

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Celluláris prokoaguláns funkció vizsgálata thrombin generációval

Dr. Hudák Renáta

Témavezető: Dr. Kappelmayer János



Debreceni Egyetem
Laki Kálmán Doktori Iskola
Debrecen, 2018

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	5
2. Bevezetés	7
3. Irodalmi áttekintés.....	9
3.1. A véralvadási kaskád aktivációjának áttekintése	9
3.1.1. A véralvadási kaskád fokozott működése atherothrombotikus állapotokban, a vérlemezkék szerepe	11
3.2. A thrombocyták aktiváció módjai.....	12
3.3. A thrombocyták funkciók gátlásának lehetőségei	13
3.4.1. Vénás thromboembóliás szövődmények kialakulása malignus kórképekben	13
3.4.2. Vénás thromboembóliás szövődmény kialakulása malignus hematológiai betegségekben	15
3.5. Mikropartikulák eredete és jelentősége a prokoaguláns hatás kialakításában	17
3.6. Globális thrombin generációs teszt és története.....	17
3.6.1. A globális thrombin generációs teszt alkalmazása	18
4. Célkitűzések.....	21
4.1. Calyculin-A hatása a vérlemezke aktivációra.....	21
4.2. Akut monocytás leukémia sejtvonalak prokoaguláns hatásának meghatározása	21
4.3. Celluláris modellek vizsgálata thrombin generációs teszttel	21
5. Anyagok és módszerek	22
5.1. Thrombocyták-szegény kevert plazma készítése.....	22
5.2. Thrombocyták-dús plazma készítése thrombocyták kísérletekhez.....	22
5.3. Normál humán monocyták szeparálása	23
5.4. Sejtvonalak és sejtenyésztés	24
5.5. Leukémiás sejtek immunfenotípusának meghatározása áramlási citometriai módszerrel	25
5.6. Thrombocyták sejtfelszíni foszfatidil-szerin expresszió vizsgálata áramlási citometriai módszerrel.....	25
5.7. Leukémiás sejtek felszíni foszfatidil-szerin és szöveti faktor expressziójának meghatározása áramlási citometriai módszerrel	26
5.8. Mikropartikulák szeparálása és mikropartikula szám meghatározása áramlási citometriai módszerrel.....	26

5.9. Leukémiás sejtek prokoaguláns hatásának meghatározása prokoaguláns aktivitás teszttel (PCA)	27
5.10. Alvadék retrakció vizsgálata.....	28
5.11. Leukémiás sejtek és mikropartikulák prokoaguláns hatásának meghatározása thrombin generációs teszttel	28
5.12. Thrombocyta funkció moduláció és CLA hatás vizsgálata thrombin generációs teszttel	30
5.13. Vérlemezke intracelluláris Ca^{2+} szint vizsgálata konfokális mikroszkóppal	30
5.14. Statisztikai elemzések	31
6. Eredmények.....	32
6.1. A leukémiás sejtvonalak immunfenotípusa és genetikai jellemzői	32
6.2. TRAP és thiomersal aktiváció és CLA gátlás hatása a thrombocyta sejtfelszíni foszfatidil-szerin expresszióra	33
6.3. Normál monocyták és leukémiás sejtek felszíni szöveti faktor (TF) és foszfatidil-szerin (PS) expressziója.....	35
6.4. Mikropartikula szám meghatározás	37
6.5. Leukémiás sejtek prokoaguláns hatása prokoaguláns aktivitás teszttel (PCA)	37
6.6. CLA hatása az alvadék retrakcióra	38
6.7. Leukémiás sejtek thrombin generációja.....	40
6.8. Leukémiás sejt eredetű mikropartikulák thrombin generációja.....	43
6.9. A vérlemezke funkció modulációjának hatása a thrombocyta-dús plazma thrombin generációjára	45
6.10. CLA gátlás és TRAP aktiváció hatása az intracelluláris Ca^{2+} szintre	46
7. Megbeszélés	48
7.1. Akut monocytás leukémia sejtek fokozott prokoaguláns hatása	48
7.2. Thrombocyta funkciók modulációjának lehetőségei	51
8. Összefoglalás	54
9. Summary	55
10. Főbb új tudományos eredmények, megfigyelések	56
11. Irodalomjegyzék	57
12. Publikációs lista	67

13. Tárgyszavak/ Keywords.....	69
14. Köszönetnyilvánítás	70
15. Önálló munka jegyzéke	71
16. Függelék.....	72

1. Rövidítések jegyzéke

ADP	Adenozin-difoszfát
ALL	Akut lymphoid leukémia
AML	Akut myeloid leukémia
ANOVA	Varianciaanalízis (analysis of variance)
APL	Akut promyelocytás leukémia
CD	Differenciációs marker (cluster of differentiation)
CLA	Calyculin-A
EDTA	Ethylene diamine tetra-acetate
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FLT3-ITD	Fms-szerű tirozin kináz 3- belső tandem duplikáció
FM	Fibrin monomer
FSC	Előre szórt fény (forward scatter)
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inozitol-trifoszfát
MDS	Myelodysplasia
MFI	Átlagos fluoreszcencia intenzitás (mean fluorescence intensity)
MP	Mikropartikula
NET	Neutrophil extracelluláris csapda (neutrophil extracellular trap)
PAR-1	Proteáz aktiválta receptor-1
PBMC	Perifériás vér mononukleáris sejt
PBS	Phosphate buffered saline
PCA	Prokoaguláns aktivitás teszt
PE	Phycoerythrin

PP1	1-es típusú protein foszfatáz
PP2A	2A típusú protein foszfatáz
PPP	Thrombocyta szegény plazma (platelet-poor plasma)
PRP	Thrombocyta dús plazma (platelet-rich plasma)
PS	Foszfatidil-szerin (phosphatidylserine)
RAEB	Refrakter anaemia blast szaporulattal (refractory anaemia with excess blasts)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Szórás (standard deviation)
SEM	Átlag standard hibája (standard error of mean)
SSC	Oldalszórás (side scatter)
TF	Szöveti faktor (tissue factor)
TGT	Thrombin generációs teszt
TRAP	Thrombin receptor aktiváló peptid (thrombin receptor activating peptide)
Vt	vad típus
vWF	von Willebrand faktor

2. Bevezetés

Ha a hemosztatis rendszer fiziológiás anti- és prokoaguláns folyamatai közötti egyensúly szerzett vagy öröklött tényezők miatt felborul, a folyamat eltolódhat a vérzékenység vagy fokozott véralvadás irányába, így különböző patológiás állapotok kialakítása révén betegségekhez vezethet. A véralvadási rendszer fokozott aktivációja révén kialakuló artériás és/vagy a vénás rendszert érintő atherothrombózissal vagy thromboembóliával járó betegségek az egész világon a vezető halálokok közé tartoznak. A fokozott aktiváció létrejöhet a keringésben jelenlévő sejtek fiziológiástól nagyobb mértékű, vagy hosszabb ideig fennálló aktiválódása és/vagy a sejtek által szekretált mediátorok hatása révén.

Az atherothrombotikus kórképek kialakításában a vérlemezkék fontos szerepet töltenek be. A folyamatosan fennálló endothel sérülés helyén a subendotheliális komponensek az érlumen felé szabaddá válnak, melyekhez a vérlemezkék receptoraikkal kötődnek, majd aktiválódnak. Az aktivációt követően a thrombocyták különböző mediátorokat szekretálnak, amelyek további vérlemezkék aktivációjához járulnak hozzá, így létrehozva az úgynevezett vérlemezke-dugót. Ezt a folyamatot atherothrombotikus betegségekben különböző hatásmechanizmussal ható vérlemezke gátló terápiával igyekeznek meggátolni.

A thrombocyták legerősebb agonistája a thrombin, mely a proteáz aktiválta receptor-1-en keresztül hat. A thrombin pleiotrop hatásainak elkerülése céljából, illetve, hogy ne történjen fibrinképződés, kísérleteinkben vérlemezke aktiváció céljából a thrombinhoz hasonló, szintén a PAR-1-en ható thrombin receptor aktiváló peptidet használtuk. A thrombocyta funkciók modulációjához egy protein foszfatáz inhibitor, a calyculin-A-t alkalmaztuk. Kísérleti körülmények között thrombocyta dús plazmában vizsgáltuk aktiváció és/vagy gátlást követően a vérlemezkék foszfatidil-szerin expresszióját, az általuk kiváltott alvadék retrakciót, thrombin generációt és intracelluláris Ca^{2+} szint változást. Hipotézisünk az volt, hogy a calyculin-A gátolja a thrombocyta intracelluláris kalcium szint emelkedést, ezáltal a foszfatidil-szerin expressziót és a következményes thrombin generációt.

Ismert, hogy malignus szolid tumorokban és malignus hematológiai megbetegedésekben a vénás thromboembóliás szövődmények kialakulásának kockázata többszöröse az egészséges populációhoz képest. Ennek hátterében A) a malignus sejtek aktivációja, B) a sejtek felszínén lévő prokoaguláns fehérjék vagy a belőlük lefűződő mikropartikulák, vagy C) az általuk kibocsátott interleukinek, citokinek és egyéb mediátorok állnak. A leukémiák közül az akut promyelocytás leukémia esetében a gyakrabban előforduló thrombotikus és vérzéses

szövődményeket már leírták, azonban ezen szövődmények kialakulásának valószínűsége más leukémiák esetében kevésbé ismert. Az akut monocytás leukémia esetén feltehetően fennáll fokozott prokoaguláns aktivitás, amely a legtöbb esetben nem manifesztálódik thromboembóliás szövődményként, hanem szubklinikus marad, azonban idáig nem közöltek olyan sejtvonalakon végzett kutatási eredményeket, melyek a monocytás leukémia sejtek prokoaguláns hatását bizonyították volna.

Akut monocytás leukémia sejtvonalakkal folytatott kísérleteink során feltételeztük sejtjeink fokozott prokoaguláns aktivitását, melyet negatív kontrollként izolált normál humán monocytákéhoz és pozitív kontrollként akut promyelocytás leukémia sejtvonal prokoaguláns hatásához hasonlítottunk.

A véralvadási kaszkád kulcsenzime a thrombin, melynek mennyisége és képződésének kinetikája plazma mintákban vagy sejtes modelleken, kísérleti körülmények között thrombin generációs teszt segítségével meghatározható. Mindkét tanulmányunk során a vizsgált sejtek (thrombocyták és monocytás leukémia sejtek) prokoaguláns hatásának vizsgálata történt különböző laboratóriumi módszerekkel.

3. Irodalmi áttekintés

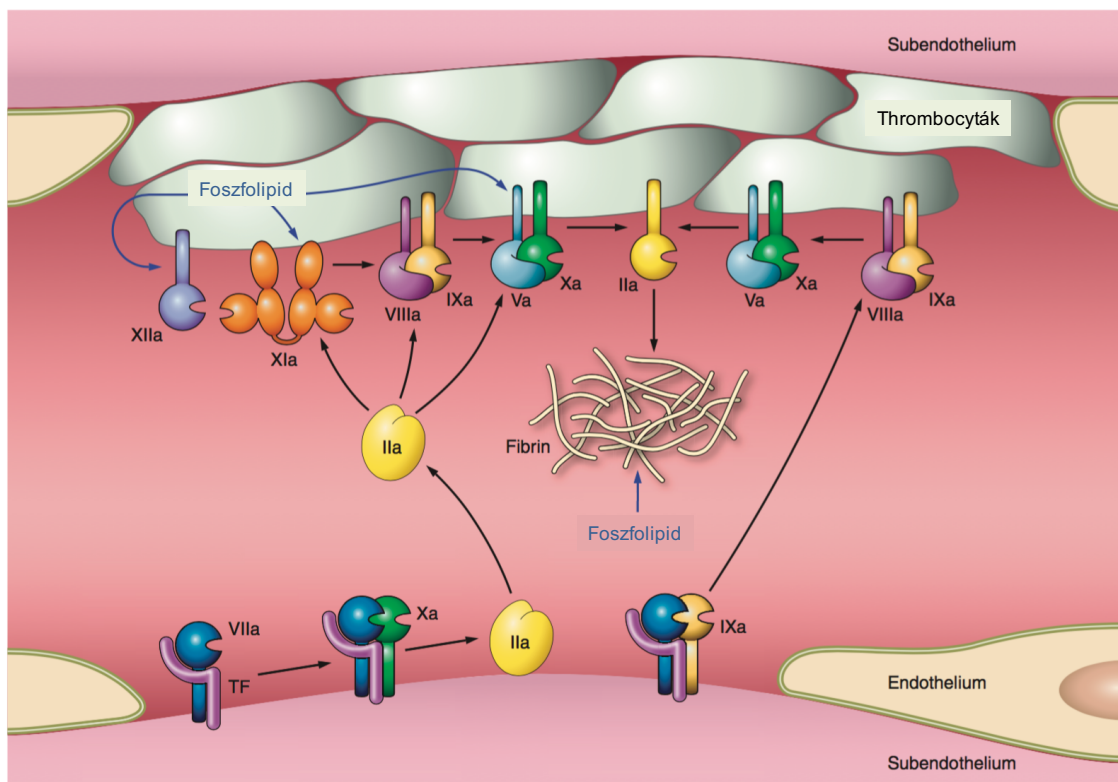
3.1. A véralvadási kaszkád aktivációjának áttekintése

A 19. század végén és 20. század első felében áttörő felfedezések történtek a hemosztatikus rendszer, illetve véralvadási kaszkád vizsgálata terén. 1865-ben Max Shultze írta le először thrombocyták jelenlétét a vérben és javasolta további vizsgálatukat, amelyet 1882-ben Bizzozero egészített ki. Bizzozero - ma leginkább őt tartják a vérlemezkék első leírójának - mikroszkóposan bizonyította a thrombocyták jelenlétét a keringő vérben és megállapította, hogy a vérlemezkék az első sejtes elemek, amelyek kötődnek a sérült érfalhoz *in vivo*, és az első véralkotók melyek „szálakhoz” kötődnek és adhéziójukkal egy időben fibrinnel fedetté válnak *in vitro* (Bizzozero et al, 1882). Az 1950-es évek végére az összes véralvadási faktort felfedezték (Riddel et al, 2007). A 20. század végére bizonyították, hogy *in vitro* körülmények között a véralvadási kaszkád intrinsic és extrinsic útvonalakra bontható, valamint ismert volt a szöveti faktor (TF) kulcsfontosságú szerepe a véralvadási kaszkád extrinsic útvonalának elindításában (Luchtman-Jones et al, 1995).

Ma tudjuk, hogy a hemosztázis rendszer kettős funkciót lát el, egyrészt antikoaguláns mechanizmusai a vért folyékony állapotban tartják és biztosítják a megfelelő véráramlást az intakt érpályán belül, másrészt endothelium sérülés esetén a lokalizált, gyors véralvadási mechanizmusok a sérülés helyén kialakuló vérrög révén minimalizálják a vérveszteség mértékét (Dalhåck et al, 2000). A hemosztázis három fő komponense: a humorális rendszer, mely az alvadási faktorok és antikoaguláns tényezők révén járul hozzá a véralvadáshoz, a celluláris rendszer, amely létrehozza a thrombocyta adhéziót, aggregációt, szekréciót és szorosan együtt működik a humorális rendszerrel, valamint a vascularis rendszer, mely érösszehúzóds és subendothelialis prokoaguláns anyagok felszabadítása révén indítja el az extrinsic útvonalat.

A legújabb irodalmi adatok alapján az alvadási kaszkád aktivációját 3 elkülönülő fázisra lehet osztani (Versteeg et al, 2013). Az első fázis az iniciáció, a véralvadás extrinsic útvonalának elindulása, mely során a sérült endotheliumon keresztül a simaizom sejtek, subendothelialis sejtek és fibroblastok a véráram felé szabaddá válnak. A sejtek felszínén TF expresszálódik, amely a VII-es alvadási faktorhoz (FVII) kötődve elindítja a FVII aktivációját (FVIIa), ezáltal a koagulációs kaszkádot. A TF/FVIIa komplex (extrinsic tenáz komplex) proteolitikusan hasítja a IX-es és X-es alvadási faktorokat (FIX és FX) és aktivált faktorokká (FIXa és FXa) alakítja

őket (Butenas et al, 2009). Ez lehetővé teszi, hogy a FXa kofaktorával, az aktivált V-ös alvadási faktorral (FVa) létrehozza a prothrombináz komplexet a TF-t expresszáló sejtek felszínén. A folyamatot fiziológiásan a plazmában található proteáz inhibitorok (tissue factor pathway inhibitor (TFPI) és antithrombin) limitálják. A második fázis az amplifikáció, amikor a lassan felhalmozódó thrombin tovább aktiválja a trombocytákat. Az aktivált trombocyták által és az iniciáció során képződött thrombin pozitív visszacsatolás révén aktiválja a FV-t és a VIII-as alvadási faktort (FVIII). A FVIIIa a FIXa kofaktora és az aktivált vérlemezkék felszínén elősegíti a FXa képződését. Továbbá a thrombin aktiválja a XI-es alvadási faktort (FXI) is. Ezt követi az utolsó fázis, a propagáció fázisa, ekkor a negatív töltésű, prokoaguláns foszfolipiddel fedett felszínekre (pl. trombocyták membránjára) lokalizálódik a véralvadási folyamat. Az aktivált FXI (FXIa) aktiválja a FIX-et, amely kofaktorával, a thrombin által aktivált FVIIIa-val képez komplexet (1. ábra) és létrejön a fibrin háló, melyet a plazma transzglutamináz, a szintén thrombin által aktivált XIII-as alvadási faktor stabilizál (Versteeg et al, 2013).



1. ábra. A vérárvadási kaszkád extrinsic útvonala. TF: szöveti faktor; FVIIa: aktivált VII-es alvadási faktor; FXa: aktivált X-es alvadási faktor; FIIa: thrombin; FIXa: aktivált IX-es alvadási faktor; FXIIa: aktivált XII-es alvadási faktor; FXIa: aktivált XI-es alvadási faktor; FVIIIa: aktivált VIII-as alvadási faktor; FVa: aktivált V-ös alvadási faktor. (Versteeg et al. New fundamentals in hemostasis. Physiological Reviews, 2013 ábrája alapján, annak módosításával készült.)

A koagulációs kaszkád intrinsic útvonalának *in vivo* aktivációjáról kevesebbet tudunk. Ismert, hogy a negatív töltésű felületek (pl. kaolin) *ex vivo* aktiválják a XII-es alvadási faktort (FXII). *In vivo* a már jelen lévő FXIa a FXII aktivációjához vezet pozitív visszacsatolás révén (Geddings et al, 2014). Korábbi tanulmányok leírták, hogy a vérben extracelluláris RNS jelenléte aktiválja a FXII-t és a FXI-t ezáltal az intrinsic alvadási útvonalat (Kannemeier et al, 2007). Más tényezők, *in vivo* képesek a FXII-t aktiválni, ezek közé tartoznak a neutrophil extracelluláris csapdák (NET, Neutrophil Extracellular Traps) DNS tartalma vagy az aktivált vérlemezkék által szekretált polifoszfátok (Müller et al, 2009 és Fuchs et al, 2012). Ezen komponenseknek intrinsic útvonalat aktiváló hatására vannak bizonyítékok.

A hemosztázis rendszer antikoaguláns mechanizmusainak részletes bemutatására az értekezés témája miatt nem kerül sor, munkánk során a véralvadási kaszkád fokozott aktivációjára fókuszáltunk.

3.1.1. A véralvadási kaszkád fokozott működése atherothrombotikus állapotokban, a vérlemezkék szerepe

A vérlemezkék a fiziológias hemosztázis biztosításában és a patológias folyamatokban is fontos szerepet töltenek be. Egy 2016-ban megjelent európai epidemiológiai tanulmányban Townsend és munkatársai leírták, hogy a hemosztázis rendszer aktiválódása révén artériás thrombus kialakulásával járó kardiovaszkuláris megbetegedések csoportja - köztük a ischémias szívbetegek és a stroke - továbbra is a vezető halálok a világon és Európában (Townsend et al, 2016). A kardiovaszkuláris megbetegedések alapjául szolgáló atherosclerotikus folyamatok fontos részvevői a vérlemezkék (Kaplan et al, 2011). Az atherosclerotikus plakk megrepedésekor, vagy endothelium sérülés esetén a subendothelialis mátrix fehérjéi (kollagén, fibronectin, laminin), köztük a von Willebrand faktor (vWF) szabaddá válnak az ér lumen felé, melyhez a trombocyták receptoraikon keresztül kötődnek (adhézió), ezáltal aktiválódnak, megváltozik az alakjuk, az intracelluláris granulumokból prokoaguláns anyagok szabadulnak fel és más subendothelialis komponensekkel reakcióba lépve elindítják a „thrombocytá dugó” (aggregáció) létrejöttét (Badimon et al, 2014).

3.2. A thrombocyta aktiváció módjai

A vérlemezkék aktivációja számos mediátor hatása következtében, több útvonalon jöhet létre. A denz granulumokban tárolt adenosin-difoszfát (ADP) a subendothelialis mátrixhoz kötődött vérlemezkékből nagy mennyiségben szabadul fel és tovább aktiválja a vérlemezkéket, főleg a P2Y₁₂ receptoron keresztül, ezáltal létrehozva először a vérlemezke monolayer-t, majd az aggregátumot. A thromboxane-A₂ felszabadulása a vérlemezkék foszfolipid tartalmú membránjából a primer „thrombocyta dugó” létrehozásában játszik szerepet és aktiválja a vérlemezkéket a thromboxane-A₂ receptoron keresztül, mind fiziológiás, mind kóros alvadás esetén. A kollagénnak, a glikoprotein Ib (GPIb), glikoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), glikoprotein Ia/IIa (GPIa/IIa) és glikoprotein VI (GPVI) receptorokon keresztül, a stabil thrombocyta-vWF és thrombocyta-thrombocyta adhézió kialakításában van szerepe. A szerotoninnak, az 5HT-2A receptoron hatva, az endothel sérülés helyszínén további vérlemezkék „toborzásában” van szerepe (Brass et al, 2003; Davi et al, 2007; Varga-Szabo et al, 2008; Offermanns et al, 2006). A thrombin a leghatásosabb thrombocyta agonista, nagyon alacsony koncentrációban - a véralvadási kaskád aktivációjához szükségessé váló alacsonyabb koncentrációban is - aktiválja a vérlemezkéket (Mann et al, 2003, Jennings et al, 2009). A vérlemezkék elsődleges thrombin receptora a proteáz aktiválta receptor-1 (PAR-1), mely G-proteinhez kapcsolt. A thrombocyták aktiválása a PAR-1-en keresztül a legerősebb aktiváló tényező, mely fontos szerepet tölt be az athero-thrombotikus folyamatok létrehozásában (Tello-Montoliu et al, 2011 és Leonardi et al, 2012). A PAR-1 aktiválása thrombinnal vagy szintetikus thrombin receptor aktiváló peptiddel (TRAP) G_{12/13} fehérjéken keresztül történik. Ez az intracelluláris Ca²⁺ felszabadulása révén vezet a G_q fehérje által mediált intracelluláris jelátviteli útvonal és az intracelluláris Ca²⁺ raktárak membránjában található inozitol-trifoszfát (IP₃) aktiválásához. Az IP₃ receptorok direkt módon is aktiválhatók szintetikus anyagokkal, például thiomersal-al, amelyet már korábban használtak sejt funkciót tanulmányozó kísérletekben intracelluláris Ca²⁺ mobilizálására (Elferink et al, 1999).

A foszfatidil-szerin (PS) negatív töltésű foszfolipid, amely többek közt a tenáz és prothrombináz komplexek megfelelő működéséhez szükséges (Lentz et al, 2003). Fiziológiás körülmények között a PS a sejtmembrán kettős foszfolipid rétegének az intracelluláris oldal felőli részén helyezkedik el. Thrombocyta aktiváció hatására, az intracelluláris Ca²⁺ szint

emelkedik és a PS transzlokálódik a külső foszfolipid rétegbe, ezáltal negatív töltésű felszín biztosít a véralkadási faktorok számára (Zwaal et al. 1998), propagálja az alvadék kialakulását. A thrombocyták felszíni PS-expresszióját áramlási citometriai módszerrel - Ca^{2+} jelenlétében, Annexin V kötődés alapján – ki lehet mutatni (Vermes et al, 1995).

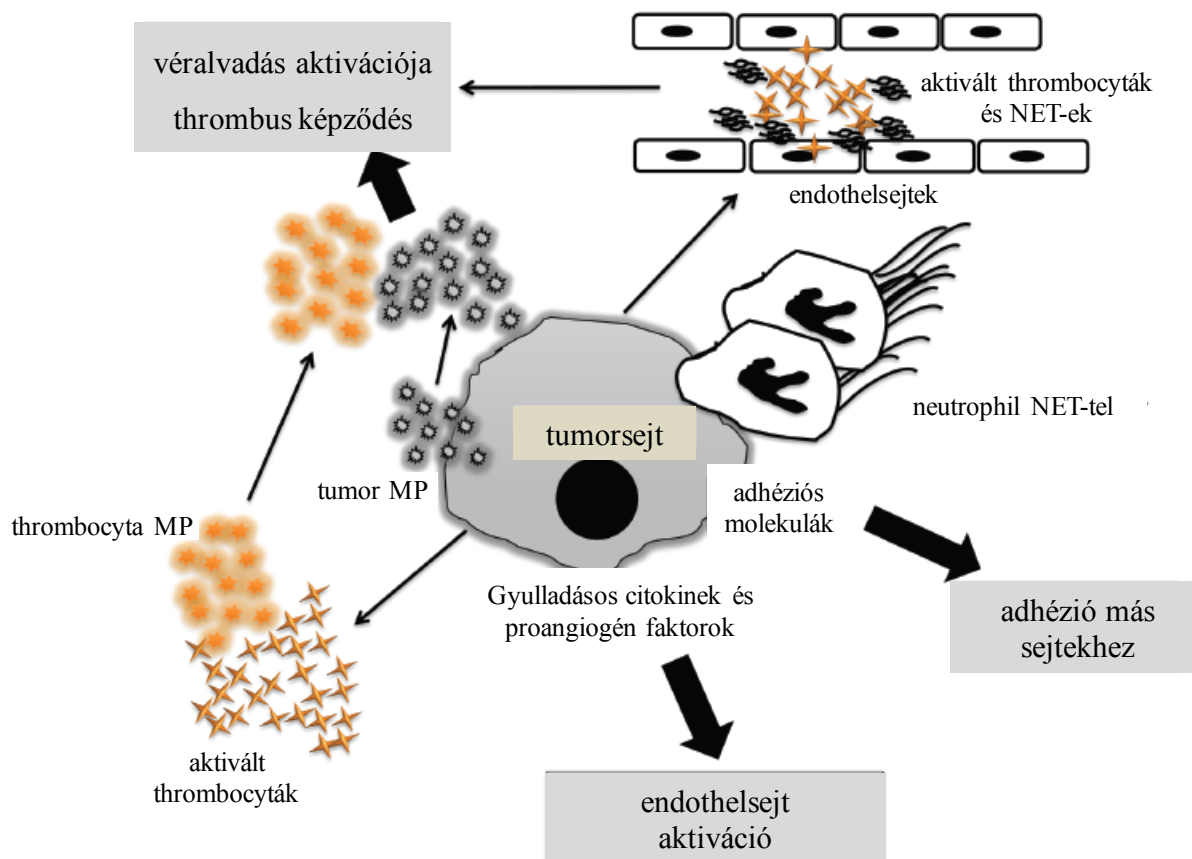
3.3. A thrombocyta funkciók gátlásának lehetőségei

A jelenleg elérhető vérlemezke gátló gyógyszerek alkalmazása igen elterjedt az atherothrombotikus betegségek kezelésében és megelőzésében. A thrombocyták felszínén lévő receptorokon hatva gátolják a vérlemezke adhéziót, aggregációt vagy szekréciót (Eikelboom et al, 2012). A legújabb thrombocyta receptor gátlók közé tartozik a PAR-1 gátlásán keresztül ható gyógyszerek csoportja (Tello-Montoliu et al, 2011; French et al, 2015 és Leonardi et al, 2012). A thrombocytákban, a szerin/threonin protein foszfatázok 1-es típusú protein foszfatáz (PP1) és 2A típusú protein foszfatáz (PP2A) alcsoportjai vannak jelen, melyek számos intracelluláris jelátviteli folyamatban játszanak szerepet. A calyculin-A (CLA) egy, a természetben jelen lévő tengeri szivacsból izolált protein foszfatáz inhibitor. Nanomoláris koncentrációban elsősorban a PP2A-t gátolja, de indirekt gátló hatást fejt ki a PP1-re is (Holy et al, 2012 és Dedinszki et al, 2015). Más, az irodalomban gyakrabban használt protein foszfatáz inhibitorok közül a tautomycetin szelektíven gátolja a PP1-et, az okadánsav nanomoláris koncentrációban inkább a PP2A-t gátolja (Mitsubishi et al, 2003; Fagerholm et al, 2010 és Simon et al, 2010). Mind a PP1, mind a PP2A a thrombocyták sejtmembránjában és a citoplazmatikus organelleiben is jelen van (Murányi et al, 1998). A munkacsoportunk korábban vizsgálta a calyculin-A hatását TRAP-aktivált vérlemezkeken. Kimutatta, hogy a protein foszfatáz inhibitor meggátolja a vérlemezke eredetű mikropartikula képződést és az aktivált vérlemezkek degranulációját (Simon et al, 2010).

3.4.1. Vénás thromboembóliás szövődmények kialakulása malignus kórképekben

Míg a thrombocyták fokozott aktivációja, endothel sérülés és ateroszklerotikus plakk megléte az artériás thrombózisra jelent nagy kockázatot, addig malignus daganatos betegségekben maga

a tumorszövet lehet a kiváltó tényező a vénás thrombózis és pulmonális embólia, együttesen a vénás thromboembóliás (VTE) szövődmények kialakulásában. Amennyiben hemosztázis rendszer pro- és antikoaguláns mechanizmusainak egyensúlya felborul, a prokoaguláns hatás lehet szubklinikus vagy manifesztálódhat VTE eseményként vagy érintheti az egész szervezetet pl. súlyos, vérzéssel járó disszeminált intravaszkuláris koaguláció formájában. A malignus daganatos betegségben szenvedőknél a VTE kialakulása akár hétszer gyakoribb a nem daganatos populációhoz hasonlítva (Timp et al, 2013). Kimutatták, hogy az aktív malignus megbetegedés a VTE szövődmények kialakulásának független rizikófaktora (Heit et al, 2000 és Alikhan et al, 2004). Számos tényező, köztük a thrombózis klasszikus rizikófaktorai (pl. immobilitás, életkor, műtéti beavatkozás), valamint a daganatra specifikus jellemzők jelenléte (a daganat típusa, a daganat stádiuma, a daganat ellenes terápia) befolyásolja a VTE kialakulásának esélyét (Falanga et al, 2012). A legújabb kutatások szerint a tumoros szövet sejtjein megjelenő különböző prokoaguláns anyagok (pl. TF) képesek aktiválni a hemosztázis rendszert és a gazdaszervezet más sejtjeit. A malignus sejt által vagy a szervezet aktivált sejtjei által képzett mikropartikulák, az intracelluláris granulumokból felszabaduló gyulladásos citokinek (pl. $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$), adhézions molekulák és proangiogén faktorok is hozzájárulhatnak a prokoaguláns hatás fokozásához (2. ábra) (Falanga et al, 2015). A daganatos sejtek direkt módon vagy indirekten, a daganatos sejtek által szekretált agonista ágensek révén aktiválják a vérlemezkéket a véráramban és ezáltal az aktivált vérlemezkék felszíne prokoagulánssá válik a koagulációs kaszkád számára. Ez mikropartikulák lefűződése révén tovább fokozza a prokoaguláns hatást. Újabb kutatások szerint a thrombocytáknak fontos szerepe lehet a daganatos szövet érhalózat integritásának megtartásában, ezáltal hozzájárulva a daganat progressziójához (Stegner et al, 2014). Ismert, hogy a thrombocyták „tumort védő” hatása mellett, a daganatos szövetben sok neutrophil granulocytá található, amelyek DNS tartalmú NET-et bocsátanak ki hozzájárulva a daganat növekedéséhez és angiogeneziséhez (2. ábra) (Demers et al, 2013).



2. ábra. Biológiai tényezők, melyek a malignus sejtek fokozott prokoaguláns hatásához hozzájárulnak. MP: mikropartikula; NET: neutrophil extracellular trap. (Falanga et al. The mechanisms of cancer-associated thrombosis. Thrombosis Research, 2015 ábrája alapján, annak módosításával készült.)

3.4.2. Vénás thromboembóliás szövődmény kialakulása malignus hematológiai betegségekben

A szolid tumoros (pl. pancreas tumor, ovárium tumor, agydaganat) betegekben ismert a VTE kialakulásának fokozott kockázata (Falanga et al, 2012). Malignus hematológiai megbetegedésekben, köztük az akut leukémiákban a VTE kockázatát jóval alacsonyabbnak vélték és inkább a vérzéses eseményeket tartották valószínűnek, azonban újabb tanulmányok kimutatták, hogy onkohematológiai, akut leukémiás betegekben is legalább olyan gyakran alakulnak ki VTE-ás szövődmények, mint szolid tumoros betegekben (Falanga et al, 2009; Falanga et al, 2012 és Franchini et al, 2015). Számos tényező játszhat szerepet a VTE szövődmények kialakulásában akut leukémiákban (2. ábra). Sok esetben leírták a terápiás beavatkozások, a centrális vénás katéter jelenlétéhez társuló prothrombotikus hatást (Mohren

et al, 2006 és Ku et al, 2009), vagy a kemoterápiához, például az L-aszparagináz terápiához köthető fokozott thrombotikus hatást, mely a természetes antikoagulánsok, mint például az antithrombin vagy plazminogén csökkenéséhez vezet és növeli a vWF szintet (Guzmán-Urbe et al, 2015 és Lejhancova-Tousovska et al, 2012). Régóta ismert, hogy az akut myeloid leukémia (AML) egyik altípusában, az akut promyelocytás leukémiában (APL) gyakoriak mind a vérzéses, mind a thrombotikus komplikációk különösen a diagnózis idején (Guzmán-Urbe et al, 2015 és Franchini et al, 2015). A vérzéses szövődmények hátterében az APL-ban tapasztalt hypofibrinogénia, esetleg az elasztáz hatás áll. A fokozott thrombosis hajlam pedig leginkább a leukémiás promyelocyták TF expressziójának tudható be. A hemosztatikus változások okozta eltéréseket a megnyúlt prothrombin-, aktivált parciális thromboplastin- és thrombin idő, valamint a fibrinogén-fibrin degradációs termékek jelenléte mutatja (Kwaan et al, 2014). A hemosztázis szövődmények tekintetében az APL egy külön entitás, azonban kevésbé ismert, hogy más akut leukémiákban, az AML egyéb altípusaiban és az akut lymphoid leukémiában (ALL) milyen gyakoriak a VTE szövődmények illetve mennyi szubklinikus thrombotikus szövődmény fordul elő. Más, nem akut promyelocytás leukémia típusú AML-ekben is megfigyelték a hemosztázis rendszer szisztémás aktivációját (Nur et al, 1995; Dicke et al, 2015 és Falanga et al, 1988). A leukémia típusától (AML vagy ALL) függően retrospektív tanulmányok kimutatták, hogy a VTE incidenciája 2,1% és 12,1% között változik (Ziegler et al, 2004; de Stefano et al, 2005 és Mohren et al, 2006). Az egyik tanulmány szerint a diagnóziskori VTE incidenciája APL-es betegekben 3,2%, egyéb AML-es betegek csoportjában 2,5% volt, azonban a különböző akut leukémia alcsoportok (ALL, AML és APL) diagnóziskor fennálló VTE incidenciája között szignifikáns különbséget nem találtak (Mohren et al, 2006). Ku és munkatársai egy tanulmány keretében, 7 éves megfigyelési periódus során retrospektív módon vizsgálták az AML-es és ALL-es betegek VTE szövődményeinek incidenciáját. Azt találták, hogy az AML-es betegek VTE kumulatív incidenciája 5,2%, az ALL-es betegeké 4,5% volt, a betegség diagnózisát követő 2 éven belül. De a leggyakrabban (az esetek 64%-ában) a diagnózist követő 3 hónapon belül alakultak ki VTE-ás szövődmények. A VTE incidenciájában az APL csoport és más AML-ák csoportja között nem találtak szignifikáns különbséget (Ku et al, 2009).

3.5. Mikropartikulák eredete és jelentősége a prokoaguláns hatás kialakításában

A mikropartikulák (MP) 0,1-1,0 μm átmérőjű, aktivált vagy apoptotikus sejtek membránjának felszínéről, a citoszkeletonról proteolitikus úton lefűződő foszfolipid tartalmú membránnal határolt partikulák. Egészséges egyének vérében fiziológiás körülmények között is megtalálhatók, de számuk növekedhet különböző betegségekben, pl. kardiovaszkuláris kórképekben, diabetesben, szepszisben vagy daganatos megbetegedésekben (Owens et al, 2011). A vérben a thrombocyta eredetű MP-k vannak jelen a legnagyobb mennyiségben (kb. 80%), de előfordulnak granulocyta, endothelsejt, vörösvértest és monocyta eredetű MP-k is (Falanga et al, 2012). A MP-k membránja arra a sejtre specifikus tulajdonságokkal rendelkezik, amelyikből származik, de más sejtekből származó proteinek is szállíthatnak, melyek sejtfúzió révén kapcsolódhatnak a MP-hoz. Mivel a MP-ák a sejteket ért stressz (pl. aktiváció) hatására képződnek, a felszínükön expresszálandó, negatív töltésű PS felelős a MP-k prokoaguláns hatásáért azáltal, hogy a negatív töltésű foszfolipid felszín tenáz és prothrombináz komplexek kialakulását segíti elő. Áramlási citometria vizsgálatokkal bizonyított, hogy akut promyelocytás sejtvonalak (pl. NB4) MP-ái a PS-expresszió mellett TF-t is expresszálnak felszínükön, hozzájárulva a leukémiás sejtek prokoaguláns hatásához (Gheldof et al, 2014). Azt is igazolták, hogy az NB4 sejtvonal eredetű MP-k kifejezett thrombin generációs potenciállal rendelkeznek (Gheldof et al, 2014).

A MP-k fontos szerepet töltenek be a szolid tumoros és hematológiai malignus megbetegedések prokoaguláns állapotának létrehozásában, a felszíni prokoaguláns anyagok expressziója révén, ezért akut monocytar leukémiás sejtvonalak prokoaguláns hatásának vizsgálatakor a sejtek által képzett, szeparált MP-k prokoaguláns hatását is tanulmányoztuk.

3.6. Globális thrombin generációs teszt és története

A véralvadási kaszkád kulcsenzime a thrombin, amely számos biológiailag fontos funkcióval rendelkezik, úgy, mint a thrombocyták aktiválása, a fibrinogén fibrinné való átalakítása és pozitív visszacsatolás a koagulációs kaszkádban. Központi szerepe révén a thrombin képződés a véralvadási folyamat egyik legfontosabb lépése (Crawley et al, 2007).

A teljes képződő thrombin mennyiség kevesebb, mint 5%-a elegendő a fibrinogén fibrinné történő átalakításához, vagyis az alvadék létrejöttéhez. A rutin hemosztázis diagnosztikában használt alvadási szűrőtesztek, mint a prothrombin idő, az aktivált parciális thromboplastin idő vagy thrombin idő esetében a mérés végpontja a fibrin, valamint alvadék képződés, melyet kevesebb, mint az teljes thrombin mennyiség 5%-a befolyásol (Baglin et al, 2005). Azaz a képződött thrombin legnagyobb része (>95%) az alvadék létrejöttét követően képződik, ezért az alvadási időket mérő tesztek nem adnak pontos információt a képződött thrombin mennyiségéről. A thrombin generációs teszt (TGT) egy globális hemosztázis teszt, mely egy adott idő intervallum alatt képződött teljes thrombin mennyiséget és a képződés kinetikáját méri.

A thrombin generáció mérésére alkalmas legelső módszert két munkacsoport egyszerre fejlesztette ki 1953-ban (Macfarlane et al, 1953 és Pitney et al, 1953). Ezek a tesztek azonban még több lépésből álltak, időigényesek, nehezen elvégezhetők és pontatlanok voltak. Az 1980-as években Hemker és munkatársai továbbfejlesztették a thrombin generációs tesztet, ekkor már a pontatlanság mértéke csökkent, de továbbra is több lépésben lehetett elvégezni, speciális eszközöket és képzettséget igényelt a kivitelezése (Hemker et al, 1986). 1993-ra a módszert már egylépéses alvadási tesztté alakították és alkalmas volt a thrombin aktivitás folyamatos detektálására (Hemker et al, 1993).

A 2003-ban módosított thrombin generációs tesztet használjuk ma is (Hemker et al, 2003), mely a folyamatosan képződő thrombin mennyiségét fluoreszcens szubsztrát segítségével határozza meg. Nem szükséges a mintát fibrin mentesíteni, a fibrinhez kötött thrombint és a szabad thrombin mennyiségét méri, valamint alkalmassá vált thrombocyta dús plazma és más celluláris komponensek vizsgálatára is.

3.6.1. A globális thrombin generációs teszt alkalmazása

Globális véralvadási teszt, ezért átfogó képet ad a hemosztázis állapotáról. A thrombin képződést egyaránt befolyásolják a pro- és antikoaguláns folyamatok, ezáltal a teszt alkalmas a fokozott trombózis készség és vérzékenység kimutatására is.

A tesztet eredetileg thrombocyta-szegény plazma (PPP) vizsgálatára fejlesztették ki (Hemker et al, 1993) és továbbra is a legelterjedtebb a PPP mintából történő thrombin generáció mérése, mely lehetőséget nyújt a minták fagyasztására és későbbi időpontban több minta egyidejű

lemérésére. Azonban a thrombocyta-szegény plazma mérésén túl - mivel a teszt pontosságát nem zavarja a vizsgált minta turbiditása vagy a vérlemezkék jelenléte - alkalmas thrombocytadús plazma (Hemker et al, 2000) és teljes vér (Ninivaggi et al, 2012) vizsgálatára is, azonban ezek a módszerek a PPP mérésekhez képest kevésbé elterjedtek. A TGT legújabb generációjának elérhetősége óta hypo- és hyperkoagulabilis állapotok vizsgálatára széles körben elterjedt módszer (Kern et al, 2014 és Tripodi, 2016). A módszer alkalmas a vérzeshajlammal járó betegségek, köztük az öröklött faktorhiánnyal és gátlótesttel járó hemofiliás betegek mintáinak értékelésére (Brummel-Ziedins et al, 2009 és Millet et al, 2011). A thrombin generációs tesztet számos kutatásban alkalmazzák artériás érrendszeri és vénás thromboembóliás megbetegedések vizsgálatára (Carcaillon et al, 2011; Tripodi et al, 2008; Marchetti et al, 2008 és Tripodi et al, 2016).

A különböző minták mérésére úgy válik alkalmassá a teszt, hogy a mintákhoz kis mennyiségű aktivátort (trigger) hozzáadva vizsgálható az *ex vivo* keletkezett thrombin mennyisége. Az általunk használt thrombin generációs tesztek során a gyártó eltérő TF és/vagy foszfolipid tartalmú reagenst ajánl a különböző minták vizsgálatára (1. táblázat).

A PPP-low reagens a FVIII, FIX és FXI detektálása szempontjából magas szenzitivitású, ezért használata hemofiliás plazmák vizsgálatára ajánlott. A PPP-high reagenst erősen gátolt thrombin generáció esetén (pl. ha a plazma nem frakcionált heparint tartalmaz) javasolt használni. A MP reagens a prokoaguláns MP-k felszínén lévő TF jelenlétére szenzitív.

Kísérleteinkben a thrombin generációs méréseket módosított körülmények között végeztük, a sejtek által indukált thrombin mennyiségére voltunk kíváncsiak. A PRP minták thrombin generációját vérlemezke aktiváció és/vagy CLA gátlást követően mértük le standard 1 pM rekombináns TF-t tartalmazó reagens jelenlétében, ebben a rendszerben a folyamat propagációjához a thrombocyta felszínén megjelenő foszfolipid járult hozzá. A leukémiás sejtvonalak és általuk képzett MP-k vizsgálata során thrombin generációs kísérleteinkben nem használtunk reagenst, itt a thrombin képződést a sejtfelszíni prokoaguláns receptorok iniciálják illetve propagálják.

Reagens neve	Szöveti faktor (pM)	Foszfolipid (μM)	Felhasználása
PPP reagens	5	4	Általános, thrombocyta szegény plazma vizsgálatára
PPP-low reagens	1	4	Haemophiliás betegek plazmájának vizsgálatára
PPP-high reagens	20	4	Véralvadásgátlót szedő betegek plazmájának vizsgálatára
PRP reagens	1	-	Thrombocyta dús plazma vizsgálatára
MP reagens	-	4	A PPP-ben jelenlévő mikropartikulák vizsgálatára

1. táblázat. A thrombin generációs teszt során alkalmazható reagensek és azok ajánlott alkalmazása.
 PPP: thrombocyta szegény plazma; PRP: thrombocyta dús plazma; MP: mikropartikula.

Az általunk végzett thrombin generációs mérések során háromféle kísérleti elrendezést használtunk, melyek az alábbiak voltak:

- 1: A fenti táblázatban nem szereplő elrendezés, melynek során a leukémiás sejtvonalak vagy a leukémiás sejtek által termelt mikropartikulák biztosítják a szöveti faktor és foszfolipid által történő aktivációt.
- 2: A táblázatban a PRP-reagensnek megfelelő kísérleti elrendezés, mely alacsony szöveti faktor koncentrációval hozza létre a thrombocyta felszínen megjelenő foszfolipid expresszió által mediált aktivációt.
3. Egy klinikai beteganyagban, ahol a plazmákat vizsgáltuk thrombin generációs képességük szerint, a thrombocyta-szegény plazmában a PPP-reagensnek megfelelően szöveti faktor és foszfolipid általi együttes aktivációt alkalmaztunk.

Az 1. kísérleti elrendezéssel kapott eredmények (Hudák és mtsai, Clin Chem Lab Med, 2017), valamint a 2. kísérlet elrendezés eredményei (Hudák és mtsai, BioMed Res Int, 2017) szerepelnek az értekezésben, míg a 3. pontban leírt vizsgálat (Hudák és mtsai, PlosOne, 2017) nem képezi az értekezés részét.

4. Célkitűzések

4.1. Calyculin-A hatása a vérlemezke aktivációra

Kísérleteinkben célul tűztük ki a protein foszfatáz gátló CLA PS-expresszióra, alvadék retrakcióra és thrombin képződésre gyakorolt hatásának vizsgálatát. Feltételeztük, hogy a CLA protein foszfatázokon keresztül kifejtett hatása révén gátolja a vérlemezke aktivációt, ezáltal a thrombin generációt, valamint hatással van a képződött alvadék szerkezetére. Mindennek háttérében feltételeztük a CLA intracelluláris kalcium szintet befolyásoló hatását.

4.2. Akut monocytás leukémia sejtvonalak prokoaguláns hatásának meghatározása

Kísérleteinkben három akut monocytás leukémia sejtvonal prokoaguláns hatását vizsgáltuk. Izolált humán monocytákat negatív kontrollként, pozitív kontrollként egy ismert akut promyelocytás leukémia sejtvonalat használtunk. A hipotézisünk az volt, hogy akut monocytás leukémia sejtvonalak prokoaguláns hatása fokozott a normál humán monocytákhoz képest.

4.3. Celluláris modellek vizsgálata thrombin generációs teszttel

Célunk volt thrombocyta dús plazmában a thrombocyták modulációját követően thrombin generáció vizsgálata, valamint olyan, az irodalomban nem elterjedten használt leukémiás sejteket vagy monocytákat tartalmazó celluláris modell létrehozása, mely alkalmas lehet a sejtek prokoaguláns hatásának meghatározására thrombin generációs teszttel.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Thrombocyta-szegény kevert plazma készítése

Öt egészséges önkéntestől perifériás vért vettünk 0,105 M nátrium-citrát antikoagulánsot tartalmazó műanyag vacutainer vérvételi csőbe (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Az önkéntesek a vérvételt megelőzően, legalább 2 hétig semmilyen gyógyszert nem szedtek. Thrombocyta szegény plazma (PPP) előállításához a teljes vért 1220 g-n, 15 percig, szobahőmérsékleten centrifugáltuk, a rutin hemosztázis diagnosztikában használt protokollnak megfelelően. Ezt követően kevert plazmát készítettünk, mely minden donor 1-1 mL PPP-jét tartalmazta. A későbbiekben a kevert PPP-re normál plazmaként hivatkozunk.

5.2. Thrombocyta-dús plazma készítése thrombocyta kísérletekhez

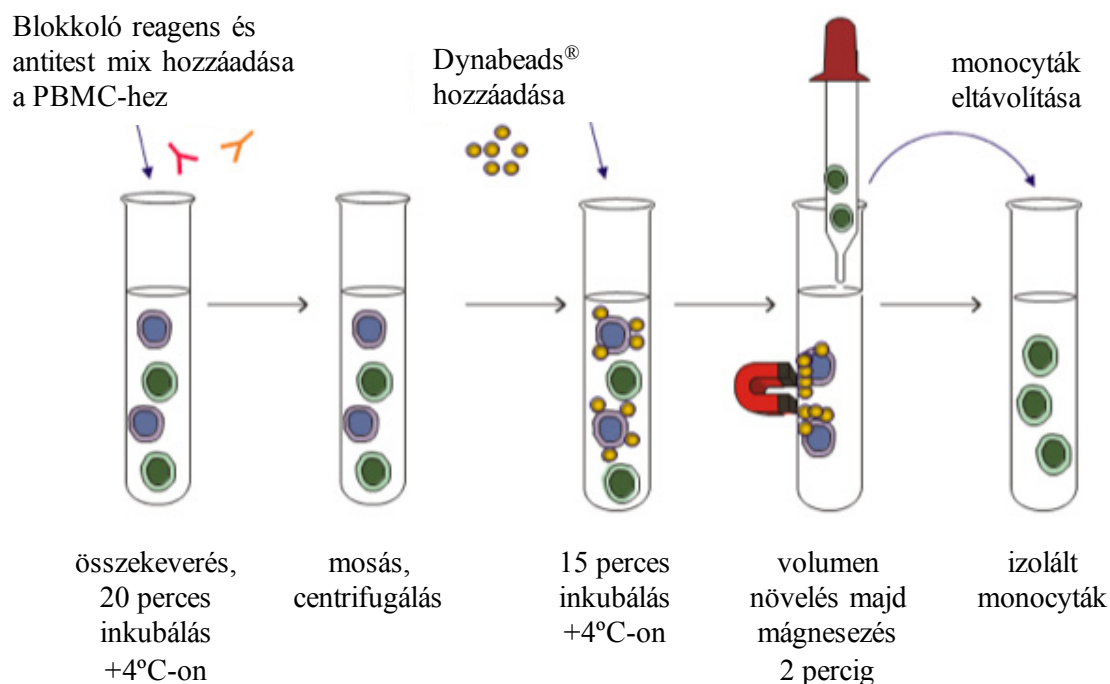
Egészséges önkéntesektől perifériás vért vettünk nátrium-citrát (0,105 M) antikoagulánsot tartalmazó műanyag vacutainer vérvételi csővekbe (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Az önkéntesek a vérvételt megelőző legalább 2 hétben semmilyen gyógyszert nem szedtek. Thrombocyta dús plazmát (PRP) a teljes vér 170 g-n, 15 percig, szobahőmérsékleten történő centrifugálásával állítottunk elő. A PRP eltávolítását követően a mintákat tovább centrifugáltuk 1500 g-n, 15 percig, szobahőmérsékleten, így thrombocyta-szegény plazmát nyertünk. Ezt követően a PRP thrombocyta számát 250 G/L-re állítottuk be autológ PPP-vel. Thrombocyta kísérletek során az alábbi PRP mintákat vizsgáltuk:

1. Nem aktivált minta (NA)
2. Calyculin-A-val (CLA) előkezelt nem aktivált minta (NA + CLA)
3. Thrombin receptor aktiváló peptid (TRAP) által aktivált minta (TRAP)
4. Calyculin-A-val előkezelt TRAP által aktivált minta (TRAP + CLA)

A CLA (Calbiochem, San Diego, CA) optimális végkoncentrációja - a munkacsoport által végzett - korábbi kísérletek alapján 50 nM volt, ugyanis ez volt az minimális koncentráció, amely még gátolta a vérlemezkék degranulációját de nem okozott toxikus hatást (Simon et al. 2010). A TRAP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) végkoncentrációja 20 μ M volt.

5.3. Normál humán monocyták szeparálása

Egészséges önkéntesektől 160 mL EDTA-val (K_2 EDTA, Becton Dickinson vacutainer vérvételi cső, San Jose, CA) alvadásgátolt perifériás vért vettünk. A perifériás vérből Ficoll Histopaque 1077-en (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) mononukleáris sejteket (PBMC) szeparáltunk. Ezt követően a PBMC-ből mágneses monocyta szeparáló, depléciós kit (Dynabeads Untouched Human Monocytes, Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA) segítségével izoláltunk monocytákat. A PBMC-hez gamma globulin tartalmú blokkoló reagenst (monocyták Fc-receptorának gátlása) és antitest keveréket (biotinált egér IgG típusú antitestek CD3, CD7, CD16 (CD16a és CD16b-re specifikus), CD19, CD56, CDw123 és CD235a - glycophorin A ellen) adtunk. Keverést és inkubációt követően a feleslegben lévő antitestet kimostuk a mintából, majd mágneses, streptavidinnel fedett gyöngyöket adtunk a PBMC-hez. A mágneses gyöngyökön lévő streptavidin a biotinált antitestekhez kötődött, így a mágnes segítségével a nem-monocyta sejteket illetve sejttörmelékeket eltávolítottuk (3. ábra). Az oldatban maradt monocytákhoz antitest nem kötődött a szeparálás során, ezért a mágnes sem volt képes őket az oldatból a cső oldalához vonni, így nem érte őket direkt aktiváló hatás. Más módszerekkel ellentétben a depléciós mágneses monocyta szeparálás során a monocyták 95%-a marad életképes, amely a szeparálást követő funkcionális tesztek szempontjából nagy jelentőségű. A monocyta szuszpenzió sejtszám beállítása centrifugálással és PBS-ben történő reszuszpendálással történt. Az izolált normált monocytákat kísérleteinkben az akut monocytás leukémia sejtvonalak negatív kontrolljaként használtuk.



3. ábra. Normál humán monocyták szeparálása negatív szelekcióval. PBMC: perifériás vér mononukleáris sejtek.

5.4. Sejtvonalak és sejtenyésztés

Három akut monocytás (THP-1, MOLM-13, MV4-11) és egy akut promyelocytás (NB4) leukémia sejtvonalat vizsgáltunk. A THP-1 sejtvonalat Prof. Dr. Vereb Györgytől (Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizika és Sejtbiológia Intézet) kaptuk. A MOLM-13 és MV4-11 sejtvonalakat a German Collection of Microorganism and Cell Cultures-től (DSMZ, Braunschweig, Németország) vásároltuk. Az akut monocytás leukémia sejtvonalakkal egyidejűleg vizsgált, NB4 sejtvonalat (DSMZ, Braunschweig, Németország) Dr. Balajthy Zoltántól (Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biokémia és Molekuláris Biológia Intézet) kaptuk. Mind a négy sejtvonalat 15% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) tartalmú RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) médiumban tenyésztettük, 37 °C-os inkubátorban, 5%-os CO₂ és 95%-os relatív páratartalom mellett. A monocytás leukémia sejtvonalak kettőződési ideje 35-48 óra volt, melyet 48 óránként történő sejtszámlálással és a 0., a 24., valamint a 48. órában vizsgált sejtciklus analízissel határoztunk meg. A sejteket kétnaponta passzáltuk, passzálások során a monocytás leukémia sejtvonalak sejtszámát 0,5 x 10⁶/mL-re, míg az NB4 sejtvonal sejtszámát 0,3 x 10⁶/mL-re állítottuk be.

Minden 7. napon a teljes médiumot eltávolítottuk és friss médiumba vettük fel a sejteket. A sejtek életképességének meghatározása tripánkék festéssel történt, kísérletekhez azokat a sejtszuspenziókat használtuk, amikben a sejtek >90%-a élőknek bizonyult.

5.5. Leukémiás sejtek immunfenotípusának meghatározása áramlási citometriai módszerrel

A leukémiás sejtek immunfenotípusának meghatározása standard felszíni 8 színű jelöléssel történt. Ötven mikroliter 1×10^7 /mL PBS-ben lévő sejtet inkubáltunk antitestekkel 15 percig, szobahőmérsékleten, sötétben. Az alábbi antitestekkel történt a felszíni antigének detektálása: CD14-FITC, CD11b-PE, HLA-DR-PerCPCy5.5, CD4-PB, CD15-FITC, CD34-PerCPCy5.5, CD71-FITC, CD117-PE, CD38-APCH7 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA), CD34-APC, CD13-PECy7, CD64-APCAF750, CD33-PECy5.5, CD56-PECy7 (Beckman Coulter, Marseille, Franciaország), CD45-PO (Invitrogen, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA), MPO-PE (Dako, Glostrup, Dánia). A FXIII-A-FITC (Katona et al, 2001) antitesttel történő jelölés a sejtek fixálása és permeabilizálása után történt. A sejtek immunfenotípusának meghatározása FACSCanto II (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA) áramlási citométerrel történt, minden minta esetén azonos beállításokkal. Mintánként 50 000 eseményt gyűjtöttünk be és az eredményeket FACSDiva szoftver (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA) segítségével értékeltük.

5.6. Thrombocyta sejtfelszíni foszfatidil-szerin expresszió vizsgálata áramlási citometriai módszerrel

Thrombocyta-dús plazmát - 250 G/L-es thrombocyta számot használva - előinkubáltunk 0,5%-os dimetilszulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) tartalmú HEPES pufferrel (15 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH 7,4) vagy a protein foszfatáz inhibitor CLA-val 30 percig, 37°C-os vízfürdőben, sötétben. A CLA-t 50 nM-os végkoncentrációban használtuk. Az előinkubációt követően a PRP-t 20 μ M-os végkoncentrációjú TRAP-pal vagy 200 μ M végkoncentrációjú Thiomersal-lal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 15 percig, 37°C-os vízfürdőben, sötétben

aktiváltuk. Majd 5 μ L PRP-t 5 μ L CD41-PE antitesttel (Dako, Glostrup, Dánia), 5 μ L Annexin-V-FITC antitesttel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) és 35 μ L Annexin-kötő pufferrel (10-szeres hígítású, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) jelöltünk 15 percig, szobahőmérsékleten, sötétben. A kísérletek során a mintákat az FC500 áramlási citométerrel (Beckman Coulter, CA) analizáltuk, a thrombocytá kapuba 10 000 eseményt gyűjtöttünk be, melyet a Kaluza szoftver (Beckman Coulter, CA) segítségével értékeltünk.

5.7. Leukémiás sejtek felszíni foszfatidil-szerin és szöveti faktor expressziójának meghatározása áramlási citometriai módszerrel

Izolált monocyták és sejtvonalak PS expressziójának meghatározásához Annexin-V-FITC antitestet és Annexin-kötő puffert használtunk, a sejtfelszíni szöveti faktor (TF) jelenlétét monoklonális PE-el konjugált humán TF ellenes antitesttel (R&D Systems, Minneapolis, MN) határoztuk meg. 100 μ L izolált monocytát vagy leukémiás sejtet (1×10^6 sejt/100 μ L) 10 μ L TF-PE-nel és 5 μ L Annexin-V-FITC antitesttel jelöltük 30 percig, szobahőmérsékleten, sötétben. A többi mintát 2-szer mostuk, végül Annexin-kötő pufferben (10-szeres hígítású) vettük fel a jelölt sejteket. A mintákat FC500 áramlási citométeren mértük ahol 30 000 eseményt gyűjtöttünk be minden mérés során, majd az eredményeket Kaluza szoftver segítségével értékeltük.

5.8. Mikropartikulák szeparálása és mikropartikula szám meghatározása áramlási citometriai módszerrel

A leukémiás sejtek kettőződési ideje kb. 48 óra, ezért a módszer standardizálásaként a leukémiás sejteket passzáláskor centrifugáltuk 190 g-n, 10 percig, szobahőmérsékleten, majd a sejteket friss 15%-os FBS tartalmú RPMI-1640 médiumba vettük fel, hogy eltávolítsuk a médiumban lévő MP-kat. Az akut monocytás leukémia sejtvonalak sejtszámát $0,5 \times 10^6$ /mL-re, míg az NB4 sejtvonal sejtszámát $0,3 \times 10^6$ /mL-re állítottuk be. Ezt követően a sejteket 48 óráig tenyésztettük, sejtszámlálást követően 5×10^6 /mL sejtet tartalmazó sejt szuszpenziót vettünk ki a sejtenyészítő flasksból. A szuszpenzióból a sejteket (190 g, 10 perc,

szobahőmérséklet) centrifugálással távolítottuk el. A maradék leukémiás sejtet, vagy sejttörmeléket a felülúszó (MP tartalmú) ismételt rövid ideig tartó centrifugálásával (13 000 g, 2 perc, szobahőmérséklet) távolítottuk el. A felülúszóból a MP-kat magas fordulatszámú (16 100 g, 30 perc, szobahőmérséklet) hosszú idejű centrifugálással szeparáltuk, majd PBS-ben mostuk és centrifugáltuk (16 100 g, 30 perc, szobahőmérséklet), végül 1 mL PBS-ben vettük fel. A MP-k áramlási citometriai mérése előtt Megamix-Plus SSC kalibrációs gyöngyöket (Biocytex, Marseille, Franciaország) használtunk a mérési protokoll beállításához. A kalibrációs gyöngyök fluoreszcensek és különböző átmérőjűek, a MP mérettartományok nagy részét lefedik. Az áramlási citométert ezekkel a fluoreszcens gyöngyökkel kalibráltuk és azt találtuk, hogy az ajánlott markerrel (SSC) a FACSCanto II áramlási citométer (Becton Dickinson, San Jose, CA) a 0,16-0,5 μm mérettartományba eső gyöngyöket volt képes azonosítani az SSC csatornán. A gyártó ajánlásának megfelelően a 0,16 μm átmérőjű gyöngyöket, illetve tartományt ki kell zárni és a maradék 0,2-0,5 μm közé eső események tekinthetők MP-nak az SSC csatornán. A leukémiás sejtek által kibocsátott MP-kat ezen beállítás segítségével azonosítottuk. Az SSC jel 0,3-1,0 μm tartományba esik az FSC csatornán detektálva. Azt találtuk, hogy a fluoreszcens gyöngyök FSC jele ugyanaz volt, mint a mikropartikuláké. A MP-k számát méretük és PS pozitivitásuk alapján határoztuk meg.

5.9. Leukémiás sejtek prokoaguláns hatásának meghatározása prokoaguláns aktivitás teszttel (PCA)

A leukémiás sejtek prokoaguláns aktivitásának vizsgálata során normál, valamint külön-külön VII-es és XII-es alvadási faktor hiányos plazmákat használtunk. Továbbá vizsgáltuk a leukémiás sejtek prokoaguláns hatását humán szöveti faktor ellenes antitest (blokkolás) jelenlétében. A különböző körülmények segítségével bővebb információt kaptunk arról, hogy a sejtek mely útvonalon befolyásolhatják az alvadást, illetve thrombin valamint fibrin képződést. A PCA során 100 μL normál, VII-es faktor vagy XII-es faktor hiányos plazmát (mindegyik Siemens, Marburg, Németország) inkubáltunk 100 μL PBS-sel vagy izolált monocytákkal vagy leukémiás sejtekkel 37°C-on 3 percig. Blokkoló antitestként poliklonális kecske IgG anti-humán szöveti faktor ellenes antitestet (ahu-TF antitest, R&D Systems, Minneapolis, MN) használtunk. A leukémiás sejteket 15 percig, 37°C-on inkubáltuk ahu-TF antitesttel (25 $\mu\text{g/mL}$ végkoncentrációban), majd 100 μL blokkolt mintát 100 μL normál

plazmával inkubáltunk 3 percig, 37°C-on. A blokkolt minta negatív kontrolljaként kecske szérumot használtunk (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 45 µg/mL végkoncentrációban. Az inkubációt követően 100 µL 20 mM-os CaCl₂ adtunk a mintákhoz, hogy beindítsuk az alvadást. A fibrin képződést KC-1 koagulométeren mértük és másodpercben fejeztük ki. Rekombináns tromboplasztin (Dade Innovin, Siemens, Marburg, Németország) 1:10 arányú hígítását választottuk 12 800 mU-nak, sorozatos hígítást használtunk a thromboplasztin kalibrációs görbe elkészítéséhez egy dupla logaritmikus skálán. Az alvadási időt mU/10⁵ monocyta mértékegységű prokoaguláns aktivitássá konvertáltuk.

5.10. Alvadék retrakció vizsgálata

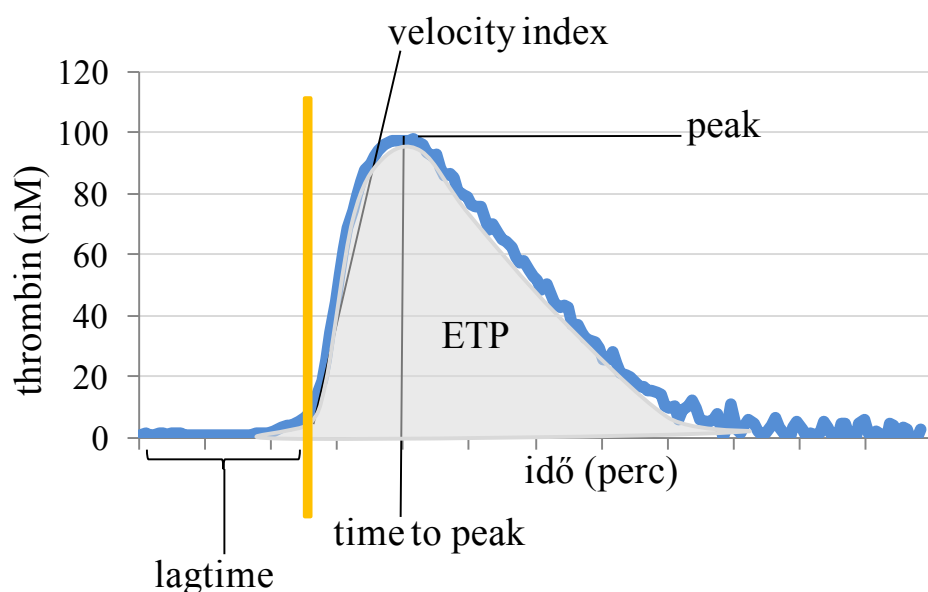
Hétszázhusz µL PRP-t pufferrel (DMSO tartalmú HEPES puffer) vagy CLA-val előinkubáltuk 30 percig, 37°C-os vízfürdőben, sötétben, majd TRAP-al aktiváltuk 15 percig 37°C-os vízfürdőben, sötétben. Egy üvegcsőbe mind a 4 mintából (NA, NA + CLA, TRAP, TRAP + CLA) 800-800 µL-t inkubáltunk CaCl₂-dal (25 mM-os végkoncentrációban) 60 percig, 37°C-os vízfürdőben, sötétben. A mintákról a 0., 20., 40. és 60. percekben fényképes dokumentációt készítettünk. A kísérlet végén a kiszorított szérum mennyiségét analitikai mérleggel határoztuk meg. A kiszorított szérum fibrin monomer mennyiségét kvantitatív immunoassay (Diagnostica Stago, Asnières, Franciaország) segítségével ACL-TOP (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA) véralvadási analizátorral határoztuk meg.

5.11. Leukémiás sejtek és mikropartikuláik prokoaguláns hatásának meghatározása thrombin generációs teszttel

A thrombin generációs tesztet (TGT) a korábban leírtaknak szerint a Thrombinoscope CAT (Calibrated Automated Thrombogram, Maastricht, Hollandia) segítségével a gyártó utasításainak (Diagnostica Stago, Asnières, Franciaország) megfelelően végeztük (Perrin et al, 2014 és Hemker et al, 2013). Röviden, egy kerek aljú, 96-lyukú, fekete lemezbe pipettáztunk 80 µL normál plazmát vagy VII-es faktor, XI-es faktor, XII-es alvadási faktor hiányos plazmát

majd hozzápipettáztunk 20 μL PBS-t/izolált monocytát vagy leukémiás sejtet ($5 \times 10^6/\text{mL}$). A MP thrombin generációs vizsgálat során 80 μL normál plazmához 20 μL szeparált MP-t pipettáztunk. A mintákat 10 percig 37°C -on inkubáltuk. Minden plazma mintához kalibrátort (Calibrator reagent, Thrombinoscope BV, Maastricht, Hollandia) - α_2 -makroglobulin és thrombin stabil komplexe - használtunk. A thrombin generációt 20 μL FluCa-KitTM (Fluo-puffer és fluorogén CaCl_2 tartalmú szubsztrát keveréke) hozzáadásával indítottuk el és a mintákat duplikátumban mértük. A fluoreszcenciát a Fluoroskan Ascent fluoriméterrel (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) detektáltuk és thrombin generációs görbéket a Thrombinoscope szoftverrel értékeltük. A thrombin generációs görbéket az alábbi paraméterekkel (az elnevezések magyar nyelvű konszenzusának hiányában) jellemezhetjük:

1. lagtime (perc): a thrombin képződés kezdetéig eltelt idő
2. endogén thrombin potenciál (ETP, $\text{nM} \times \text{perc}$): a görbe alatti terület
3. peak thrombin (nM): a legmagasabb thrombin koncentráció
4. time to peak (perc): a legmagasabb thrombin koncentráció létrejöttéig eltelt idő
5. start tail (perc): a thrombin generáció végpontja
6. velocity index (nM/perc): a lagtime és time to peak közötti görbe (4. ábra).



4. ábra. A thrombin generációs görbe jellemző paraméterei. Narancssárga függőleges vonal jelzi a fibrin képződés kezdetéig eltelt időt. ETP: endogén thrombin potenciál.

5.12. Thrombocyta funkció moduláció és CLA hatás vizsgálata thrombin generációs teszttel

Nyolcvan mikroliter CLA-val illetve TRAP-pal kezelt PRP-t 20 μL előre gyártott 1 pM-os rekombináns szöveti faktor tartalmú PRP regenssel (rTF, PRP-reagent, Thrombinoscope BV, Maastricht, Hollandia) inkubáltunk 10 percig, 37°C-on, fekete kerek aljú lemezekben. Az előző fejezetben feltüntetett módon, minden plazma mintához kalibrátort készítettünk. A mintákat duplikátumokban mértük.

5.13. Vérlemezke intracelluláris Ca^{2+} szint vizsgálata konfokális mikroszkóppal

A thrombocyták intracelluláris Ca^{2+} szint méréséhez a PRP-t a fent említettek alapján készítettük elő, Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) peptidet (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) adtunk a mintákhoz az aggregáció megelőzésére (Sage et al, 2011). A PRP-t (100 μL) 1,5 μL 2 mM-os Fluo-4-AM festékkel inkubáltuk 10 percig, 37°C-os vízfürdőben. A thrombocytákat ezt követően 2 μL 1 mM-os Fura-Red-AM-el töltöttünk 30 percig, 37°C-os vízfürdőben. Két mL Hepes-puffert adtunk a mintákhoz, ezt követően centrifugáltuk őket 350 g-n, 20 percig, szobahőmérsékleten. Ezt követően a vérlemezkéket 100 μL pufferben vettük fel. Az intracelluláris Ca^{2+} szint meghatározása Zeiss LSM 5 live (Carl Zeiss AG, Jéna, Németország) high-speed konfokális mikroszkóppal történt. A mintát egy 37°C-ra beállított kamrában található tárgylemezre pipettáztuk. A kamra és az objektív hőmérsékletét az egész mérés során 37°C-on tartottuk. A mérést 5 percig végeztük 488 nm-es excitációs hullámhosszon és két detektáló kamra segítségével: 500-525 nm közötti band pass filter csatornán detektáltuk a FLuo-4 jelét. Long pass filteren, 635 nm felett a Fura-Red fluoreszcens jelét. A mérés során kapott fluoreszcens arányok kiszámítását, és a konfokális mikroszkópos mérést Dr. Vincze János (Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani Intézet) végezte.

5.14. Statisztikai elemzések

A statisztikai analízist a GraphPad Prism szoftver 5.0-ás (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) verziójával végeztem. A normalitás vizsgálata Kolmogorov-Smirnov és Shapiro-Wilk tesztekkel történt. Az átlag ± 2 SD-n kívül eső értékeket kizártam. Két összetartozó csoport összehasonlítására, amennyiben a változó mindkét csoportban normál eloszlást mutatott, egymintás t-próbát (paired t-test), nem normál eloszlású változó esetén Wilcoxon signed rank tesztet (párosított Wilcoxon-teszt) alkalmaztam. Két független csoport összehasonlítására nem párosított t-próbát (normál eloszlás) és Mann-Whitney tesztet (nem normál eloszlás) alkalmaztam. Több független csoport összehasonlítása ANOVA és Bonferroni poszt teszt (Gaussi eloszlás) valamint Kruskal-Wallis és Dunn's poszt teszt (nem Gaussi eloszlás) segítségével történt. A 0,05-nál kisebb p -értéket tekintettem statisztikailag szignifikánsnak.

6. Eredmények

6.1. A leukémiás sejtvonalak immunfenotípusa és genetikai jellemzői

A THP-1 sejteket egy relapszusban lévő akut monocyta leukémiás betegből izolálták. A MOLM-13 sejtvonal egy myelodysplasia (MDS), RAEB formájából transzformálódott szekunder monocytás leukémiában szenvedő betegből, az MV4-11 sejtvonal *de novo* akut monocyta leukémiás betegből származik. Az immunfenotípus vizsgálat során a CD33 myeloid marker volt az egyetlen antigén, amely egyformán expresszáldott (100%) mindhárom sejtvonal felszínén. Más pan-myeloid marker (CD13) és különböző monocyta markerek változó expressziót mutattak. A THP-1 sejtvonal bizonyult a legérettebbnek a CD34 negativitás és minimális (9%) CD117 expresszió miatt. A három sejtvonal különböző immunfenotípust mutatott inkongruens myeloid és monocyta marker expresszióval. Mindhárom sejtvonal esetén komplex citogenetikai eltérések voltak kimutathatóak. A THP-1 sejtvonal az fms-szerű tirozin kináz 3 – internal tandem duplikáció (FLT3-ITD) mutáció szempontjából vad típusú, a MOLM-13 sejtvonal heterozigóta, míg az MV4-11 sejtvonal homozigóta (2. táblázat).

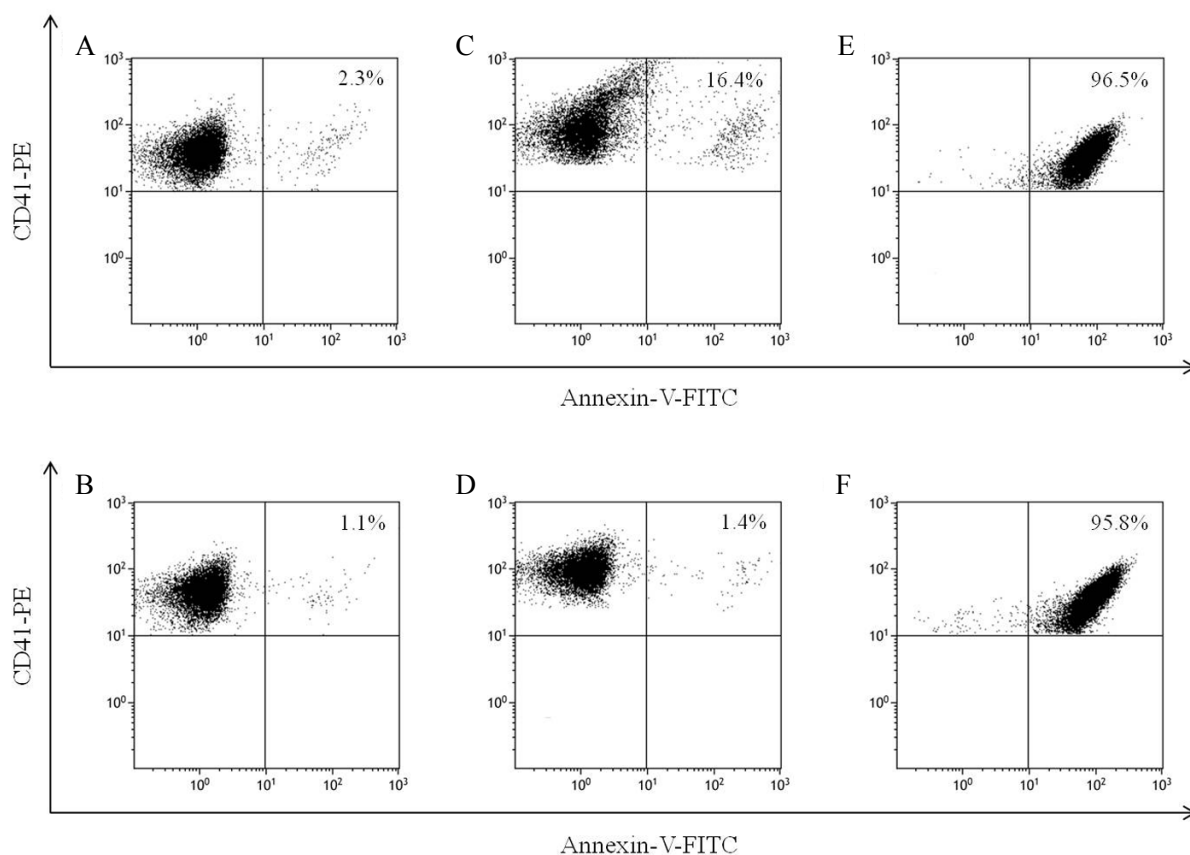
Sejtvonal	THP-1	MOLM-13	MV4-11
Klinikai jellemzők	relapszusban lévő monocytás AML	MDS-ből transzformálódott, szekunder AML	<i>de novo</i> monocytás AML
Kettőződési idő	35-50 óra	50 óra	50 óra
Immunfenotípus			
Myeloid			
CD33	100 %	100 %	100 %
CD13	100 %	7 %	20 %
CD15	100 %	100 %	100 %
cyMPO	0 %	0 %	34 %
CD11b	100 %	15 %	100 %
Monocyta			
CD64	50 %	11 %	100 %
CD14	0 %	5 %	14 %
CD4	20 %	100 %	100 %
HLA-DR	12 %	3 %	18 %
cyFXIII-A	0 %	11 %	60 %
Más			
CD38	100 %	100 %	20 %
CD71	100 %	11 %	100 %
CD56	100 %	100 %	18 %
CD34	0 %	7 %	14 %
CD117	9 %	5 %	20 %
Citogenetikai jellemzők	Komplex citogenetikai eltérések		
Molekuláris genetikai jellemzők	MLL-AF9	MLL-AF9	MLL-AF4
FLT3-ITD mutáció	vt/vt	vt/FLT3-ITD ⁺	FLT3-ITD ⁺ / FLT3-ITD ⁺

2. táblázat. Akut monocytás leukémia sejtvonalak jellemzői. AML: akut myeloid leukémia; MDS: myelodysplasia; CD: cluster of differentiation; vt: vad típus; FLT3-ITD: fms-szerű tirozin kináz 3- internal tandem duplikáció.

6.2. TRAP és thiomersal aktiváció és CLA gátlás hatása a thrombocyta sejtfelszíni foszfatidil-szerin expresszióra

Az áramlási citometriai mérés során először a vérlemezkéket azonosítottuk a mintáinkban CD41-PE jelölődés alapján. A reprezentatív dot plotok (5. ábra) jobb felső kvadránsába eső események a PS pozitív thrombocytákat mutatják. A NA és CLA-val előkezelt mintákat aktiváltuk 20 μ M végkoncentrációjú TRAP-pal vagy 200 μ M végkoncentrációjú thiomersal-

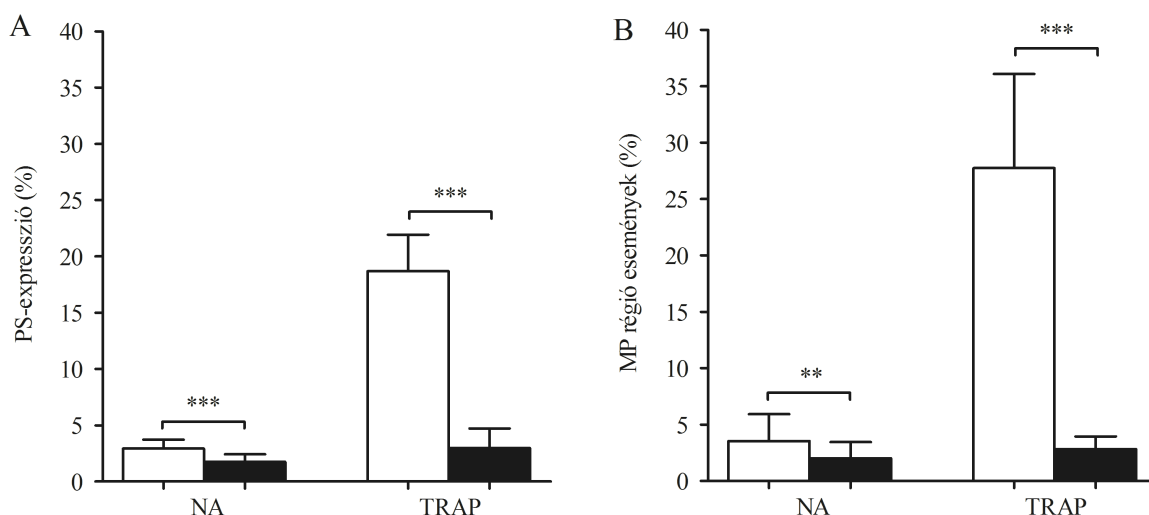
lal, majd a PS-expressziót áramlási citometriai módszerrel határoztuk meg. A NA vérlemezék PS-expressziója minimális, pár százaléknak adódott, melyet a CLA előkezelés tovább csökkentett (5. ábra A és B). A PS-expressziót mutató vérlemezék aránya TRAP aktiváció hatására jelentősen emelkedett, melyet a CLA előkezelés minimális mértékűre csökkentett (5. ábra C és D). A PAR-1 receptoron keresztül ható TRAP-al ellentétben, a thiomersal a vérlemezék 96%-án indukált PS-expressziót, melyet a CLA-előkezelés nem befolyásolt (5. ábra E és F).



5. ábra. A PS-expresszió áramlási citometriás eredményeit bemutató reprezentatív dot plotok. NA: nem aktivált; TRAP: thrombin receptor aktiváló peptid; FITC: fluoreszcein-izotiocianát; PE: phycoerythrin.

A kísérletek eredményeit összefoglaló oszlopdiagram ábrázolja a vérlemezék PS-expresszióját különböző körülmények között. A nem aktivált minták PS-expressziója alacsony, $3,0 \pm 0,8\%$ (átlag $\pm$ SD) volt, melyet a CLA előkezelés tovább csökkentett (átlag $\pm$ SD: $1,8 \pm 0,7\%$, $p=0,0004$). A PAR-1 receptor agonista, TRAP szignifikánsan növelte a PS-expressziót mutató trombocyták számát (átlag $\pm$ SD: $18,7 \pm 3,2\%$) összehasonlítva a NA mintával

($p=0,0001$). A thrombocyta fényszórási képeken a vérlemezke FSC alatti mikropartikula (MP) régió eseményeit százalékosan elemeztük. A CLA előkezelés teljesen meggátolta a PS-expressziót valamint a MP régióban megjelenő események kialakulását TRAP-aktiválta thrombocyták esetén (6. ábra A és B).



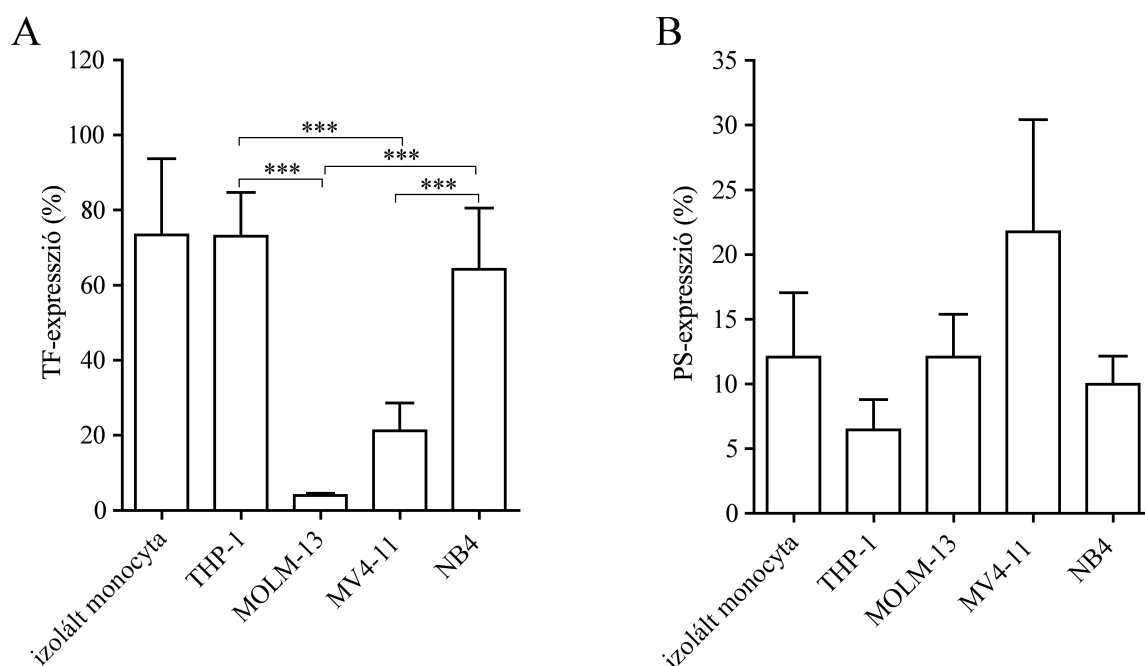
6. ábra. A calyculin-A PS-expressziót (A) és MP régióba eső eseményeket (B) csökkentő hatása. Fehér oszlopok a nem aktivált és TRAP aktivált mintákat mutatják, a fekete oszlopok a CLA előkezelt mintákat jelzik. Az oszlopok 8 különböző mérés átlagát és szórását (SD) mutatják. A statisztikai analízist egymintás, párosított t-próbával végeztem, *** $p<0,001$. PS: foszfatidil-szerin; MP: mikropartikula; NA: nem aktivált; TRAP: Thrombin receptor aktiváló peptid aktivált.

6.3. Normál monocyták és leukémiás sejtek felszíni szöveti faktor (TF) és foszfatidil-szerin (PS) expressziója

A negatív kontroll, izolált normál monocyták $73,4 \pm 20,3\%$ -a (átlag $\pm$ SD) mutatott TF-expressziót. A leukémiás sejtvonalak esetében a TF-expresszió mértéke eltérő volt. A THP-1 sejtvonal TF-expressziója (átlag $\pm$ SD: $73,1 \pm 11,6\%$) a monocytákétól nem különbözött. A MOLM-13 sejtvonal mutatta a legalacsonyabb TF-expressziót (átlag $\pm$ SD: $3,9 \pm 0,6\%$). Mind a MOLM-13, mind az MV4-11 (átlag $\pm$ SD: $21,2 \pm 7,4\%$) sejtvonal TF-expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a monocyták, a THP-1 és az NB4 sejtvonalakétól ($p<0,001$), a két sejtvonal között nem volt szignifikáns különbség ($p>0,05$). A pozitív kontroll, NB4 sejtvonal átlag $\pm$ SD: $64,2 \pm 16,4\%$ -os TF-expressziót mutatott, mely a monocyták és THP-1 sejtvonalétól szignifikánsan nem különbözött (7. ábra A). A három akut monocytás leukémia sejtvonal közül a THP-1 PS-expressziója volt a legalacsonyabb (átlag $\pm$ SD: $6,5 \pm 2,3\%$). A

MOLM-13 (átlag $\pm$ SD: 12,1 $\pm$ 3,3%) és MV4-11 (átlag $\pm$ SD: 21,8 $\pm$ 8,4%) sejtvonalak kissé magasabb, azonban ezek a különbségek nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak. A negatív kontroll, monocyták (átlag $\pm$ SD: 12,1 $\pm$ 4,9%) és a pozitív kontroll, NB4 sejtvonal (átlag $\pm$ SD: 9,8 $\pm$ 2,2%) PS-expressziója sem különbözött a monocyta leukémiás sejtvonalakétól ($p > 0,05$) (7. ábra B).

Az akut monocytás leukémia sejtvonalak esetén vizsgáltuk a PS-expresszió intenzitását, melyet az átlagos fluoreszcencia intenzitás (mean fluorescence intensity, MFI) arányával jellemeztünk. Értékét úgy kaptuk meg, hogy a PS-pozitív populáció MFI-jét elosztottuk a PS-negatív populáció MFI-jével. A THP-1 MFI arány átlag $\pm$ SD: 14,1 $\pm$ 3,9 volt, amely szignifikánsan nem különbözött az MV4-11 sejtvonalétól (átlag $\pm$ SD: 20,2 $\pm$ 12,1). A MOLM-13 sejtvonal estében az MFI arány (átlag $\pm$ SD: 75,9 $\pm$ 30,2) szignifikánsan magasabb ($p < 0,001$) volt a másik két sejtvonaléhoz képest. Az MV4-11 sejtvonal felszínén volt a legtöbb foszfatidil-szerin, a MOLM-13 sejtvonalon volt a foszfatidil-szerin expresszió intenzitása a legnagyobb.



7. ábra. Izolált normál monocyták és leukémiás sejtvonalak TF- (A) és PS-expressziója (B). Az oszlopokon legalább 6 különböző mérés átlagát és szórását (SD) mutatják. A statisztikai analízist ANOVA és Bonferroni poszt tesztet végeztem. *** $p < 0,001$. TF: szöveti faktor; PS: foszfatidil-szerin.

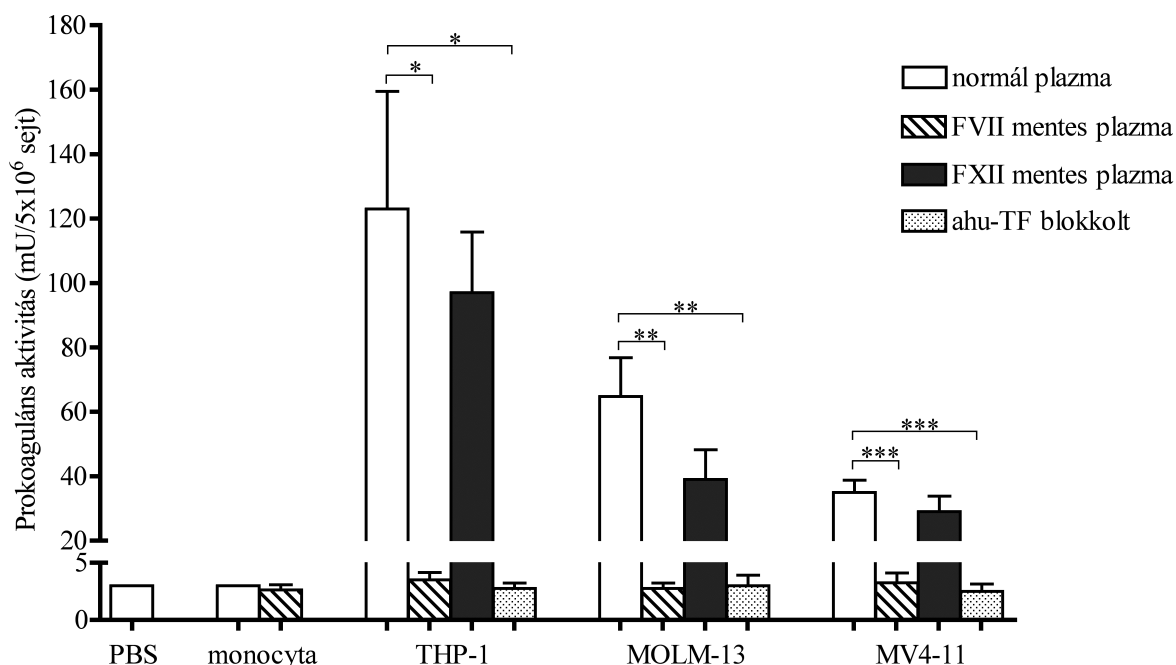
6.4. Mikropartikula szám meghatározás

Az azonos sejtenyésztési körülmények és sejtszám mellett minden akut monocytás leukémia sejtvonalból jelentős mennyiségű MP képződött. Mivel a MP-kat szeparálást követően PBS-be vettük fel, az áramlási citometriai MP szám meghatározáskor először a MP-t nem tartalmazó PBS mintát mértük le. A PBS mintát ugyanúgy kezeltük (centrifugáltuk), mint a MP-kat tartalmazó felülúszót. Az egyes sejtvonalak MP számából kivontuk a PBS minta MP kapuba eső eseményeinek számát. A THP-1 sejtvonal sejteiből kétszer annyi MP (átlag: $4,7 \times 10^7/5 \times 10^6$ sejt) képződött, mint a MOLM-13 (átlag MP szám: $2,2 \times 10^7/5 \times 10^6$ sejt) vagy MV4-11 sejtvonal sejteiből (átlag MP szám: $2,6 \times 10^7/5 \times 10^6$ sejt). A pozitív kontrollként használt, NB4 sejtvonal esetén átlagosan $3,2 \times 10^7$ MP/ 5×10^6 sejt képződött. Statisztikailag szignifikáns különbség a MP számok között nem volt.

6.5. Leukémiás sejtek prokoaguláns hatása prokoaguláns aktivitás tesztel (PCA)

A negatív kontroll sejteken, monocytákon kívül használtunk egy sejtmentes kontroll mintát is, monocytákkal és sejtekkel azonos térfogatú PBS-t inkubáltunk normál plazmával. A PBS kontroll alvadási ideje mérhetetlenül hosszú volt, amely minimális alvadási aktivitásban fejezhető ki. A monocyták normál plazmában szintén minimális mértékű prokoaguláns aktivitást mutattak. A PBS és monocyták között szignifikáns különbség nem volt kimutatható. A monocytákat LPS-el aktiválva azonban ki lehetett mutatni PCA megjelenését mely TF függő volt. A nem aktivált mononukleáris sejtek rekalcifikálás után 102 másodperces míg az LPS-aktivált sejtek 57 másodperces alvadási időt mutattak. Ezen alvadási idők a thromboplasztin hígítási görbéről leolvasva a nem aktivált 18 mU míg az LPS-aktivált 110 mU-os thromboplasztin aktivitást jelentettek. Mindhárom akut monocytás leukémia sejtvonal szignifikánsan fokozott prokoaguláns aktivitást mutatott a normál monocytákhoz képest ($p < 0,05$). A monocyták normál plazmában mért minimális mértékű prokoaguláns aktivitását a VII-es alvadási faktor hiányos plazma nem befolyásolta. A sejtvonalak esetében a VII-es alvadási faktor hiányos plazma és az anti-humán szöveti faktor ellenes antitesttel (ahu-TF antitest) gátolt minta prokoaguláns aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt a normál plazmában mértekhez képest. A XII-es alvadási faktor hiányos plazmában nem csökkent

szignifikánsan a prokoaguláns aktivitás egyik sejtvonal esetében sem. Bár a sejtvonalak prokoaguláns aktivitása fokozott volt, a sejtvonalak között szignifikáns különbség nem volt kimutatható (8. ábra).

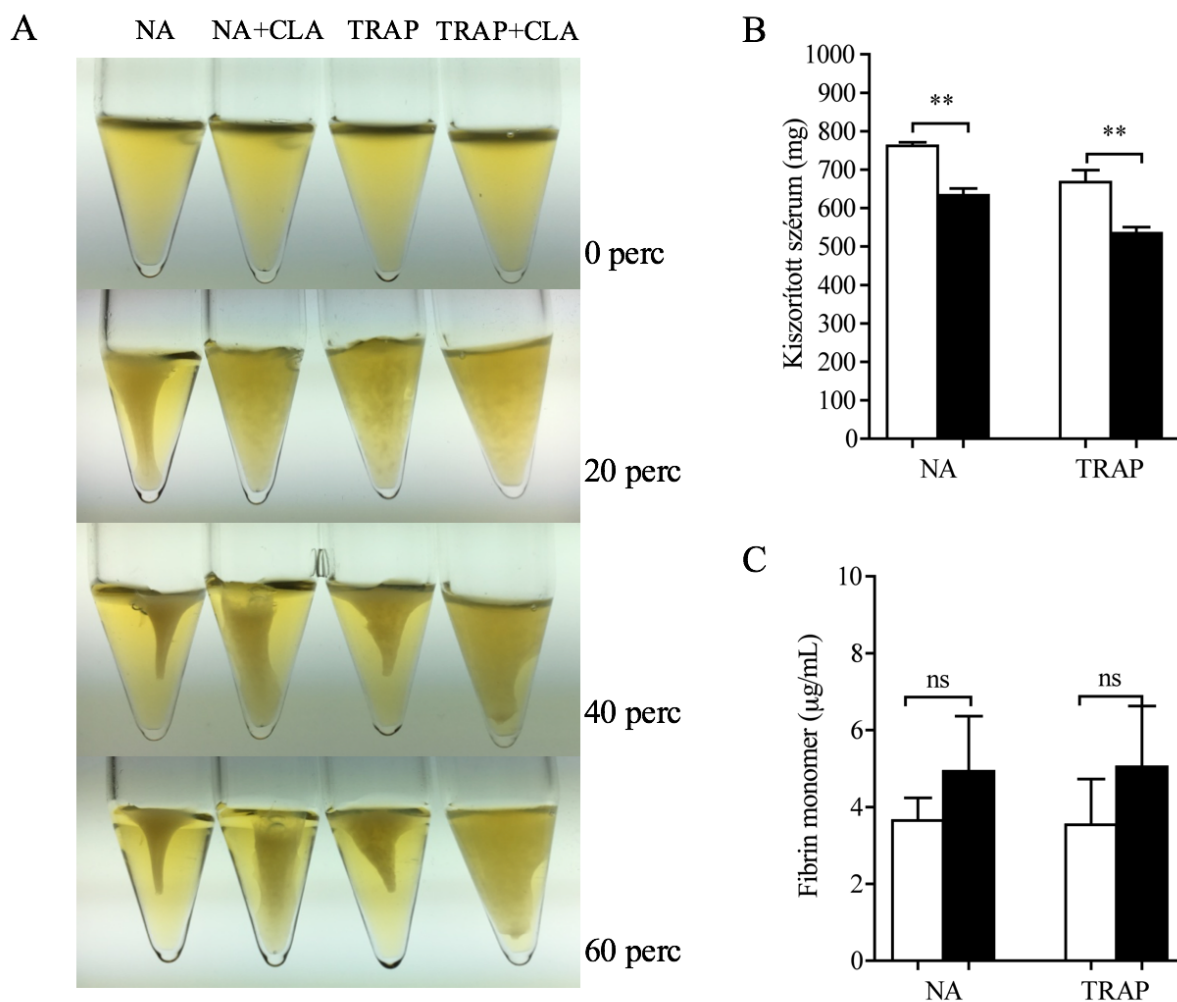


8. ábra. Akut monocytás leukémia sejtvonalak és kontrollok prokoaguláns aktivitása. A fehér oszlopok a normál plazmát, a csíkos oszlopok a VII-es alvadási faktor hiányos plazma mintát, a fekete oszlopok a XII-es alvadási faktor hiányos plazma mintát és a pöttyös oszlopok az ahu-TF antitesttel blokkolt mintákat mutatják. Az oszlopokon az átlagot és a SEM-et tüntettem fel. A statisztikai analízist ANOVA és Bonferroni poszt tesztel végeztem. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. PBS: phosphate buffered saline; FVII: VII-es alvadási faktor; FXII: XII-es alvadási faktor; ahu-TF: anti-humán szöveti faktor.

6.6. CLA hatása az alvadék retrakcióra

Az üvegcsővekben az alvadék kialakulása már a 20. percben látható, a 60. perben a NA és TRAP aktivált mintákban intenzív alvadék retrakció figyelhető meg. A CLA-előkezelt minták esetében az alvadék retrakció kisebb mértékű (9. A ábra). A szabad szemmel látható alvadék képződésnek megfelelően, a CLA-val előkezelt minták esetében a kiszorított szérum mennyisége szignifikánsan kevesebb volt (9. B ábra), mint a NA (754,4 mg vs. NA + CLA: 653,2 mg, $p = 0,0085$) és TRAP aktivált (647,4 mg vs. TRAP + CLA: 570,0 mg, $p = 0,005$) minták esetében. A fibrinogén szint a mintákban nephelometriás módszerrel mérve is mérhetetlenül alacsony volt a 60. percben. A kiszorított szérum fibrin monomer (FM) szintje a CLA-előkezelt

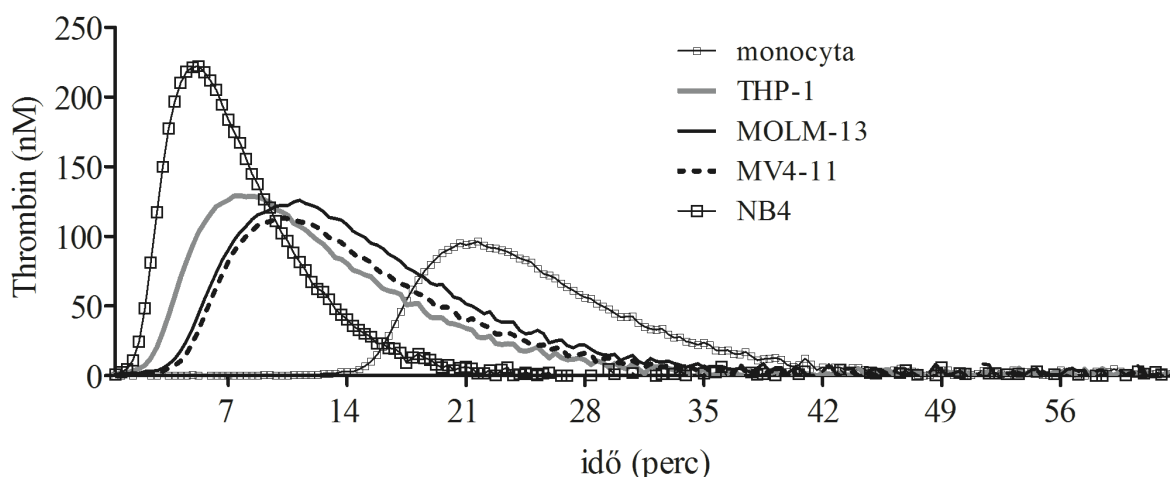
minták esetében magasabb tendenciát mutatott a nem CLA előkezelt mintákhoz viszonyítva (NA vs. NA + CLA: 3,65 $\mu\text{g/mL}$ vs. 5,23 $\mu\text{g/mL}$, $p=0,44$ és TRAP vs. TRAP + CLA: 3,26 $\mu\text{g/mL}$ vs. 5,16 $\mu\text{g/mL}$, $p=0,39$) (9. C ábra).



9. ábra. CLA alvadék retrakcióra kifejtett gátló hatása. Alvadék retrakció (A) 0., 20., 40. és 60. percben. A fehér oszlopok a NA és TRAP aktivált mintákat mutatják. A fekete oszlopok a CLA-előkezelt mintákat jelölik. A retrakció során kiszorított szérum mennyisége (B). A kiszorított szérumban mért fibrin monomer mennyiség (C). Az ábrákon 5 különböző mérés eredménye látható. Az oszlopokon az átlagot és a SEM-et ábrázoltam. A statisztikai analízist párosított t-próbával végeztem. ns: nem szignifikáns; ** $p<0,01$. NA: nem aktivált; TRAP: thrombin receptor aktiváló peptid.

6.7. Leukémiás sejtek thrombin generációja

A leukémiás sejtek prokoaguláns hatásának vizsgálatára a prokoaguláns aktivitás teszten (PCA) kívül TGT-et is alkalmaztuk. A PCA során a fibrinképződés kezdetéig eltelt időt mértük, majd konvertáltuk át aktivitássá. A TGT során az egy óra alatt képződött thrombin mennyiségéről és a képződés kinetikájáról kapunk információt. A 10. ábrán a monocyták és leukémiás sejtvonalak reprezentatív thrombin generációs görbéi láthatók normál plazmában. A pozitív kontroll, NB4 sejtvonal esetén indult a leggyorsabban a thrombin képződés, a peak thrombin érték is az NB4 sejtvonal esetében volt a legmagasabb. A monocyták thrombin generációja jóval később indult el, mint a sejtvonalaké. A három akut monocytás sejtvonal thrombin generációja hasonló (10. ábra).



10. ábra. Monocyták és leukémiás sejtek reprezentatív thrombin generációs görbéi. A monocyták thrombin generációját a kis négyzetek, a THP-1 sejtvonalét a szürke vonal, a MOLM-13 sejtvonalét a fekete vonal, az MV4-11 sejtvonalét a szaggatott vonal és az NB4 sejtvonalét a nagy négyzetek jelölik.

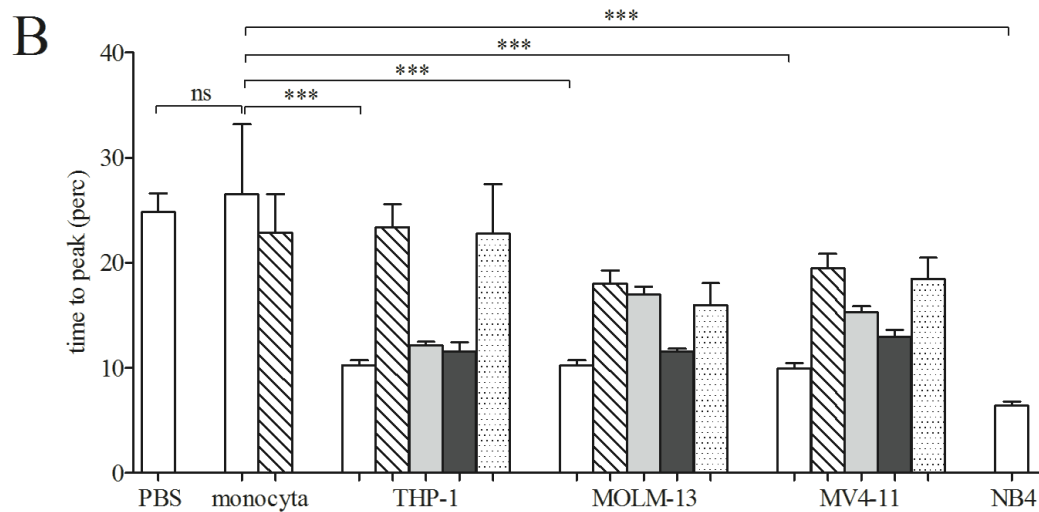
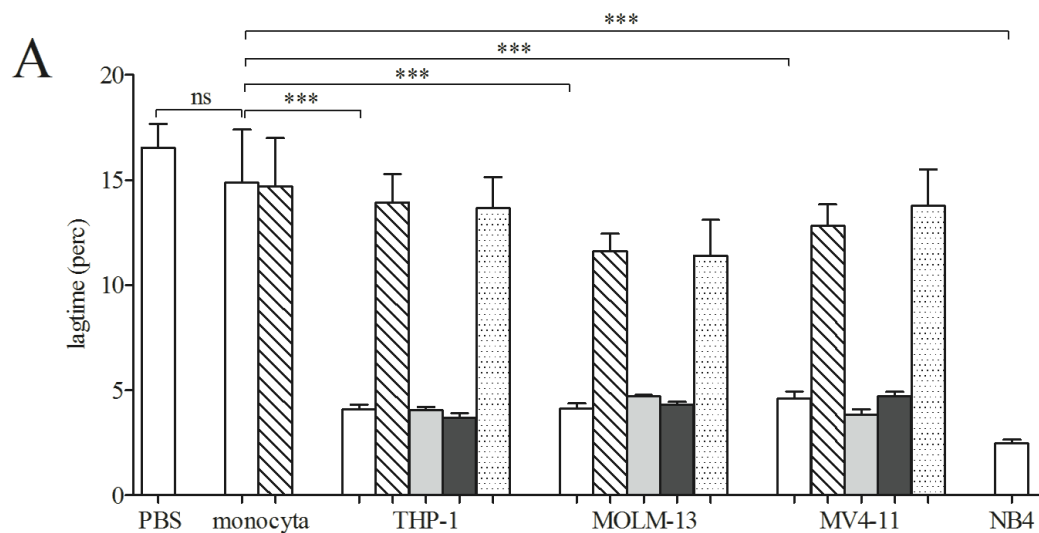
A PBS (sejt nélküli kontroll) és monocyták thrombin generációja között nem volt szignifikáns különbség egyik paraméter esetében sem, normál plazmában (11. ábra A, B, C és D rész). Mindhárom akut monocytás leukémia sejtvonal lagtime és time to peak értékei szignifikánsan rövidültek voltak a monocytákhoz képest ($p < 0,001$) normál plazmában, a thrombin képződés gyorsabban következett be a sejtvonalaknál (ábra 11. ábra A, B rész fehér oszlopok). A monocytás leukémia sejtvonalak (átlag $\pm$ SEM: THP-1: $3,7 \pm 0,2$ perc; MOLM-13: $4,1 \pm 1,3$

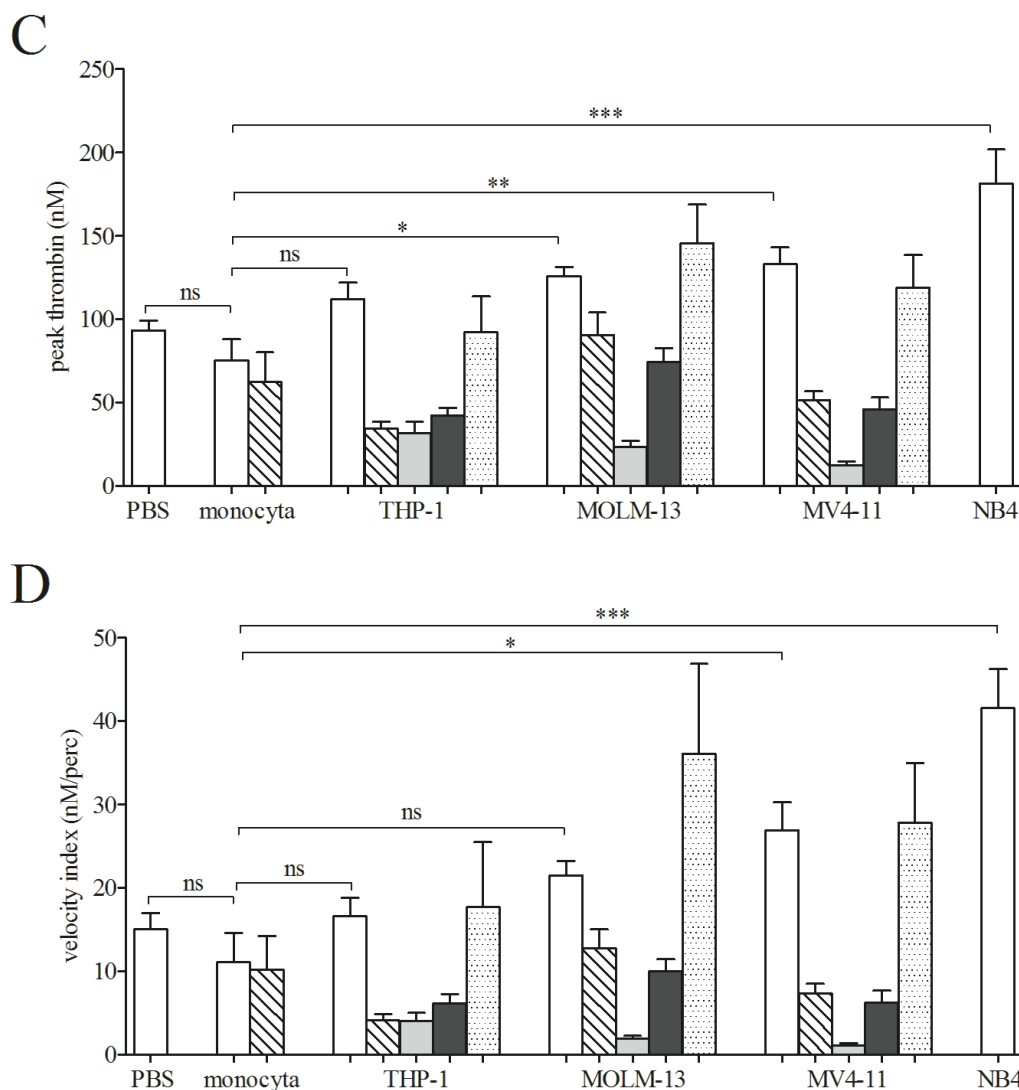
perc; MV4-11: $4,6 \pm 1,4$ perc) lagtime értékei között nem volt szignifikáns különbség. Az NB4 sejtvonal lagtime-ja (átlag $\pm$ SEM: $2,1 \pm 0,2$ perc) volt a legrövidebb, azonban a másik három sejtvonalhoz hasonlítva az eltérés nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak (11. ábra A). A VII-es alvadási faktor mentes plazmában és az ahu-TF-al blokkolt mintában mindhárom akut monocytás leukémia sejtvonal lagtime értékei megnyúltak, a thrombin képződés szignifikánsan lassabban következett be a VII-es alvadási faktor hiányában, valamint a TF blokkolása esetén (11. ábra A és B), olyan lassan, mint a monocytáknál. A XI-es és XII-es alvadási faktor hiányának nem volt hatása a thrombin generáció kezdetére (11. ábra A, szürke és fekete oszlopok). A MOLM-13 sejtvonal time to peak értéke XI-es faktor mentes plazmában szignifikánsan hosszabb volt a normál plazmáéhoz képest (11. ábra B rész és 3. táblázat). A peak thrombin érték THP-1 sejtvonal esetében nem volt szignifikánsan magasabb a monocytákéhoz képest, a másik két monocytás leukémia sejtvonal esetén a különbség szignifikáns volt, normál plazmában (11. ábra C, fehér oszlopok). A monocytás leukémia sejtek peak thrombin értékét a VII-es, XI-es, valamint XII-es alvadási faktorok hiánya szignifikánsan csökkentette, a MOLM-13 sejtvonal kivételével, ahol a peak thrombin értéket a VII-es alvadási faktor hiánya nem befolyásolta (3. táblázat). A peak thrombin értéket, vagyis a képződött thrombin mennyiségét az ahu-TF-el történő blokkolás egyik sejtvonal esetében sem befolyásolta (11. ábra C rész, pontozott oszlopok).

	lagtime	time to peak	peak
Normál vs. FVII mentes plazma			
THP-1	p <0,001	p <0,001	p <0,001
MOLM-13	p <0,001	p <0,001	ns
MV4-11	p <0,001	p <0,001	p <0,001
Normál vs. FXI mentes plazma			
THP-1	ns	ns	p <0,001
MOLM-13	ns	p <0,01	p <0,001
MV4-11	ns	ns	p <0,001
Normál vs. FXII mentes plazma			
THP-1	ns	ns	p <0,001
MOLM-13	ns	ns	p < 0,05
MV4-11	ns	ns	p <0,001

3. táblázat. Eltérések az egyes thrombin generációs paraméterek esetében normál- és hiányplazmában. A statisztikai analízis ANOVA és Bonferroni poszt tesztel történt. ns: nem szignifikáns; FVII: VII-es alvadási faktor; FXI: XI-es alvadási faktor; FXII: XII-es alvadási faktor.

normál plazma
 FVII mentes plazma
 FXI mentes plazma
 FXII mentes plazma
 ahu-TF blokkolt



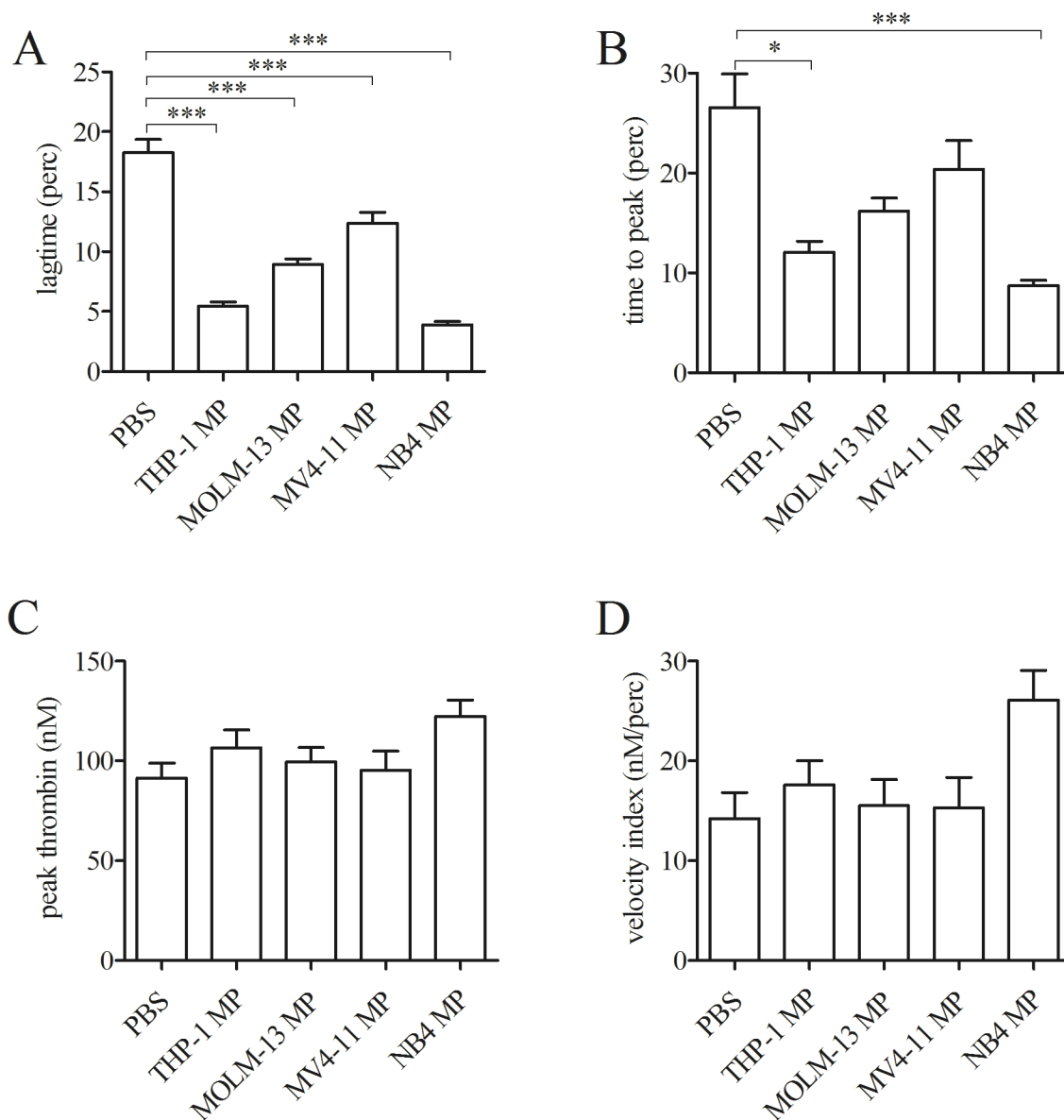


11. ábra. Leukémiás sejtek és kontrolljaik thrombin generációja normál- és faktor hiányos plazmában. A fehér oszlopok a normál plazmát, a csíkos oszlopok a VII-es alvadási faktor hiányos plazma mintát, a szürke oszlopok a XI-es faktor hiányos plazmát, a fekete oszlopok a XII-es alvadási faktor hiányos plazma mintát és a pöttyös oszlopok az ahu-TF antitesttel blokkolt mintákat mutatják. Az oszlopokon az átlagot és a SEM-et tüntettem fel. A statisztikai analízist ANOVA és Bonferroni poszt tesztet végeztem. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. PBS: phosphate buffered saline; FVII: VII-es alvadási faktor; FXII: XII-es alvadási faktor; ahu-TF: anti-humán szöveti faktor.

6.8. Leukémiás sejt eredetű mikropartikulák thrombin generációja

A szeparált mikropartikulák lagtime értékei alapján, thrombin generációt iniciáló hatásuk jelentős (12. ábra A). Minden leukémiás sejt eredetű mikropartikula szignifikánsan rövidítette a lagtime-ot a PBS kontrollhoz hasonlítva. A THP-1 és NB4 sejtvonalak esetében a time to peak paramétert is szignifikánsan rövidítették (12. ábra B), azonban a képződött thrombin mennyiségét (peak thrombin) és a képződés kinetikáját (velocity index) nem befolyásolták (12.

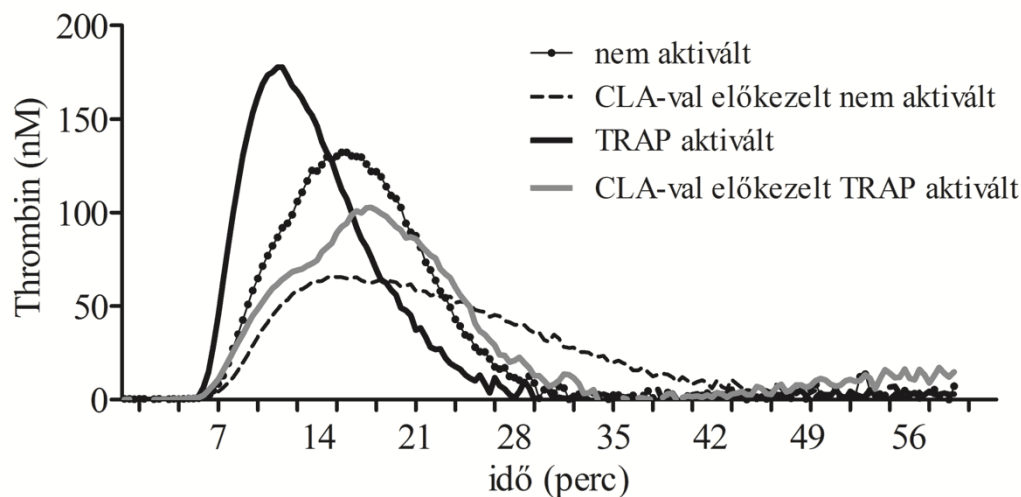
ábra C és D). Az eredmények alapján, a MP-k hozzájárulnak a leukémiás sejtek thrombin generációjának iniciálásához.



12. ábra. Leukémiás sejtekből szeparált mikropartikulák thrombin generációja. Az oszlopokon az átlagot és a SEM-et tüntettem fel. Normál eloszlású változók esetén a statisztikai analízist ANOVA és Bonferroni poszt tesztel, nem parametrikus változók esetén Kruskal-Wallis és Dunn's poszt tesztel végeztem. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. PBS: phosphate buffered saline; MP: mikropartikula.

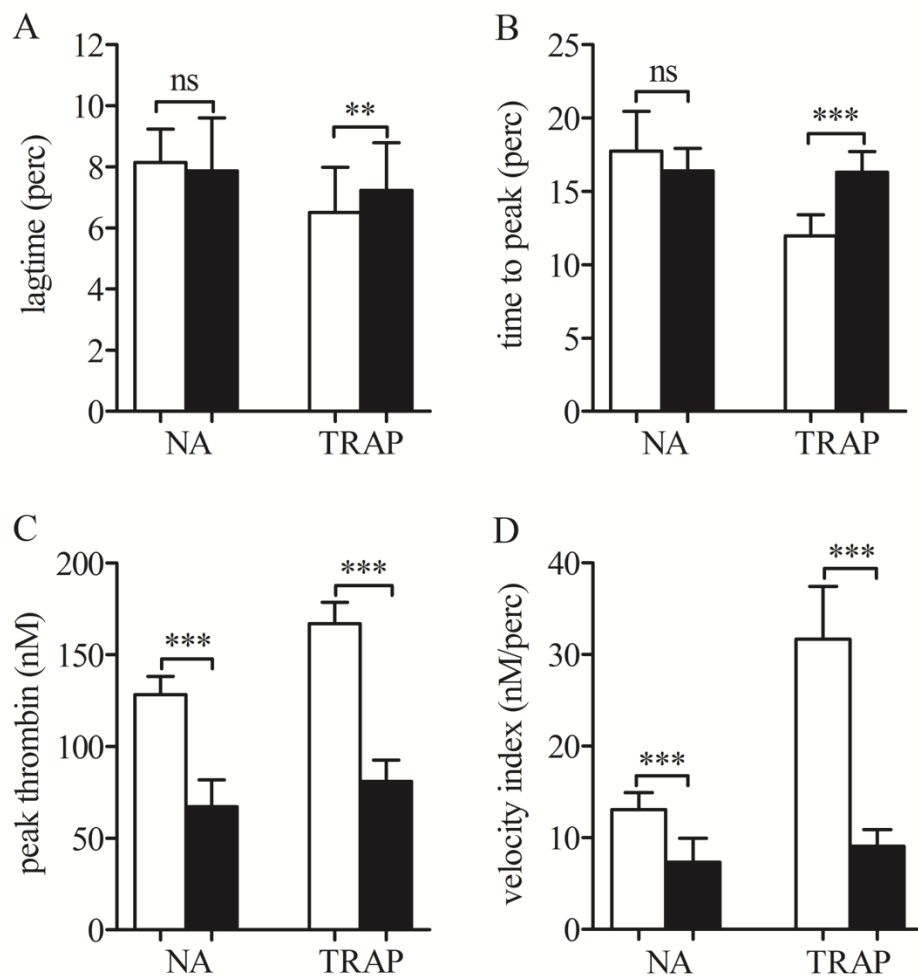
6.9. A vérlemezke funkció modulációjának hatása a thrombocyta-dús plazma thrombin generációjára

Reprezentatív görbék mutatják a TRAP aktiváció és/vagy CLA gátlás hatását a vérlemezke asszociált thrombin generációra (13. ábra).



13. ábra. Thrombocyta aktiváció és gátlás hatása a thrombin generációra- reprezentatív görbék. A nem aktivált minta (NA) thrombin generációját a pontozott vonal, a CLA-val előkezelt NA mintáét a szaggatott vonal, a TRAP aktivált mintáét a fekete vonal és a CLA előkezelt TRAP aktivált minta thrombin generációját a szürke vonal jelzi. TRAP: thrombin receptor aktiváló peptid; CLA: Calyculin-A.

Nem aktivált vérlemezkek lagtime (átlag $\pm$ SD: $8,1 \pm 1,1$ perc) és time to peak (átlag $\pm$ SD: $18,2 \pm 2,8$ perc) értékét a CLA előkezelés (lagtime átlag $\pm$ SD: $7,8 \pm 1,6$ perc; time to peak átlag $\pm$ SD: $16,4 \pm 1,5$ perc) nem befolyásolta szignifikánsan ($p=0,633$ és $p=0,210$) (14. ábra A és B). TRAP aktiváció hatására a thrombin képződés gyorsabb, a lagtime (átlag $\pm$ SD: $6,5 \pm 1,5$ perc) és time to peak (átlag $\pm$ SD: $11,9 \pm 1,5$ perc) paraméterek szignifikánsan rövidebbek ($p=0,035$ és $p<0,001$) lettek a NA vérlemezkekhez képest. A TRAP aktivált minták CLA előkezelése szignifikánsan megnyújtotta, mind a lagtime (átlag $\pm$ SD: $7,2 \pm 1,6$ perc, $p=0,003$), mind a time to peak (átlag $\pm$ SD: $16,3 \pm 1,4$ perc, $p<0,001$) értéket (14. ábra A és B). A peak thrombin és velocity index értékét a CLA előkezelés a NA és TRAP vérlemezkek esetén is szignifikánsan csökkentette ($p<0,001$ és $p<0,001$) (14. ábra C és D). TRAP aktiváció hatására a vérlemezkek szignifikánsan rövidebb idő alatt szignifikánsan több thrombint generáltak, melyet a CLA előkezelés teljes mértékben meggátolt.



14. ábra. Thrombocytá aktiváció és gátlás hatása a thrombin generációra. Az oszlopokon az átlagot és a SD-et tüntettem fel, a sötét oszlopok a CLA előkezelt minták, a világosak a kezeletlenek. A statisztikai analízist egymintás, párosított t-próbával végeztem. ns: nem szignifikáns; **p<0,01; ***p<0,001. NA: nem aktivált; TRAP: thrombin receptor aktiváló peptid; CLA: Calyculin-A.

6.10. CLA gátlás és TRAP aktiváció hatása az intracelluláris Ca^{2+} szintre

Először a NA vagy CLA előkezelt nem aktivált vérlemezkék fluoreszcens jeleit mértük 60 másodpercig, ezt követően adtuk a PRP szuszpenzióhoz a TRAP-ot. A thrombocytá intracelluláris Ca^{2+} szintet, NA vagy CLA előkezelt mintán vizsgáltuk 20 μM végkoncentrációjú TRAP adását követően. A TRAP aktivált vérlemezkék esetén két típusos mintázat volt megfigyelhető az intracelluláris Ca^{2+} szint változásában: nem jelentkező kalcium

tranziens a TRAP adását követően vagy a Ca^{2+} szint emelkedése volt megfigyelhető az aktivációt követően. Ha a vérlemezkéket CLA-val előkezeltük, TRAP adását követően a vérlemezkékben egy alkalommal sem alakult ki kalcium tranziens. Összesen 117 vérlemezkét vizsgáltunk a TRAP aktivált mintákban. Nem előkezelt minták esetében (NA minta) a vérlemezkék 22,2%-ában alakult ki intracelluláris kalcium tranziens TRAP aktivációt követően. A CLA-val előkezelt 122 thrombocytá közül egyben sem volt megfigyelhető kalcium tranziens létrejötté TRAP aktivációt követően (4. táblázat). A CLA előkezelés nem befolyásolta a nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} szintet (erről további adatokat az értekezés nem tartalmaz).

minta	a vizsgált vérlemezkék száma	TRAP hatására kialakuló kalcium tranziens		nem alakult ki kalcium tranziens	
		n	%	n	%
TRAP-aktivált PRP	117	26	22,2% (15,6-30,6%)	91	77,8% (69,4-84,4%)
CLA előkezelt TRAP-aktivált PRP	122	0	(0,0-3,7%)	122	100% (96,3-100,0%)

4. táblázat. Az intracelluláris kalcium tranziens alakulása NA és CLA előkezelt vérlemezkéken TRAP aktiváció hatására. A zárójelben található számok a 95%-os konfidencia intervallumot mutatják, n=13. TRAP: thrombin receptor aktiváló peptid; CLA: calyculin-A; PRP: thrombocytá dús plazma.

A másik aktiváló ágens, az IP_3 receptoron közvetlenül ható thiomersal intracelluláris Ca^{2+} szintre kifejtett hatását is vizsgáltuk. A thiomersal minden vérlemezke esetében elnyújtott lefolyású intracelluláris kalcium tranzienszt váltott ki, melyet a CLA előkezelés nem befolyásolt.

7. Megbeszélés

7.1. Akut monocytás leukémia sejtek fokozott prokoaguláns hatása

Az akut monocytás leukémia sejtek esetében tapasztalt kifejezett prokoaguláns hatás hátterében a véralvadási kaszkád fokozott aktivációja áll, melyet a PCA és TGT funkcionális tesztek eredményeivel támasztottunk alá.

A koaguláció iniciációjának sejtfelszíni kulcsfehérjéje a TF, amely a FVIIa-hoz kötődve aktiválja a véralvadási kaszkád extrinsic útvonalát és végül thrombin, fibrin képződéshez vezet. A tradicionális elképzelés szerint a TF a keringő vérben nincs jelen, az ér endothel által elzártan az extravascularis térben található meg (Drake et al, 1989). Korábbi tanulmányokban leírták, hogy a monocyták aktivációt követően rendelkeznek TF aktivitással, azonban az aktivált intakt monocyták és a monocyta lizátum TF aktivitása között jelentős különbség van, a monocyta lizátum erősebb prokoaguláns hatást mutatott, mint az intakt sejtek (Kappelmayer et al, 1993). Amikor akut myeloid leukémiás betegek intakt és lizált mononukleáris sejtjeit vizsgálták, akkor is a lizált sejtek mutattak erősebb prokoaguláns hatást (Dicke et al, 2015). Egy másik tanulmányban lizált daganatos sejt vonalakat vizsgáltak, leírták a promyelocytás, NB4 leukémia sejt vonal és az emlőtumorból származó, MCF7 sejt vonal FVII függő véralvadás aktivációját, de más sejt vonalakat lizátumából (pl. krónikus myeloid leukémia, K562 sejt vonal, erythro-leukémia sejt vonal, HEL-sejtek) nem tudtak kimutatni TF aktivitást és a FVII-től függő aktivációt (Marchetti et al, 2012).

A legújabb eredmények szerint fiziológias körülmények között a keringő vérben a monocyták az egyedüli sejtes elemek, amelyek képesek TF-t szintetizálni, aktiváció hatására pedig nagy mennyiségben TF-t expresszálni felszínükön (Osterud et al, 2010). Feltételeztük, hogy az akut monocytás leukémia sejt vonalakat is TF-t expresszálnak felszínükön, mely hozzájárulhat a fokozott prokoaguláns hatásukhoz.

A negatív kontrollként használt, izolált, nem aktivált humán monocyták átlagosan 73%-a mutatott TF expressziót, azonban a felszíni TF expresszió nem járt a PCA és TGT tesztekben kimutatható fokozott prokoaguláns hatással, annak mértéke a sejteket nem tartalmazó, pufferes kontrollal megegyező volt. Ennek hátterében több mechanizmus állhat, a legújabb irodalmi adatok alapján a sejt felszíni TF két formában lehet jelen a vérben lévő sejteken: „cryptic”, azaz funkcionálisan inaktív formában vagy „decryptic” vagyis funkcionálisan aktív formában. Aktiválatlan sejtek felszínén is detektálták a TF-t antigén assay-vel, de ezen sejtek prokoaguláns aktivitása minimális volt (Bach et al, 2006). A monocytás leukémia sejt vonalakat

különböző mértékű TF expressziót mutattak és szignifikáns különbség nem volt kimutatható normál plazmában az egyes sejtek funkcionális teszttel mért prokoaguláns hatása között. Újabb kutatási eredmények szerint a TF aktiváció különböző mechanizmusok révén jöhet létre. A legtöbb bizonyíték amellett szól, hogy a plazmamembrán külső felszínén expresszálandó negatív töltésű foszfolipidek, mint például a PS expressziója aktiválja a TF-t ezáltal iniciálva az alvadást (Chen et al, 2013). Akut monocytás leukémia sejtvonalaink között a PS-expresszió mértékében nem volt szignifikáns különbség, azonban a PS-expresszió intenzitása a MOLM-13 sejtvonal esetén statisztikailag szignifikánsan nagyobbak bizonyult, mint a THP-1 vagy MV4-11 sejtvonalaké.

A normál monocytákhoz hasonlóan a leukémiás sejtvonalak prokoaguláns aktivitása jelentős mértékű volt. Ennek háttérében feltételeztük az in vitro folyamat elindulásához nélkülözhetetlen alvadási faktorok szerepét. Ezért vizsgáltuk az intrinsic és extrinsic útvonal elindításában szerepet játszó alvadási faktorok szerepét is, vagyis XII-es és VII-es alvadási faktor mentes plazmában vizsgáltuk sejtvonalaink prokoaguláns aktivitását. A PCA teszt során nagyon kevés thrombin elegendő a fibrin képződés elindításához, néhány perc alatt végbemegy a folyamat, amely FVII mentes plazmában és anti-humán TF antitesttel gátolt plazmában a sejtek fibrin képződésének teljes gátlásához vezetett. A thrombin generációs teszt során a thrombin képződést 1 órán keresztül követjük, lehetővé téve a különböző alvadási faktorok közreműködésének tanulmányozását a hiányplazmák révén. Ezzel nem csupán a fibrin képződéshez szükséges minimális thrombin mennyiségről, hanem a rendszerben lévő összes thrombin mennyiségéről és a képződés kinetikájáról is kapunk információt. Eredményeink alapján a fibrin- és thrombin képződés szempontjából a FVII-nek fontos szerepe van a fokozott prokoaguláns hatás elindításában. A további thrombin generáció inkább FXI és részben FXII függő, mely a time to peak és peak thrombin paraméterekben észrevehető. A peak thrombin kialakításában kifejezett szerepe a FXI-nek van a MOLM-13 és részben az MV4-11 sejtvonalak esetében, így feltételezzük, hogy a FXI-et a képződött thrombin feedback mechanizmus útján aktiválja - függetlenül a FVII-és FXII-től -, ezáltal tovább triggerelve a thrombin generációt.

A sejtvonalak peak thrombin értékeinek alakulása FVII hiányplazma hatására és ezen eredmények összefüggése a TF expresszióval azt mutatta, hogy a legalacsonyabb felszíni TF expressziót mutató MOLM13 sejtvonal, bár szignifikánsan több thrombint képzett mint a monocyta, de VII-es hiányplazmával ez a hatás nem volt érdemben befolyásolható, mely összefügghet az alacsony TF-expresszió általi thrombin képződéstől független hemosztatikus aktivációval. A humán TF ellenes poliklonális antitesttel végzett gátlási kísérletek a PCA-tesztben teljes gátlást mutattak, csakúgy mint a TGT teszt időparamétereiben. A képződött

thrombin esetében és az ezen paraméterből származtatott Velocity Index esetében azonban nem lehetett gátlást elérni az anti-humán TF poliklonális antitesttel.

Szisztémás és hematológiai betegségekből egyaránt leírták a különböző eredetű, endothelből vagy a vér sejtjes elemeiből származó mikropartikulák jelentőségét a prokoaguláns hatás kialakításában, illetve szabályozó szerepüket a véralvadásban (Piccin et al, 2007). Az általunk vizsgált leukémiás sejtvonalak esetében feltételeztük, hogy a sejtek által létrehozott mikropartikulák fokozott prokoaguláns hatással rendelkeznek. Azt találtuk, hogy 48 órás tenyésztési idő alatt egy intakt leukémiás sejtől átlagosan 4-10 mikropartikula képződött. Áramlási citometriai módszerrel vizsgálva a különböző sejtvonalakból lefűződő mikropartikulák számában nem volt szignifikáns különbség.

A thrombin generációt befolyásolja a sejt/mikropartikula felszíni tulajdonsága és a felszínen lévő prokoaguláns receptorai. Ha a monocytar leukémiás sejtek és mikropartikulák feltételezhetően gömb alakúak, akkor azok felszíne kiszámolható. A mikropartikula-szám analízis során használt Canto II áramlási citométer detektálási határát figyelembe véve a mikropartikulák és leukémiás sejtek átlagos átmérőjét 0,3 - 10 μm -nek becsülhetjük. A gömbfelszín kiszámításához használt képlet ($A=4r^2\pi$) segítségével azt találtuk, hogy az intakt sejtek felszíne kb. 1000-szerese a mikropartikuláénak, mivel 4-10 MP képződik egy sejtől a mikropartikulák 100-szor prokoagulánsabbak, mint „anyasejtjeik”. A funkcionális thrombin generációs teszttel azt találtuk, hogy a MP-k leginkább a lagtime paraméter, és kisebb mértékben a time to peak paraméter rövidülése révén járulnak hozzá a thrombin képződéshez. Ez azt támasztja alá, hogy a leukémiás sejtekből származó MP-k inkább a thrombin képződés iniciációjához járulnak hozzá, mintsem a propagációhoz.

Akut leukémiás betegek mintáiból szeparált mikropartikulák thrombin generációjának vizsgálatakor Gheldolf és munkatársai azt találták, hogy a TGT magas prokoaguláns hatást mutat azon betegek esetében, akiknek volt thrombotikus komplikációja a kezelés alatt, leginkább a lagtime és peak paraméterek voltak alkalmasak a thrombotikus szövődménnyel rendelkező vagy nem rendelkező betegek elkülönítésére (Gheldolf et al, 2017). Hasonlóan Gheldolf és munkatársai által leírtakhoz, a TGT során azt tapasztaltuk, hogy leukémiás sejtjes modellünk esetén a lagtime paraméter volt a legszenzitívebb a fokozott prokoaguláns hatás kimutatására, de sok esetben a time to peak paraméter szignifikáns rövidülései is informatívak voltak a negatív kontrollhoz hasonlítva. A peak thrombin és ETP paraméterekben mi szignifikáns különbséget nem találtunk.

Ismert, hogy a PS-expresszió indukálható, akut myeloid leukémiás beteg esetében az alkalmazott kemoterápia hatására a sejtek PS-expressziójának fokozódásáról számoltak be

(Boles et al, 2012), amely a fent említett hatások révén járulhat hozzá a fokozott prokoaguláns hatás kialakításához, mely azonban az esetek jelentős többségében szubklinikus maradhat.

Kísérleteinkben azt találtuk, hogy az akut monocytar leukémiás sejtvonalak és mikropartikuláik prokoaguláns hatása szignifikánsan nagyobb a normál monocytákéhoz képest, amely hatás elsősorban TF-függő, azonban más tényezők is befolyásolhatják.

Eredményeink azt mutatják, hogy a funkcionális tesztek alkalmasak lehetnek a sejtek által létrehozott thrombin generáció vizsgálatára akut myeloid leukémiában.

7.2. Thrombocyta funkciók modulációjának lehetőségei

Az artériás atherosclerotikus kórképek kulcsfontosságú szereplői a vérlemezkék. A vérlemezkék in vitro körülmények között történő vizsgálatára és modulációjára ezért egy „sejtes modellt” hoztunk létre. Kísérleteinkben vizsgáltuk a thrombocyták aktivációját PS-expressziójuk révén, valamint funkcionális tesztekkel (alvadék retrakciós teszt, thrombin generációs teszt) a véralvadásra és thrombin képződésre kifejtett hatásukat. Ezen túlmenően tanulmányoztuk a protein foszfataz gátló (CLA) vérlemezke PS-expresszióra, vérlemezke funkcióra és intracelluláris Ca^{2+} szint változásra kifejtett hatását.

A kísérleteinkben a korai alvadék képződés elkerülése és más, a kísérletet befolyásoló thrombin hatások miatt thrombocyta dús plazma minták aktivációja nem thrombinnal, hanem a thrombinnal megegyező hatású PAR-1 receptor agonista peptiddel, a TRAP-pal történt (Furman et al, 1998).

A szerin/threonin protein foszfatazok fontos szerepet töltenek be a sejtek, köztük a thrombocyták jelátvitelének, metabolizmusának és sejtciklusának szabályozásában (Fagerholm et al, 2010), valamint a thrombocyta szekréció és aggregáció iniciációjában (Nishikawa et al, 1994). Kísérleti körülmények között a protein foszfataz inhibitorral kezelt vérlemezkék aktin polimerizációját az inhibitor gátolta, a mikrotubulusok hosszú pseudopodiumokba rendeződtek, a miozin könnyűlánc foszforilációja pedig elmaradt thrombinnal stimulált vérlemezkékben (Yano et al, 1995). A miozin könnyűlánc foszforilációja nélkülözhetetlen az aktomiozin komplex létrejöttéhez, ezáltal a vérlemezkék szekréciójához és a következményes aktivációhoz. A munkacsoportunk korábbi kísérleteiben vizsgálta a protein foszfataz inhibitor, CLA hatását a foszfataz aktivitásra, a P-szelektin expresszióra és a PRP-ből centrifugálással izolált MP mennyiségére. Azt találták, hogy már 10 nM CLA gátolta a foszfataz aktivitást, mind a nem aktivált, mind a TRAP aktivált PRP-ben lévő thrombocyták esetében. A foszfataz aktivitást 50

nM CLA több, mint 50%-kal csökkentette (Simon et al, 2010). Ezért az értekezés alapjául szolgáló kísérleteinkben a CLA végkoncentrációját 50 nM-nak határoztuk meg.

A thrombocyták aktiválhatók különböző, a vérlemezék sejtfelszíni receptoraikon keresztül ható agonistákkal, mely szignálútvonalak aktiválódásához, majd intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedéshez vezet, amely nélkülözhetetlen a vérlemezke adhézió, aggregáció és szekréció elindításához és propagációjához. Az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedés az intracelluláris kalcium raktárak membránjában található IP_3 receptor által szabályozott úton megy végbe. Korábban spektrofotometriás módszerrel kimutatták, hogy az aktivált vérlemezék CLA kezelése csökkentette az aktiváció indukálta intracelluláris Ca^{2+} szintet (Koike et al, 1994; Yano et al, 1994). Intracelluláris Ca^{2+} szint meghatározása kísérleteinkben valós idejű konfokális mikroszkóppal történt, hogy az intracelluláris kalcium változások a fluoreszcens festékeknek köszönhetően szabad szemmel mikroszkóp alatt követhetők legyenek. TRAP aktivációt követően csak a vérlemezék 22,2%-ában alakult ki kalcium tranziens, melyet a CLA előkezelés teljesen gátolt és ez a hatás független volt a bazális kalcium szintektől. A TRAP aktivált minták esetében (ahol CLA előkezelés nem történt) a vérlemezék heterogén viselkedése korábbi tanulmányok alapján várható volt (Heemskerk et al, 1992; Heemskerk et al, 2001), a vérlemezék aktivációjuk és a hemosztázisban betöltött szerepük szerint alcsoportokra oszthatók (Heemskerk et al, 2013). Eredményeink összhangban vannak az itt leírtakkal, ugyanis a vérlemezék aktiválása során kb. negyedrészükből kaptunk PS-expresszió fokozódást és kalcium jelet. Ezen thrombocyták „procoagulant platelets” néven kerültek leírásra. A vérlemezék másik része pedig a „contracting platelets” ahol a GPIIb/IIIa aktivációja jön létre. Mi a vizsgálataink során a CLA gátló hatását mindkét thrombocyta funkciók tesztben ki tudtuk mutatni.

A PS-expresszió vizsgálata során az intracelluláris kalcium méréseknél tapasztalt vérlemezke heterogenitást láttuk sejtfelszíni PS-expresszió vizsgálata során is, hasonlóan az intracelluláris kalcium mérésnél látottakhoz, a vérlemezék közel 20%-a volt PS-pozitív. Thiomersal aktivációt követően a vérlemezék 96%-a mutatott felszíni PS-expressziót, melyet nem befolyásolt a CLA előkezelés. Az intracelluláris kalcium mérések során thiomersal aktivációt követően a kalcium tranziens minden vérlemezékben létrejött, melyet a CLA – a PS-expresszióhoz hasonlóan - nem tudott meggátolni. A thiomersal aktivációval kapott eredményeink azt mutatják, hogy a CLA foszfatáz gátló hatását valahol intracellulárisan még az intracelluláris raktárak, illetve az IP_3 receptor előtti útvonalon fejt ki, a direkt IP_3 receptor aktivációt nem tudta meggátolni.

Az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedés hatására a PS a thrombocyták külső membrán rétegébe transzlokálódik, amely negatív töltésű felszín biztosít az extrinsic tenáz és prothrombináz komplexek számára hozzájárulva a thrombin képződéshez (Clemetson et al, 2012). A thrombin generáció jellemzésére a vérlemezkék TRAP aktivációját és CLA gátlását követően leginkább a lagtime, time to peak, peak thrombin és velocity index paraméterek voltak informatívak. A CLA gátolta a TRAP indukálta thrombin generációt, mely mind a thrombin kialakulását, mind a képződött thrombin mennyiségét jellemző paraméterekben látszott. A CLA gátolta továbbá azt a thrombocyta szubpopulációt is, amely feltehetően az alvadék retrakcióban vesz részt.

Az eredményeink azt támasztják alá, hogy a protein foszfatázok gátlása CLA-val kísérleti körülmények között alkalmas lehet különböző vérlemezke alcsoportok vizsgálatára, amelyek a fokozott thrombin képződésben és alvadék retrakcióban vesznek részt.

Vizsgálataink során a thrombin generációs tesztet rendkívül hasznosnak találtuk, fehérvérsejtek és vérlemezkék által mediált thrombin generáció vizsgálatára. Ezen kísérleti rendszerekben elsősorban a thrombin képződés idejének vizsgálati paraméterei mutatkoztak igen szenzitívnek a patológiás folyamatok követésében.

8. Összefoglalás

Kísérleteinkben egy protein foszfatáz inhibitor, a Calyculin-A vérlemezke aktivációra, alvadék retrakcióra és thrombin generációra kifejtett hatását vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a CLA teljesen meggátolta thrombocyta dús plazmában a nem aktivált és TRAP-aktivált vérlemezkek PS-expresszióját. A CLA a thrombin generációt is gátolta. Nem aktivált és TRAP-aktivált minták intenzív alvadék retrakciót mutattak 60 perces inkubációt követően, azonban a CLA-val előkezelt mintáknál ez nem volt megfigyelhető.

CLA hatékonyan gátolja a foszfatázokat nyugvó és aktivált vérlemezkekben, ezért széles körben, alvadék retrakciótól a kalcium méréseken keresztül a thrombin generációs tesztekig használható vérlemezke funkcionalitás vizsgálatára. A szelektív vérlemezke aktiváló ágensek használata mellett alkalmas lehet a thrombus képződésben szerepet játszó különböző biokémiai útvonalak tanulmányozására.

Másik tanulmányunkban három akut monocytás leukémia sejtvonalat vizsgáltunk. Feltételeztük, hogy a monocytás leukémia sejtvonalak fokozott prokoaguláns aktivitással rendelkeznek, ezért különböző módszerekkel vizsgáltuk thrombin generációjukat, alvadási faktor mentes és TF-t neutralizáló környezetben. Az eredményeket negatív kontrollhoz, egészséges monocytákhoz és pozitív kontrollként egy akut promyelocytás leukemia sejtvonalhoz hasonlítottuk. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a MP-ák befolyásolhatják az alvadék képződést, a leukémiás sejtekből szeparált MP-ák thrombin generációját is vizsgáltuk.

Azt találtuk, hogy a monocytás leukémia sejtvonalak és a sejtekből keletkező mikropartikuláik szignifikánsan erősebb prokoaguláns hatással rendelkeznek, mint a normál monocyták. Ez a hatás elsősorban TF függőnek bizonyult, azonban más faktoroknak is lehet szerepe a hatás létrehozásában. Eredményeink azt mutatják, hogy az általunk használt funkcionális tesztek alkalmasak lehetnek akut myeloid leukémiában a sejtek által létrehozott thrombin generáció vizsgálatára.

9. Summary

We studied the effects of the protein phosphatase inhibitor, Calyculin-A on platelet activation, clot formation and thrombin generation. We found that CLA completely blocked the PS-expression of the platelets in both the non-activated and the TRAP-activated platelet rich plasma sample. CLA also inhibited the process of thrombin generation. Non-activated and TRAP-activated samples displayed an intense clot retraction by 60 minutes, while CLA-pretreated samples were much less retracted.

CLA effectively inhibits phosphatases in resting and activated platelets and can be used in a wide variety of platelet functional assays ranging from clot retraction, via calcium measurements, to thrombin generation. With the simultaneous use of selective platelet activators, it can be utilized to dissect biochemical pathways during thrombus formation.

We investigated three monocytic leukemia cell lines, derived from a patient with de novo AML, a case of relapsed AML and from an AML case that developed secondary to myelodysplastic syndrome. We hypothesized that monocytic leukemic cells have a higher procoagulant activity thus, we characterized their thrombin generating potential by different assays using coagulation factor-deficient plasmas and TF neutralization. Results were compared to isolated normal human monocytes as negative and to an acute promyelocytic leukemia cell line as positive controls. Because in previous studies microparticles from various cells have been shown to differentially modulate clot formation, we also tested the thrombin generating potential of the MPs derived from these leukemic cell lines.

In these experiments, we have found that monocytic leukemia cell lines and MP generated by these cells exhibit significantly higher PCA compared to normal monocytes and that this effect is primarily TF dependent; however, other factors may modulate this effect. Our results demonstrate that functional assays may provide a useful tool to identify cell induced thrombin generation in acute myeloid leukemias.

10. Főbb új tudományos eredmények, megfigyelések

1. A thrombocyta-funkciós vizsgálatok során TRAP adását követően a vérlemezkék kb. negyedében alakult ki intracelluláris Ca-szint emelkedés és PS-expresszió.
2. TRAP hatására thrombocyta-dús plazmában a thrombin képződés gyorsabban és magasabb thrombin csúcs értékkel következett be nem aktivált mintához képest.
3. A protein foszfatáz gátló CLA thrombocyta dús plazmában teljesen meggátolta a nem aktivált és TRAP-aktivált vérlemezkék PS-expresszióját, gátolta a thrombin generációt.
4. CLA előkezelt minták esetében alvadék retrakció nem volt megfigyelhető.
5. Intracelluláris IP₃ receptor direkt aktiválásakor a CLA gátló hatását nem tudja kifejteni, tehát a CLA protein foszfatáz gátló hatását a thrombocyta sejtmembrán és az IP₃ receptor között lévő szignálútvonalon gátolja.
6. Igazoltuk az akut monocytás leukémia sejtvonalak jelentős prokoaguláns hatását, melynek hátterében a TF-nek és a FVII-nek kiemelt szerepe van.
7. A későbbi thrombin generáció inkább FXI és kisebb mértékben FXII függő.
8. Akut monocytá leukémiás sejtvonalak sejtenként 4-10 mikropartikulát képeznek 48 óra alatt és ezen mikropartikulák kb. 100-szor erőteljesebb prokoaguláns hatással bírnak, mint az anyasejtjeik.
9. Az általunk beállított funkcionális thrombin generációs teszt alkalmas lehet akut myeloid leukémiákban a sejtek által létrehozott thrombin generáció vizsgálatára.

11. Irodalomjegyzék

Alikhan R, Cohen AT, Combe S, Samama MM, Desjardins L, Eldor A, Janbon C, Leizorovicz A, Olsson CG, Turpie AG; MEDENOX Study. Risk factors for venous thromboembolism in hospitalized patients with acute medical illness: analysis of the MEDENOX Study. *Arch Intern Med.* 2004; 164: 963-968.

Bach RR. Tissue factor encryption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 456-461.

Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med.* 2014; 276: 618-632.

Baglin T. The measurement and application of thrombin generation. *Br J Haematol.* 2005; 130: 653-661.

Bizzozzero, J. Ueber einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und Blutgerinnung. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, 1882a; 90: 261–332.

Boles JC, Williams JC, Hollingsworth RM, Wang JG, Glover SL, Owens AP 3rd, Barcel DA, Kasthuri RS, Key NS, Mackman N. Anthracycline treatment of the human monocytic leukemia cell line THP-1 increases phosphatidylserine exposure and tissue factor activity. *Thromb Res.* 2012; 129: 197-203.

Brass LF. Thrombin and platelet activation. *Chest* 2003; 124: 18S-25S.

Brummel-Ziedins KE, Whelihan MF, Gissel M, Mann KG, Rivard GE. Thrombin generation and bleeding in haemophilia A. *Haemophilia.* 2009; 15: 1118-1125.

Butenas S, Orfeo T, Mann KG. Tissue factor in coagulation: Which? Where? When? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29: 1989-1996.

Carcaillon L, Alhenc-Gelas M, Bejot Y, Spaft C, Ducimetière P, Ritchie K, Dartigues JF, Scarabin PY. Increased thrombin generation is associated with acute ischemic stroke but not with coronary heart disease in the elderly: the Three-City cohort study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 1445-1451.

Chen VM, Hogg PJ. Encryption and decryption of tissue factor. *J Thromb Haemost.* 2013;11 Suppl: 277-284.

Clemetson KJ. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res.* 2012; 129: 220-224.

Crawley JT, Zanardelli S, Chion CK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 95-101.

Dahlbäck B. Blood coagulation. *Lancet.* 2000; 355: 1627-1632.

Davi G, Patrono C. Platelet activation and athero- thrombosis. *N Engl J Med* 2007; 357: 2482–2494.

Dedinszki D, Kiss A, Márkász L, Márton A, Tóth E, Székely L, Erdődi F. Inhibition of protein phosphatase-1 and -2A decreases the chemosensitivity of leukemic cells to chemotherapeutic drugs. *Cell Signal.* 2015; 27: 363-372.

Demers M, Wagner DD. Neutrophil extracellular traps: A new link to cancer-associated thrombosis and potential implications for tumor progression. *Oncoimmunology.* 2013; 2: e22946.

Dicke C, Amirkhosravi A, Spath B, Jiménez-Alcázar M, Fuchs T, Davila M, Francis JL, Bokemeyer C, Langer F. Tissue factor-dependent and –independent pathways of systemic coagulation activation in acute myeloid leukemia: a single-center cohort study. *Exp Hematol Oncol.* 2015; 4: 22.

Drake TA, Ruf W, Morrissey JH, Edgington TS. Functional tissue factor is entirely cell surface expressed on lipopolysaccharide-stimulated human blood monocytes and a constitutively tissue factor-producing neoplastic cell line. *J Cell Biol.* 1989; 109: 389-395.

Eikelboom JW, Hirsh J, Spencer FA, Baglin TP, Weitz JI. Antiplatelet drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest. 2012; 141: e89S-119S.

Elferink JG. Thimerosal: a versatile sulfhydryl reagent, calcium mobilizer, and cell function-modulating agent. Gen Pharmacol. 1999; 33: 1-6.

Fagerholm AE, Habrant D, Koskinen AM. Calyculins and related marine natural products as serine-threonine protein phosphatase PP1 and PP2A inhibitors and total syntheses of calyculin A, B, and C. Mar Drugs. 2010; 8: 122-172.

Falanga A, Marchetti M, Russo L. The mechanisms of cancer-associated thrombosis. Thromb Res. 2015; 135: S8-S11.

Falanga A, Marchetti M, Russo L. Venous thromboembolism in the hematologic malignancies. Curr Opin Oncol. 2012; 24: 702-710.

Falanga A, Russo L. Epidemiology, risk and outcomes of venous thromboembolism in cancer. Hamostaseologie. 2012; 32: 115-125.

Falanga A, Tartari CJ, Marchetti M. Microparticles in tumor progression. Thromb Res. 2012; 129: S132-136.

Falanga A, Marchetti M. Venous thromboembolism in the hematologic malignancies. J Clin Oncol. 2009; 27: 4848-4857.

Falanga A, Alessio MG, Donati MB, Barbui T. A new procoagulant in acute leukemia. Blood. 1988; 71: 870-875.

Franchini M. Thromboembolic risk in hematological malignancies. Clin Chem Lab Med. 2015; 53: 1139-1147.

French SL, Arthur JF, Tran HA, Hamilton JR. Approval of the first protease-activated receptor

antagonist: Rationale, development, significance, and considerations of a novel anti-platelet agent. *Blood Rev.* 2015; 29: 179-189.

Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 1777-1783.

Furman MI, Liu L, Benoit SE, Becker RC, Barnard MR, Michelson AD. The cleaved peptide of the thrombin receptor is a strong platelet agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 3082-3087.

Geddings JE, Mackman N. New players in haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost.* 2014; 111: 570-574.

Gheldof D, Mullier F, Bailly N, Devalet B, Dogné JM, Chatelain B, Chatelain C. Microparticle bearing tissue factor: a link between promyelocytic cells and hypercoagulable state. *Thromb Res.* 2014; 133: 433-439.

Gheldof D, Haguet H, Dogné JM, Bouvy C, Graux C, George F, Sonet A, Chatelain C, Chatelain B, Mullier F. Procoagulant activity of extracellular vesicles as a potential biomarker for risk of thrombosis and DIC in patients with acute leukaemia. *J Thromb Thrombolysis.* 2017; 43: 224-232.

Guzmán-Urbe P, Vargas-Ruíz ÁG. Thrombosis in leukemia: incidence, causes, and practical management. *Curr Oncol Rep.* 2015; 17: 444.

Heemskerk JW, Hoyland J, Mason WT, Sage SO. Spiking in cytosolic calcium concentration in single fibrinogen-bound fura-2-loaded human platelets. *Biochem J.* 1992; 283: 379-383.

Heemskerk JW, Willems GM, Rook MB, Sage SO. Ragged spiking of free calcium in ADP-stimulated human platelets: regulation of puff-like calcium signals in vitro and ex vivo. *J Physiol.* 2001; 535: 625-635.

Heemskerk JW, Mattheij NJ, Cossemans JM. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost.* 2013; 11: 2-16.

Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN et al. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Arch Intern Med* 2000; 160: 809–815.

Hemker HC, Willems GM, Béguin S. A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. *Thromb Haemost.* 1986; 56: 9-17.

Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T, Béguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003; 33: 4-15.

Hemker HC, Kremers R: Data management in thrombin generation. *Thromb Res.* 2013; 131: 3-11.

Hemker HC, Wielders S, Kessels H, Béguin S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb Haemost.* 1993; 70: 617-624.

Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoort R, Béguin S. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost.* 2000; 83: 589-591.

Holy M, Brautigan DL. Calyculin A from *Discodermia calyx* is a dual action toxin that blocks calcium influx and inhibits protein Ser/Thr phosphatases. *Toxins (Basel).* 2012; 4: 940-954.

Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost.* 2009; 102: 248-257.

Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, Song Y, Tzima E, Kennerknecht E, Niepmann M, von Bruehl ML, Sedding D, Massberg S, Günther A, Engelmann B, Preissner KT. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 6388-6393.

Kaplan ZS, Jackson SP. The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011; 2011: 51-61.

Kappelmayer J, Bernabei A, Edmunds LH Jr, Edgington TS, Colman RW. Tissue factor is expressed on monocytes during simulated extracorporeal circulation. *Circ Res.* 1993; 72: 1075-1081.

Katona E E, Ajzner E, Tóth K, Kárpáti L, Muszbek L. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J Immunol Methods.* 2001; 258: 127-135.

Kern A, Várnai K, Vásárhelyi B. [Thrombin generation assays and their clinical application]. *Orv Hetil.* 2014; 155: 851-7.

Koike Y, Ozaki Y, Qi R, Satoh K, Kurota K, Yatomi Y, Kume S. Phosphatase inhibitors suppress Ca^{2+} influx induced by receptor-mediated intracellular Ca^{2+} store depletion in human platelets. *Cell Calcium.* 1994; 15: 381-390.

Ku GH, White RH, Chew HK, Harvey DJ, Zhou H, Wun T. Venous thromboembolism in patients with acute leukemia: incidence, risk factors, and effect on survival. *Blood.* 2009; 113: 3911-3917.

Kwaan HC, Cull EH. The coagulopathy in acute promyelocytic leukaemia—what have we learned in the past twenty years. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2014; 27: 11-18.

Lejhancova-Tousovská K, Zapletal O, Vytisková S, Strbacková P, Sterba J. Profile of thrombin generation in children with acute lymphoblastic leukemia treated by Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) protocols. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2012; 23: 144-154.

Lentz BR. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res.* 2003; 42: 423-438.

Leonardi S, Tricoci P, Becker RC. Protease-activated receptor-1 inhibitors: a novel class of antiplatelet agents for the treatment of patients with acute coronary syndrome. *Adv Cardiol.* 2012; 47: 87-99.

Luchtman-Jones L, Broze GJ Jr. The current status of coagulation. *Ann Med.* 1995; 27: 47-52.

Macfarlane RG, Biggs R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J Clin Pathol.* 1953; 6: 3-8.

Mann KG. Thrombin formation. *Chest* 2003; 124: 4S-10S.

Marchetti M, Castoldi E, Spronk HM, van Oerle R, Balducci D, Barbui T, Rosing J, Ten Cate H, Falanga A. Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood.* 2008; 112: 4061-4068.

Marchetti M, Diani E, ten Cate H, Falanga A. characterization of the thrombin generation potential of leukemic and solid tumor cells by calibrated automated thrombography. *Haematologica.* 2012; 97: 1173-1180.

Millet A, Gravelleau J, Gueret P, Trossaert M, Decaux O, Aouba A, Lasne D, Guillet B. Thrombin generation in patients with acquired haemophilia and clinical bleeding risk. *Br J Haematol.* 2011; 153: 136-139.

Mitsuhashi S, Shima H, Tanuma N, Matsuura N, Takekawa M, Urano T, Kataoka T, Ubukata M, Kikuchi K. Usage of tautomycetin, a novel inhibitor of protein phosphatase 1 (PP1), reveals that PP1 is a positive regulator of Raf-1 in vivo. *J Biol Chem.* 2003; 278: 82-88.

Mohren M, Markmann I, Jentsch-Ullrich K, Koenigsmann M, Lutze G, Franke A. Increased risk of venous thromboembolism in patients with acute leukaemia. *Br J Cancer.* 2006; 94: 200-202.

Murányi A, Erdodi F, Ito M, Gergely P, Hartshorne DJ. Identification and localization of myosin phosphatase in human platelets. *Biochem J.* 1998; 330: 225-231.

Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, Schmidbauer S, Gahl WA, Morrissey JH, Renné T. platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell.* 2009; 139: 1143-1156.

Ninivaggi M, Apitz-Castro R, Dargaud Y, de Laat B, Hemker HC, Lindhout T. Whole-blood

thrombin generation monitored with a calibrated automated thrombogram-based assay. *Clin Chem*. 2012; 58: 1252-1259.

Nishikawa M, Toyoda H, Saito M, Morita K, Tawara I, Deguchi K, Kuno T, Shima H, Nagao M, Shirakawa S. Calyculin A and okadaic acid inhibit human platelet aggregation by blocking protein phosphatases types 1 and 2A. *Cell Signal*. 1994; 6: 59-71.

Nur S, Anwar M, Saleem M, Ahmad PA. Disseminated intravascular coagulation in acute leukaemias at first diagnosis. *Eur J Haematol*. 1995; 55: 78-82.

Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006; 99: 1293–1304.

Østerud B. Tissue factor expression in blood cells. *Thromb Res*. 2010; 125 Suppl 1: S31-4.

Owens AP 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res*. 2011; 108: 1284-1297.

Perrin J, Depasse F, Lecompte T: Large external quality assessment survey on thrombin generation with cat: Further evidence for the usefulness of normalisation with an external reference plasma. *Thromb Res*. 2014; 136: 125-130.

Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev*. 2007; 21: 157-171.

Pitney WR, Dacie JV. A simple method of studying the generation of thrombin in recalcified plasma; application in the investigation of haemophilia. *J Clin Pathol*. 1953; 6: 9-14.

Riddel JP Jr, Aouizerat BE, Miaskowski C, Lillicrap DP. Theories of blood coagulation. *J Pediatr Oncol Nurs*. 2007; 24: 123-131.

Sage SO, Pugh N, Mason MJ, Harper AG. Monitoring the intracellular store Ca^{2+} concentration in agonist-stimulated, intact human platelets by using Fluo-5N. *J Thromb Haemost*. 2011; 9: 540-551.

Simon Z, Kiss A, Erdődi F, Setiadi H, Beke Debreceni I, Nagy B Jr, Kappelmayer J. Protein phosphatase inhibitor calyculin-A modulates activation markers in TRAP-stimulated human platelets. *Platelets*. 2010; 21: 555-562.

Stegner D, Dütting S, Nieswandt B. Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis. *Thromb Res*. 2014; 133: S149-157.

Tello-Montoliu A, Tomasello SD, Ueno M, Angiolillo DJ. Antiplatelet therapy: thrombin receptor antagonists. *Br J Clin Pharmacol*. 2011; 72: 658-671.

Timp JF, Braekkan SK, Versteeg HH, Cannegieter SC. Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis. *Blood*. 2013; 122: 1712-1723.

Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J*. 2016; 37: 3232-3245.

Tripodi A, Legnani C, Chantarangkul V, Cosmi B, Palareti G, Mannucci PM. High thrombin generation measured in the presence of thrombomodulin is associated with an increased risk of recurrent venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*. 2008; 6: 1327-1333.

Tripodi A. Thrombin generation assay and its application in the clinical laboratory. *Clin Chem* 2016; 62: 699-707.

Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 403–412.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995; 184: 39-51.

Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 2013; 93: 327-358.

Yano Y, Sakon M, Kambayashi J, Kawasaki T, Senda T, Tanaka K, Yamada F, Shibata N.

Cytoskeletal reorganization of human platelets induced by the protein phosphatase 1/2 A inhibitors okadaic acid and calyculin A. *Biochem J.* 1995; 307: 439-449.

Yano Y, Kambayashi J, Shiba E, Sakon M, Oiki E, Fukuda K, Kawasaki T, Mori T. The role of protein phosphorylation and cytoskeletal reorganization in microparticle formation from the platelet plasma membrane. *Biochem J.* 1994; 299: 303-308.

Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1376: 433-53.

12. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/332/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hudák Renáta
Neptun kód: UK710R
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Hudák, R.**, Bekéné Debreceni, I., Deák, I., Gál Szabó, G., Hevessy, Z., Antal-Szalmas, P., Osterud, B., Kappelmayer, J.: Laboratory characterization of leukemic cell procoagulants. *Clin. Chem. Lab. Med.* 55 (8), 1215-1223, 2017.
IF: 3.432 (2016)
2. **Hudák, R.**, Vincze, J., Csernoch, L., Bekéné Debreceni, I., Oláh, T., Erdődi, F., Clemetson, K. J., Kappelmayer, J.: The phosphatase inhibitor calyculin-A impairs clot retraction, platelet activation and thrombin generation. *Biomed Res. Int.* 2017, 1-10, 2017.
DOI: [http://dx.doi.org/megjelenés alatt](http://dx.doi.org/megjelenés%20alatt)
IF: 2.476 (2016)





További közlemények

3. **Hudák, R.**, Székely, E. G., Czuriga-Kovács, K. R., Nagy, A., Hofgárt, G., Berényi, E., Csiba, L., Kappelmayer, J., Bagoly, Z.: Low thrombin generation predicts poor prognosis in ischemic stroke patients after thrombolysis.
PLoS One. 12 (7), 1-13, 2017.
IF: 2.806 (2016)
4. Frendl, I., Katkó, M., Galgóczi, E., Boda, J., Zsíros, N., Némethi, Z., Bereczky, Z., **Hudák, R.**, Kappelmayer, J., Erdei, A., Turchányi, B., Nagy, E.: Plasminogen Activator Inhibitor Type 1: a Possible Novel Biomarker of Late Pituitary Dysfunction after Mild Traumatic Brain Injury.
J. Neurotrauma. [Epub ahead of print], 2017.
IF: 5.19 (2016)
5. Becs, G., **Hudák, R.**, Fejes, Z., Bekéné Debreceni, I., Bhattoa, H. P., Balla, J., Kappelmayer, J.: Haemodiafiltration elicits less platelet activation compared to haemodialysis.
BMC Nephrol. 17 (1), 147, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12882-016-0364-x>
IF: 2.289
6. Hevessy, Z., **Hudák, R.**, Kiss-Sziráki, V., Antal-Szalmás, P., Udvardy, M., Rejtő, L., Szeráfin, L., Kappelmayer, J.: Laboratory evaluation of a flow cytometric BCR-ABL immunobead assay.
Clin. Chem. Lab. Med. 50 (4), 689-692, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2011.834>
IF: 2.15

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,343

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,908**

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

Debrecen, 2017.10.25.



13. Tárgyszavak/ Keywords

véralvadás/coagulation

trombózis/ thrombosis

vérlemezke/platelet

calyculin-A/ calyculin-A

akut monocytás leukémia/ acute monocytic leukemia

szöveti faktor/ tissue factor

mikropartikula/ microparticle

alvadék retrakció/ clot retraction

thrombin generáció/ thrombin generation

14. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Kappelmayer János Professzor Úrnak, aki az elmúlt 7 évben, tudományos diákkörös hallgató korom óta mindvégig támogatott munkámban. A kutatáshoz szükséges feltételek megteremtésén túl szakmai tanácsokkal látott el, valamint a kutatáshoz szükséges szemlélet kialakításában is nagyon fontos szerepet töltött be.

Köszönöm Bagoly Zsuzsának a kísérletekhez adott hasznos tanácsait és ötleteit.

Köszönöm Antal-Szalmás Péternek, hogy konzultációkkal segítette munkámat.

Köszönöm Bekéné Debreceni Ildikónak és Gálné Szabó Gabriellának a laboratóriumi munkák során nyújtott segítségét, továbbá a Laboratóriumi Medicina Intézet Hemosztázis Részlegének a mintagyűjtések során nyújtott segítségét, valamint az Áramlási Citometria Részlegnek, Hevessy Zsuzsának a leukémiás sejtek immunfenotípusának meghatározásában végzett segítő munkáját.

Köszönöm Antal Csabának, hogy segített a közlemények ábráinak szerkesztésében. Köszönet illeti Székely Leventét és Kópis Ildikót az adminisztratív segítségért. Továbbá köszönöm a Laboratóriumi Medicina Intézet valamennyi munkatársának a támogatását.

Hálás vagyok családomnak és barátaimnak, akik mellettem álltak és támogatásukkal biztosították ezen munka elkészüléséhez szükséges hátteret.

15. Önálló munka jegyzéke

Munkám során önállóan végeztem:

- A thrombocyttákkal végzett kísérletekhez minták előkészítése, a thrombocyták aktivációja, gátlása.
- Leukémiás sejtvonalakkal végzett kísérletek előkészítése, megtervezése, a leukémiás sejtek tenyésztése a sejtes és mikropartikula mérésekhez.
- A különböző funkcionális kísérletekhez a sejtek és mikropartikulák előkészítése, szeparálása.
- Normál humán monocyták szeparálása.
- Sejtfelszíni jelölés, áramlási citometria mérések.
- Alvadék retrakció vizsgálata.
- Konfokális mikroszkópos mérésekhez a vérlemezkék töltését fluoreszcens festékkel és a vérlemezkék aktivációját, valamint gátlását.
- Leukémiás sejtek prokoaguláns aktivitásának meghatározása PCA-val.
- Leukémiás sejtek és mikropartikulák prokoaguláns hatásának meghatározása thrombin generációs teszttel.
- Eredmények értékelése és interpretálása.
- Statisztikai analízis.

Munkám során segítséget kaptam:

- A munkám során használt metodikák (sejtenyésztés, áramlási citometria mérések) elsajátításában.
- A leukémiás sejtek immunfenotípusának meghatározásában.
- A thrombocyta kísérletek során az intracelluláris kalcium szint meghatározásához a konfokális mikroszkópos mérést és a fluoreszcens arányok kiszámítását Dr. Vincze János végezte.

16. Függelék

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények.