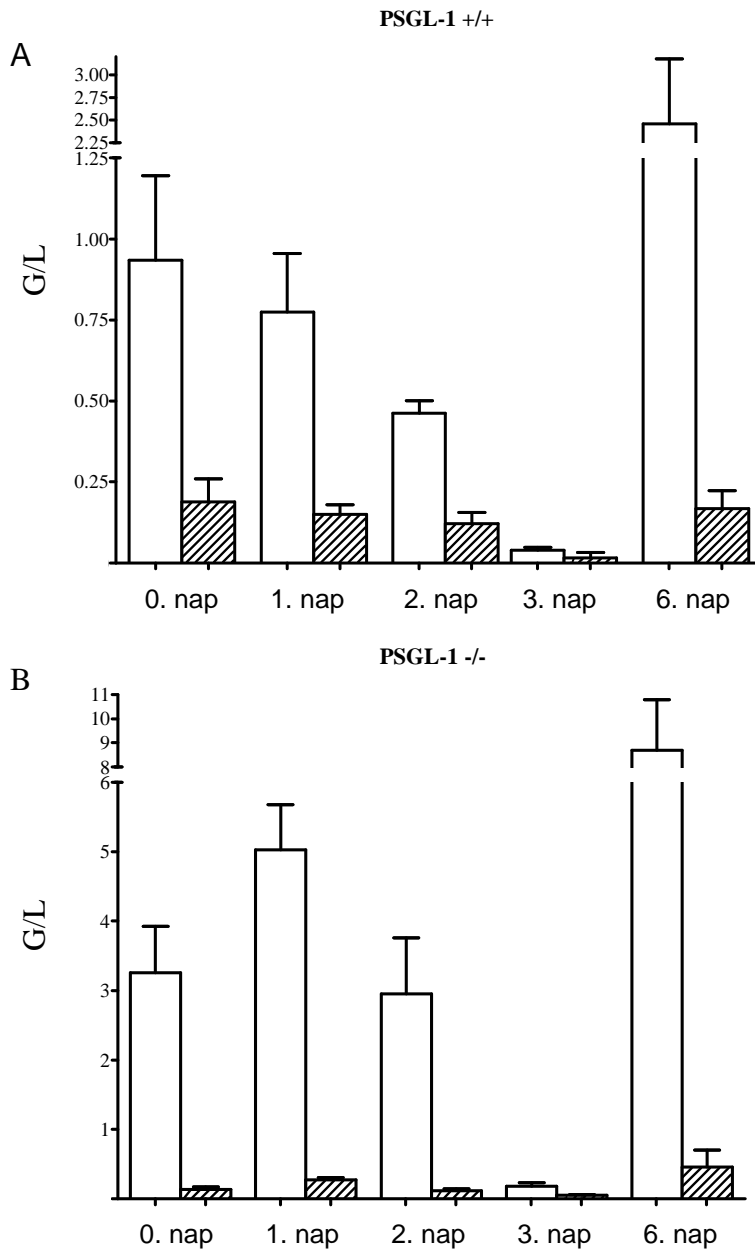


11. ábra. Fehérvérsejtek CD41 fluoreszcencia intenzitásának értékei (MFI: átlagos fluoreszcencia intenzitás). A fehérvérsejt-vérlemezke aggregátumokat a CD41 jelölés alapján azonosítottuk a vad típusú (A. ábra) és KO egértörzsben (B. ábra). A vad típusú egerekben magasabb fluoreszcencia intenzitás értéket lehetett mérni már a kontroll (kezelést nem kapott) állatoknál, mely TRAP hatására tovább fokozódott, viszont anti-PSGL-1 blokkoló antitest hatására nagymértékben lecsökkent. A KO egértörzsben nem lehetett számottevő CD41 fluoreszcencia intenzitást detektálni. A világos oszlopok a neutrophyl granulocyták, a sötét oszlopok a lymphocyták fluoreszcencia intenzitás értékeit mutatják. (n=4, az ábrán az átlag és SD értékek vannak feltüntetve).

6.5. Fehérvérsejtek eliminációja a keringésből indukált citopénia során

Ciklofoszfamid kezelés hatására mindkét egértörzs fehérvérsejtszáma lecsökkent 80-90%-kal, de különböző kinetikával. A vad típusú egerekben minden fehérvérsejt populáció abszolút száma lecsökkent, míg a KO állatoknál az abszolút neutrophyl és monocyta szám az első nap emelkedett és csak a második napon kezdett el csökkenni.

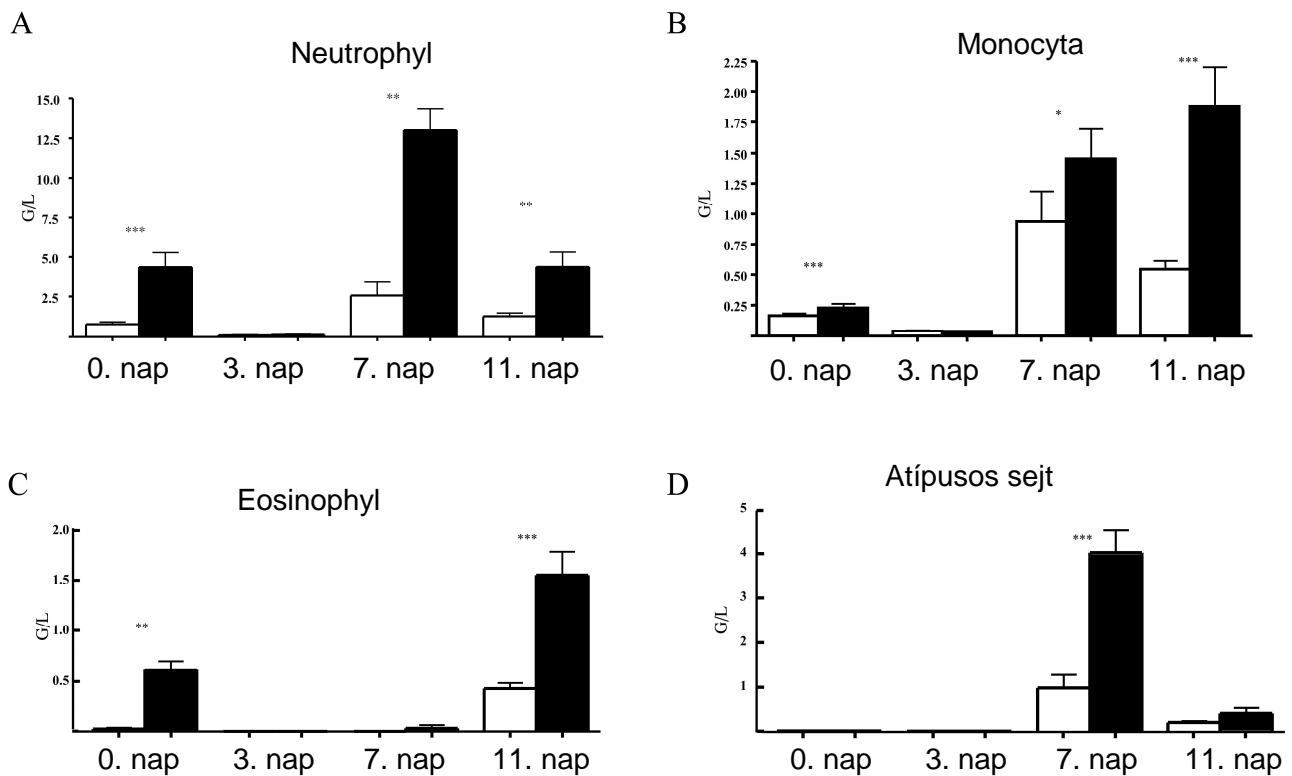
Mindkét egértörzs egyedeiben a harmadik napra csökkent le leginkább a fehérvérsejtszám. A sejtszámok a hatodik napon érték el a maximumot, de a KO egereknél az értékek szignifikánsan magasabbak voltak (a kiindulási sejtszám háromszorosa, 12. ábra).



12. ábra. Egyszeri dózísú ciklofoszfamid beadása után mért fehérvérsejtszámok ($10^9/L$, $n=4$). A világos oszlop mutatja a neutrophyl granulocytákat, míg a csíkozott vonal a monocytákat vad típusú (A) és KO egereknél (B).

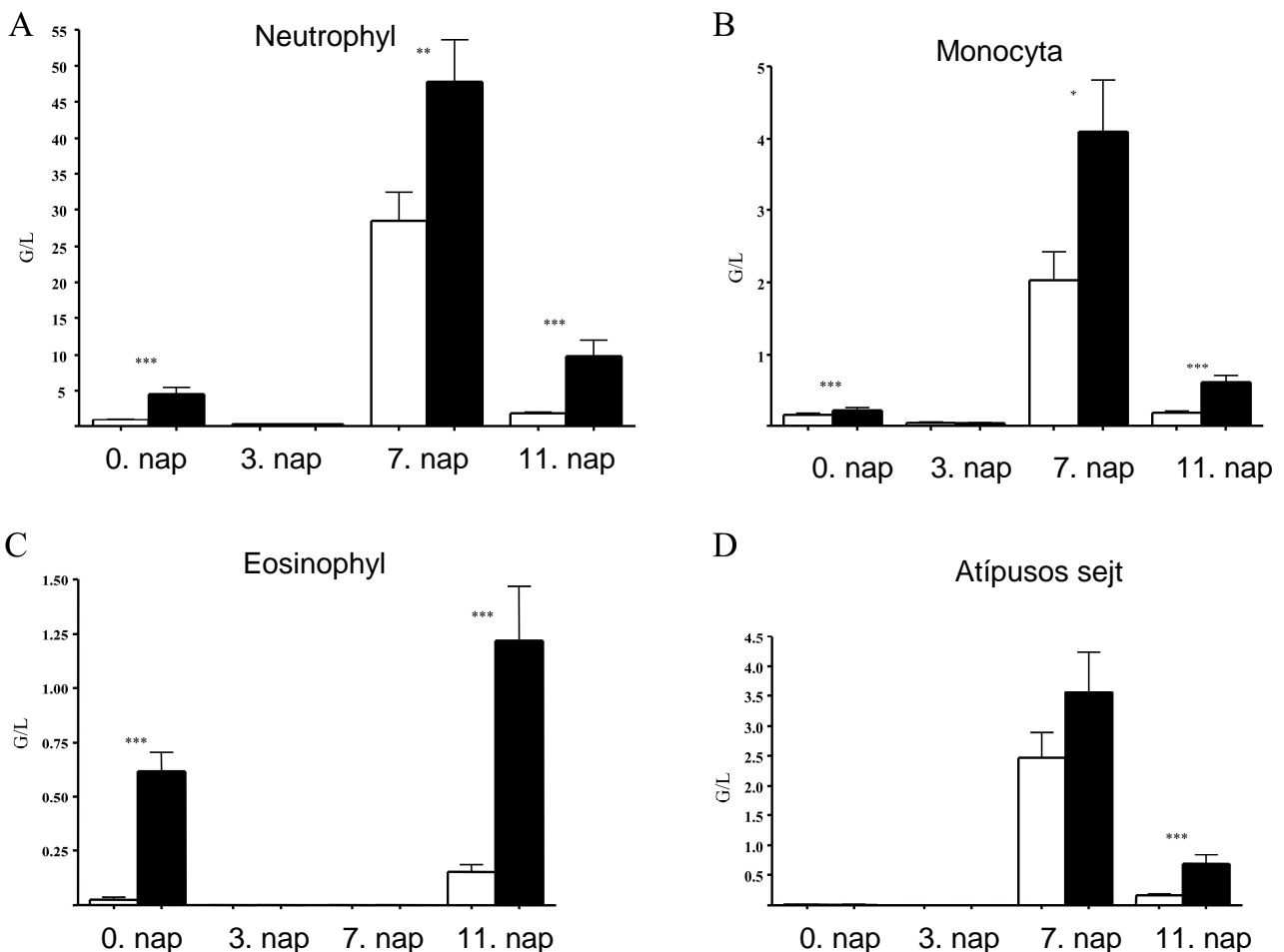
6.6. Spontán és G-CSF indukált fehérvérsejt mobilizáció

A spontán fehérvérsejt mobilizáció során (az állatok nem kaptak G-CSF kezelést) az egyszeri dózisú ciklofoszfamid injekció beadása után hét nappal mindkét egértörzsben a kiindulási értéknél szignifikánsan magasabb neutrophyl és monocyta számot mértünk (n=7). A vad típusú egereknél az abszolút neutrophyl granulocyta szám a 7. napon 3,0 G/L volt, míg a KO egértörzsben sokkal magasabb (12,5 G/L). A monocyták esetén a legmagasabb sejt számot a vad típusú egereknél a 7. napon, míg a KO egereknél a 11. napon lehetett megfigyelni. A korábban elhanyagolható mennyiségben jelenlévő atípusos neutrophyl granulocyták (prekursor sejtek) száma szintén megemelkedett a 7. és 11. napon. Az eosinophyl sejtek számának változása egy másfajta mintázatot mutatott: a 7. napon szinte detektálhatatlanul alacsony volt a mennyiségük, de egy kis késleltetéssel a 11. napra (különösen a KO egértörzsben) megemelkedett a számuk (13. ábra).



13. ábra. Endogen G-CSF hatása indukált citopéniában. A kísérletek során az állatok nem kaptak G-CSF kezelést a ciklofoszfamid injekció után (n=7). A neutrophyl granulocyták (A), monocyták (B), eosinophyl sejtek (C) és atípusos sejtek (D) számát $10^9/L$ mértékegységben fejeztük ki. Az világos oszlopok a vad típusú törzset, a sötét oszlopok a KO törzset jelképezik. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

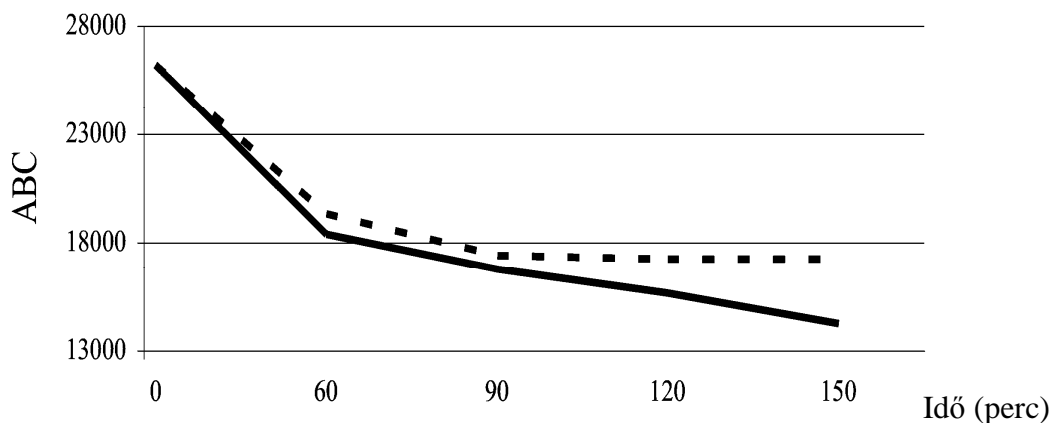
Az exogén G-CSF hatásának vizsgálatokor az egerek (n=15) a citopenia kiváltása után négy napon keresztül, naponta két alkalommal 7,8 µg/kg dózisban kaptak Neupogent (G-CSF). Négy órával az utolsó dózis után (a 7. napon) a neutrophyl granulocyták száma 28,3 G/L-re (vad típusú), illetve 47,7 G/L-re (KO) emelkedett, míg a monocyták száma 2,0 G/L (vad típusú), illetve 4,1 G/L (KO) értéket ért el. A neutrophylek, monocyták és eosinophyl sejtek abszolút száma a KO törzsben szignifikánsan emelkedett ($p < 0,05$ – $p < 0,0001$) a vad típusú egerekhez képest (14. ábra). A korábbi kísérletekkel összehasonlítva, exogén G-CSF kezelés hatására a neutrophylek és monocyták abszolút száma lényegesen magasabbra emelkedett, míg az eosinophylek számában nem lehetett megfigyelni ezt a különbséget. A spontán fehérvérsejt mobilizációhoz hasonlóan az eosinophyl sejtek számának emelkedése kis késleltetéssel, a 11. napon alakult ki.



14. ábra. Indukált citopénia utáni exogén G-CSF adagolásának hatása. Neutrophyl (A), monocyta (B), eosinophyl (C) és atípusos sejtek (D) számának ($10^9/L$ mértékegységben) változása G-CSF hatására (melyet négy napon keresztül, naponta kétszer adagoltunk 7,8 µg/kg dózisban, n=15). A világos oszlop a vad típusú egértörzset, a sötét oszlop a KO törzset jelképezi.

6.7. A G-CSF hatása a PSGL-1 expresszióra

Egy in vitro kísérletben azt vizsgáltuk, hogy a G-CSF befolyásolja-e a PSGL-1 expressziót az inkubációs idő függvényében. Összesen 4 humán és 4 vad típusú egér mintát használtunk. Az eredményeket antitest-kötő kapacitással (ABC- antibody binding capacity) jellemeztük, ami arányos a sejtfelszíni receptorszámmal. Habár a sejtek felszínéről a PSGL-1 spontán is lehasadt, sikerült egy korábbi kísérlet eredményeit (Jilma et al. 2002) alátámasztanunk, melyben emberi mintákban spontán PSGL-1 lehasadást írtak le neutrophyl granulocyták felszínéről (15. ábra). A vad típusú egértörzs neutrophyl granulocytáinak felszínén található PSGL-1 receptor sűrűsége megegyezett a korábban emberben leírt értékekkel (Benkő et al. 1999, Kappelmayer et al. 2001).



15. ábra. A sejtfelszíni PSGL-1 receptorszám csökkenése G-CSF hatására. ACD (adenin-citrát-dextróz) antikoagulált vad típusú egerek perifériás véréből különböző ideig inkubáltuk 60 µg/L koncentrációjú G-CSF jelenlétében (folyamatos vonal), illetve fiziológiás sóoldattal (szaggatott vonal). Az egér neutrophyl granulocyták felszínén spontán is csökkent a PSGL-1 receptorok száma, de G-CSF hatására a folyamat sokkal kifejezettebb volt. ABC: antitest-kötő kapacitás (antibody binding capacity). Az ábrán négy kísérlet közül az egyik reprezentatív minta görbéje látható.

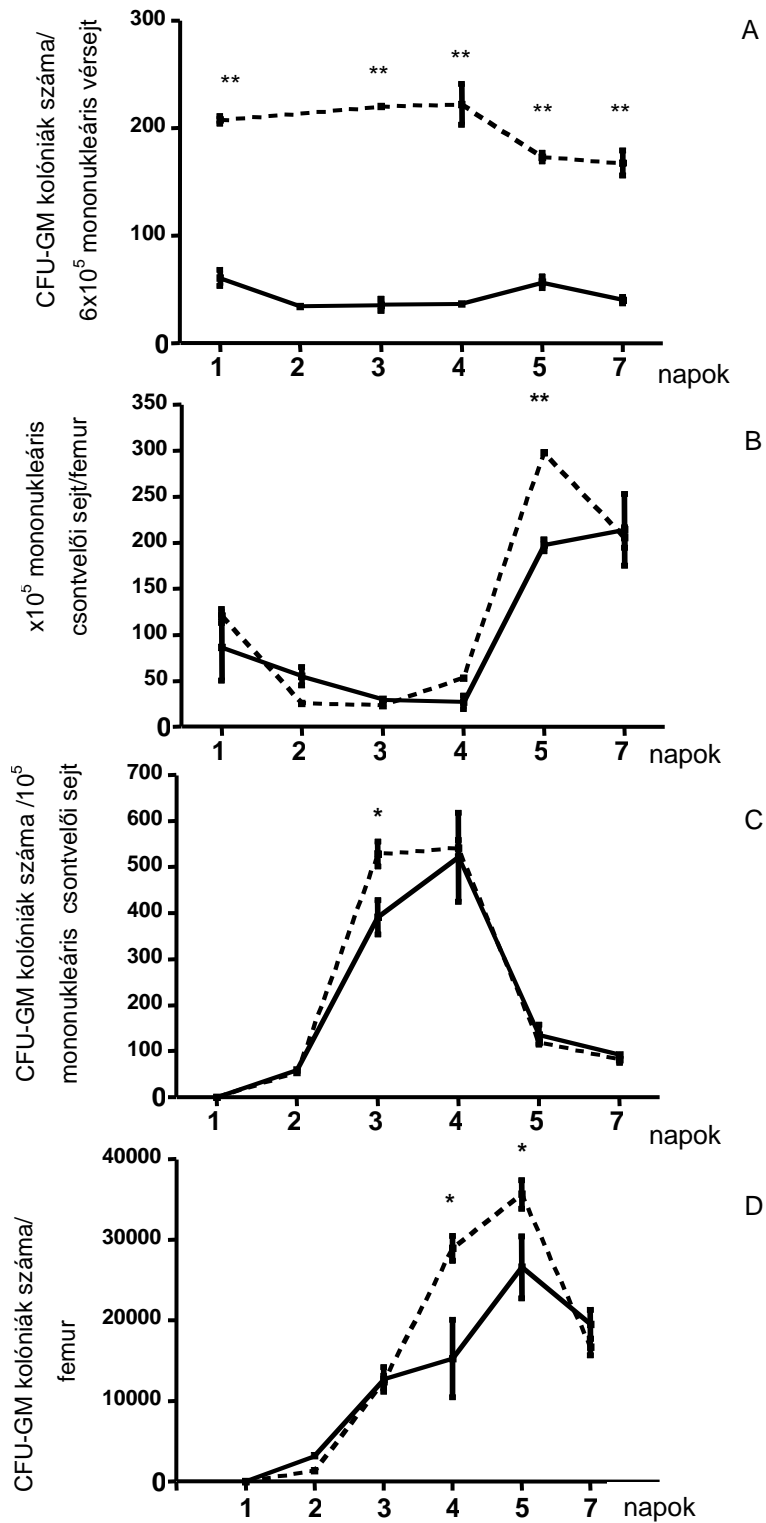
6.8. CFU-GM vizsgálat a perifériás vérben és a csontvelőben

Kolónia-képző egységek vizsgálata során folyamatosan magasabb CFU-GM számot találtunk a KO egerek perifériás vérében. Átlagosan négyszer több CFU-GM található a KO egerek perifériás vérében, mint a vad típusú egerek mintájában (16. ábra A).

Az ötödik napon kifejezett csökkenést lehetett megfigyelni a CFU-GM számban a KO egerek esetében, de még így is szignifikánsan magasabb volt a számuk, mint a vad típusú törzsben ($p < 0,01$).

A csontvelői cellularitást az összes mononukleáris sejt száma alapján határoztuk meg, ami a ciklofoszfamid kezelés utáni első napokban csökkent, mivel a proliferáló progenitor sejtek károsodtak, illetve elpusztultak (16. ábra B). A csontvelői sejtsűrűség tükrözi a csontvelő hemopoetikus aktivitását, habár a csontvelő regenerációjában a CFU-GM sejtek vesznek részt. A csontvelőben a 10^5 mononukleáris sejtre jutó CFU-GM kolóniák száma párhuzamosan csökkent mindkét egértörzsben az indukált citopénia hatására, de a számuk szignifikánsan magasabbra emelkedett a PSGL-1^{-/-} egerekben a harmadik napra ($p < 0,05$, 16. ábra C).

A CFU-GM kolóniák számának emelkedésével a combcsontra (femur) vonatkoztatott CFU-GM populáció száma szignifikánsan magasabbra emelkedett a 4. és 5. napon a PSGL-1^{-/-} egerekben (16. ábra D).



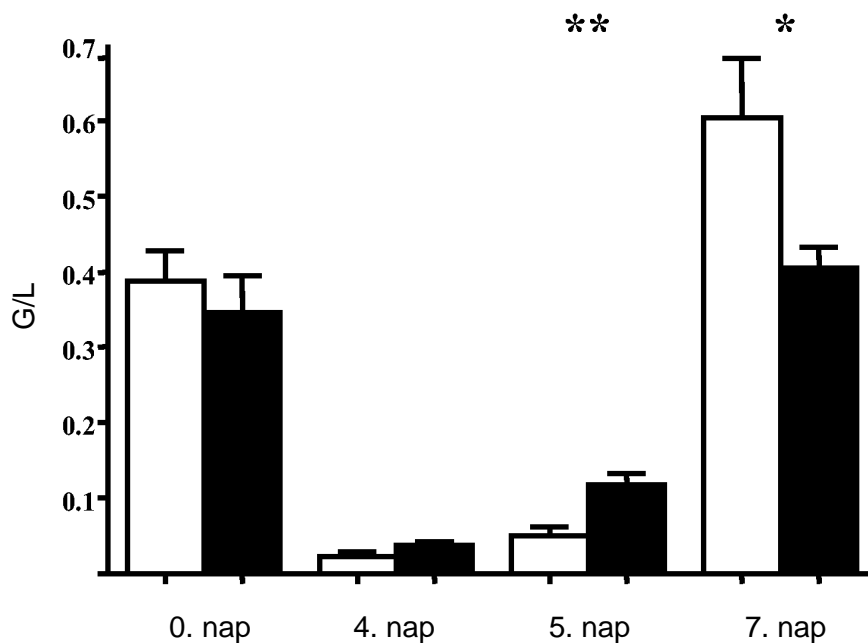
16. ábra. Kolónia képző egységek és mononukleáris sejtek vizsgálata csontvelőben és perifériás vérben ciklofoszfamid kezelés után (G-CSF kezelés nélkül). A folyamatos vonal a vad típusú, míg a szaggatott vonal a KO egerek értékeit mutatja.

A perifériás vér CFU-GM számának vizsgálatakor (A) minden időpontban szignifikánsan magasabb értékeket kaptunk a PSGL-1^{-/-} egerek esetén. A femurban található mononukleáris sejtek számát (B) és a mononukleáris sejtekre vonatkoztatott CFU-GM kolóniák számát (C) meghatározva kapjuk meg a femur CFU-GM kolóniáinak a számát (D). A PSGL-1^{-/-} törzs egyedekben szignifikánsan magasabb CFU-GM kolóniaszámot kaptunk a 3. napon, ami szignifikánsan magasabb mononukleáris sejtszámot és CFU-GM mennyiséget eredményezett a femurban a 4. és 5. napon. *p<0,05, **p<0,01

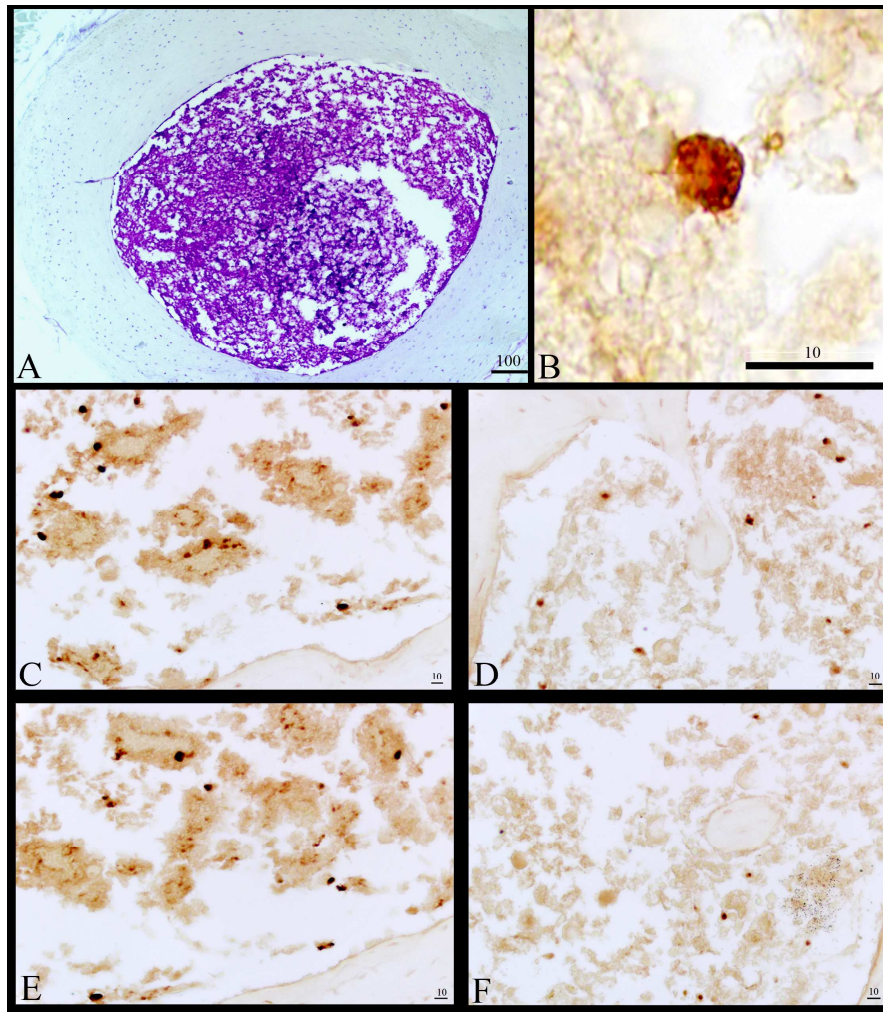
6.9. Össejtek vizsgálata perifériás vérben és csontvelőben

A kolónia képző egységek vizsgálatának eredményei egyezést mutattak a perifériás vérben keringő CD34+/CD117+ össejtek számával, mivel utóbbiak mennyisége szignifikánsan magasabb volt az 5. napon a KO egértörzsben két színnel történő jelöléssel áramlási citometriai vizsgálatok során (17. ábra).

Áramlási citometriai vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a 7. napon a vad típusú egerekben az össejtek száma a perifériás vérben jelentősen megemelkedett és ez összhangban volt a csontvelő immunhisztokémiai vizsgálatának eredményeivel (18. ábra).



17. ábra. CD34/CD117 dupla pozitív sejtek száma ciklofoszfamid kezelés után. CD34 és CD117 dupla pozitívítást mutató sejtek száma 0, 4, 5 és 7 nappal a ciklofoszfamid kezelés után (n=4-7). A világos oszlop a PSGL^{+/+} törzset, a sötét oszlop pedig a PSGL^{-/-} törzset mutatja.



18. ábra. CD34⁺ sejtek mikroszkópos vizsgálata. Egér combcsont keresztmetszet kis nagyítással (A). CD34 pozitív immunreakció nagyobb nagyítással (B), illetve kezeletlen vad (C) és KO (D) egerekben. Csontvelői kép 7 nappal a ciklofoszfamid kezelés után vad (E) és KO (F) állatokban. A méretskála 100 µm nagyságú az A ábrán és 10 µm a B-F ábrákon.

7. Megbeszélés

A PSGL-1 hiány védő hatása thrombotikus stimulusokkal szemben

A genetikailag módosított egerek kiváló modellek a humán megbetegedések pathomechanizmusának megértésében (Dold et al. 2010, Fernandes et al. 2003). Habár az egereknek az emberhez képest jelentősen emelkedett a thrombocyta száma és mások az áramlási viszonyok az erekben, a kidolgozott thrombosis modellek a klinikai betegellátásban is hasznosak lehetnek, mely alapján új gyógyszereket lehet kifejleszteni az artériás thrombosis megelőzésében (Nigam et al. 2002).

A fehérvérsejtek, vérlemezkék és endothel sejtek közti interakciók fontos szerepet játszanak a thrombosis kialakulásában. Részletes vizsgálatok bizonyították, hogy P-szelektin hiányában csökken a fehérvérsejtek érfalhoz történő kitapadási képessége és a különböző stimulusokra bekövetkező thrombus képződés mértéke (Myers et al. 2003, Yamada et al. 1995). A PSGL-1 hiányában a thrombotikus stimulusokra adott választ korábban nem vizsgálták részletesen, ezért módosítottunk egy korábbi thrombosis modellt, melyben kollagén+adrenalin stimulust használtak (DiMinno et al. 1983, Momi et al. 2009). A korábbi tanulmányokban alkalmazott dózisban bejuttatva a kollagént és adrenalint nem találtunk számottevő különbséget vad típusú és PSGL-1 hiányos egerek válaszreakciójában. Amikor felére csökkentettük a thrombosis kiváltó anyagok mennyiségét („fél” dózis), látványos különbséget tapasztaltunk a két egértörzs túlélésében. Teljes dózis alkalmazásakor a vad típusú egerek 62%-a pusztult el, míg a PSGL^{-/-} törzs egyedeinek a 47%-a. A felére csökkentett dózis alkalmazásával azt találtuk, hogy a vad típusú egerek 50%-a pusztult el, míg a KO egereknek csupán a 10%-a. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a nagyobb dózis elfedi a PSGL-1 hiányának protektív hatását a thrombotikus stimulusokkal szemben. A thrombocytaszám csökkenésében nem találtunk különbséget a két egértörzs között amikor teljes dózisú kollagént+adrenalin alkalmaztunk, de „fél dózis” beadásakor a vad típusú egerek vérlemezke számának csökkenése szignifikánsan nagyobb volt. Ez felveti a lehetőséget, hogy a PSGL-1 molekulának fontos szerepe van a thrombus képződésben és a fehérvérsejt-vérlemezke interakcióban.

A neutrophyl granulocyták száma a stimulus hatására mindkét törzsben szignifikánsan csökkent. Igazoltuk a korábbi megfigyeléseket, mely szerint a PSGL^{-/-} törzs egyedeinek perifériás vérében magasabb a neutrophyl granulocyták aránya (Xia et al. 2002).

A vérlemezkéket közvetlenül aktiváltuk az egerek farokvénájába fecskendezett kollagén+adrenalin injekcióval és ezzel kiváltottuk a szisztémás thrombosit. Az előzetes kísérleteink során megállapítottuk, hogy a mikrothrombusok leginkább a tüdőszövetben akadnak el/rakódnak le (mivel a tüdőnek jó a vérellátása, kisebbek az erek és egy kicsit lassabb a keringés). Immunoblot vizsgálatokkal több fibrint találtunk a vad típusú törzsben és később ezt alátámasztottuk mikroszkópos vizsgálatokkal. Hematoxin-eozin, Masson festést, valamint fibrinre specifikus monoklonális antitestet (mAb350) alkalmazva is azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú egereknél több thrombus keletkezik és ezek teljesen, vagy nagy részben (70-80%) elzárják az ereket. A PSGL-1 hiányos állatokban az erek nem, vagy csak részlegesen (az erek nagyobb része maradt átjárható) záródtak el és szignifikánsan kevesebb volt a thrombotizált erek száma. Ez azt a hipotézist támasztja alá, mely szerint a PSGL^{-/-} állatokban a kisebb fibrin lerakódás a kevesebb thrombus képződésének a következménye.

A heterotipikus aggregátumok képződésének módja eltért a két állattörzsben. Annak igazolására, hogy ennek a hátterében valóban a PSGL-1 molekula áll, egy antitesttel leblokkoltuk a vad típusú egerek PSGL-1 receptorát és in vitro aktiváltuk a vérlemezkéket. A blokkoló antitest hatására ugyanazt a mintázatot kaptuk, mint a KO egereknél és ezzel igazoltuk, hogy a thrombocyta-fehérvérsejt aggregátumok azért különböztek a két törzsben, mert a KO egerek nem rendelkeztek a PSGL-1 molekulával.

Összefoglalva: kutatásaink igazolták, hogy a PSGL-1 hiányának védő hatása van a mesterségesen kiváltott thrombosis szemben. Ez a hatás kapcsolatban állhat ennek a mucinnak a széleskörű előfordulásával és a sokrétű sejt-sejt interakcióban betöltött szerepével (Miszti-Blasius et al. 2011). A klinikai gyakorlatban a P-szelektin, E-szelektin, L-szelektin és PSGL-1 ellen termelt antitestek alkalmazásával a szövetek szívinfarktus utáni reperfüziós károsodásai esetleg csökkenthetők lehetnek (Nigam et al. 2002).

A PSGL-1 hiány jelentősége a csontvelői őssejt mobilizációban

A csontvelőben az érett myeloid sejtek, illetve prekursor sejtek „horgonyzása”, majd perifériás vérbe kerülése receptor-ligand kölcsönhatások bonyolult együtthatásának a következménye. Mindig a szervezet igényének megfelelően kerülnek ki az érett fehérvérsejtek, vagy az éretlenebb előalakok a perifériás vérbe. Az egyensúlyban lévő csontvelőből mindig annyi fehérvérsejt jut a keringésbe, amennyi elpusztul. Egy fertőzés, vagy citosztatikus kezelés hatására a stimulált csontvelőből sokkal éretlenebb leukocita előalakok is kikerülnek (Nervi et al. 2006). A receptor-ligand interakciókat részletesen vizsgálták (Wojciechowski et al. 2008, Zarbock et al. 2011), de még nem teljesen tisztázott, hogy ezek a kapcsolódások mennyire „túlbiztosítottak”, illetve minden kapcsolódás fontos-e ahhoz, hogy időben kerüljön ki a fehérvérsejt a csontvelőből a keringésbe. A P-szelektin hiányának jelentőségét korábban már leírták (Frenette et al. 2000), ezért a kísérleteink során mi a ligandjának (PSGL-1) jelentőségét vizsgáltuk. A PSGL-1 hiány kétféleképpen is befolyásolhatja a sejt-sejt interakciókat. Egyrészt megtalálható a csontvelőben az extracelluláris mátrixban (Nervi et al. 2006) és ezáltal segíti a hemopoetikus őssejtek és progenitor sejtek horgonyzását (a felszínükön található L-szelektin segítségével). Másrészt ez a dimer mucin segíti a myeloid sejtek kilépését az érpályából a szövetekbe. Az aktivált endothel sejtek P-szelektint és E-szelektint expresszálnak, melyek döntően meghatározzák a gördülő fehérvérsejtek és az érfal közti kapcsolódást (Laszik et al. 1996, Patel et al. 1997, Patel et al. 2002, Sperandio et al. 2003). A fehérvérsejtek felszínén folyamatosan jelenlévő PSGL-1 (Kappelmayer et al. 2004) molekula biztosítja a kapcsolatot a receptor és ligandja között. Kísérleteink során bebizonyítottuk, hogy a PSGL-1 molekula hiányában a neutrophyl granulocyták és monocyták érpályából történő kilépése lassabb és emiatt tovább maradtak a keringésben amikor cyclophosphamiddal citopéniát váltottunk ki. Amikor egy egyszeri dózisú citosztatikummal blokkoltuk az új fehérvérsejtek képződését, akkor a KO törzs egyedeiben lassabban csökkent a fehérvérsejtszám, mint a vad típusú állatokban.

A különböző myeloid sejtek csontvelőből történő kikerülése változatos volt. A neutrophyl granulocyták és monocyták száma nagyon hasonló módon változott, akár történt exogén G-CSF adagolás, akár nem.

A myeloid sejtek emelkedésének aránya mindkét kísérletsorozatban hasonló volt a két egértörzsben, de a myeloid sejtek abszolút száma magasabb volt a PSGL-1^{-/-} egerek esetén.

Az egyetlen különbség a két kísérletsorozat között az volt, hogy exogén G-CSF adagolása nélkül a monocyták a 11. napon érték el a maximális számukat, míg exogén G-CSF hatására már a 7. napon (hasonlóan a neutrophyl granulocytákhoz). Ennek hátterében az állhat, hogy a monocyták lassabban kerültek ki a csontvelőből, vagy még inkább az a jelenség, hogy hosszabb ideig maradtak a keringésben a PSGL-1 hiányában.

Az eosinophyl granulocyták a neutrophyl granulocytákhoz és monocytákhoz képest késleltetetten érték el a maximális számukat mindkét kísérletsorozatban és ezt az értéket nem befolyásolta a G-CSF adása. Az eosinophyl granulocyták főleg az emésztőrendszerben találhatóak, és a perifériás vérben a teljes fehérvérsejtszám 1-4%-át teszik ki, a számuk csökkenésének, vagy emelkedésének a kinetikája sokkal összetettebb mint a neutrophyl granulocytáké. Ráadásul számos egyéb faktor közrejátszhat ebben az eltérő kinetikában. A G-CSF nem hat közvetlenül az eosinophyl granulocytákra, de egyéb citokinek (IL-2, IL-3, IL-5 és IL-7) gyorsítják a kijutásukat a perifériás vérbe és ezáltal egy indirekt, késleltetett stimuláló hatást fejtenek ki. Korábbi kísérletek során megfigyelték, hogy P-szelektint, vagy E-szelektint tartalmazó felületen kevesebb eosinophyl szaporodik fel mint neutrophyl (Patel et al. 1997). Ezen kívül az eosinophylek kevesebb fehérvérsejt-fehérvérsejt interakcióban vesznek részt. Ahhoz, hogy ezeket az eredményeket megfelelően értelmezzük, ki kell emelni, hogy a korábbi kísérletekhez hasonlóan (Davenpeck et al. 2000, Jilma et al. 2002) mi is alátámasztottuk, hogy in vitro körülmények között a G-CSF csökkent a PSGL-1 sejtfelszíni expresszióját és adhézióját a P-szelektinhez. Emiatt elképzelhető, hogy abban a kísérletsorozatban, amelyikben exogén G-CSF adagolása történt a vad típusú egereknél (melyeknél jelen van a PSGL-1 molekula) nemcsak több sejtet mobilizáltunk a csontvelőből, hanem a sejtek tovább maradtak a keringésben, mivel elvesztették a sejtfelszíni PSGL-1 mennyiségük egy részét és kevésbé tudtak kötődni az érfalhoz. Nemcsak az egereknél, hanem emberi mintákban is tapasztaltuk a PSGL-1 expresszió csökkenését exogén G-CSF hatására. A vad típusú egértörzs myeloid sejtjeinek felszínén csökkent a CD162 (PSGL-1) expresszió G-CSF hatására, de a lymphocyták esetén nem változott a CD162 mennyisége. Kis mértékben mindkét egértörzsnél csökkenhetett a fehérvérsejtek érpályából történő kikerülésének képessége, mert a G-CSF hatására csökkent a fontos sejtadhéziós molekulának, az L-szelektinnek is a sűrűsége a fehérvérsejtek felszínén. A G-CSF másik hatása az volt, hogy az osteoblastok felszínén csökkentette az SDF-1 mennyiségét (Nervi et al. 2006) és ezáltal a szelektinek és ligandjaik kölcsönhatása megváltozott.

Az atípusos neutrophyl granulocytá prekurzorok száma szignifikánsan magasabb volt a KO egértörzsben, mint a vad típusú törzsben. Ezen sejtek számában nem volt különbség exogén G-CSF hatására. A G-CSF hatására megjelenő prekurzor sejtek vizsgálata alapvető fontosságú, ezért a kolóniaképző egységeket részletesen elemeztük a csontvelőben és a perifériás vérben. Ezzel párhuzamosan áramlási citometriai vizsgálatokat és immunhisztokémiai vizsgálatokat is végeztünk. A kolóniaképző egységek jelentős része elkötelezett - „lineage-restricted” - kolóniából állt. Vizsgálataink során a perifériás vérben sokkal több CFU-GM kolóniát találtunk mint a csontvelőben az indukált citopéniás periódus alatt. Ebben az időszakban a csontvelőben a kolóniák száma mindkét törzsben emelkedett, de másfajta kinetikával. A PSGL-1^{-/-} állatokban több CFU-GM kolóniát találtunk a femurban. Noha a kolóniaképző esszék jól mutatják a progenitor sejtek mennyiségének a változását, a kolóniaképző sejtek nem azonosak a hemopoetikus őssejtekkel, viszont a csontvelő CFU-GM sejtjeinek mennyisége arányos a CD34/CD117 dupla pozitív sejtek mennyiségével (Purton et al. 2007). Az emberi őssejtek a CD45/CD34 dupla pozitívitásuk alapján azonosíthatók, amivel ki lehet zárni a keringő endothel sejteket. Ez a megközelítés egerekben kevésbé használható, mert a vizsgálatok során a CD34 sejt felszíni jelölődése változhat (Sato et al. 1999), ezért ilyenkor inkább a CD117/CD34 dupla pozitív események jelzik az őssejteket.

Korábbi tanulmányokhoz hasonlóan (De Haan et al. 2000) azt tapasztaltuk, hogy a sejt mobilizáció csúcspontján szignifikánsan több CD34/117 dupla pozitív progenitor sejtet találtunk a perifériás vérben, mint a kezelésben nem részesülő állatoknál („egyensúlyi állapot”), de ez csak a vad típusú egértörzsben volt megfigyelhető. Ezek az adatok összhangban álltak az immunhisztokémiai megfigyeléseinkkel, ahol a csontvelőben több CD34+ sejtet találtunk a vad típusú állatokban akár történt sejt mobilizáció, akár nem. Ismeretes, hogy a PSGL-1 nemcsak közreműködik az érett fehérvérsejtek P-szelektinhez történő kötődésében, de ez az egyetlen ligandja a P-szelektinnek az éretlen CD34+ hemopoetikus progenitor sejteken (Lévesque et al. 1999). Ezeknek a nagyon éretlen sejteknek a felszínén lényegesen alacsonyabb az egyéb adhezív receptoroknak (CD44, CD49d) a sűrűsége és emiatt talán könnyebben kerülnek a keringésbe a PSGL-1 hiányában (Elghetany 2002). A blast- és őssejtek viszont lényegesen több adhezív receptort hordoznak a felszínükön (Lévesque et al. 1999), ami a PSGL-1 – szelektin horgonyzás hiányában egészen másfajta sejt mobilizációs kinetikát eredményez.

A kísérleteinkben alkalmazott G-CSF dózisa alacsonyabb volt, mint a más munkacsoportok által egerekben alkalmazott mennyiség (Ellefson et al. 2004, Lord et al. 2001). Az embereknél ajánlott dózis leggyakrabban 5-10 µg/kg között változik és a vizsgálataink során mi is ezt alkalmaztuk. A KO egereknél a neutrophyl granulocyták és monocyták számának emelkedése lényegesen kifejezettebb volt, mint a vad típusú állatoknál akár alkalmaztunk G-CSF kezelést, akár nem. A G-CSF kezelés PSGL-1 hiányában sokkal nagyobb mértékű myeloid sejt mobilizációt eredményezett. Ennek a jövőben akár a humán terápiában is lehetne szerepe: ha sikerülne átmenetileg blokkolni a PSGL-1 és P-szelektin közti kötődést, akkor talán a nehezen mobilizáló betegeknél is sikeresebb lehetne az őssejt-gyűjtés, vagy kisebb dózisu G-CSF kezeléssel is hatékonyan lehetne mobilizálni a myeloid sejteket citosztatikus kezelés után és ezáltal csökkenteni lehetne a mellékhatásokat és a kezelés költségeit.

Összefoglalva: a kísérleteink rámutattak, hogy indukált citopénia során, PSGL-1 hiányában a myeloid sejtek perifériás vérbe történő mobilizációja sokkal gyorsabb. G-CSF hatására ez a jelenség még kifejezettebb (Miszti-Blasius et al. 2014). Ha a humán orvosi gyakorlatban átmenetileg blokkolni lehetne a P-szelektin és PSGL-1 közötti kapcsolatot (pl. egy PSGL-1 ellen termelt antitesttel), akkor kisebb dózisu G-CSF hatására is megfelelő myeloid sejtmobilizációt lehetne elérni hematológiai betegségekben, vagy citosztatikus kezelés után.

8. Összefoglalás

A gyulladás és érlemezés hátterében a vérlemezkék, fehérvérsejtek és endothel sejtek közti interakció áll. A vérlemezkéket a különböző sejtfelszíni receptoraikon keresztül, illetve szolubilis mediátorok által lehet aktiválni, melyek ezután központi szerepet játszanak a gyulladás kezdeti szakaszában és az endothel sejtek károsodásában. Ez a folyamat atherosclerotikus plakk kialakulásához vezethet, melynek következménye érelzáródás is lehet. A szívinfarktus, ischaemiás stroke és thrombosis a vezető halálokok közé tartoznak a fejlett világban. Ezekben a betegségekben közös, hogy az aktivált thrombocyták felszínén megjelenik a P-szelektin, mely kölcsönhatásba léphet a fehérvérsejtekkel a PSGL-1 molekulán keresztül, így heterotipikus aggregátumok keletkeznek. Ugyanezen ligand által kapcsolódnak a leukocyták az endothelsejtekhez.

Kollagén és adrenalin együttes beadásával thrombotikus stimulust idéztünk elő állatkísérletes modellben és igazolni tudtuk, hogy a PSGL-1 hiányában az egerek túlélési esélyei jobbak. Két különböző mikroszkópos módszerrel kimutattuk, hogy a kialakult thrombusok száma kevesebb és ezek a thrombusok kevésbé zárják el az ereket a PSGL-1^{-/-} egerekben. Ez a hatás a P-szelektin és PSGL-1 közti interakcióra vezethető vissza, mert ha blokkoltuk ezt a kapcsolódást, akkor kevesebb heterotipikus aggregátum keletkezett.

A P-szelektin és PSGL-1 közti kapcsolatnak a myeloid sejtek csontvelőből történő mobilizációjában, illetve az érpályából történő kilépésében is jelentősége van. Napjainkban a hemopoetikus őssejtek mobilizációja elképzelhetetlen lenne a különböző mobilizáló ágensek (G-CSF, GM-CSF, AMD-3100) nélkül. Munkánk során bizonyítottuk, hogy PSGL-1 hiányában a myeloid progenitor sejtek gyorsabban kerülnek ki a csontvelőből a perifériára. Ciklofoszfamid kezelés után a granulocytá-macrophag kolóniaképző egységek (CFU-GM) száma is emelkedett a PSGL-1^{-/-} állatok combcsontjában és ezzel párhuzamosan a perifériás vérben is emelkedett a CD34+/CD117+ őssejtek száma. Az eredményeink arra utalnak, hogy PSGL-1 hiányában a G-CSF hatékonyabban emelte meg a myeloid sejtek abszolút számát a perifériás vérben a csontvelőből történő gyorsabb mobilizáció, a keringő őssejtek érésének serkentése és az érpályából történő lassabb kilépés által.

9. Summary

Interactions between leukocytes, platelets and the endothelium influence inflammation and atherosclerosis. Platelets can be activated by specific cell adhesion molecules or soluble mediators and play an important role in the initial phase of inflammation and endothelial cell damage. This process can lead to formation of atherosclerotic plaque and later thrombosis.

Myocardial ischemia, ischemic stroke and thrombosis are the leading causes of death in the modern world. The common phenomenon in these disorders is that P-selectin appears on the surface of activated platelets that crossreacts with leukocytes via PSGL-1 and thus, heterotypic aggregates are formed. Leukocytes adhere to the endothelial cells via the same ligand.

Our findings indicated, that mice lacking PSGL-1 were more resistant to the thrombotic challenge elicited with collagen and adrenalin. In these PSGL-1^{-/-} mice less thrombi were detected by two different microscopic methods. In addition, fibrin deposition was considerably attenuated in the PSGL-1^{-/-} animals. These effects were due to the absence of P-selectin PSGL-1 interaction, since the blocking of this binding eliminated the effect as observed by the changes in the number of heterotypic aggregates.

Interaction between P-selectin and PSGL-1 may also mediate myeloid cell mobilization from the bone marrow and transendothelial migration of leukocytes. In clinical practice, cell mobilizing agents (G-CSF, GM-CSF, AMD-3100) are commonly used. In a series of experiments we demonstrated in mice lacking PSGL-1, that the mobilization of myeloid progenitor cells is faster than in wild-type animals. Furthermore, a significantly elevated number of colony forming unit granulocyte-macrophage (CFU-GM) was detected also in the femurs of PSGL-1^{-/-} mice, after cyclophosphamide treatment and these values paralleled with the elevation of CD34⁺/CD117⁺ stem cell counts in the peripheral blood. Our data suggest, that in the absence of PSGL-1, G-CSF was more potent in elevating absolute myeloid cell numbers by acting on cell release from the bone marrow, maturation from circulating precursor cells in the peripheral blood and prolonged retainment in the circulation.

10. A disszertáció új eredményei, megállapításai, klinikai jelentősége

1. Módosítottunk egy thrombosis modellt, melynek segítségével állatkísérletben vizsgálni lehet különböző dózisú kollagén és adrenalin hatására adott választ. A PSGL-1 hiányos állatok túlélési esélyei jobbak, mint a vad típusú egértörzs egyedeinek.
2. A kollagén és adrenalin dózis megfelelő megválasztásával („fél dózis”) megállapítottuk, hogy a PSGL-1^{-/-} állatokban kevesebb thrombus alakul ki és rakódik le a tüdőszövetben. A klinikai gyakorlatban a szelektinek és a PSGL-1 közti interakció blokkolásával feltételezhetően csökkenteni lehetne a reperfüziós szindróma hatásait, illetve stroke, vagy thrombosis során mérsékelni lehetne az érelzáródás (és ezzel az ischaemia) mértékét.
3. PSGL-1 hiányában, vagy annak in vitro blokkolásakor azt tapasztaltuk, hogy TRAP-indukált thrombosis hatására kevesebb heterotipikus aggregátum alakul ki.
4. PSGL-1 hiányában indukált citopénia hatására a myeloid sejtek lassabban lépnek ki a keringésből, tovább marad a perifériás vér fehérvérsejtszáma magas. Ha a betegellátásban blokkolni lehetne a PSGL-1 molekula hatását (pl. monoklonális antitesttel), akkor a citopénia utáni sepsis kockázata is kisebb lenne.
5. Rámutattunk, hogy PSGL-1 hiányában, indukált citopénia után a csontvelőből gyorsabban mobilizálódnak a hemopoetikus őssejtek és exogén G-CSF adagolása nélkül is magasabb fehérvérsejtszám érhető el. Ezt a klinikai gyakorlatban úgy lehetne hasznosítani, hogy a PSGL-1 blokkolása után kevesebb G-CSF adagolására lenne szükség. Ennek előnye, hogy kevesebb lenne a mellékhatás (beleértve az esetleges tumorsejt mobilizációt is).

11. Irodalomjegyzék

Asaduzzaman M, Rahman M, Jeppsson B, Thorlacius H. P-selectin glycoprotein-ligand-1 regulates pulmonary recruitment of neutrophils in a platelet-independent manner in abdominal sepsis. *Br J Pharmacol.* 2009;156:307-15.

Bahbouhi B, Berthelot L, Pettré S, Michel L, Wiertelowski S, Weksler B, Romero IA, Miller F, Couraud PO, Brouard S, Laplaud DA, Soullillou JP. Peripheral blood CD4+ T lymphocytes from multiple sclerosis patients are characterized by higher PSGL-1 expression and transmigration capacity across a human blood-brain barrier-derived endothelial cell line. *J Leukoc Biol.* 2009;86:1049-1063.

Baïsse B, Galisson F, Giraud S, Schapira M, Spertini O. Evolutionary conservation of P-selectin glycoprotein ligand-1 primary structure and function. *BMC Evol Biol* 2007;7:166.

Barthel SR, Gavino JD, Descheny L, Dimitroff CJ. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2007;11:1473-1491.

Benko I, Hernádi F, Megyeri A, Kiss A, Somogyi G, Tegyei Z, Kraicsovits F, Kovács P. Comparison of the toxicity of fluconazole and other azole antifungal drugs to murine and human granulocyte-macrophage progenitor cells in vitro. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:675-681.

Benko I, Kovács P, Szegedi I, Megyeri A, Kiss A, Balogh E, Oláh E, Kappelmayer J, Kiss C. Effect of myelopoietic and pleiotropic cytokines on colony formation by blast cells of children with acute lymphoblastic leukemia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001;363:499-508.

Bensinger W, Appelbaum F, Rowley S, Storb R, Sanders J, Lilleby K, Gooley T, Demirer T, Schiffman K, Weaver C, et al. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. *J Clin Oncol.* 1995;13:2547-2555.

Bienvenu JG, Tanguay JF, Théorêt JF, Kumar A, Schaub RG, Merhi Y. Recombinant soluble p-selectin glycoprotein ligand-1-Ig reduces restenosis through inhibition of platelet-neutrophil adhesion after double angioplasty in swine. *Circulation*. 2001;103:1128-34.

Bonfanti R, Furie BC, Furie B, Wagner DD. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood*. 1989;73:1109-1112.

Borges E, Tietz W, Steegmaier M, Moll T, Hallmann R, Hamann A, Vestweber D. P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on T helper 1 but not on T helper 2 cells binds to P-selectin and supports migration into inflamed skin. *J Exp Med*. 1997;185:573-578.

Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, Liles WC, Li X, Graham-Evans B, Campbell TB, Calandra G, Bridger G, Dale DC, Srour EF. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med*. 2005;201:1307-1318.

Bullard DC, Kunkel EJ, Kubo H, Hicks MJ, Lorenzo I, Doyle NA, Doerschuk CM, Ley K, Beaudet AL. Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J Exp Med*. 1996;183:2329-2336.

Busuttil RW, Lipshutz GS, Kupiec-Weglinski JW, Ponthieux S, Gjertson DW, Cheadle C, Watkins T, Ehrlich E, Katz E, Squiers EC, Rabb H, Hemmerich S. rPSGL-Ig for improvement of early liver allograft function: a double-blind, placebo-controlled, single-center phase II study. *Am J Transplant*. 2011;11:786-797.

Cambien B, Wagner DD. A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *Trends Mol Med*. 2004;10:179-186.

Cerletti C, Tamburrelli C, Izzi B, Gianfagna F, de Gaetano G. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thromb Res*. 2012;129:263-266.

Chervenick PA, Boggs DR. In vitro growth of granulocytic and mononuclear cell colonies from blood of normal individuals. *Blood*. 1971;37:131-135.

Cline MJ, Golde DW. Mobilization of hematopoietic stem cells (CFU-C) into the peripheral blood of man by endotoxin. *Exp Hematol* 1977;3:186-190.

da Costa Martins P, García-Vallejo JJ, van Thienen JV, Fernandez-Borja M, van Gils JM, Beckers C, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1023-1029.

Csongrádi É, Nagy B Jr, Fulop T, Varga Z, Karányi Z, Magyar MT, Oláh L, Papp M, Facskó A, Kappelmayer J, Paragh G, Káplár M. Increased levels of platelet activation markers are positively associated with carotid wall thickness and other atherosclerotic risk factors in obese patients. *Thromb Haemost*. 2011;106:683-692.

Davenpeck KL, Brummet ME, Hudson SA, Mayer RJ, Bochner BS. Activation of human leukocytes reduces surface P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) and adhesion to P-selectin in vitro. *J Immun* 2000;165:2764-2772.

De Haan G, Ausema A, Wilkens M, Molineux G, Dontje B. Efficient mobilization of haematopoietic progenitors after a single injection of pegylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in mouse strains with distinct marrow-cell pool sizes. *Br J Haematol* 2000;110:638-646.

Diaz-Ricart M, Brunso L, Pino M, Navalon F, Jou JM, Heras M, et al. Preanalytical treatment of EDTA-anticoagulated blood to ensure stabilization of the mean platelet volume and component measured with the ADVIA counters. *Thromb Res* 2010;126:30-35.

DiMinno G, Silver MJ. Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol. *J Pharmacol Exp Ther* 1983;225:57-60.

Dold S, Laschke MW, Zhau Y, Schilling M, Menger MD, Jeppsson B, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1-mediated leukocyte recruitment regulates hepatocellular damage in acute obstructive cholestasis in mice. *Inflamm Res* 2010;59:291-298.

Dugan MJ, Maziarz RT, Bensinger WI, Nademanee A, Liesveld J, Badel K, Dehner C, Gibney C, Bridger G, Calandra G. Safety and preliminary efficacy of plerixafor (Mozobil) in combination with chemotherapy and G-CSF: an open-label, multicenter, exploratory trial in patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma undergoing stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45:39-47.

Ehrhardt C, Kneuer C, Bakowsky U. Selectins-an emerging target for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56(4):527-549.

Elghetany MT. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol Dis* 2002;28:260-274.

Ellefson DD, diZerega GS, Espinoza T, Roda N, Maldonado S, Rodgers KE. Synergistic effects of co-administration of angiotensin 1-7 and Neupogen on hematopoietic recovery in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004;53:15-24.

Engelhardt B. PSGL-1--the hidden player in T cell trafficking into the brain in multiple sclerosis? *J Leukoc Biol*. 2009;86:1023-1025.

Eto T, Winkler I, Purton LE, Lévesque JP. Contrasting effects of P-selectin and E-selectin on the differentiation of murine hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 2005;33:232-242.

Falati S, Gross P, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med*. 2002;8:1175-1181.

Farmer DG, Anselmo D, Da Shen X, Ke B, Carmody IC, Gao F, Lassman C, McDiarmid SV, Shaw G, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Disruption of P-selectin signaling modulates cell trafficking and results in improved outcomes after mouse warm intestinal ischemia and reperfusion injury. *Transplantation*. 2005;80:828-835.

Fenk R, Hieronimus N, Steidl U, Bruns I, Graef T, Zohren F, Ruf L, Haas R, Kobbe G. Sustained G-CSF plasma levels following administration of pegfilgrastim fasten neutrophil reconstitution after high-dose chemotherapy and autologous blood stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Exp Hematol* 2006; 34:1296-1302.

Fernandes LS, Conde ID, Wayne Smith C, Kansas GS, Snapp KR, Bennet N, et al. Platelet-monocyte complex formation: effect of blocking PSGL-1 alone, and in combination with alphaIIb beta3 and alphaM beta2, in coronary stenting. *Thromb Res*. 2003;111:171-177.

Figueiredo J, Ferreira AE, Silva RL, Ulloa L, Grieco P, Cunha TM, Ferreira SH, Cunha FD, Kanashiro A. NDP-MSH inhibits neutrophil migration through nicotinic and adrenergic receptors in experimental peritonitis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2013;386:311-318.

Fischer EG, Riewald M, Huang HY, Miyagi Y, Kubota Y, Mueller BM, Ruf W. Tumor cell adhesion and migration supported by interaction of a receptor-protease complex with its inhibitor. *J Clin Invest*. 1999;104:1213-1221.

Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med*. 2000;191:1413-1422.

Frenette PS, Weiss L. Sulfated glycans induce rapid hematopoietic progenitor cell mobilization: evidence for selectin-dependent and independent mechanisms. *Blood*. 2000; 96:2460-2468.

Gaber AO, Mulgaonkar S, Kahan BD, Woodle ES, Alloway R, Bajjoka I, Jensik S, Klintmalm GB, Patton PR, Wiseman A, Lipshutz G, Kupiec-Weglinski J, Gaber LW, Katz E, Irish W, Squiers EC, Hemmerich S. YSPSL (rPSGL-Ig) for improvement of early renal allograft function: a double-blind, placebo-controlled, multi-center Phase IIa study. *Clin Transplant*. 2011;25:523-533.

Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature*. 1990;343:757-760.

Géresi K, Benkő K, Szabó B, Megyeri A, Peitl B, Szilvássy Z, Benkő I. Toxicity of cytotoxic agents to granulocyte-macrophage progenitors is increased in obese Zucker and non-obese but insulin resistant Goto-Kakizaki rats. *Eur J Pharmacol* 2012;696:172-178.

Gertz MA. Current status of stem cell mobilization. *Br J Haematol* 2010;150:647-662.

Goldschneider I. Cyclical mobilization and gated importation of thymocyte progenitors in the adult mouse: evidence for a thymus-bone marrow feedback loop. *Immunol Rev*. 2006;209:58-75.

Goodman JW, Hodgson GS. Evidence for Stem Cells in the Peripheral Blood of Mice. *Blood* 1962;19:702-714.

Gossens K, Naus S, Corbel SY, Lin S, Rossi FM, Kast J, Ziltener HJ. Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via S1P-controlled expression of thymic P-selectin/CCL25. *J Exp Med*. 2009;206:761-778.

Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood*. 1990;75:550-554.

Hansen A, Kumar A, Wolf D, Frankenbergerova K, Filusch A, Gross ML, Mueller S, Katus H, Kuecherer H. Evaluation of cardioprotective effects of recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-immunoglobulin in myocardial ischemia-reperfusion injury by real-time myocardial contrast echocardiography. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:887-891.

He XY, Xu Z, Melrose J, Mallowney A, Vasquez M, Queen C, Vexler V, Klingbeil C, Co MS, Berg EL. Humanization and pharmacokinetics of a monoclonal antibody with specificity for both E- and P-selectin. *J Immunol.* 1998;160:1029-1035.

Henon PR, Liang H, Beck-Wirth G, Eisenmann JC, Lepers M, Wunder E, Kandel G. Comparison of hematopoietic and immune recovery after autologous bone marrow or blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant.* 1992;9:285-291.

Hsu-Lin S, Berman CL, Furie BC, August D, Furie B. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J Biol Chem.* 1984;259:9121-9126.

Jackson SP. Arterial thrombosis—insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med.* 2011;17:1423-1436.

Jilma B, Hergovich N, Homoncik M, Marsik C, Kreuzer C, Jilma-Stohlawetz P. Rapid down-modulation of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) by G-CSF in humans. *Transfusion.* 2002;42:328-333.

Kaplar M, Kappelmayer J, Veszpremi A, Szabo K, Udvardy M. The possible association of in vivo leukocyte-platelet heterophilic aggregate formation and the development of diabetic angiopathy. *Platelets.* 2001;12:419-422.

Kappelmayer J, Kiss A, Karászi E, Veszprémi A, Jakó J, Kiss C. Identification of P-selectin glycoprotein ligand-1 as a useful marker in acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol.* 2001;115:903-909.

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.

Kessinger A. High dose chemotherapy with autologous marrow transplantation for advanced gastrointestinal adenocarcinomas. *Dig Dis.* 1986;4:203-207.

Khan AI, Landis RC, Malhotra R. L-Selectin ligands in lymphoid tissues and models of inflammation. *Inflammation*. 2003;27:265-280.

Kim YJ, Borsig L, Varki NM, Varki A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:9325-9330.

Klinkhardt U, Dragutinovic I, Harder S. P-selectin (CD62p) and P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) polymorphisms: minor phenotypic differences in the formation of platelet-leukocyte aggregates and response to clopidogrel. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2005;43:255-263.

Kurnick JE, Robison WA. Clony growth of human peripheral white blood cells in vitro. *Blood*. 1971;37:136-141.

Laird DJ, von Andrian UH, Wagers AJ. Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease. *Cell*. 2008;132:612-630.

Lane TA, Law P, Maruyama M, Young D, Burgess J, Mullen M, Mealiffe M, Terstappen LW, Hardwick A, Moubayed M et al. Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. *Blood*. 1995; 85:275-282.

Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell*. 1989;59:305-312.

Larsen E, Palabrica T, Sajer S, Gilbert GE, Wagner DD, Furie BC, Furie B. PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15). *Cell*. 1990;63:467-474.

Laszik Z, Jansen PJ, Cummings RD, Tedder TF, McEver RP, Moore KL. P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood*. 1996;88:3010-3021.

Leon C, Alex M, Klocke A, Morgenstern E, Moosbauer C, Eckly A, Spannagl M, Gachet C, Engelmann B. Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation. *Blood*. 2004;103:594-600.

Lévesque JP, Zannettino AC, Pudney M, Niutta S, Haylock DN, Snapp KR, Kansas GS, Berndt MC, Simmons PJ. PSGL-1 mediated adhesion of human hematopoietic progenitors to P-selectin results in suppression of hematopoiesis. *Immunity* 1999;11:369-378.

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:678-689.

Li F, Wilkins PP, Crawley S, Weinstein J, Cummings RD, McEver RP. Post-translational modifications of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P- and E-selectin. *J Biol Chem*. 1996;271:3255-3264.

Li TT, Larrucea S, Souza S, Leal SM, López JA, Rubin EM, Nieswandt B, Bray PF. Genetic variation responsible for mouse strain differences in integrin alpha 2 expression is associated with altered platelet responses to collagen. *Blood*. 2004;103:3396-3402.

Lo CY, Antonopoulos A, Gupta R, Qu J, Dell A, Haslam SM, Neelamegham S. Competition between core-2 GlcNAc transferase and ST6GalNAc transferase regulates the synthesis of the leukocyte selectin-ligand on human P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Biol Chem*. 2013;288:13974-13987.

Lord BI, Woolford LB, Molineux G. Kinetics of neutrophil production in normal and neutropenic animals during the response to filgrastim (r-metHu G-CSF) or filgrastim SD/01 (PEG-r-metHu G-CSF). *Clin Cancer Res*. 2001;7:2085-2090.

Marquardt L, Ruf A, Mansmann U, Winter R, Schuler M, Bugge F, Mayer H, Grau AJ. Course of platelet activation markers after ischemic stroke. *Stroke*. 2002;33:2570-2574.

Matsukawa A, Lukacs NW, Hogaboam CM, Knibbs RN, Bullard DC, Kunkel SL, et al. Mice genetically lacking endothelial selectins are resistant to the lethality in septic peritonitis. *Exp Mol Pathol*. 2002;72:68-76.

Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell*. 1993;74:541-554.

McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ. Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science*. 1971;171:293-294.

McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest*. 1989;84:92-99.

McEver RP, Martin MN. A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem*. 1984;259:9799-9804.

McEver RP. Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost* 2001;86:746-756.

McEver RP. Selectins: novel receptors that mediate leukocyte adhesion during inflammation. *Thromb Haemost*. 1991;65:223-228.

Mertens P, Maes A, Nuyts J, Belmans A, Desmet W, Esplugas E, Charlier F, Figueras J, Sambuceti G, Schwaiger M, Mortelmans L, Van de Werf F; PSALM investigators. Recombinant P-selectin glycoprotein ligand-immunoglobulin, a P-selectin antagonist, as an adjunct to thrombolysis in acute myocardial infarction. The P-Selectin Antagonist Limiting Myonecrosis (PSALM) trial. *Am Heart J*. 2006 ;152:125.e1-8.

Micallef IN, Stiff PJ, DiPersio JF, Maziarz RT, McCarty JM, Bridger G, Calandra G. Successful stem cell remobilization using Plerixafor (Mozobil) plus granulocyte colony-stimulating factor in patients with non-Hodgkin lymphoma: results from the Plerixafor NHL phase 3 study rescue protocol. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:1578-1586.

Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;104:1533-1537.

Miner JJ, Xia L, Yago T, Kappelmayer J, Liu Z, Klopocki AG, et al. Separable requirements for cytoplasmic domain of PSGL-1 in leukocyte rolling and signaling under flow. *Blood*. 2008;112:2035-2045.

Miszi-Blasius K, Debreceni IB, Felszeghy S, Dezsó B, Kappelmayer J. Lack of P-selectin glycoprotein ligand-1 protects mice from thrombosis after collagen/epinephrine challenge. *Thromb Res* 2011;127:228-234.

Miszi-Blasius K, Felszeghy S, Kiss C, Benkő I, Géresi K, Megyeri A, Hevessy Z, Kappelmayer J. P-selectin Glycoprotein Ligand-1 deficiency augments G-CSF induced myeloid cell mobilization. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2014;387:109–118.

Mocco J, Choudhri T, Huang J, Harfeldt E, Efros L, Klingbeil C, Vexler V, Hall W, Zhang Y, Mack W, Popilskis S, Pinsky DJ, Connolly ES Jr. HuEP5C7 as a humanized monoclonal anti-E/P-selectin neurovascular protective strategy in a blinded placebo-controlled trial of nonhuman primate stroke. *Circ Res*. 2002;91:907-914.

Momi S, Falcinelli E, Giannini S, Ruggeri L, Cecchetti L, Corazzi T, et al. Loss of matrix metalloproteinase 2 in platelets reduces arterial thrombosis in vivo. *J Exp Med*. 2009;206:2365-2379.

Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DF, Cummings RD, Varki A, McEver RP. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol*. 1992;118:445-456.

Moore KL, Varki A, McEver RP. GMP-140 binds to a glycoprotein receptor on human neutrophils: evidence for a lectin-like interaction. *J Cell Biol*. 1991;112:491-499.

Myers DD, Hawley AE, Farris DM, Wroblewski SK, Thanaporn P, Schaub RG, Wagner DD, Kumar A, Wakefield TW. P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *J Vasc Surg.* 2003;38:1075-1089.

Nabors LK, Wang LD, Wagers AJ, Kansas GS. Overlapping roles for endothelial selectins in murine hematopoietic stem/progenitor cell homing to bone marrow. *Exp Hematol.* 2013;41:588-96.

Nagy B Jr, Miszti-Blasius K, Kerenyi A, Clemetson KJ, Kappelmayer J. Potential therapeutic targeting of platelet-mediated cellular interactions in atherosclerosis and inflammation. *Curr Med Chem* 2012;19:518-531.

Nemeth N, Kiss F, Furka I, Miko I. Gender differences of blood rheological parameters in laboratory animals. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010;45:263-272.

Nervi B, Lin DC, DiPersio JF. Cytokines and Hematopoietic Stem Cell Mobilization. *J Cell Biochem* 2006;99:690-705.

Nigam A, Kopecky SL. Therapeutic potential of monoclonal antibodies in myocardial reperfusion injury. *Am J Cardiovasc Drugs* 2002;2:367-376.

Paganessi LA, Walker AL, Tan LL, Holmes I, Rich E, Fung HC, Christopherson KW 2nd. Effective mobilization of hematopoietic progenitor cells in G-CSF mobilization defective CD26^{-/-} mice through AMD3100-induced disruption of the CXCL12-CXCR4 axis. *Exp Hematol* 2011;39:384-390.

Palicz Z, Jenes A, Gáll T, Miszti-Blasius K, Kollár S, Kovács I, Emri M, Márián T, Leiter E, Pócsi I, Csósz E, Kalló G, Hegedűs C, Virág L, Csernoch L, Szentesi P. In vivo application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF). *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;269:8-16.

Patel KD, Cuvelier SL, Wiehler S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin Immunol* 2002;14:73-81.

Patel KD, McEver RP. Comparison of tethering and rolling of eosinophils and neutrophils through selectins and P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Immunol* 1997;159:4555-4565.

Pelus LM. Peripheral blood stem cell mobilization: new regimens, new cells, where do we stand. *Curr Opin Hematol* 2008;15:285-292.

Polgar J, Matuskova J, Wagner DD. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost* 2005;3:1590-1596.

Purton LE, Scadden DT. Limiting factors in murine hematopoietic stem cell assays. *Cell Stem Cell*. 2007;1:263-270.

Ramachandran V, Nollert MU, Qiu H, Liu WJ, Cummings RD, Zhu C, McEver RP. Tyrosine replacement in P-selectin glycoprotein ligand-1 affects distinct kinetic and mechanical properties of bonds with P- and L-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:13771-13776.

Ravagnani F, Siena S, Bregni M, Sciorelli G, Gianni AM, Pellegris G. Large-scale collection of circulating haematopoietic progenitors in cancer patients treated with high-dose cyclophosphamide and recombinant human GM-CSF. *Eur J Cancer*. 1990;26:562-564.

Renné T, Pozgajová M, Grüner S, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, Gailani D, Nieswandt B. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* 2005;202:271-281.

Richman CM, Weiner RS, Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood*. 1976;47:1031-1039.

Roller J, Wang Y, Rahman M, Schramm R, Laschke MW, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Direct in vivo observations of P-selectin glycoprotein ligand-1-mediated leukocyte–endothelial cell interactions in the pulmonary microvasculature in abdominal sepsis in mice. *Inflamm. Res*. 2013;62:275–282.

Rossi FM, Corbel SY, Merzaban JS, Carlow DA, Gossens K, Duenas J, So L, Yi L, Ziltener HJ. Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat Immunol.* 2005;6:626-634.

Sako D, Chang XJ, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, Veldman GM, Bean KM, Ahern TJ, Furie B, et al. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell.* 1993;75:1179-1186.

Salmi M, Jalkanen S. Regulation of L-selectin expression on cultured bone marrow leukocytes and their precursors. *Eur J Immunol.* 1992;22:835-843.

Sato T, Laver JH, Ogawa M. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1999;94:2548-2554.

Schmitz N, Linch DC, Dreger P, Goldstone AH, Boogaerts MA, Ferrant A, Demuynck HM, Link H, Zander A, Barge A. Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients. *Lancet.* 1996;347:533-537.

Shao B, Wahrenbrock MG, Yao L, David T, Coughlin SR, Xia L, Varki A, McEver RP. Carcinoma mucins trigger reciprocal activation of platelets and neutrophils in a murine model of Trousseau syndrome. *Blood.* 2011;118:4015-4023.

Slotta JE, Braun OO, Menger MD, Thorlacius H. Capture of platelets to the endothelium of the femoral vein is mediated by CD62P and CD162. *Platelets.* 2009;20:505-512.

Smyth SS, Reis ED, Väänänen H, Zhang W, Coller BS. Variable protection of beta 3-integrin--deficient mice from thrombosis initiated by different mechanisms. *Blood* 2001;98:1055-62.

Sobol AB, Watala C. The role of platelets in diabetes-related vascular complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2000;50:1-16.

Sperandio M, Smith ML, Forlow SB, Olson TS, Xia L, McEver RP, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J Exp Med* 2003;197:1355-63.

Sultana DA, Zhang SL, Todd SP, Bhandoola A. Expression of functional P-selectin glycoprotein ligand 1 on hematopoietic progenitors is developmentally regulated. *J Immunol*. 2012;188:4385-4393.

Sumariwalla PF, Malfait AM, Feldmann M. P-selectin glycoprotein ligand 1 therapy ameliorates established collagen-induced arthritis in DBA/1 mice partly through the suppression of tumour necrosis factor. *Clin Exp Immunol*. 2004;136:67-75.

Sundd P, Pospieszalska MK, Ley K. Neutrophil rolling at high shear: flattening, catch bond behavior, tethers and slings. *Mol Immunol*. 2013;55:59-69.

Sweeney EA, Priestley GV, Nakamoto B, Collins RG, Beaudet AL, Papayannopoulou T. Mobilization of stem/progenitor cells by sulfated polysaccharides does not require selectin presence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:6544-6549.

Tanguay JF, Geoffroy P, Sirois MG, Libersan D, Kumar A, Schaub RG, Merhi Y. Prevention of in-stent restenosis via reduction of thrombo-inflammatory reactions with recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1. *Thromb Haemost*. 2004;91:1186-1193.

Tenno M, Ohtsubo K, Hagen FK, Ditto D, Zarbock A, Schaerli P, von Andrian UH, Ley K, Le D, Tabak LA, Marth JD. Initiation of protein O glycosylation by the polypeptide GalNAcT-1 in vascular biology and humoral immunity. *Mol Cell Biol*. 2007;27:8783-8796.

Théorêt JF, Chahrour W, Yacoub D, Merhi Y. Recombinant P-selectin glycoprotein-ligand-1 delays thrombin-induced platelet aggregation: a new role for P-selectin in early aggregation. *Br J Pharmacol* 2006;148:299-305.

Tsakiris DA, Scudder L, Hodivala-Dilke K, Hynes RO, Coller BS. Hemostasis in the mouse (*Mus musculus*): a review. *Thromb Haemost* 1999;81:177-188.

Tschoepe D. The activated megakaryocyte-platelet-system in vascular disease: focus on diabetes. *Semin Thromb Hemost*. 1995;21:152-160.

Ushiyama S, Lau TM, Moore KL, Erickson HP, McEver RP. Structural and functional characterization of monomeric soluble P-selectin and comparison with membrane P-selectin. *J Biol Chem*. 1993;268:15229-15237.

Veldman GM, Bean KM, Cumming DA, Eddy RL, Sait SN, Shows TB. Genomic organization and chromosomal localization of the gene encoding human P-selectin glycoprotein ligand. *J Biol Chem*. 1995;270:16470-16475.

Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev*. 1999;79:181-213.

Wang X. Lipopolysaccharide augments venous and arterial thrombosis in the mouse. *Thromb Res* 2008;123:355-360.

Watson ML, Kingsmore SF, Johnston GI, Siegelman MH, Le Beau MM, Lemons RS, Bora NS, Howard TA, Weissman IL, McEver RP, et al. Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1. *J Exp Med*. 1990;172:263-272.

Welte K, Platzer E, Lu L, Gabilove JL, Levi E, Mertelsmann R, Moore MA. Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:1526-1530.

Wojciechowski JC, Narasipura SD, Charles N, Mickelsen D, Rana K, Blair ML, King MR. Capture and enrichment of CD34-positive haematopoietic stem and progenitor cells from blood circulation using P-selectin in an implantable device. *Br J Haematol*. 2008;140:673-681.

Xia L, Sperandio M, Yago T, McDaniel JM, Cummings RD, Pearson-White S, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow. *J Clin Invest*. 2002;109:939-950.

Yamada S, Mayadas TN, Yuan F, Wagner DD, Hynes RO, et al. Rolling in P-selectin-deficient mice is reduced but not eliminated in the dorsal skin. *Blood*. 1995;86:3487-3492.

Yamaoka T, Fujimoto M, Ogawa F, Yoshizaki A, Bae SJ, Muroi E, Komura K, Iwata Y, Akiyama Y, Yanaba K, Shimizu K, Sato S. The roles of P- and E-selectins and P-selectin glycoprotein ligand-1 in primary and metastatic mouse melanomas. *J Dermatol Sci*. 2011;64:99-107.

Yanada M, Kojima T, Ishiguro K, Nakayama Y, Yamamoto K, Matsushita T, Kadomatsu K, Nishimura M, Muramatsu T, Saito H. Impact of antithrombin deficiency in thrombogenesis: lipopolysaccharide and stress-induced thrombus formation in heterozygous antithrombin-deficient mice. *Blood*. 2002;99:2455-2458.

Yang J, Galipeau J, Kozak CA, Furie BC, Furie B. Mouse P-selectin glycoprotein ligand-1: molecular cloning, chromosomal localization, and expression of a functional P-selectin receptor. *Blood*. 1996;87:4176-4186.

Yao L, Setiadi H, Xia L, Laszik Z, Taylor FB, McEver RP. Divergent inducible expression of P-selectin and E-selectin in mice and primates. *Blood*. 1999;94:3820-3828.

Zarbock A, Müller H, Kuwano Y, Ley K. PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation. *J Leukoc Biol*. 2009;86:1119-1124.

Zarbock A, Ley K, McEver RP, Hidalgo A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood*. 2011;22:6743-6751.

Zimmerman GA. Two by two: the pairings of P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:10023-10024.

12. Publikációs lista



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/27/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Miszti-Blasius Kornél
Neptun kód: AJ4XM4
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
Mtm azonosító: 10034630

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Miszti-Blasius, K.**, Felszeghy, S., Kiss, C., Benkő, I., Géresi, K., Megyeri, A., Hevessy, Z., Kappelmayer, J.: P-selectin glycoprotein ligand-1 deficiency augments G-CSF induced myeloid cell mobilization.
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 387 (2), 109-118, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-013-0913-9>
IF:2.147 (2012)
2. Nagy, B., **Miszti-Blasius, K.**, Kerényi, A., Clemetson, K.J., Kappelmayer, J.: Potential therapeutic targeting of platelet-mediated cellular interactions in atherosclerosis and inflammation.
Curr. Med. Chem. 19 (4), 518-531, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/092986712798918770>
IF:4.07
3. **Miszti-Blasius, K.**, Beke Debreceni, I., Felszeghy, S., 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



További Közlemények

4. Kappelmayer J., **Miszi-Blasius K.**: Laboratóriumi vizsgálatok.
In: Urológia 2. átdolg. kiad. Szerk.: Tóth Csaba, Medicina, Budapest, 86-97, 2014.
5. Horváth K., **Miszi-Blasius K.**, Gyurina K., Szegedi I., Kiss C.: Hereditær sphaerocytosis - A széles spektrumú betegség.
Gyermekgyógyászat. 64 (5), 217-220, 2013.
6. **Miszi-Blasius K.**, Esze R., Szegedi I., Kiss C., Kappelmayer J.: Diagnosztikai lehetőségek örökletes hemolitikus anémiákban.
Gyermekgyógyászat. 64 (5), 213-214, 2013.
7. Palicz, Z., Jenés, Á., Gáll, T., **Miszi-Blasius, K.**, Kollár, S., Kovács, I., Emri, M., Márián, T., Leiter, É., Pócsi, I., Csósz, É., Kalló, G., Hegedűs, C., Virág, L., Csernoch, L., Szentesi, P.: In vivo application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF).
Toxicol. Appl. Pharmacol. 269 (1), 8-16, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.02.014>
IF:3.975 (2012)
8. Kotán, R., Németh, N., Kiss, F., Pósn, J., **Miszi-Blasius, K.**, Tóth, L., Furka, I., Mikó, I., Sápy, P., Szentkereszty, Z.: Micro-rheological changes during experimental acute pancreatitis in the rat.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 51 (4), 255-264, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2012-1531>
9. Németh, N., Kiss, F., Magyar, Z., **Miszi-Blasius, K.**, Furka, I.: Following-up hemorheological consequences of gonadectomy in male and female rats.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 50 (4), 231-243, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2011-1430>
10. **Miszi-Blasius K.**, Veszprémi A., Kissné S.V., Kappelmayer J.: A liquor fehérvérsejtszám és sejtösszetétel vizsgálatának algoritmusá =Algorithm for the investigation of the white blood cell count and cell differentiation in cerebrospinal fluid.
Klin. Kísérl. Lab. Med. 33 (2), 11-16, 2008.
11. Kappelmayer, J., Nagy, B., **Miszi-Blasius, K.**, Hevessy, Z., Setiadi, H.: The emerging value of P-selectin as a disease marker.
Clin. Chem. Lab. Med. 42 (5), 475-486, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2004.082>
IF:1.685

12. Nagy B., Veszprémi A., Kiss F., **Miszi-Blasius K.**, Kappelmayer J.: Thrombocyták aktiváltsági állapotának vizsgálata áramlási citometriai módszerekkel =Detection platelet activation status by flow cytometric methods.
Klin. Kísér. Lab. Med. 30, 46-53, 2003.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14.317

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 8.657

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

Debrecen, 2014.02.07



13. Tárgyszavak/Keywords

egér/mouse

fibrin/fibrin

G-CSF/G-CSF

kollagén/collagen

mobilizáció/mobilization

myeloid sejt/myeloid cell

őssejt/stem cell

PSGL-1/PSGL-1

P-szelektin/P-selectin

trombózis/thrombosis

14. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Kappelmayer Jánosnak, aki a témavezetői feladatain túl is támogatót és akitől nemcsak a témához kapcsolódó ismereteket, hanem az értékes szakmai beszélgetések során a kutatói munkához szükséges gondolkodásmódot is elsajátíthattam.

Hálás vagyok Gomba Szabolcsnak, akitől az egérkísérletekhez szükséges ismeretek alapjait még TDK hallgatóként megszerezhettem.

Külön köszönet illeti Orosz-Tóth Katát, aki segített az egérkísérletek kivitelezésében, amikor „két kéz nem volt elég” és Pálné Terdik Tündét, aki fáradhatatlanul készítette a szövettani metszeteket.

Felszeghy Szabolcstól nagyon sok segítséget kaptam az immunhisztokémiai metszetek fényképezésében és értékelésében, amiért nagyon hálás vagyok.

Köszönöm Hevessy Zsuzsannának az áramlási citometriai eredmények kiértékelésében nyújtott segítséget és hasznos konzultációkat.

Dezső Balázsnak és Bessenyei Máriának köszönöm a Pathologia Intézetben végzett munkámban nyújtott támogatást.

Köszönöm Benkő Ilonának és Géresi Krisztinának a kolóniaképző sejtek vizsgálatában nyújtott segítséget és Kiss Csongornak az eredmények klinikai szemszögből történő értékelését.

Köszönöm Bekéné Debreceni Ildikónak, Györfiné Veszprémi Anikónak, Gálné Mihálka Andreának, Szánáné Simon Mariannak, Dobrai Mariannának és Papp Attilának a technikai munkában nyújtott segítséget.

Köszönettel tartozom Antal Csabának, aki a közlemények ábráinak elkészítésében sokat segített.

A genetikailag módosított egereket Rodger P. McEver (Oklahoma City) biztosította számunkra.

Hálás vagyok a Laboratóriumi Medicina Intézet összes dolgozójának a közös munkáért.

Végül köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy mindig mellettem álltak és támogattak a munkám során.

15. Támogatások

Jedlik Ányos Doktorjelölti Ösztöndíj a konvergencia régiókban. A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



16. Függelék

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények.