

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Coated-thrombocyták. A thrombocyták hiperaktív szubpopulációja. Alap kutatás és klinikai megfigyelések.

Dr. Reményi Gyula

Témavezető: Dr. Udvardy Miklós



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2013

Tartalomjegyzék

| | |
|--|-----------|
| Tartalomjegyzék | 2 |
| Összefoglalás | 4 |
| Kulcsszavak | 4 |
| Summary | 5 |
| Keywords | 5 |
| Rövidítések listája | 6 |
| Bevezetés | 9 |
| Coated-platelets – Fedett vérlemezkék, coated-vérlemezkék | 11 |
| Célkitűzések | 18 |
| I. A coated-vérlemezkékkel végzett alapkutatás..... | 18 |
| I/1 A cink és a coated-vérlemezke kapcsolata | 18 |
| I/2. Pórusképződés a coated-vérlemezke kialakulása során..... | 18 |
| I/3. A mikropartikulák és a coated-vérlemezkék kapcsolata..... | 18 |
| I/4. Tetraspanin (CD9) és a thrombocytá-mikropartikula képződés | 18 |
| II. A coated-thrombocyták vizsgálata essentialis thrombocythaemiában | 19 |
| Vizsgálati módszerek | 20 |
| A gélfiltrált thrombocytá előkészítése | 20 |
| Flowcytometriás vizsgálat | 20 |
| Fluorometriás cink meghatározás | 21 |
| b-BSA-(5-HT) ₆ ELISA | 21 |
| PFA-100 teszt..... | 22 |
| Bodipy fluorochrom jelölés 1. | 22 |
| Bodipy fluorochrom jelölés 2. | 22 |
| Mitochondriális átmeneti permeabilitási pórus (mitochondrial permeability transition pore) aktivátor vizsgálat | 23 |
| Konfokális mikroszkópia | 23 |
| Áramlási cytometria bodipy-jelölt vérlemezke esetén..... | 23 |
| Coated-thrombocytá kimutatás cinkmentes diétán tartott egereknél | 23 |
| Betegek és módszerek essentialis thrombocythaemiás betegek vizsgálatánál..... | 24 |
| Statisztika..... | 24 |
| Eredmények | 25 |

| | |
|--|-----------|
| I/1. A cink és a coated-thrombocyták kapcsolata..... | 25 |
| Bevezetés | 25 |
| Eredmények | 25 |
| Megbeszélés..... | 27 |
| I/2. Pórusképződés a coated-vérlemezke kialakulása során..... | 30 |
| Bevezetés | 30 |
| Eredmények | 30 |
| Megbeszélés..... | 37 |
| I/3. A thrombocyta mikropartikulák és a coated vérlemezkek kapcsolata..... | 38 |
| Bevezetés | 38 |
| Eredmények | 39 |
| Megbeszélés..... | 47 |
| I/4. A CD9 és a thrombocyta eredetű mikropartikulák kapcsolata | 48 |
| Bevezetés | 48 |
| Eredmények | 51 |
| Megbeszélés..... | 54 |
| II. A coated-thrombocyták vizsgálata essentiális thrombocythaemiában | 55 |
| Bevezetés | 55 |
| Eredmények | 57 |
| Megbeszélés..... | 62 |
| Irodalomjegyzék..... | 65 |
| Köszönetnyilvánítás | 72 |
| Függelék | 73 |

Összefoglalás

Ha a thrombocytákat convulxinnal (GPVI aktivátor csörgőkígyó mérge) és thrombinnal egyidejűleg aktiváljuk akkor a vérlemezkék sajátos szubpopulációja alakul ki. Ezen thrombocytákra jellemző a foszfatidil-szerin expresszió, az α -granulum eredetű fehérjék retenciója és az ezekkel együtt járó fokozott prothrombináz aktivitás. A coated-thrombocyta elnevezés a sejtfelszíni hálózatos, egymással részben kovalens kötésben lévő alvadásaktív fehérjeburokra utal. Jelen munkában döntően áramlási cytometriás vizsgálatokkal bemutatjuk, hogy a cink fokozza a coated-thrombocyták arányát. A biológiai mechanizmusok részben az apoptózissal közösek, az apoptózisban szerepet játszó mitokondriális permeabilitás átmeneti pórus (MPTP) befolyásolása kihat a coated-vérlemezke termelődésre is. A thrombocyta eredetű mikropartikulák képződése is szoros kapcsolatban van mind a coated-thrombocytákkal, mind az MPTP-vel. Továbbiakban bemutatjuk, hogy a CD9 tetraspanin molekula, az ismert sejtfúziós szerepén túl a mikropartikulák képződésben is szerepet játszik. A klinikai jelentőség megismerésére essentialis thrombocythaemiában (ET) vizsgáltuk a coated-thrombocytákat. Kimutattuk, hogy a nem kezelt ET-s betegek coated-thrombocyta aránya alacsonyabb, mint a kontrolloké, amit a hydroxyurea (HU) terápia szignifikánsan emel. Ez a hatás nem függ a kortól és a JAK2V617F mutáció pozitív esetek még alacsonyabb értékkel bírnak. A jelenség vélhetőleg szerepet játszhat az ET-s betegekben lévő thrombocytopathiában.

Kulcsszavak

apoptózis, CD9 tetraspanin, Coated-thrombocyta, essentialis thrombocythaemia flowcytometria, thrombocyta-mikropartikula

Summary

Coated-platelets represent a subpopulation of cells observed after dual agonist stimulation of platelets with convulxin (GPVI agonist rattlesnake venom) and thrombin. The hallmarks of coated-platelets are surface expression of phosphatidylserine and retention of α -granule proteins accompanied with strong prothrombinase activity. The name of „coated” refers to the surface bound coagulant protein matrix stabilized by partially covalent manner. Based mainly on flowcytometric analyses we have managed to show that zinc increases coated-platelet production. Machinery of coated-platelet synthesis are partly common with apoptosis. Inhibition or activation of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) in the apoptotic process influences the coated-platelet formation. Production of platelet-microparticles is in strong connection with both coated-platelets and MPTP. Furthermore we present that CD9 tetraspanin plays role not only in cellfusion but in microparticle formation too. To assess the clinical importance coated-platelets have been studied in essential thrombocythaemia (ET). Significantly lower levels of coated-platelets have been detected in ET patients compared to controls, not influenced by age. JAK2V617F mutation further decreases the coated-platelet level. Hydroxyurea (HU) treatment restores coated-platelet production. These observations support the thrombocytopathy observed in ET.

Keywords

Apoptosis, CD9 tetraspanin, Coated-platelet, essential thrombocythaemia, flow cytometry, platelet-microparticle

Rövidítések listája

ACD – acid-citrát-dextróz

ADP – adenzin-difoszfát

ALB6 – anti-CD9 monoklonális antitest

α_2 AP – α_2 -antiplazmin

AP2 – anti-GPIIb/IIIa monoklonális antitest

ATP – adenzin-trifoszfát

A32187 – kalcium ionofor

BALBc – albínó háziegértörzs

BAX – Bcl-2 asszociált X protein

Bodipy – boron-dipyrrometilén

BSA – marha szérum albumin

b-BSA-(5-HT)₆ – biotinált BSA-szerotonin

BSGC – pufferelt NaCl-glükóz-citrát oldat

CD9 – p24, motility related protein 1

COAT – convulxin and thrombin

Coated-thrombocyta – hiperaktív vérlemezke szubpopuláció

CVX – convulxin

CT – PFA-100 záródási idő

Cys-A – cyclosporin-A

DMP-802 – anti-CD9 monoklonális antitest

$\Delta\Psi_m$ – mitokondrium organelum potenciál

EC₅₀ – félhatásos koncentráció

ET – essentialis (haemorrhagiás) thrombocythaemia

Fbg – fibrinogén

FITC – fluoreszcein-izotiocianát

FMC – anti-CD9 monoklonális antitest

fiz. só – fiziológiás sóoldat

FV – véralvadási faktor V

FVIII – véralvadási faktor VIII

FX – véralvadási faktor X

GAMG – kecske anti-egér monoklonális antitest

GP – glikoprotein

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-etán-szulfonsav

HU – hydroxyurea

ITP – idiopathias thrombocytopeniás purpura

IV.3 – anti-Fc γ RIIa monoklonális antitest

JAK2 V617F – Janus kináz 14. exonján lévő G1849T (V617F) mutáció

JC-1 – 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianin jodid

L-PL – nagy (>20 fL) thrombocytá arány

MIX – 100 μ l reakció elegy a coated-thrombocytá vizsgálatoknál

ML13 – anti-CD9 monoklonális antitest

MPTP – mitokondrium átmeneti permabilitási pórus

MPV – átlagos thrombocytá térfogat

mRNS – messenger RNS

NSAID – nem szteroid gyulladáscsökkentők

NG-Ac – Newport Green észter

PAC-1 – aktív GPIIb/IIIa ellenes antitest

PAF – thrombocytá aktivátor faktor

PAO – fenil-arzénoxid

PFA-100 – thrombocyta funkció analizátor

PBS – foszfát pufferelt NaCl oldat

PE-SA – phycoerythrin-streptavidin

PS – foszfatidil-szerin

SCC – oldalszórás

SLE – szisztémás lupus erythematosus

SN4 – anti-CD9 monoklonális antitest

TAB – anti-GPIIb antitest

TIA – tranzitórikus ischémiás attack

TM4SF – transzmembrán 4 szupercsalád

TPEN – N,N,N',N'-Tetrakis-(2-piridilmetil)-etiléndiamin

TRAP – thrombin receptor agonista peptid

TSP – thrombospondin

vWF – von Willebrand faktor

5-HT – 5-hydroxi-triptamin = szerotonin

Bevezetés

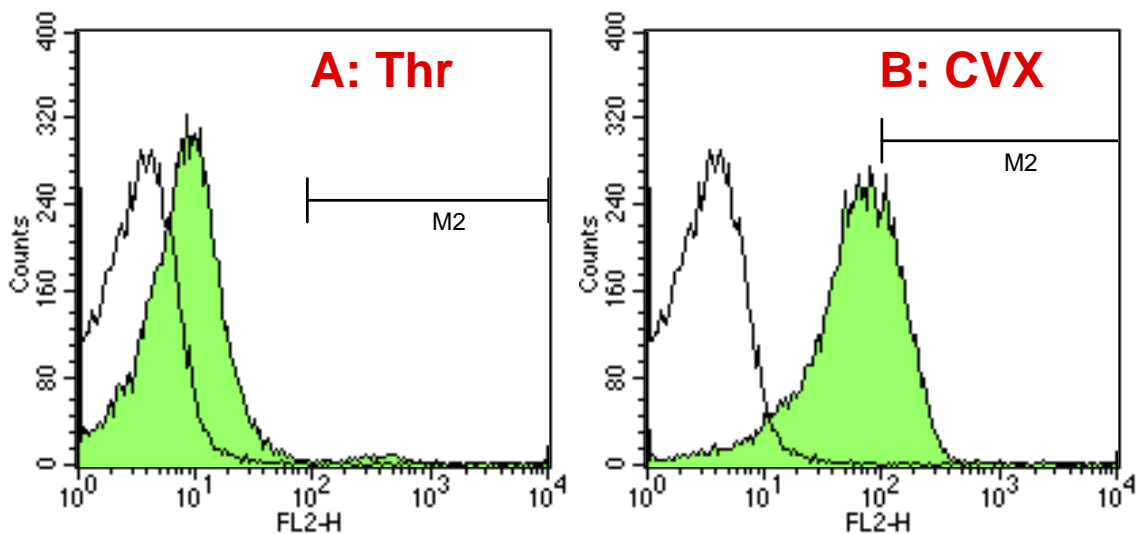
Az aktivált thrombocyták számos tekintetben különböznek a keringésben lévő nyugvó vérlemezkéktől:

- alaki változás: a diszkoid alakból pszeudopodiumokkal borított „sündisznó” alakúvá válnak
- a sejtmembrán belső oldaláról a foszfatidil-szerin a külső oldalra fordul (flip)
- az α -granulumok ill. a denz testecskék tartalma a thrombocyták közti térbe kerül (release)
- az vérlemezkék felszínén alvadásaktív anyagok, aktivált receptorok jelennek meg
- az így kialakult foszfolipid/ fehérje felszín részt vesz a koagulációs kaszkádban is

A vérlemezkék aktivációjában számos adhezív glikoprotein és sejtfelszíni receptor vesz részt: a vWF-t kötő GPIb/IX/V, a fibrinogént és vWF-t kötő GPIIb/IIIa, a kollagént megkötő GPIa/IIa és GPVI, valamint a fibronectint kötő GPIa/IIa és laminint kötő GPIc/IIa. A glikoproteinek mellett az egyik legerősebb fiziológiás thrombocyta aktivátor a thrombin, a vérlemezke felszínén lévő thrombin receptoron keresztül aktiválja a thrombocytákat. Számos más fiziológiásan is előforduló anyag pl. a ADP, arachidonsav, adrenalin, thrombocyta aktiváló faktor (PAF) vagy mesterséges szubsztancia pl. a thrombin receptor agonista peptid (TRAP) képes a fent részletezett folyamatokat beindítani.

A laboratóriumi munkában a nehezen standardizálható kollagén helyett a hasonló GPVI aktiváló kígyómérget a Convulxint is használhatjuk.

Thrombocyta aktiváció során a vérlemezkék felszínén számos fehérje mennyisége megnő. Áramlási cytometriás vizsgálattal már kis különbséget is ki tudunk mutatni. Trombin aktivált vérlemezkék felszínén például az V faktor retencióját észleljük. (1. ábra)



1. ábra [7]Thrombinnal (A) és convulxinnal (B) aktivált vérlemezkéken biotinnal konjugált V faktor kimutatása phycoerythrin-streptavidin (PE-SA) fluoreszcenciával. Üres görbe: nyugvó vérlemezkék. Zöld terület: aktivált thrombocyták, nagyobb FL2 értékkel, ami több felszíni FV-t jelent.

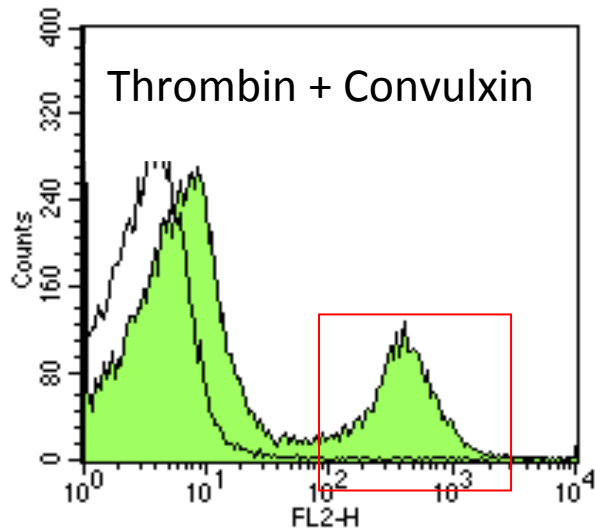
Az a megfigyelés, hogy a vérlemezkéknek bizonyos tulajdonságuk alapján több fajtája van már nem új keletű. 1965-ben Webber and Firkin [1] figyelte meg először a látható különbségeket a vérlemezkék között. Mások citopatológiai festéssel, a vérlemezkék citoplazmatikus foszfatáz kimutatásával differenciáltak különböző vérlemezke populációkat. Az ezzel járó biokémiai eltérések leírása Behnke és koll. nevéhez fűződik [2,3]. Már Pasquet is leírta, hogy kollagén és thrombin aktiváció után a thrombocyták egy része, nagyobb mennyiségben expresszál foszfatidil-szerint [4], míg Feng és Tracy megfigyelése szerint nagy dózisú thrombin aktiváció után a thrombocyták közel 40%-a nagyobb mértékben prezentál aktív faktor V-t és X-t [5]. Közvetlen videómikroszkópos vizsgálatok alapján létezik egy előőrs („vanguard”) vérlemezke populáció, ami képes a vaszkuláris lézió helyén szabaddá váló kollagénhez kötődni olyan módon, hogy ezt a GPIIb/IIIa receptorgátlók nem blokkolják. Az így lekötődött vérlemezkék a további thrombocytáknak tapadási felületként szolgálnak, amit már a GPIIb/IIIa gátlók akadályozni tudnak [6].

Coated-platelets – Fedett vérlemezkék, coated-vérlemezkék

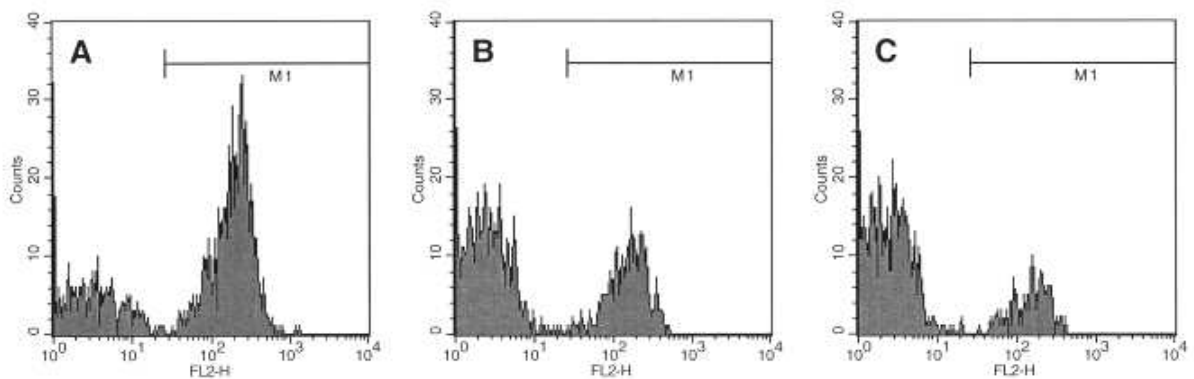
Ha a vérlemezkéket egyszerre thrombinnal és kollagénnel aktiváljuk, akkor annak ellenére, hogy az összes thrombocyta maximális aktiváción esett át 2 populáció alakul ki a vérlemezkék felszínén kimutatható alfa-granulum eredetű fehérjék alapján. A thrombocyták mintegy 30%-án ($33.0 \pm 9.3\%$) [7,8,9] 10-100x több ilyen alvadás aktív anyag halmozódik fel. Mivel ez kettős stimulusra (convulxin és thrombin) alakult ki, ezért korábban CONvulxin And Thrombin=COAT thrombocytáknak nevezték. Tekintettel arra, hogy egyéb agonisták, egyedül, vagy kombinációban, kisebb-nagyobb mértékben képesek ilyen szubpopuláció létrehozására az elnevezés megváltozott és a létrehozó agonista helyett inkább a végtermék tulajdonsága alapján már nem COAT-thrombocytának [10], hanem coated (fedett) thrombocytának nevezzük. (2. ábra) Coated-thrombocytát hoz létre a convulxin + thrombin aktiváció mellett például thrombin + Fc receptor kötés [11], nagy dózisú thrombin [5,12], thrombin receptor agonista peptid (TRAP) [12] vagy az immobilizált kollagénnel történő thrombocyta aktiválás [13,14]. Az, hogy a kettős aktiváció során a thrombocyták hány százaléka alakul coated-thrombocytákká több tényező befolyásolja: még egyelőre ismeretlen faktorok mellett a szerepet játszik a reakció hőmérséklete, azaz szobahőmérsékleten több coated-thrombocyta képződik, mint 37 °C -on. Az újonnan képződött vérlemezkék szintén nagyobb százalékban ($\approx 70\%$) alakulnak fedett vérlemezkékké (3. ábra) [10].

Fontos kihangsúlyozni két dolgot a coated-thrombocyta kialakulásával kapcsolatban:

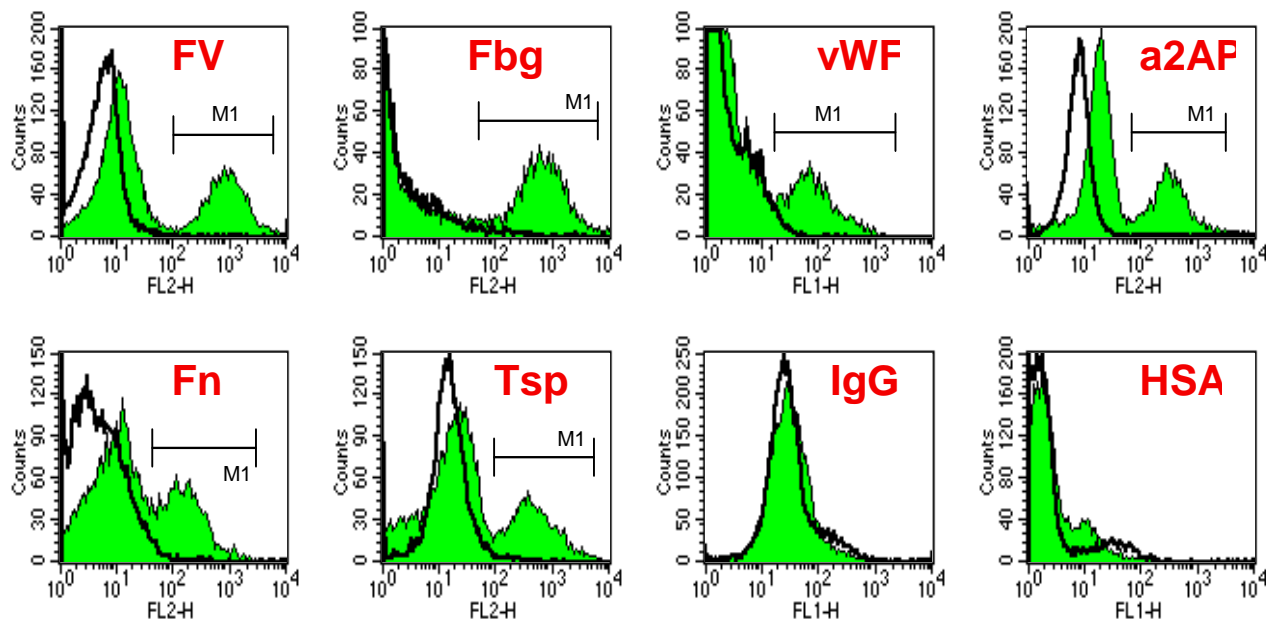
1. A vérlemezke aktiváció során olyan koncentrációban van jelen az aktivátor thrombin és convulxin, hogy a reakció során az **összes** thrombocyta aktiválódik (0.5 U/mL thrombin és 500 ng/mL convulxin).
2. A coated-vérlemezkék termelődése során nem egy folyamatos spektrumot, hanem **2 jól elkülönülő populációt** kapunk. Tehát az aktivált vérlemezkék kb. 70 %-án a korábban már jól ismert folyamatok során bizonyos mennyiségű pl. fibrinogén jelenik meg, míg a másik kb. 30%-án ennek a mennyiségnek a 10-100-szorosa (coated thrombocyták). Vagy ennyi, vagy annyi, nincs köztes állapot, egy folyamatos spektrum (2. ábra)



2. ábra [7] Thrombinnal és convulxinnal egyidejűleg aktivált vérlemezkék. Thrombocyták szubpopulációja (nagyjából 30%) alakul ki kb. 100-szoros FV felszíni tartalommal (piros négyzet). Nem folyamatos spektrum, hanem a vérlemezkék maximális aktivációjuk után vagy az egyik, vagy a másik csoportba tartoznak.



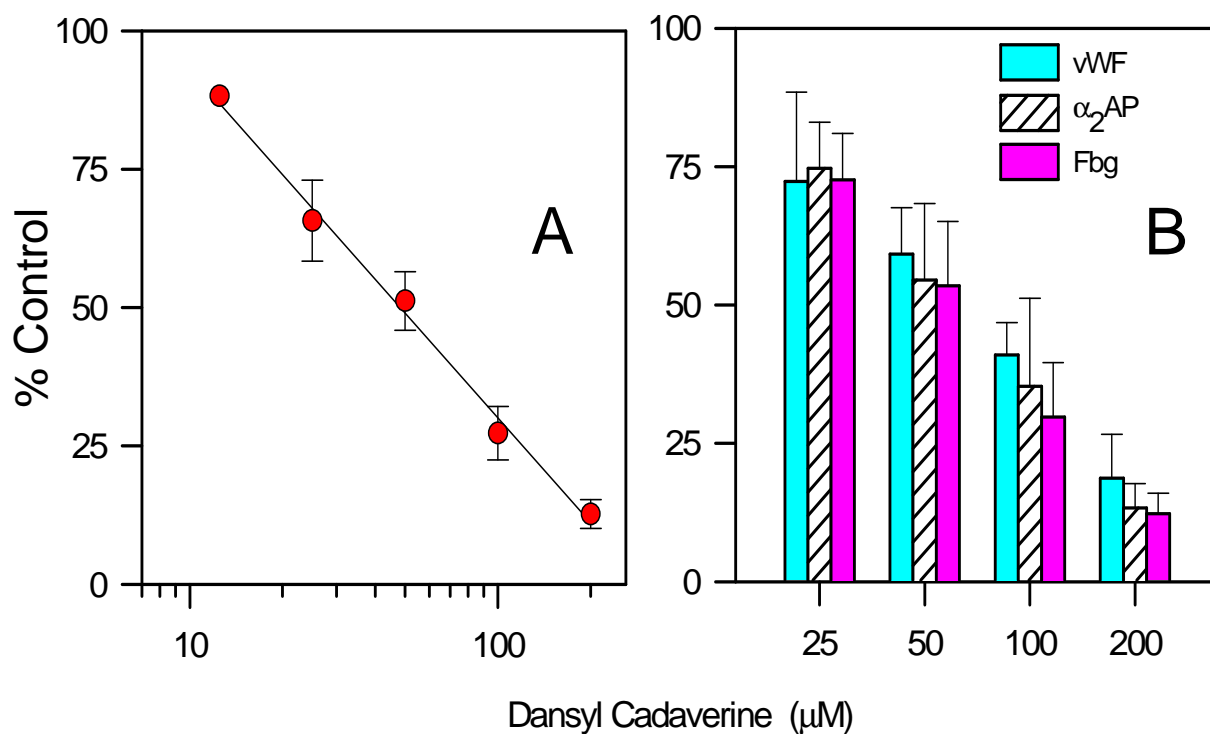
3. ábra [7] Coated-thrombocyták (M1 régió) termelődése convulxin + thrombin aktiváció során fiatal, tiazol-narancs pozitív (A), vegyes (B) és érett thrombocyták (C) esetén. A fiatal vérlemezkék több coated-thrombocytát képeznek [7]. A tiazol-narancs a fiatal vérlemezkékben lévő mRNS-hez kötődő festék.[10]



4. ábra [18] A coated-thrombocyták α -granulum eredetű fehérjéket expresszálnak (Faktor V, fibrinogén, von Willebrand faktor, α_2 anti-plazmin, fibronectin, thrombospondin), ugyanakkor egyéb fehérjét, mint az immunglobulin G-t, vagy a humán szérum albumint nem.

A coated-thrombocyták az V Faktoron kívül más, α -granulum eredetű, alvadásaktív anyagokat is prezentálnak a felszínükön úgymint: Faktor V, fibrinogén, von Willebrand faktor (vWF), α_2 anti-plazmin (α_2 AP), fibronectin, thrombospondin [10] (4. ábra).

Az α -granulum eredetű fehérjék a coated-thrombocyta képződése során aktív, enzimatisz úton rögzülnek az aktivált thrombocyták felszínén. Ezt a folyamatot transzglutamináz gátlókkal megakadályozhatjuk. (5. ábra) Ilyen a vérlemezkék számára rendelkezésre álló transzglutaminázok a szöveti transzglutamináz [15] és a faktor XIII. A faktor XIII nagy mennyiségben található a vérlemezkékben [16]. A vérlemezke fibrinogén receptor (GPIIb/IIIa) gátlása nem csökkenti a coated-thrombocyta szintézist, a fehérje retenciót [8]. Az aktív GPIIb/IIIa ellenes monoklonális antitest a PAC-1 nem gátolta és számos egyéb GPIIb/IIIa gátló éppenséggel növelte a coated-vérlemezkék százalékos kialakulását in vitro [8].

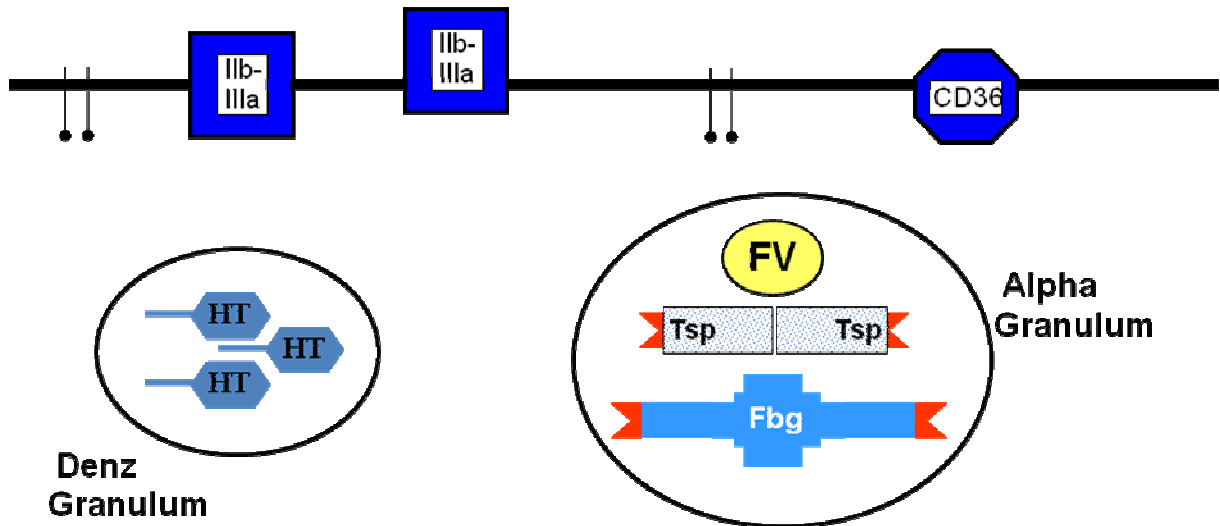


5. ábra [10] Transzglutamináz gátló dansyl cadaverine dózisfüggő mértékben gátolja a coated-thrombocyták kialakulását. A: Convulxin + thrombin aktiváció során kialakult coated-thrombocyták (100%) mennyisége a dansyl cadaverine dózis emelésével csökken. B: három különböző coated-thrombocyt marker, a von Willebrand faktor, az α_2 anti-plazmin és a fibrinogén hasonlóan viselkedik a dansyl cadaverine hatására.

Az α -granulum eredetű fehérjék tehát a coated-vérlemezke képződés során, transzglutamináz reakciót igénybe véve egy hálózatos, összefonódott struktúrát, bevonatot hoznak létre a thrombocyták felszínén. További vizsgálatok megerősítették, hogy a szerotonin kulcsfontosságú ezen fehérje hálózat kialakulásában: az α -granulum eredetű fehérjék szerotoninálódnak, szerotonin kötődik hozzájuk és ezen szerotoninált fehérjék a thrombocytá felszínén található fibrinogénhez és thrombospondinhoz kötődnek. [10,17] A molekulák közötti multivalens kötődések stabilizálják a fehérje burkot. [18] Ez a mechanizmus magyarázza, hogy a coated-vérlemezskéken 1-2 nagyságrenddel több ilyen protein mutatható ki. (6. ábra)

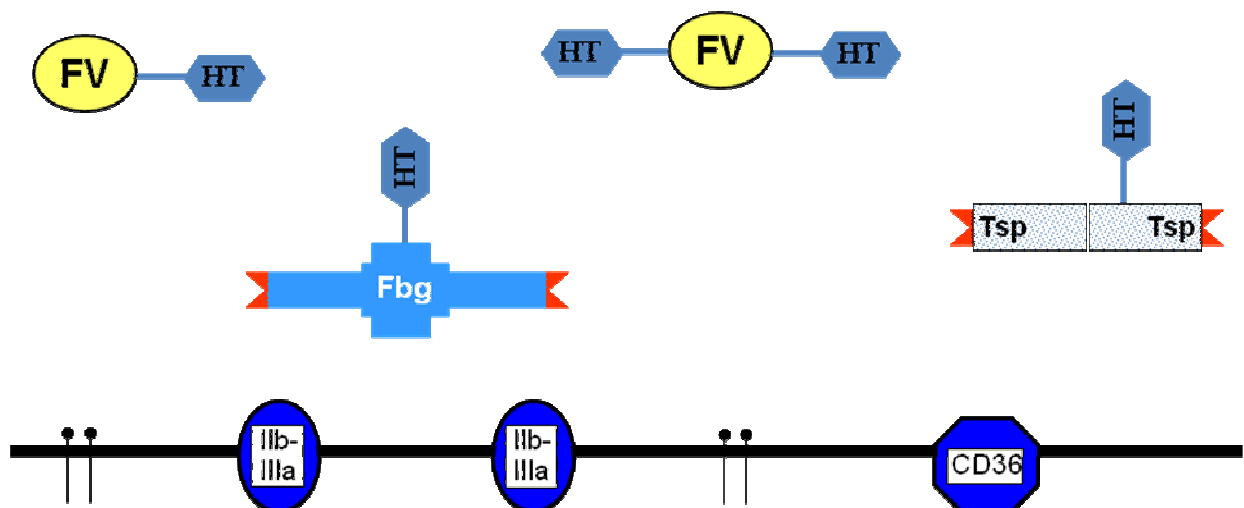
A

Nyugvó thrombocyta

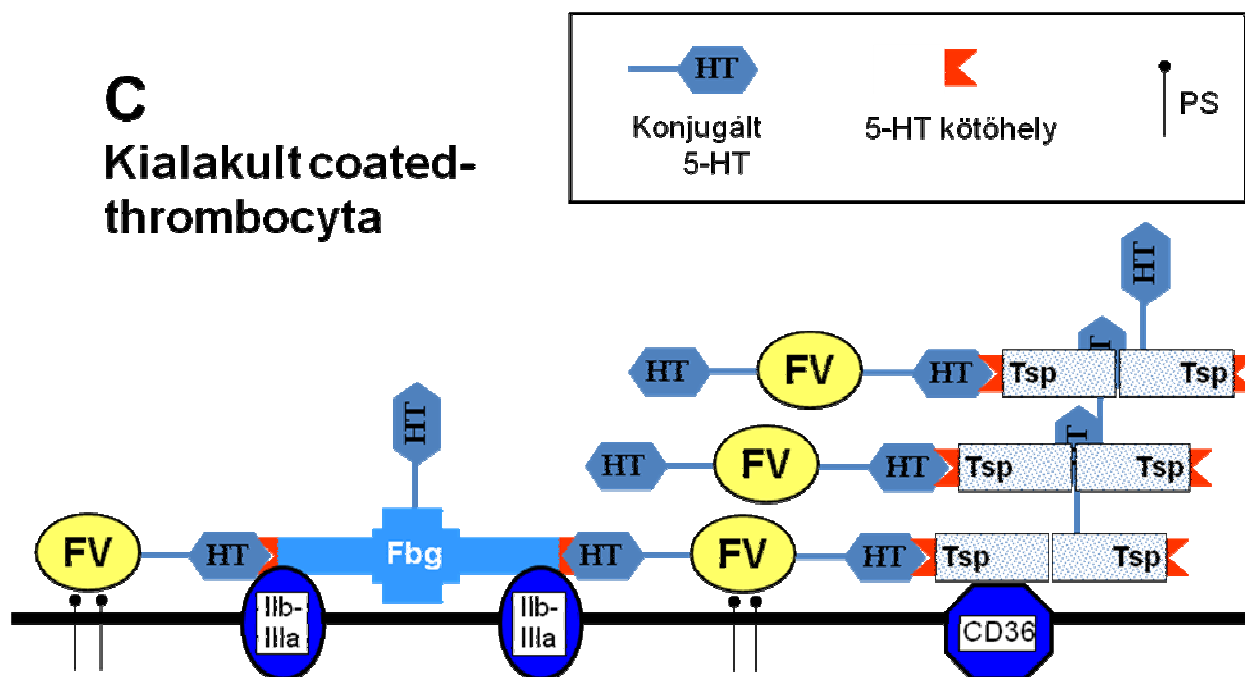


B

Kialakulóban lévő coated-thrombocyta



C Kialakult coated- thrombocyt



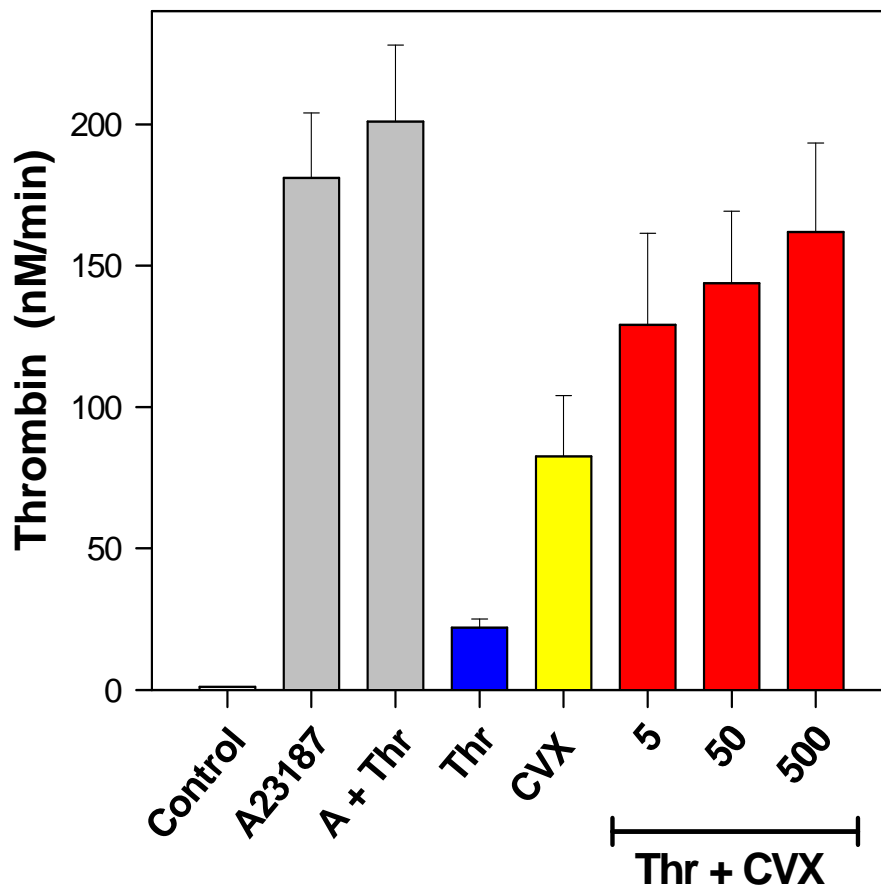
6. ábra A coated-thrombocyt

6. ábra A coated-thrombocyt

A coated-thrombocyt

A coated-thrombocyt

ismeretlen mechanizmus, nem specifikus a foszfatidil-szerinre és nem jár aktív energiafelhasználással. A coated-thrombocyták, a nem coated aktivált thrombocytákhoz hasonlóan, tehát foszfatidil-szerint expresszálnak. Az alvadásaktív fehérjeburok (benne a sok faktor V) plusz a negatív töltésű foszfatidil-szerin foszfolipid ideális feltételt teremt a véralvadáshoz, az aktív X faktor megkötéséhez, ami a coated-vérlemezkék harmadik jellegzetessége: a potens prothrombináz aktivitás (7. ábra) [7].



7. ábra [7]Különböféle agonistákkal aktivált thrombocyták prothrombináz aktivitása, azaz 1 perc alatt termelt thrombin mennyisége. Control: nyugvó vérlemezkék, A23187: 1 μ M A23187 kalcium ionofor, A + Thr: 1 μ M ionofor +0.5 U/mL thrombin, Thr: 0.5 U/mL thrombin, CVX: 500 ng/mL convulxin, thr + CVX:0.5 U/mL thrombin és különböző koncentrációjú convulxin (5ng/mL, 50 ng/mL, 500 ng/mL) aktiválással. Piros oszlopok: részben coated-thrombocyták

Célkitűzések

I. A coated-vérlemezkekkel végzett alapkutatás

I/1 A cink és a coated-vérlemezke kapcsolata

A vérlemezkek nagy mennyiségű cink iont tartalmaznak. A cinknek számos biológiai folyamatban van szerepe, ugyanakkor a hiánya többek között vérzékenységhez vezet. A coated-thrombocyták, hiperaktív vérlemezkek, irodalmi adatok szólnak a vérzékenység és az alacsony coated-thrombocytá arány kapcsolatáról. Cinkkötő fehérjéket alkalmazva megvizsgáltuk, hogy ezen nyomelemnek milyen hatása van a coated-thrombocytá képződésre.

I/2. Pórusképződés a coated-vérlemezke kialakulása során

Sejtmembrán impermeábilis fluoreszcens festékeket használva azt a megfigyelést tettük, hogy a coated-thrombocytá képződés során a festék kijutott a vérlemezkéből. Feltételeztük, hogy a coated-thrombocytán pórus alakul ki, amin a festék átjut. Vizsgálatainkkal arra kerestük a választ, hogy mekkora ez a pórus és aktiválásával, vagy gátlásával változtatható-e a coated-thrombocyták termelődése?

I/3. A mikropartikulák és a coated-vérlemezkek kapcsolata

A vérlemezke eredetű mikropartikulák a szervezetben előforduló leggyakoribb mikropartikulák. Mind a normális hemosztázis fenntartásában, mind patológiás állapotokban bizonyított a szerepük. Az aktivált thrombocytákról fűződőnek le. Kimutatásuk áramlási cytometriás módszerrel nehéz. Vizsgáltuk annak a lehetőségét, hogy a flowcytometriás rendszer érzékenységét fokozzuk, valamint arra is kerestük a választ, hogy van-e kapcsolat a coated-thrombocytá képződés a mikropartikula termelődés között.

I/4. Tetraspanin (CD9) és a thrombocytá-mikropartikula képződés

Eddigi vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a coated-thrombocytá képződés együtt jár thrombocytá mikropartikulák termelődésével. Vizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a coated-thrombocytát eredményező agonisták mikropartikula képző képességét illetően? Ehhez kapcsolódóan részletesen áttekintettük a CD9 molekula szerepét a thrombocytá működésében, valamint a mikropartikula termelődésre kifejtett hatását.

II. A coated-thrombocyták vizsgálata essentiális thrombocythaemiában

Egyre több klinikai adat szól a coated-thrombocyták betegségekben betöltött szerepéről. Ha a hemosztázis egyensúlya a trombotikus irányba tolódik el, mint pl stroke, cukorbetegség, akkor magasabb, ha inkább a vérzékenység irányába, mint pl agyvérzés, vagy haemophilia, akkor alacsonyabb coated-thrombocyta arányt találtak ez eddigi irodalom alapján. A nagy vérlemezke számmal járó essentialis thrombocythaemiában még eddig senki sem vizsgálta a coated-thrombocytákat. A kliniánkon gondozott ET-s betegekből kialakított homogén betegcsoport coated-thrombocyta arányait hasonlítottuk egészséges kontrollokéhoz. Vizsgáltuk, hogy a hydroxyurea kezelés hogyan befolyásolja az észlelt alacsony coated-thrombocyta szintet?

Vizsgálati módszerek

A gélfiltrált thrombocytá előkészítése

Mind az alap kutatásban, mind klinikai vizsgálatokban gélfiltrált vérlemezke szuszpenzióval történtek a kísérletek. Az antecubitalis vénából 5 ml vért vettünk 0.5 mL acid citrát dextrózt (ACD) tartalmazó műanyag fecskendővel. A mintát szobahőn 1:2-re hígítottuk pufferezt NaCl-glükóz-citrát oldattal (BSGC, pH 7.3), amit ezután műanyag csőben 170 g-vel 8 percig centrifugáltunk. A thrombocytá dús plazmát (PRP) Sepharose CL-2B (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) gélt tartalmazó oszlopon szűrtük. A tisztított vérlemezke oldatot $4 \times 10^4/\mu\text{L}$ -re állítottuk be BSGC-vel.

Flowcytometriás vizsgálat

A vérlemezke aktiváció ill. az immunfestések 100 μL térfogatban történtek 37 °C-on: 79 μL MIX (10 mM HEPES, 1 mg/mL BSA, 2.5 mM CaCl_2 , 1.25 mM MgCl_2 és 150 mM NaCl) + 10 μL 40 G/L gélfiltrált vérlemezke + 1 μL biotin-fibrinogén (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma-Aldrich) + 10 μL agonista convulxin (1.25-0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Pentapharm, Basel, Switzerland) és α -thrombin (5 U/mL) (bovine thrombin; Sigma-Aldrich). A különböző tesztekben egyéb agonista keveréket is alkalmaztunk a 10 μL -ben: 5 U/mL thrombin + 10 μL A23187. A biotin-fibrinogén helyett 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FITC-anti-fibrinogén antitestet is használtunk (ill. egyéb FITC jelölt antitestet) jelölésként. Pórus vizsgálatok esetén FITC-phalloidin 1 μM , ill. calcein 2 μM koncentrációban volt a jelölő anyag. Gátló vagy aktiváló kísérletek során általában a gélfiltrált thrombocytákat inkubáltuk a megfelelő anyagokkal pl.: 150 μM o-phenanthroline, 4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ cyclosporin-A, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ALB6 stb. Anti-CD9 antitest alkalmazásakor a vérlemezkéket előzetesen szobahőn, 5 percig, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ végkoncentrációjú IV.3 antitesttel inkubáltuk, hogy az Fc γ RIIa receptor blokkolásával gátoljuk a vérlemezkéek anti-CD9 általi aktiválódását. Anti-GP IIb/IIIa használatakor nem kellett IV.3-t előzetesen alkalmazni, mert ezek az antitestek a korábbi vizsgálatok szerint nem aktiválják közvetlenül a vérlemezkéket. Tíz perccel az agonisták hozzáadása után, a reakciót megállítottuk és a thrombocytákat fixáltuk 200 μL 1%-os paraformaldehid/HEPES/NaCl hozzáadásával 20 percig. A fixálás után 3.5 mL 1 mg/mL BSA-t tartalmazó PBS-t adtunk a reakcióelegyhez (PBS/BSA), majd 1500 g-n 15 percig centrifugáltuk. A pelletet 200 μL PBS/BSA-ban reszuszpendáltuk, majd jelöltük anti-CD41a-PE-Cy5 és PE-streptavidinnel (Becton Dickinson, San Jose CA). A jelölés után újabb centrifugálás történt a

korábbiak szerint, majd PBS-ben reszuszpendáltuk a jelölt thrombocytyákat. A P-selectin (CD62) meghatározás a korábbi módon leírtak szerint történt. [20]

A flowcytometriás vizsgálatok FACS-Calibur (Becton Dickinson, Mansfield, MA, USA) gépen, 15 mW argon lézerrel és a CellQuest programmal történtek az alap kutatás esetén.

A klinikai mintákat a DEOEC-en BD FACS-Canto II flowcytométeren mértük (Becton Dickinson, Mansfield, MA, USA), az adatok elemzése BD FACSDiva szoftverrel történt (6.1.3 version).

Fluorometriás cink meghatározás

A vérlemezkék cink tartalmának meghatározásához a Zn^{++} kötő Newport Green (Molecular Probes Europe) fluoreszcens festéket használtuk. A Newport Green észter formája (NG-Ac) membrán permeábilis, bejut a thrombocytyába, ahol az intracitoplazmatikus észteráz az észter gyököt lehasítja, ami után már membrán impermeábilissá válik. A gélfiltrált nyugvó, vagy aktivált thrombocytyákat PBS pufferben 30 percig $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk $25\text{ }\mu\text{M}$ NG-Ac festékkel. PBS mosás után a mintákat microwell lemezen fluorofotométerrel (Fluorocount; Packard, Rungis, Franciaország) mértük 485 és 530 nm hullámhosszon, PBS/ $25\text{ }\mu\text{M}$ NG-AC blank mellett.

b-BSA-(5-HT)₆ ELISA

A gélfiltrált thrombocytyákat a MIX reakcióelegyben $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ b-BSA-(5-HT)₆-azido-tetrafluoro-benzolsavval és az aktivátorokkal inkubáltuk $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on korábban leírtaknak megfelelően. 10 perc után a mintákban keresztkötéseket hoztunk létre UV lámpával 2 percig. (UV Crosslinker, FB-UVXL-1000; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Kimotripszin $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 30 percig, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on emésztés után a sejteket lizáltuk 0.5%-os Triton X-100 oldattal. $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ anti-fibrinogénnel fedett és 2 mg/mL BSA-val blokkolt microtiter ELISA lemezeket $100\text{ }\mu\text{L}$ thrombocyta lizátummal töltöttük fel 90 percre szobahőn. A lekötődött BSA-(5-HT)₆-t streptavidin-peroxidázzal mutattuk ki.

PFA-100 teszt

A vérlemezke működést nagy nyíróerő (5000-6000/s) viszonyok között a PFA-100 készülékkel (Siemens, Miami, Fl, USA) vizsgáltuk. Kollagén + ADP és kollagén + adrenalin tartalmú patronokon keresztül szívja a vákuum egy membránon keresztül a vérmintát. Az aggregálódott thrombocyták elzárják a nyílást, ami a záródási időt (CT) adja meg, másodpercben.

Bodipy fluorochrom jelölés 1.

Közvetlenül a használata előtt 5 mM bodipy-maleimid-et 1:10-re felhígítottuk HEPES/fiz. sóban és ebből 5 μ L-t adtunk 1 mL gélfiltrált thrombocytához, amit 37 C fokon, 5 percig inkubáltunk. A bodipy-maleimid végkoncentrációja 2.5 μ M. 10 μ L bodipy jelölt thrombocytához 80 μ L 1 μ L/mL biotin-fibrinogént tartalmazó reakció puffert és 10 μ L aktivátort adtunk. Az agonisták végkoncentrációja a reakció elegyben: 0.5 U/mL thrombin, 500 ng/mL convulxin, 1 μ M A23187, külön-külön, vagy egymással kombinálva. Nagy dózisú thrombin + convulxin esetén a thrombin koncentrációját 2.5 U/mL-re emeltük, míg a convulxin maradt 500 ng/mL. A mikropartikula vizsgálathoz a mintákat a vérlemezke aktiválás után 1:100-ra felhígítottuk HEPES/fiz. só-val. A coated-thrombocytá százalékos meghatározáshoz 20 μ L reakciós oldatot adtunk 6 μ g/mL PE-SA-t tartalmazó 100 μ L HEPES/fiz. só-hoz. Szobahőn 5 perc múlva 1 %-os formalinnal fixáltuk és hígítottuk flowcytometriás vizsgálathoz a korábbiak szerint.

Bodipy fluorochrom jelölés 2.

A bodipy-maleimid-et a vérlemezke aktiválás után is hozzá lehet adni a reakció elegyhez, így ki lehet küszöbölni a festék esetleges vérlemezke aktivációra kifejtett hatását. 10 μ L vérlemezke (4×10^7 /mL HEPES/fiz. só) adtunk 80 μ L 1 μ g/mL biotin-fibrinogént tartalmazó pufferhez, amit 10 μ L agonista keverékkel 15. oldal aktiváltunk. 5 perc aktiválás után 10 μ L 5 μ M-os bodipy-maleimid-et tettünk minden kémcsőbe és 10 perc jelölés után 1:100-ra hígítottuk HEPES/fiz. só-val a mikropartikulák vizsgálatához. A coated-vérlemezkeket a korábban leírtak szerint mutattuk ki.

Mitokondriális átmeneti permeabilitási pórus (**mitochondrial permeability transition pore**) aktivátor vizsgálat

A bodipy-jelölt convulxinnal és thrombinnal aktivált thrombocytákhoz 1 perc aktiválás után PAO-t, vagy diamid-et adtunk, úgy, hogy a végkoncentráció 6-50 μM (PAO) ill. 60-250 μM (diamid) legyen. A teljes aktiváció 10 percig 37 C fokon történt.

Konfokális mikroszkópia

A konfokális képek Leica TCS NT (Heidelberg, Németország) mikroszkóppal, 100x objektívvel, 1.4 numerikus apertúra mellett készültek. A használt lézerek a következők: 488 nm Argon, 568 nm Krypton, 633 nm Helium-Neon.

Áramlási cytometria bodipy-jelölt vérlemezke esetén

A flowcytometriás vizsgálatok FACS-Calibur (Becton Dickinson, Mansfield, MA, USA) gépen, 15 mW argon lézerrel és a CellQuest programmal történtek. Minden beállítás logaritmikus volt. Az ellenirányú szórás (Forward Scatter, FSC) E02, az oldalszórás (Side Scatter, SSC) 475 V, FL1 600 V volt. Az adatokat kb. 100-as FL1 küszöbvel gyűjtöttük. Másodlagos küszöbérték nem volt. Az HEPES/fiz. só-ban 1:100-ra hígított aktivált thrombocytá mintákat 90 másodpercig mértem közepes áramlással (35 $\mu\text{L}/\text{perc}$). Az FL1 küszöbértéket úgy változtattuk, hogy a nem aktivált kontroll esetén az összes esemény 50/perc alatt legyen. A mérést a thrombocytá aktiváció és a minta hígítása után 30 percen belül elvégeztük. A biotin-fibrinogénnel és bodipy-vel jelölt coated-thrombocyták mérése a következő beállítással történt: FSC E00-n, SSC 330 V, FL1 560 V, FL2 560 V. A kompenzációk: FL1 – 0.8%FL2 és FL2 – 40%FL1.

Coated-thrombocytá kimutatás cinkmentes diétán tartott egereknél

A helyi állatkísérleti szabályok betartásával BALBc egereket kereskedelemben kapható cinkmentes tápszerrel etettünk és cinkmentes vízzel itattunk. Az elkábított egerekből kardiális szúrásból 1 ml citráttal alvadásgátolt vért vettük. A vérminta további feldolgozása és a coated-thrombocyták kimutatása megegyezett a humán kísérleteknél alkalmazott eljárással.

Betegek és módszerek essentialis thrombocythaemiás betegek vizsgálatánál

A DEOEC II. Belklinikán ez idő szerint 175 ET-s beteget gondozunk. A betegek kisebb része, a kis-rizikójú betegek, nem igényelnek kezelést, vagy csak thrombocytá gátló szereket kapnak (aszpirin, clopidogrel). A nagy trombólízis rizikóval rendelkező betegek (60 év felett, trombotikus esemény az anamnézisben), vagy nagy vérzéses rizikójú betegek (>1500 G/L thrombocytaszám) mindenesetben citoreduktív kezelésben részesülnek. Ez az esetek legnagyobb részében hydroxyurea (Litalir, Bristol-Myers Squibb), vagy anagrelid (Thromboreductin, AOP Orphan) terápiát jelent.

Mivel korábbi közlések szólnak arról, hogy az NSAID szerek és a cukorbetegség befolyásolhatják a coated-thrombocytá termelődést [80,81], ezért a vizsgálatba olyan betegeket válogattunk be, akik nem diabéteszesek és nem szednek NSAID-ot, anagrelidet. A vizsgálati csoport homogénné tétele érdekében trombólízis és vérzés szempontjából negatív anamnézisű pácienseket választottunk.

Flowcytometriás módszerrel 43 ET betegben határoztuk meg a coated-thrombocytá arányt és a P-selectin (CD62) pozitivitást és ezeket hasonlítottuk 31 egészséges kontroll eredményeihez. A 43 betegből 15 nem kezelt és 28 HU kezelésben részesült. Emellett még vizsgáltuk vérlemezke funkciót PFA-100 módszerrel.

Statisztika

Az adatokat a Student t-teszttel hasonlítottuk össze és a statisztikai szignifikancia $P < 0.05$ volt. Az MPTP-s mikropartikula termelődési adatokat páros t-teszttel értékeltük.

Az ET-s betegek adatainak a feldolgozása során a Kolmogorov-Smirnov tesztet használtuk a normalitás értékelésére. Lineáris regressziót használtunk a nem, a reticulocytá-szám és a thrombocytá-számnál. A csoportok közti variancia analízis Kruskal-Wallis teszttel történt, $p < 0.05$ alatt értéket tekintettük szignifikánsnak. Statisztikai programként a SPSS-t ver. 13.0 (SPSS inc., Chicago, IL, USA) használtuk.

Eredmények

I/1. A cink és a coated-thrombocyták kapcsolata

Bevezetés

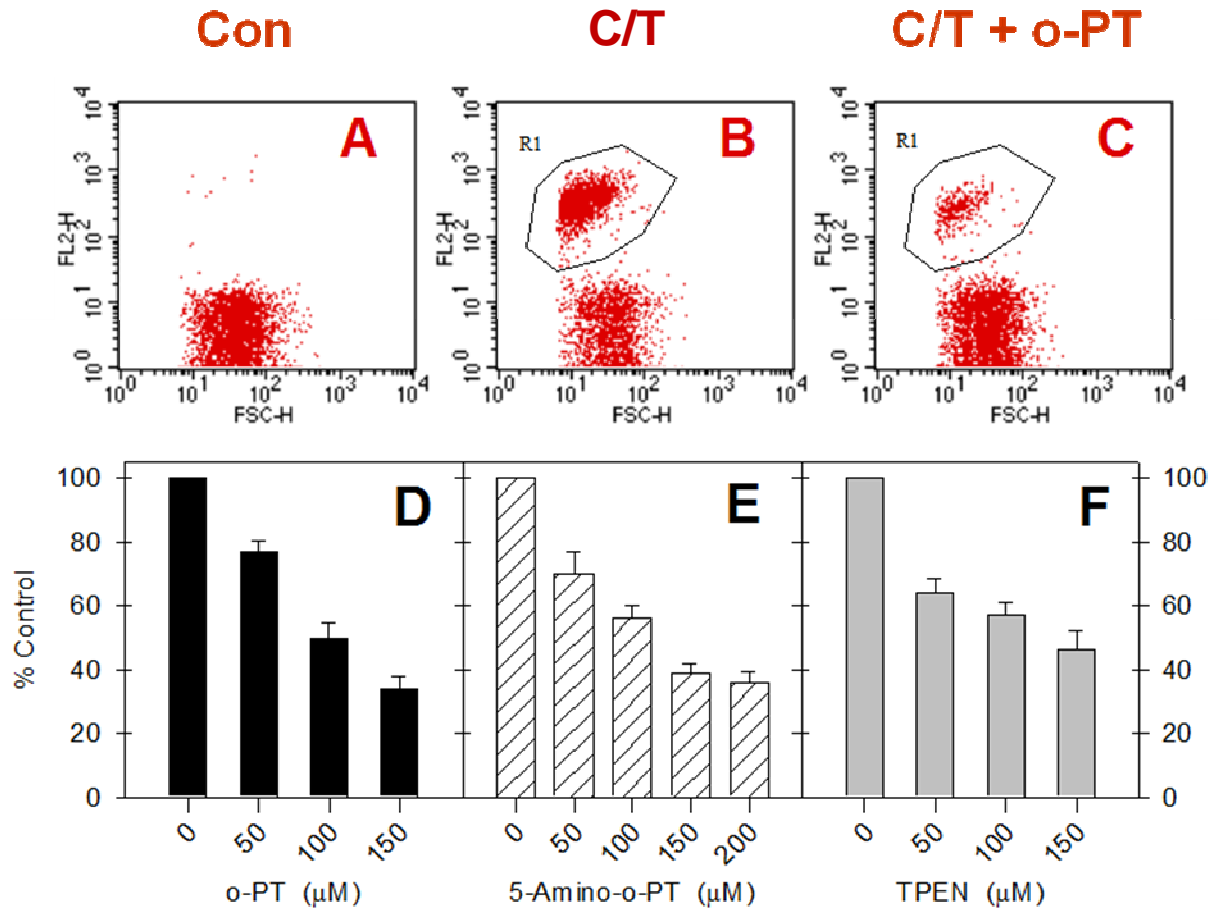
A cink nyomelemként, viszonylag állandóan nagy koncentrációban van jelen az agyban, szívben, tüdőben, izomzatban, míg a vérben, csontban, herében, hajszáliban a bevitt mennyiségtől függően változik a szintje. A thrombocyták, a többi sejthez képest, nagy mennyiségben tartalmaznak citoplazmatikus cink iont (400-800 μM), döntően a citoplazmában ill. a denz testecskékben [21,22]. Ennek fiziológias magyarázata nem ismert. A cink szerepet játszik csaknem minden biológiai folyamatban a membránstabilizálástól a sejt növekedésig. Hiánya sebgyógyulási, növekedési, idegrendszeri zavarokhoz vezet. Közlések vannak a cink és a primer hemosztázis kapcsolatáról [23,24,25]. A cink hiány ugyanakkor vérzéses diatézishez vezet [26,27]. Ezek miatt felmerült, hogy a cinknek szerepe lehet a coated-vérlemezkék kialakulásánál, működésénél.

Eredmények

Cink kelátorok hatását vizsgáltuk a coated-thrombocytá produkcióra. Az extracelluláris cink kelátor o-phenanthroline, 5-amino-o-phenanthroline és TPEN mindegyike csökkentette a coated-vérlemezkék mennyiségét mind kettős (convulxin + thrombin), mind hármas (convulxin + thrombin + ADP) aktiválás esetén. 150 μM o-phenanthroline bizonyult a legerősebb gátló hatásúnak, 66 \pm 12%-kal csökkentve a coated-vérlemezkék termelődését. (8. ábra)

A thrombocyták intracelluláris cink tartalma ugyanakkor a 40 \pm 17%-kal csökkent a hármas aktiváció során. (1. táblázat) A μM -os koncentrációjú cink valószínűleg aktívan részt vesz a coated-vérlemezkék képződésében. A szerotoninált α -granulum eredetű fehérjék kötődését erősítheti az immobilizált fibrinogénhez. Emellett szól az a megfigyelés, hogy 50 μM cink 56%-kal csökkentette a biotin-BSA-szerotonin fibrinogénhez kötődés EC_{50} értékét (9. ábra).

A cink szerepe mellett szól az is, hogy 40 napig cinkmentes diétán tartott patkányok szignifikánsan kevesebb coated-thrombocytát képeztek kettős agonista stimulusra (10. ábra).



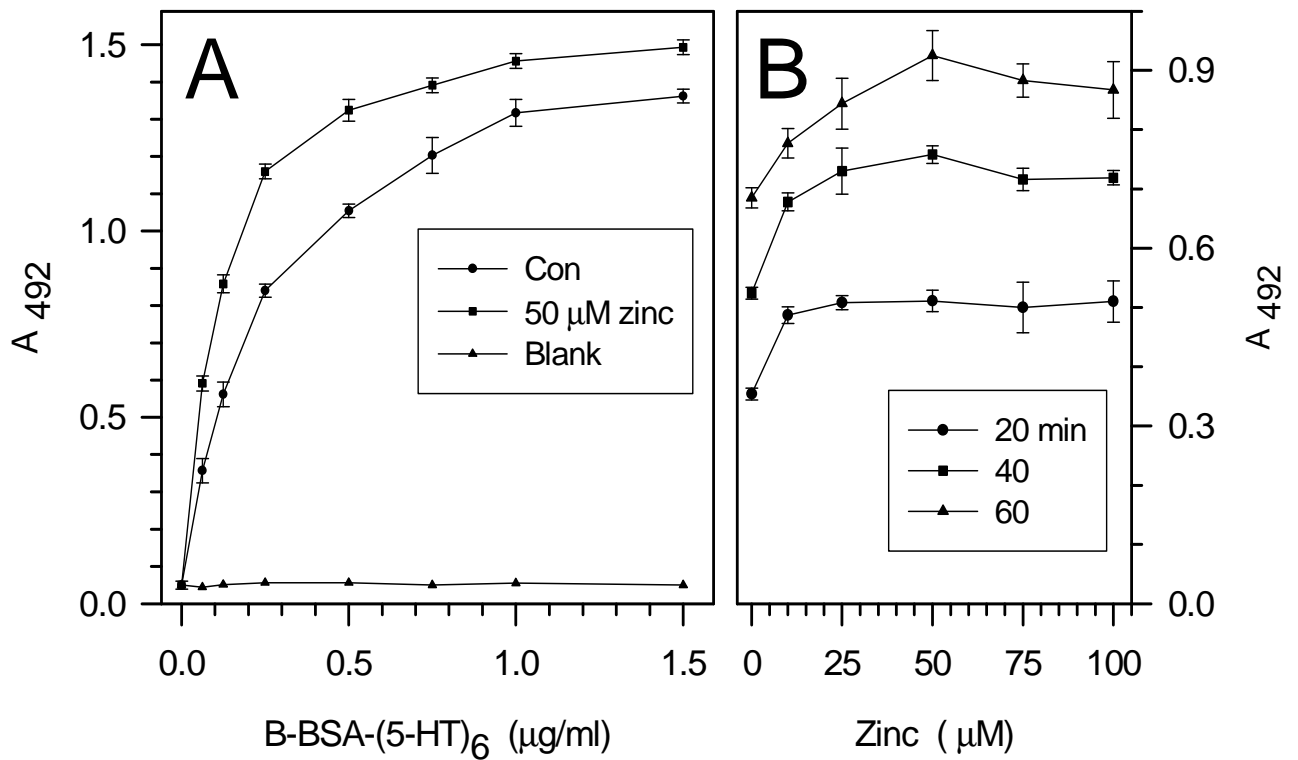
8. ábra [28] Extracelluláris cink kelátorok hatása a coated-thrombocyták képződésére. A: nyugvó thrombocyták. B: convulxin és thrombin egyidejű aktiválással coated-thrombocyták alakulnak ki (R1 terület). C: 150 μM o-phenanthroline (o-PT) 80%-kal csökkenti a coated-thrombocyták arányát. D, E, F: három cink kelátor dóziszfüggő coated-thrombocyták gátló hatása.

| | |
|-----------------------|---|
| Kontroll vérelemezkek | $0.243 \pm 0.036 \mu\text{g Zn} / 10^9 \text{ thr}$ |
| Coated-thrombocyták | $0.146 \pm 0.047 \mu\text{g Zn} / 10^9 \text{ thr}$ |
| % változás | $40 \pm 17 \%$ n=15 p<0.001 |

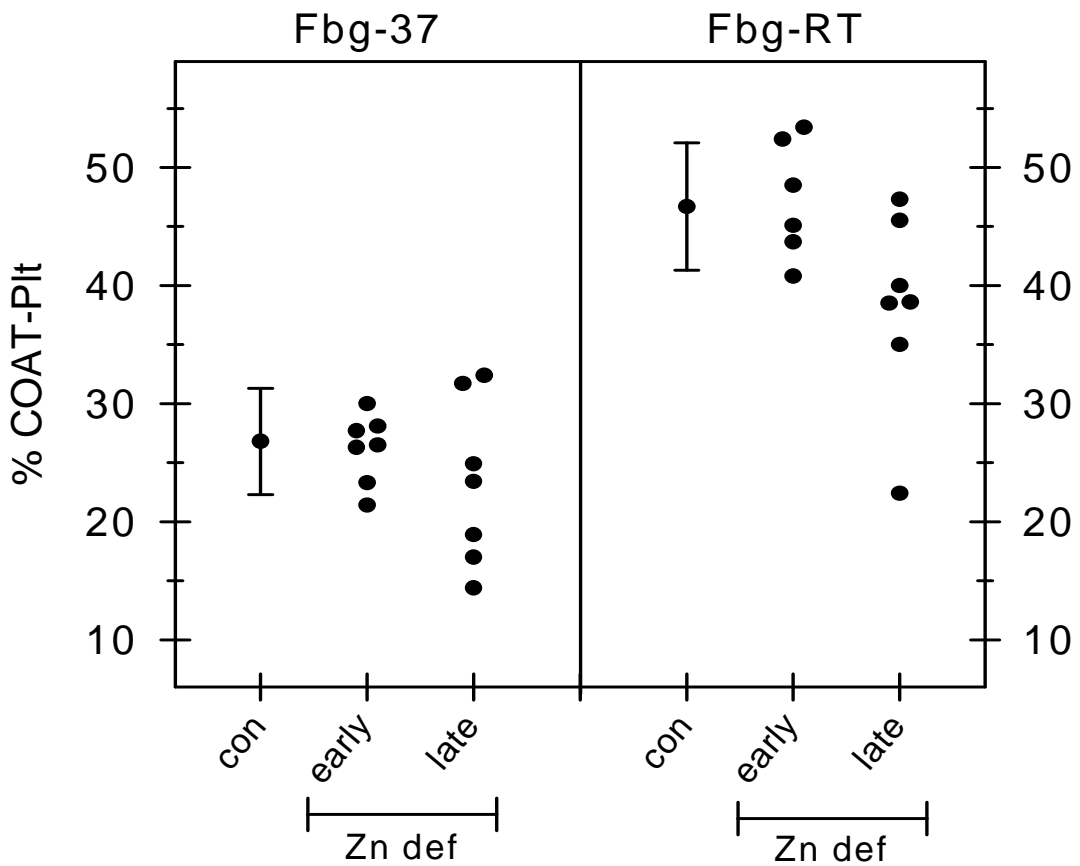
1. táblázat [28] Teljes cink-szint kontroll és coated-thrombocytákban. Az intracelluláris cinktartalom csökken coated-thrombocytá kialakulása során. A gélfiltrált vérelemezkek, hármagonista aktiváció során (convulxin + thrombin + ADP) az intracelluláris cink 40 %-t elvesztették.

Megbeszélés

Elmondható, hogy a cink ion szerepe a vérelemezke működésében nem ismert pontosan. Kísérleteink azt a meglepő eredményt hozták, hogy az extracelluláris cink kelátorok gátolják a coated-thrombocytá képződést. A coated-thrombocyták aktivációjuk során az intracitoplazmatikus cinktartalmuk 40%-át elvesztik. Ez a sejtekből kiáramló cink a coated-thrombocyták felszíni fehérjeburkának megszilárdításában vesz részt. A szerotoninált α -granulum eredetű fehérjék fibrinogénhez és thrombospondinhoz való kovalens kötődését facilitálják, mint ahogy kísérletes körülmények között a szerotoninált albumin fibrinogénhez kapcsolódását dózistól függő mértékben fokozta. A cink hiány állatmodellekben vérzészavart okoz. További adatot nyertünk a cinkmentes diétán tartott egerekkel. Minél hosszabb ideig tartott a cinkmegvonás, annál jobban csökkent a coated-thrombocytá populáció aránya az aktivált vérelemezkekénél.



9. ábra [28] A cink fokozza a szerotoninált albumin fibrinogénhez kapcsolódását. Az extracelluláris cinknek szerepe lehet a szerotoninált α -granulumból származó fehérjéknek a fibrinogén és thrombospondinon lévő szerotonin kötőhelyekhez kapcsolódásában. Szerotoninhoz (5-HT) kapcsolt albumin (bovine szérum albumin) fibrinogén kötődését vizsgáltuk ELISA módszerrel. A cink fokozza a biotin-BSA-(5-HT)₆ kötődés sebességét és mértékét az immobilizált fibrinogénhez.



10. ábra [28] Coated-thrombocyták cink hiányos egerekben. 40 napig tojásfehérje bázisú, cinkmentes étrenden tartott (Zn def) BALBc egerek és cink szuplementációban részesülő kontroll egerek coated-thrombocytá képző képessége látható biotin-fibrinogén assay-vel 37 °C-on és szobahőn. COAT-Plt: coated-thrombocyták, con: kontroll egerek, early: a cinkmentes diéta elején (3-29 nap), late: a diéta végén (30-40 nap) végzett coated-assay. A késői szobahős minták szignifikánsan kevesebb coated-thrombocytát képeztek.

I/2. Pórusképződés a coated-vérlemezké kialakulása során

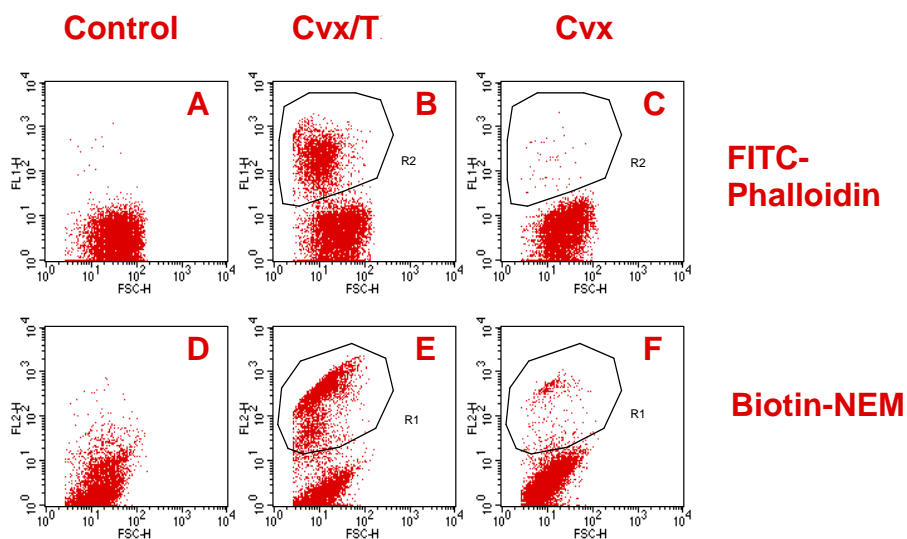
Bevezetés

A cink ion és a coated-thrombocyták összefüggését vizsgáló flowcytometriás vizsgálatok során a következő érdekes megfigyelést tettük: az intracelluláris cink kelátor Newport-greenel jelölt nyugvó vérlemezkék, miközben coated-vérlemezkékké alakultak a kelátor festék egy részét „elvesztették”, miközben a vérlemezkék nagysága (flowcytometriás vizsgálattal nézve a FSC) érdemben nem változott. A Newport-green „kifolyt” a sejtekből. Ez úgy lehetséges, hogy a coated-vérlemezkék kialakulásával a sejtmembránon lukak, pórusok alakulnak ki, amin keresztül intracelluláris anyag juthat a külvilágba. Mivel a Newport-green molekulamérete ismert, a pórus legalább akkora kell legyen, hogy az átférjen rajta.

Eredmények

A folyamat fordítva is működik: a gyilkos galóca mérgeinek egyik összetevője, a phalloidin, nem tud az extracelluláris térből a sejtmembránon keresztül a thrombocytá belsejébe jutni. Convulxin és thrombin egyidejű stimulációja után azonban a phalloidin már megjelenik a coated-thrombocyták belsejében, ahol az F-aktinhoz kötődik. Ha a phalloidint fluoreszcens festékkel jelöljük, akkor flowcytométerrel pontosan detektálható a coated-thrombocyták „fényesedése”, ahogy a FITC-phalloidin a sejtekbe jut (11. ábra). Mivel a FITC-phalloidin molekula mérete szintén ismert, ez is felhasználható a szükséges pórusméret meghatározására. A szintén az F-aktinhoz kötődő FITC-DNáz és anti-aktin IgG azonban már nem képes a sejteket megjelölni, csak saponin előkezelés után, ami a sejtmembránt roncsolja. (2. táblázat)

A pórus ezen meghatározás szerint 2100-3400 dalton maximális tömegű molekulák átengedésére képes.



11. ábra [28] Membrán impermeábilis próbák bejutása a coated-thrombocytákba. A coated-thrombocyták membránja átmenetileg átengedi a nagy molekulákat. A coated-thrombocytákat FITC-phalloidinnel inkubálva, a fluoreszcens jelzésű phalloidin az intracelluláris F-aktinhoz kötődik, ha az aktiváció convulxin+ thrombinnal történik (coated-thrombocyták képződés, 11/B). Aktiválás nélkül (11/A) vagy csak convulxin aktiváció után (nincs coated-thrombocyták, 11/C) a FITC-phalloidin nem jut be a sejtbe. Hasonló eredményre jutunk másik F-aktinhoz kötődő makromolekula esetén (Biotin-maleimid) (11/D, E, F).

Membrán pórus méret a COATED-thr-ban

| | | <u>molekula súly</u> |
|--------------|-------------------------------------|----------------------|
| Igen: | Fluorescein | 332 |
| | Biotin-maleimide | 452 |
| | Calcein | 623 |
| | FITC-phalloidin | 1,252 |
| | Alexa-phalloidin | 1,950 |
| | FI-CP₁₅-maleimide | 2,139 |
| Nem: | A-chain-maleimide | 3,380 |
| | FITC-DNase | 31,000 |
| | Anti-actin-IgG | 150,000 |

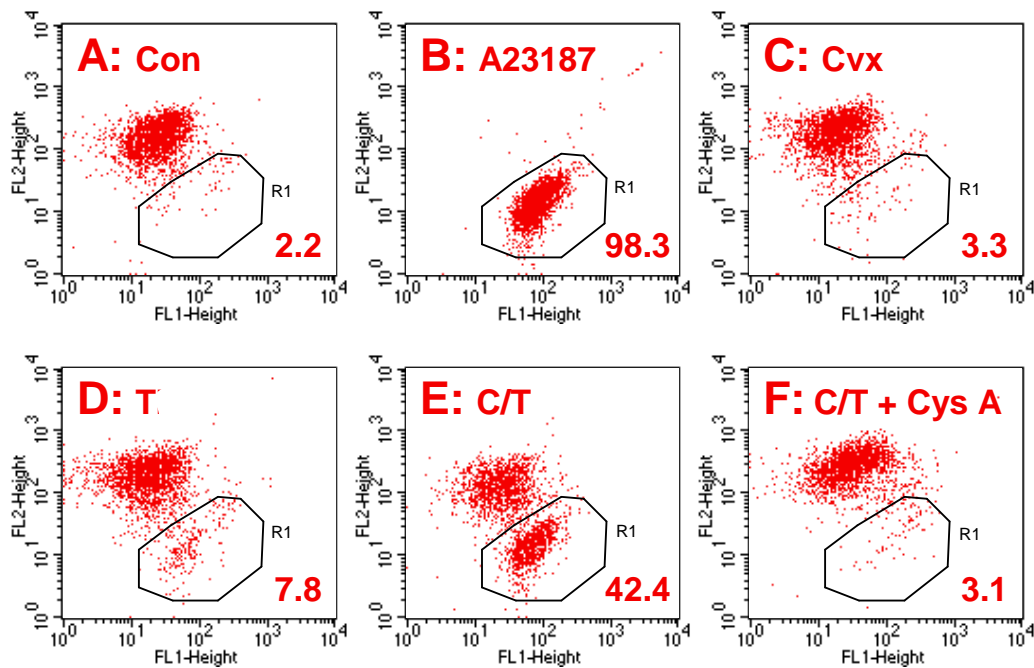
2. táblázat [28]: A coated-thrombocytá membrán pórus mérete. Coated-thrombocytá szintézis során a 332-2139 dalton közötti molekulák átjutnak a sejtmembránon, míg az ennél nagyobb molekulaméretű próbák nem illetve csak a membránroncsoló saponin előkezelés után.

Ilyen méretű csatorna a mitokondrium membránjában lévő, az apoptózis során átmenetileg kialakuló pórus az *átmeneti mitokondrium permeabilitási pórus* (mitochondrial permeability transition pore, MPTP). Az MPTP 2.5 nm átmérőjű csatorna, ami 1500 dalton cut off-al rendelkezik, több alkotórészből áll:

- adenin nukleotid transzlokáz
- feszültségfüggő ion csatorna
- perifériás benzodiazepin receptor
- egyéb fehérjék

Apoptózis szignálkor többek között ez a csatorna aktiválódik, ami együtt jár a mitokondrium duzzadásával és a citokróm-c sejtbe áramlásával és a caspas-3 és caspas-9 aktivációval. Több irodalmi adat szól a thrombocyta aktivációja és az apoptózis hasonlóságára. [29,30,31] A thrombocyta szintézis [32,33] és a tárolt thrombocyta készítményben létrejövő változások is mutatnak hasonlóságot az apoptózissal [34,35]. Ilyen változás például a mitokondrium integritásának a megváltozása, a sejtorganelum potenciál a $\Delta\Psi_m$ csökkenése, elvesztése [36]. Amennyiben az MPTP részt vesz a coated-thrombocyta képződésben, akkor feltételezhetően az MPTP gátlásával csökken és aktiválásával fokozódik a coated-thrombocyta produkció. Ezen hipotézis igazolására az MPTP gátló cyclosporin-A, coenzym Q, bongkrekic sav, valamint az MPTP aktiváló atractyloside, fenil-arzenoxid (PAO) és diamide hatását vizsgáltuk a mitokondrium potenciálra a coated-thrombocyta képződés során.

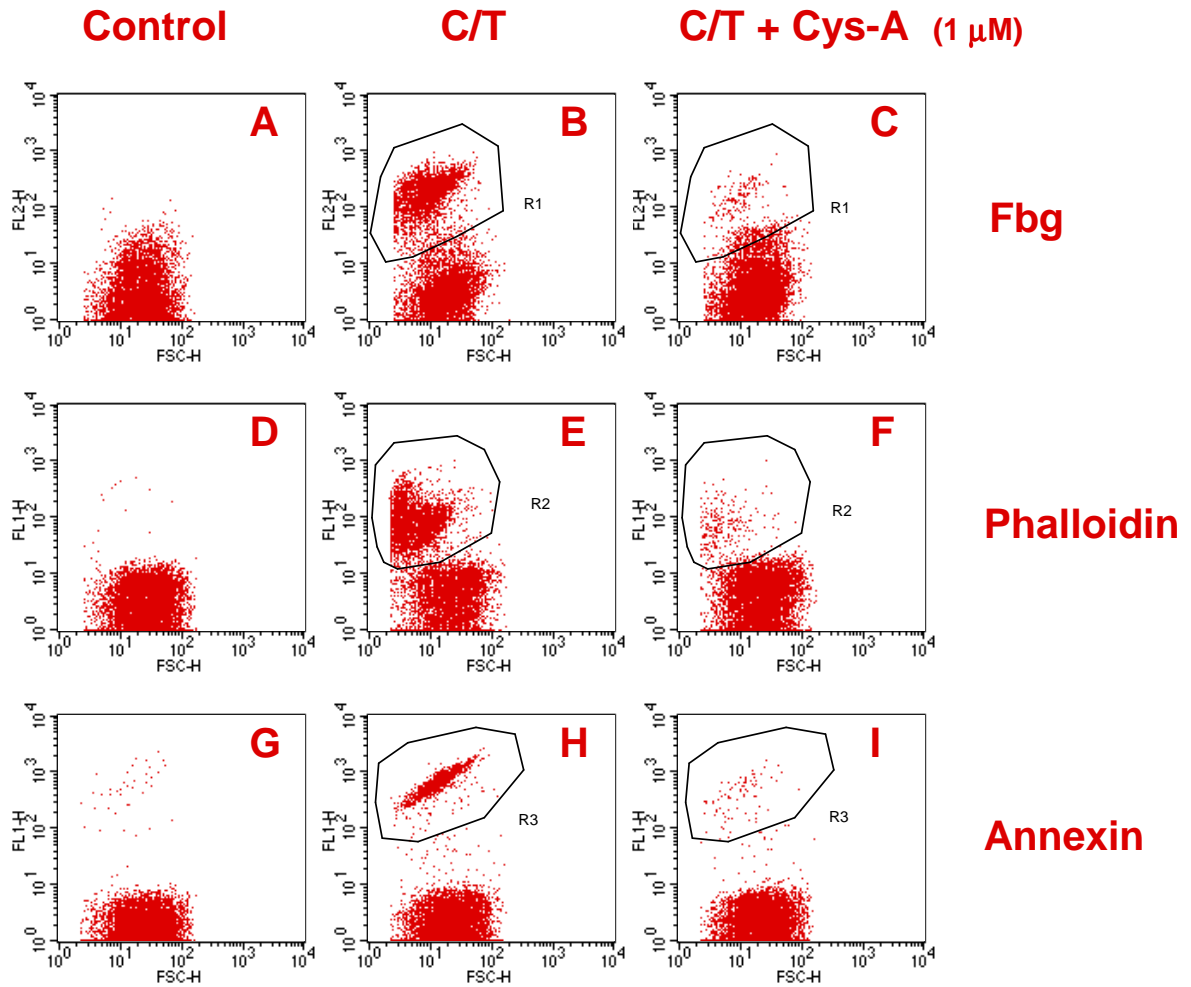
A JC-1 egy fluoreszcens festék, ami a mitokondrium potenciálra ($\Delta\Psi_m$) érzékeny és annak mértékétől függően festi meg a sejteket. Ennek megfelelően a nyugvó (teljes mitokondrium integritással rendelkező) vérlemezkék nagy intenzitással jelölődnek (12/A ábra). Kalcium ionofor A23187 alkalmazása csaknem az összes aktivált thrombocyta potenciálját megszüntette (12/B ábra), convulxin alig (3.3%) és thrombin kis mértékben (7.8%) okozta a $\Delta\Psi_m$ összeomlását (12/C és D ábra). Convulxin és thrombin egyidejű aktiválással az aktivált thrombocyta 42.4%-nak szűnt meg a potenciálja. Ahogy az a 12/E ábrán látható ezen szubpopuláció FL2 intenzitás csökkenése jelzi a megszüntét, ugyanakkor ezek a thrombocyta a coated-thrombocyta, amit a jelzett anti-fibrinogén kötődés igazol. A convulxin + thrombin aktivációhoz adott cyclosporin-A meggátolja a $\Delta\Psi_m$ csökkenést és a coated-thrombocyta kialakulását (12/F ábra).



12. ábra [37] Aktivált vérlemezkék mitokondriális depolarizációja, JC-1 fluoreszcencia. FL1: FITC-anti-fibrinogén fluoreszcencia intenzitás, FL2: JC-1 fluoreszcencia intenzitás. A gélfiltrált vérlemezkéket különböző agonistákkal aktiváltuk, majd JC-1 festékkel inkubáltuk. A: kontroll thrombocyták, intakt mitokondrium potenciállal ($\Delta\Psi_m$), magas FL2 jelölődéssel. B: A23187 ionofor alkalmazására csaknem teljesen megszűnik a mitokondrium potenciál, amit a FL2 intenzitás csökkenése jelez, a sejtek 98.3 %-a az R1 kapuban van. C: convulxinnal történő thrombocyta aktiváció érdemben nem befolyásolja a JC-1 fluoreszcenciát, thrombin aktiválás önmagában (D) 7.8%-ban okozza a $\Delta\Psi_m$ összeomlását (R1 terület). E: convulxin és thrombin (C/T) egyidejű aktivációjával az aktivált vérlemezkék jelentékeny (42.4 %) része kerül az R1 kapuba, azaz az FL1 intenzitás nő, míg az FL2 intenzitás csökken. F: 4 μ mol/L cyclosporin-A (Cys-A) adva a C/T aktiváció mellett nem csökkent az FL2 fluoreszcencia.

A cyclosporin-A a peptidyl prolyl cis/trans izomeráz gátlója, ami az MPTP kialakulásához szükséges, így meggátolja a mitokondrium potenciál csökkenését, azaz a 12/E ábrán az FL2 csökkenését. Hogy megbizonyosodjunk, hogy ez egyidejűleg a coated-thrombocyta képződését is meggátolja három, a coated-thrombocyta jellegzetes, próbát alkalmaztunk: a fibrinogén retenciót, a phalloidin beáramlást és a foszfadil-szerin jelölődést (13. ábra)

Az MPTP inhibitorok tehát egyidejűleg a coated-thrombocyták termelődését is meggátolták. Hogy az MPTP és a coated-thrombocyták közti kapcsolatot megerősítsük, MPTP aktiváló ágenseket is megvizsgáltunk. Ilyen anyag a fenil-arzenoxid (PAO). Convulxin + thrombin aktivált thrombocytákhoz, az agonistákkal együtt, vagy a reakció 60. másodpercéig adott PAO 80%-kal növelte meg a coated-thrombocyták arányát, bármelyik coat-thrombocytát kimutató módszert alkalmaztunk is (fibrinogén, phalloidin, annexin). Diamide, egy másik MPTP aktivátor ugyancsak dózisfüggő módon erősítette a coated-thrombocyták képződését, a PAO-hoz hasonlóan, ugyanakkor egyikük sem volt képes egyedül (convulxin + thrombin nélkül) coated-vérlemezeket létrehozni. Még egy aktivátort teszteltünk, az atractylosidet, ami azonban csak az annexin pozitívítást emelte, a többi coated-thrombocyták specifikus próba negatív lett. A 3. táblázat mutatja a vizsgálatok összefoglalását: gyakorlatilag az összes MPTP gátló gátolta, míg az aktivátorok fokozták a coated-thrombocyták arányát convulxin + thrombin stimulusra.



13. ábra [37] Három coated-thrombocytá specifikus próba, nyugvó (control), convulxinnal és thrombinnal egyidejűleg aktivált thrombocyták (C/T) és ehhez adott 1 μ M cyclosporin-A (C/T + Cys-A) esetén. Nyugvó thrombocyták esetén nincs coated-thrombocytá populáció (A, D, G), C/T aktivációval a coated-thrombocytákra jellegzetes szubpopuláció alakul ki (B, E, H ábrákon az R1, R2 ill. R3 régió). Cys-A hatékonyan gátolja a coated-thrombocyták kialakulását (C, F, I).

| | MPTP | Coated-thrombocyt marker | | |
|----------------|------|--------------------------|----|---------|
| | | B-Fbg | PS | calcein |
| Cyclosporin-A | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Coenzim Q | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Bongkrekik sav | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Atractyloside | ↑ | ± | ↑ | ↑ |
| PAO | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| Diamide | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |

3. táblázat [37] Az MPTP-t gátló cyclosporin-A, coenzim Q, bongkrekik sav, valamint az MPTP aktiváló atractyloside, fenill-arsénoxid (PAO) és a diamide hatása a coated-thrombocyt képződésre. A különböző coated-thrombocyt markerek (Biotin-fibrinogén és foszfatidil-szerin jelölődés, calcein vesztés) egyformán viselkednek: az MPTP gátlók gátolják, az aktivátorok fokozzák a coated-thrombocyt képződést.

Megbeszélés

Elmondható, hogy a coated-thrombocyt képződés során a thrombocytákon pórusok képződnek. Ezek a pórusok 2100-3400 dalton maximális tömegű molekulák átengedésére képesek. Ilyen pórus a MPTP. Az MPTP az apoptózisban vesz részt. Az MPTP gátlók a coated-thrombocyták kialakulását is gátolják, míg az aktivátorok a coated-thrombocyták kialakulását is elősegítik. Ez újabb bizonyíték amellet, hogy a coated-thrombocyták kialakulása során részt vevő mechanizmusok, legalább is részben, közösek az apoptózissal.

I/3. A thrombocytá mikropartikulák és a coated vérlemezkék kapcsolata

Bevezetés

A thrombocytá mikropartikulák 0.1-1 μm átmérőjű, szabálytalan alakú részecskék, melyek thrombocytá aktiváció során az aktivált thrombocytákról válnak le. Ezek a leggyakoribb mikropartikulák a szervezetben. Jellegzetességük, hogy számos a thrombocytákon ill. a thrombocytákban meglévő fehérjét tartalmaznak pl. P-selectin, GPIb, GPIIb/IIIa, GPIV, GPV, GPIX, vWF, fibrinogén, FV, FVIII, thrombospondin, protein-S [38], caspase, citokrom-C [39]. További tulajdonságuk a felszíni foszfatidil-szerin pozitivitás, ezáltal a felszíni negatív töltés. Ezeknek köszönhetően fokozzák a tenáz, prothrombináz aktivitást [40], a koagulációt. Számos betegségben észlelték a thrombocytá-mikropartikulák emelkedett szintjét: SLE, sarlósejtes vérszegénység, paroxysmális nocturnalis haemoglobinuria, krónikus myeloproliferatív betegségek, cukorbetegség, veseelégtelenség, magasvérnyomás [41]. Mivel a coated-vérlemezkék is foszfatidil-szerinnel rendelkeznek az extracelluláris felszínükön kézenfekvő a lehetséges kapcsolat a coated-thrombocyták és a thrombocytá mikropartikulák közt.

A mikropartikulák számos módszerrel mutathatók ki: elektronmikroszkóp, konfokális mikroszkóp, immunoblott technika, áramlási cytometria. Mindegyiknek megvannak az előnyei és hátrányai. A vizsgálatokhoz olyan megbízható metodikát kellett találni, ami pontos mennyiségi számítást ad a thrombocytá aktiváció, coated-vérlemezkék képződése során kialakult mikrorészecskékről.

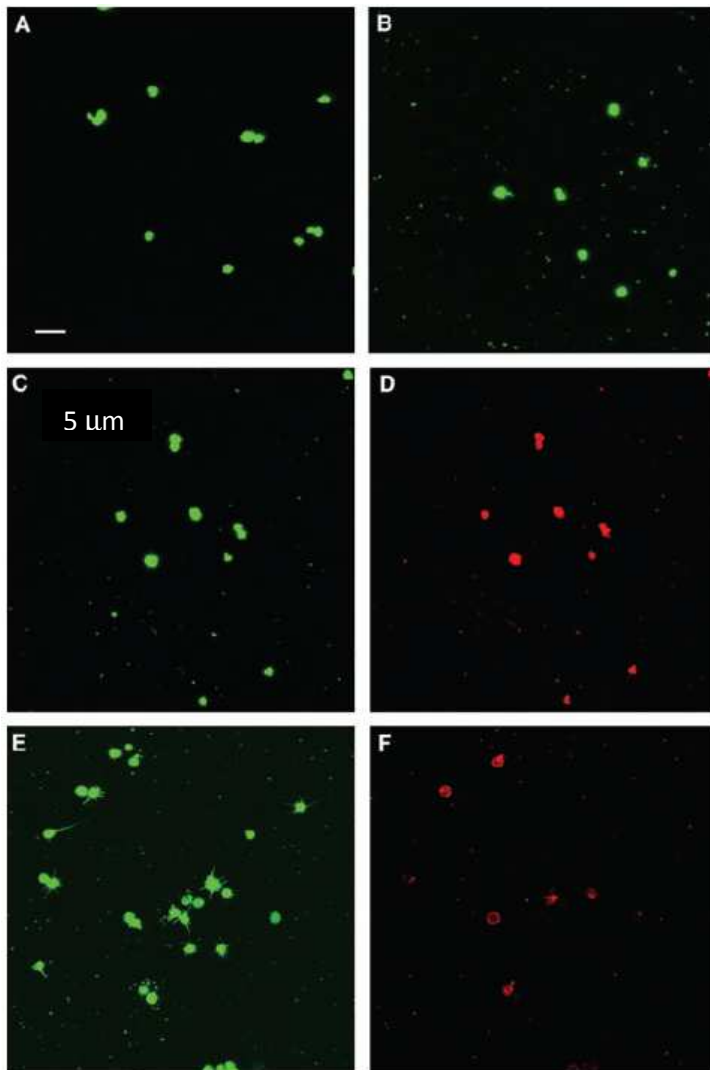
Mivel a coated-thrombocyták vizsgálatához leggyakrabban az áramlási cytometriát alkalmaztuk, ezért a mikropartikulákhoz is ezt szerettem volna használni. Ezzel a szokásos, a thrombocytá felszínén lévő különféle antigének pl. a nagy mennyiségben jelen lévő GPIIb/IIIa vagy GPI/b antigén ellenes antitest jelöléssel is lehetséges a thrombocyták és mikrorészecskék kimutatása, azonban van egy probléma: a mikropartikulák átlagosan 0.4 μm átmérőjűek, 0.03 fl térfogatúak, ami a nyugalmi vérlemezke (8 fl) kb. 0.4%-a. Ezáltal a fluoreszcens jelölése is ezzel lesz arányos, tehát 2-3 nagyságrenddel halványabbak lesznek a vérlemezkékénél, ami szinte lehetetlenné, ill. megbízhatatlanná teszi az áramlási cytometriás értékelést, ugyanis ez már a gépzaj tartományába esik bele. Ezért egy olyan festéket kellett találni, ami 100-1000-szer erősebben jelöli a vérlemezkéket. Ilyen festék a bodipy-maleimid. Ez

egy tiol reagens, ami a citoplazma membránon áthatolva nem specifikusan kötődik a citoplazma fehérjékhez. Ha ezt az anyagot a vérlemezkékkel inkubáljuk, akkor azok felveszik és megkötik a festéket, és lézer fényvel megvilágítva zöldes-sárgán fluoreszkálnak. Az így előkezelt thrombocyták aktivációjuk során mind a teljes vérlemezkék, mind az arról lefűződő mikropartikulák fluoreszkálnak, ezáltal áramlási cytometriával ill. konfokális mikroszkóppal is jól vizsgálhatóak.

Eredmények

1. Konfokális mikroszkópos eredmények

A gélfiltrált vérlemezkéket a membrán permeábilis fluoreszcens bodipy-maleimiddel (2.5 μM), egy tiol reagenssel jelöltük. A 14. ábrán láthatóak az intenzíven fluoreszkáló jelölt vérlemezkék. Ha a bodipyvel előinkubált sejteket convulxinnal és thrombinnal aktiváljuk, akkor nagy mennyiségű 0.3-0.5 μm átmérőjű mikropartikula képződik (14/B ábra). Konfokális mikroszkóppal további felszíni antigéneket vizsgáltunk az aktivált vérlemezkéken és a mikropartikulákon. FITC-anti GPIIb/IIIa antitestet használva látható, hogy az összes vérlemezke és mikropartikula felszínén megtalálható ez az integrin (14. C, D ábra), míg Alexa-568-annexinnel az összes mikropartikula, ugyanakkor a thrombocyták csak egy része (a coated-thrombocyták) bizonyult pozitívnak, azaz foszfatidil-szerint expresszálnak (14. E, F ábra).



14. ábra [42] A vérlemezke mikropartikulák konfokális mikroszkópos vizsgálata. A. A bodipy-maleimiddel jelölt vérlemezkek intenzíven világítanak. B. Convulxinnal és thrombinnal koaktivált thrombocyták. Számos apró mikropartikula jelent meg ($0.3-0.5 \mu\text{m}$). A C és D ábra ugyanazt a látóteret mutatja, C. Bodipy festés D. Alexa-568 anti-GPIIb/IIIa (mAb TAB). Látható, hogy a mikropartikulák GP IIb/IIIa-ra pozitívak. E, F ugyanaz a látótér: E bodipy festés, F: Alexa-568-annexin festés, ami a felszíni foszfatidil-szerint jelöli. Látható, hogy minden mikropartikula PS pozitív, ugyanakkor convulxin + thrombin aktivációval a thrombocyták csak egy része PS pozitív, azok a coated-thrombocyták.

2. A bodipy-jelölt mikropartikulák áramlási citometriás vizsgálata

A konfokális mikroszkópiás vizsgálat alapján a thrombocyta mikropartikulák átlagos átmérője $0.4\ \mu\text{m}$ és a számított térfogata $0.03\ \text{fL}$, ami az átlagos vérlemezke térfogatának ($8\ \text{fL}$) 0.4% -a. Ebből adódóan a fluoreszcens intenzitása is a nyugvó vérlemezke 0.4% -a lesz. Ráadásul a kis méretből adódóan a fluoreszcens jelet könnyen elfedheti a gép „háttérzaja”, ezért a szokásos FSC vagy SSC helyett inkább a fluoreszcens szignált használtuk eseményként.

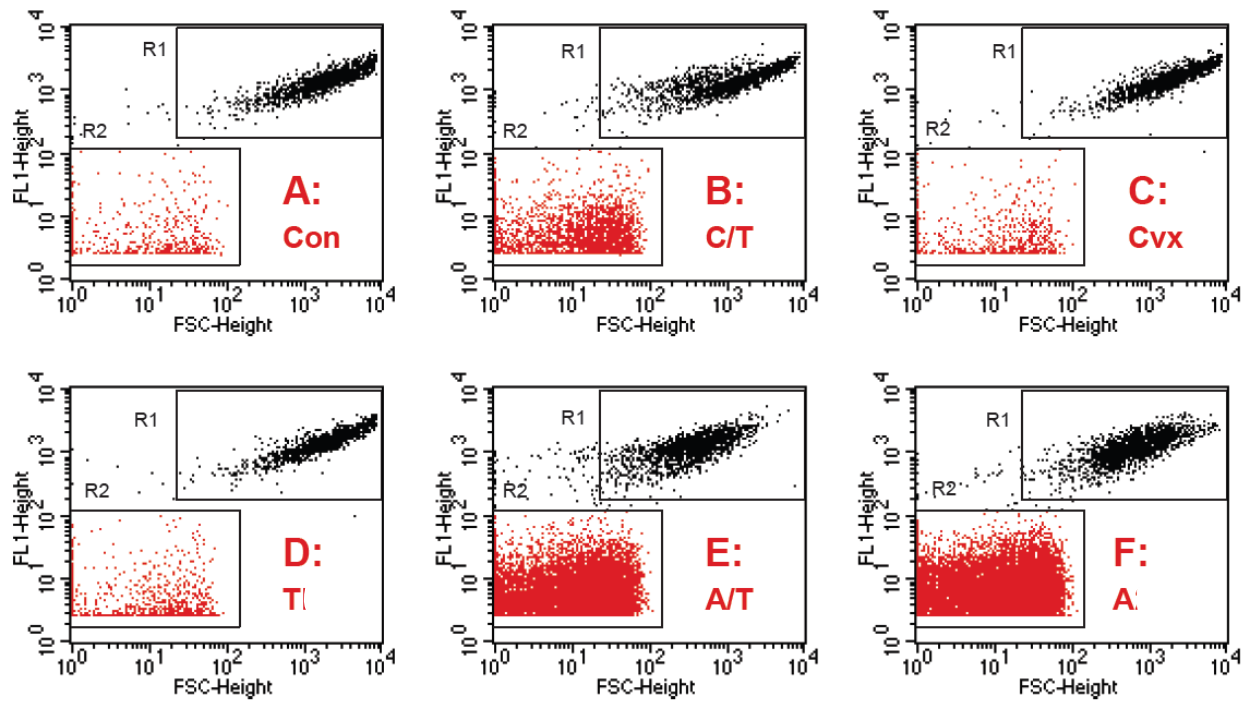
A 15. ábra A diagramja kontroll, nyugvó, bodipy-jelölt vérlemezkéket mutat flowcytometriás módszerrel az R1 régióban. A 15/B ábra convulxin és thrombin hatását mutatja: az R2 kapuban kisméretű és kis fluoreszcens intenzitású események jelennek meg. A jelintenzitás a nyugvó thrombocyták 0.5% -a, méretük pedig az ismert nagyságú gyöngyök kalibrálása alapján (16/D ábra) $\leq 0.5\ \mu\text{m}$ és a konfokális mikroszkóppal látott mikropartikuláknak felelnek meg (14/B ábra). Nagyságukat FSC/SCC diagramon is ábrázolhatjuk, azonban ezt a régiót a műszerzaj is zavarja.

A 15/C és D ábra mutatja, hogy szóló convulxin és thrombin aktiváció csak kevés mikropartikulát képez, ugyanakkor a Ca-ionofor A23187 már önmagában (15/F) is és thrombinnal együtt (15/E) is nagymennyiségű mikropartikulát generál. Ezáltal a kísérletekben ideális standard anyag, ami a maximális vérlemezke mikropartikulát tudja előállítani. A 15/B-F ábrákon az R2 kapuban látható populáció pontos számszerű meghatározása (tehát, hogy hány darab mikropartikula keletkezett) pontosan nem adható meg, ugyanis ha csökkentjük az észlelési küszöböt, azaz növeljük az érzékenységet, akkor az egyre inkább a méréstől független gépzaj lesz a domináns. A probléma megoldásában a 17. ábrán látottak vannak segítségünkre: ha az R2 kapu eseményeit FL1 hisztogramon ábrázoljuk, akkor látható a görbe csúcsa. Ha feltételezzük, hogy a mikropartikuláknak normál nagyságeloszlása van, akkor a csúcs előtti és utáni terület nagyjából azonos lesz, tehát a csúcs előtti terület (a görbe fele) alapján, ami jól látható és mérhető, az egész populációt meg tudjuk adni. Ezen számítás alapján meg tudjuk adni a mikropartikula mennyiségét, darabra, ami különböző stimulusokra (kontroll, convulxin és thrombin, convulxin, thrombin, Ca-ionofor + thrombin, Ca-ionofor) képződött lsd. 4 táblázat.

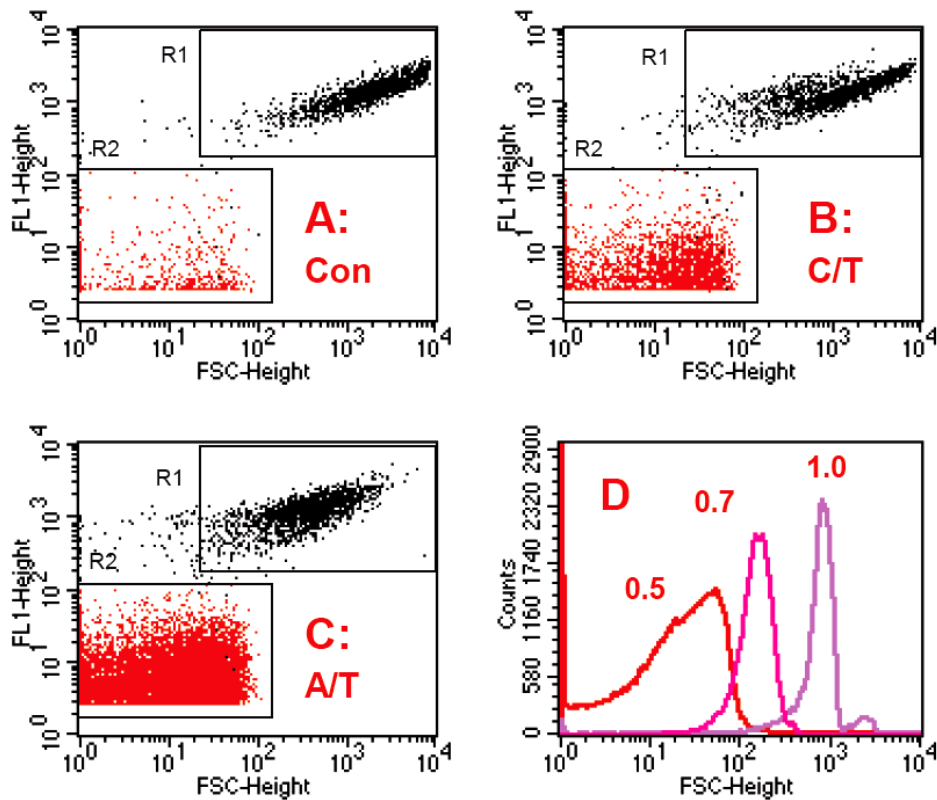
| Agonista | thr (R1) | thr FL1 | össz MP | MP FL1 | MP/thr | MP/coated thr |
|-----------|----------|---------|---------|--------|--------|---------------|
| vak kont | 0 | - | 18 | - | - | - |
| kont. thr | 3786 | 1479 | 1550 | 6.5 | 0.4 | - |
| Cvx/T | 3576 | 1443 | 10400 | 6.6 | 2.9 | 12 |
| Cvx | 3788 | 1502 | 1950 | 6.2 | 0.5 | - |
| T | 4017 | 1475 | 2240 | 5.7 | 0.6 | - |
| ionf/T | 3435 | 1280 | 60600 | 7.5 | 18 | 20 |
| ionf | 3908 | 1320 | 56500 | 7.7 | 14 | - |

4. táblázat [42] a 15. ábrán látott vizsgálatnak megfelelően az R1 kapu eseményei jelentik az összes vérlemezke számot, az FL1 pedig az átlagos bodipy fluoreszcenciát. A 17. ábra segítségével kiszámolható az összes mikropartikula szám, ill. megadható az egy vérlemezkére eső mikropartikula szám, valamint a coated-vérlemezkére eső mikropartikula mennyiség. Ebben az esetben convulxin és thrombin 25% és az A23187 Ca-ionofor 90% coated-vérlemezkét generált. Thr= thrombocytá, T= thrombin, MP= mikropartikula, kont= kontroll, Cvx= convulxin, ionf= A23187 ionofor

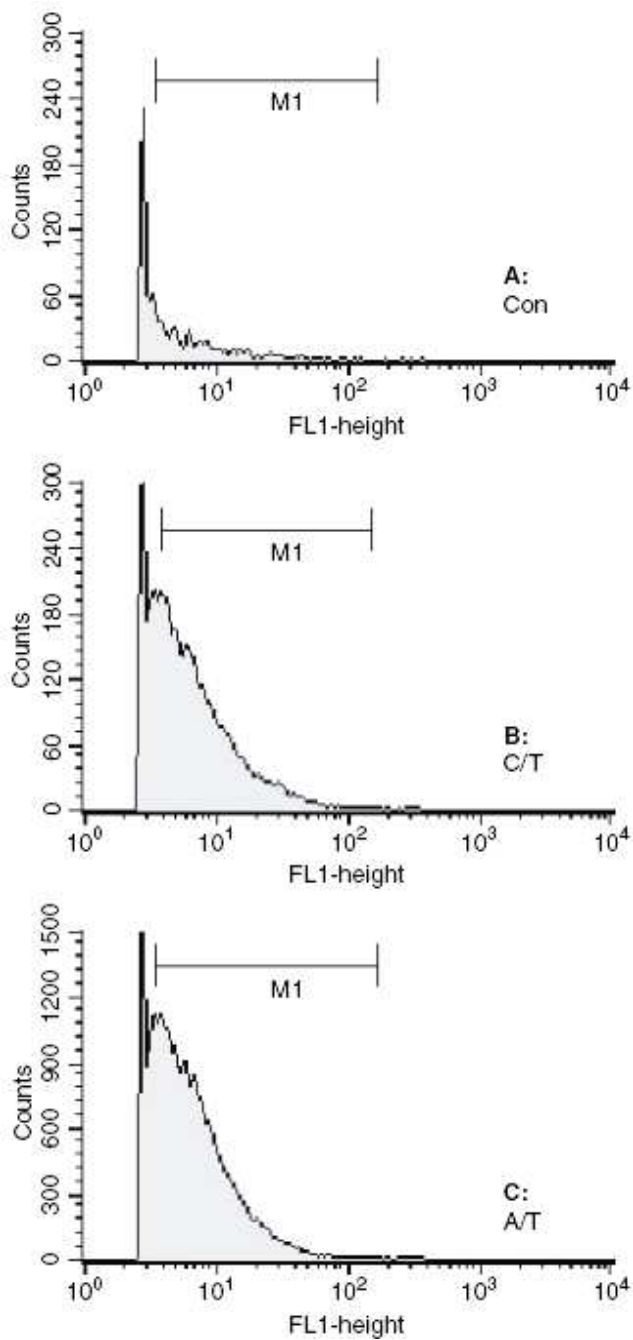
Ha a vérlemezkéket egyfajta agonistával (convulxin vagy thrombin) aktiváljuk, akkor az egy thrombocytára eső mikropartikula szám < 1 , ami nem különbözik a kontrolltól. Ugyanakkor, ha kettős agonistát alkalmazunk, vagy a Ca-ionofor A23187-t akkor a mikropartikula mennyisége megnőtt, ahogy az a 15. ábrán is látszik. A 15. ábrán bemutatott mérésnél az adott donor vérlemezkéi convulxin + thrombin stimulusra 25%-ban és A23187 aktivációra 90%-ban alakultak át coated-vérlemezkékké, miközben az egy coated-vérlemezkére eső mikropartikula mennyiség 12-20 db volt. Számos vérmintával megismételve a kísérletet szoros egyezés áll fenn a coated-vérlemezke mennyisége és a thrombocytá mikropartikula mennyisége között (18. ábra).



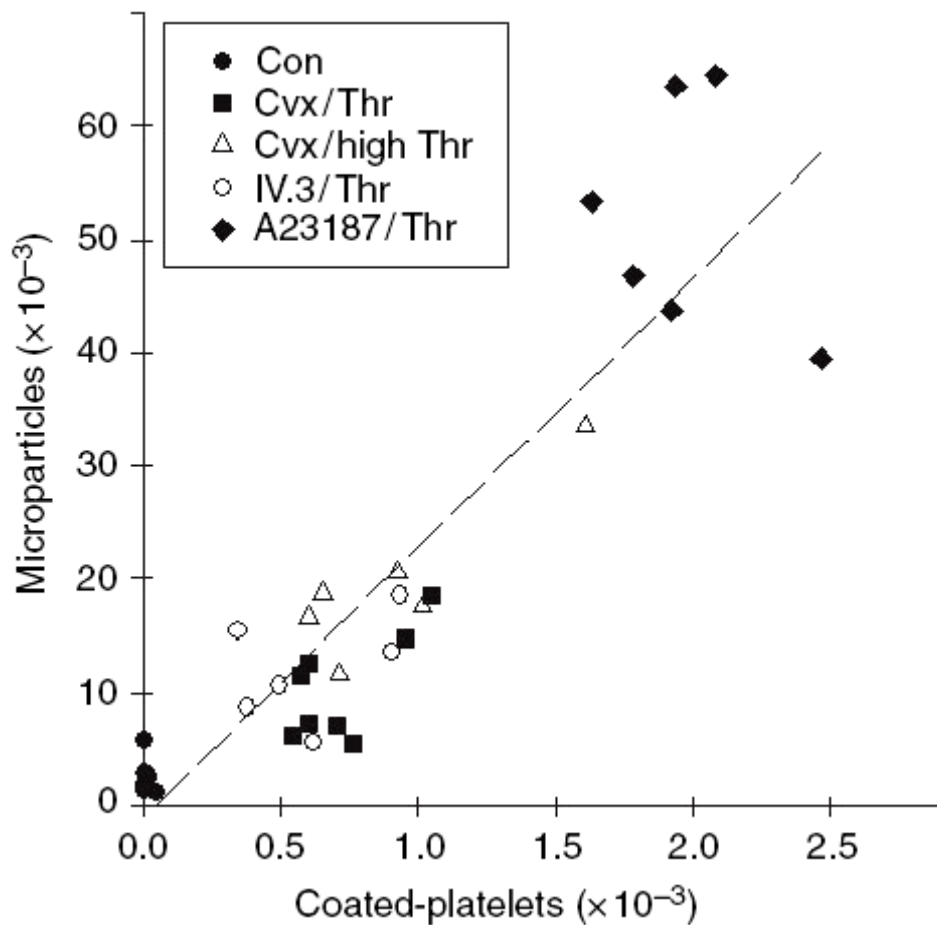
15. ábra [42] A bodipy-jelölt thrombocyta mikropartikulák flowcytometriás elemzése. A: aktiválatlan vérlemezkék az R1 kapuban. B: convulxin és thrombin aktivációra új populáció jelent meg az R2 kapuban, ami az eredeti vérlemezkék fluoreszcens intenzitásának < 1%-a. C: convulxin egyedül nem generál R2 régiós eseményeket. D: thrombin egyedül is képez kevés R2 populációt. E: Ca ionofor A23187 thrombinnal együtt igen nagyszámú R2 eseményt generál. F: az ionofor A23187 egyedül is sok R2 eseményt generál.



16. ábra [42] Bodipy-jelölt thrombocyták flowcytometriás elemzése. A: nyugvó vérlemezkék (R1 régió), B: convulxin és thrombin aktiváció után mikropartikulák képződnek (R2 régió). C: maximális mennyiségű mikropartikula képződik ionofor és thrombin agonistákkal. D: ismert nagyságú gyöngyök FSC diagramja. Ebből látszik, hogy a C ábra R2 populációja a $\leq 0.5 \mu\text{m}$ nagyságba esik.



17. ábra [42] A mikropartikulák hisztogram analízise. Az A, B, C ábra a 15. ábra A, B és E részének R2 populációját jeleníti meg esemény/FL1 képen. Megfigyelhető a B és C panelen a görbe csúcsa. Feltételezve, hogy az események normál eloszlást követnek, akkor a görbe fele (M1 marker) az összesemény (mikropartikula) felét jelenti.



18. ábra [42]: A coated-vérlemezkek és a thrombocyta mikropartikulák termelődése. A bodípy-jelölt vérlemezkéket convulxin + thrombin (Cvx/Thr), convulxin + nagy dózisú thrombin (Cvx/high Thr), IV.3-GAMG + thrombin (IV.3/Thr) vagy A23187 ionofor + thrombin (A23187/Thr) agonistákkal aktiváljuk. Flowcytometriás módszerrel mérjük a coated-vérlemezkek és a mikropartikulomok mennyiségét. 6 különböző donor feltüntetett értékei alapján szoros kapcsolat ($r=0.87$) van a coated-vérlemezkek és a mikropartikulák mennyisége között.

Megbeszélés

A thrombocytá aktiváció során képződött mikropartikuláknak fontos szerepe lehet, különösen ITP esetén a hemosztázisban tekintettel arra, hogy a negatív felszíni töltésükkel ideális helyet teremtenek a prothrombináz komplexnek. Méretüknél fogva a thrombocytá mikropartikulák megjelenítése, vizsgálata nehézségekbe ütközik. A korábbiak során alkalmazott thrombocytá felszíni antigének jelölése is lehetővé teszi a mikropartikulák tanulmányozását, azonban ezek felbontóképessége az alacsony jelintenzitás miatt nem megfelelő. Például a GPIb antigén jelölése FITC-anti-GPIb antitesttel kiváló módszer a vérlemezkék detektálására, hiszen ez az integrin mintegy 25000 kópiaszámban fordul elő a sejt felszínén. Az eredeti vérlemezke térfogat kevesebb, mint 1%-t kitevő mikropartikulán már csupán 250 GPIb antigén található, ami a flowcytometriás vizsgálat érzékenysége alatt lesz. Hasonló a helyzet a FITC-anti-GPIIb/IIIa antitesttel jelölt vérlemezkék esetén is. Az általunk alkalmazott bodipy-maleimid jelöléssel megfelelő fluoreszcenciát kapunk a mikropartikulák méretében is, ami lehetővé teszi a mennyiségi meghatározást is. Részletes aktivátor vizsgálatokkal szoros korreláció bizonyult a coated-thrombocytá képződés és a thrombocytá-mikropartikulák száma között (18. ábra). Minden agonista, ami coated-thrombocytát generál, mikropartikulát is eredményez. Ugyanakkor az A23187 kalcium ionofor önmagában is termel mikropartikulát, de coated-thrombocytát nem. A közös pont a foszfatidil-szerin expresszió, nem feltétlenül a coated-thrombocytá. Tehát ezen adatok alapján a foszfatidil-szerin külső sejtmembránon való megjelenése a minimális feltétele a mikropartikula képződésnek.

Az előző fejezetben részletesen tárgyaltaknak megfelelően a MPTP és a coated-thrombocyták termelődése között szoros összefüggés van. Ez érvényes a mikropartikula termelődésre is, azaz a MPTP aktiváló PAO és diamide fokozta a mikropartikula termelődést is.

I/4. A CD9 és a thrombocyta eredetű mikropartikulák kapcsolata

Bevezetés

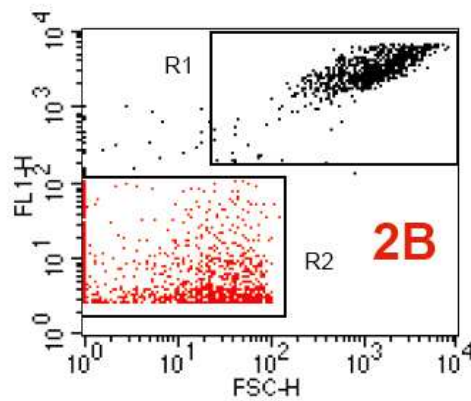
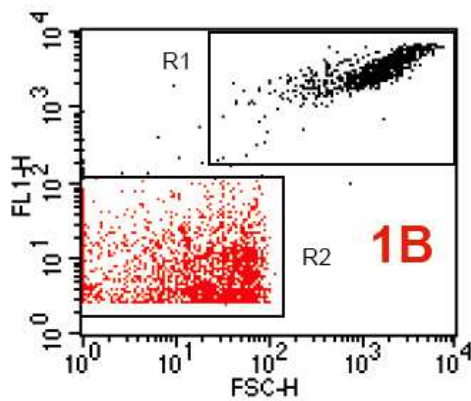
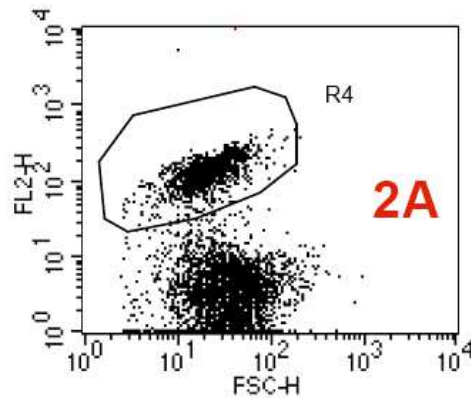
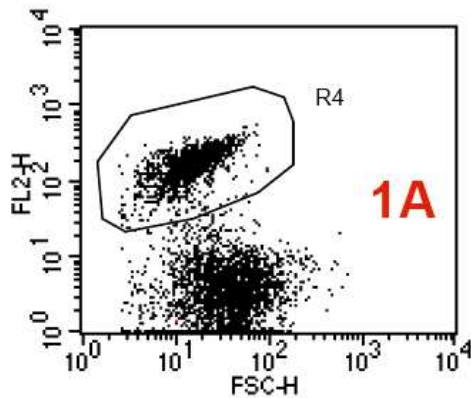
A CD9 fehérje (p24, motility related protein 1) a transzmembrán 4 vagy másként tetraspanin szuperfamilia tagja (TM4SF). A vérlemezék mellett, a fehérvérsejteken, az endothel sejteken, idegsejteken, vaszkuláris simaizomsejteken, szívizomsejteken, valamint az epithel sejteken fordul elő. Négy transzmembrán domén mellett 2 nagy extracelluláris hurkot képez a rövid intracitoplazmatikus N- és C-terminális résszel. A tetraspaninok hajlamosak egymással és más membránfehérjével összekapcsolódni és nagy molekula komplexet képezni [43]. A CD9 számos biológiai folyamatban vesz részt, úgymint sejt növekedés, motilitás, sejtadhézió, sejtaktiváció és a jelátvitel [44]. A tetraspanin molekulák hálózatos szerkezete, a tetraspanin háló, a sejt-fúzióban vesz még részt [45]. Ehhez szükséges a sejt-felső felületi integrinokhoz történő kapcsolódás, komplex képződés [46]. Ilyen sejt-fúzió pl. a petesejt és a spermium összeolvadása. CD9 hiányos egereknél elmarad a megtermékenyülés az oocita-spermium fúzió zavara miatt [47]. A vírusmediált sejt-sejt fúzió is gátolható CD9 ellenes antitesttel [48]. Még nem ismert, hogy milyen mechanizmussal segíti elő ez a tetraspanin háló a sejtösszeolvadást. A CD9 fehérje a thrombocyták felszínén nagy mennyiségben fordul elő. 40000 kópia/vérlemezke számmal a harmadik leggyakoribb fehérje az integrin α_{IIb} és β_3 után (50000-50000 kópia/thrombocyta). Egyéb vérlemezke tetraspanin még a CD63, CD151 és még 7 másik fehérje. A CD9 szerepe a vérlemezke működésében nem ismert. A megakaryocyták érésében részt vesz [49], valamint a GPIIb/IIIa-hoz és a Fc γ RIIa-hoz kapcsolódva szükséges az előbbi aktiválásához [50,51,52]. CD9 hiányos egereknél azonban nincs kimutatható hemosztázis zavar [53]. Korábbiakban kimutattuk, hogy a coated-thrombocyták döntően szerepet játszanak a thrombocyta mikropartikulák képződésében. Vizsgálataink szerint 1 coated-vérlemezke átlagosan 20 (15-25) db mikropartikulát termel [42].

Jelen részben azt néztük, hogy a CD9 gátló monoklonális antitestek hogyan befolyásolják a mikropartikula képződést. Az ötletet az adta, hogy szisztematikusan végigvizsgálva az coated-vérlemezeket eredményező agonistákat ill. agonista kombinációkat a thrombin + ALB6 (egy anti-CD9 monoklonális antitest) agonista pár esetén, bár átlagos mennyiségű coated-thrombocytát eredményezett, a mikropartikula képződés azonban szinte teljes mértékben elmaradt [7,11,54] (19. ábra).

A CD9 és az Fc γ RIIa egymással kapcsolatban vannak a sejtmembránon. Az anti-CD9 ALB6 az Fc γ RIIa aktiválásával, egyéb agonistával pl. thrombinnal együtt okoz coated-thrombocyta képződést. Ha az IV.3 anti-Fc γ RIIa antitestekkel fedett (gátolt) Fc γ RIIa-kat keresztkötjük GAMG-vel és ehhez thrombin koaktivátort adunk akkor coated-thrombocytákat kapunk [11]. Ebben az esetben azonban mikropartikulák is képződnek (18. ábra). Ebből az következik, hogy a mikropartikula képződéshez esszenciális a CD9 molekula (19. ábra).

IV.3/GAMG + T

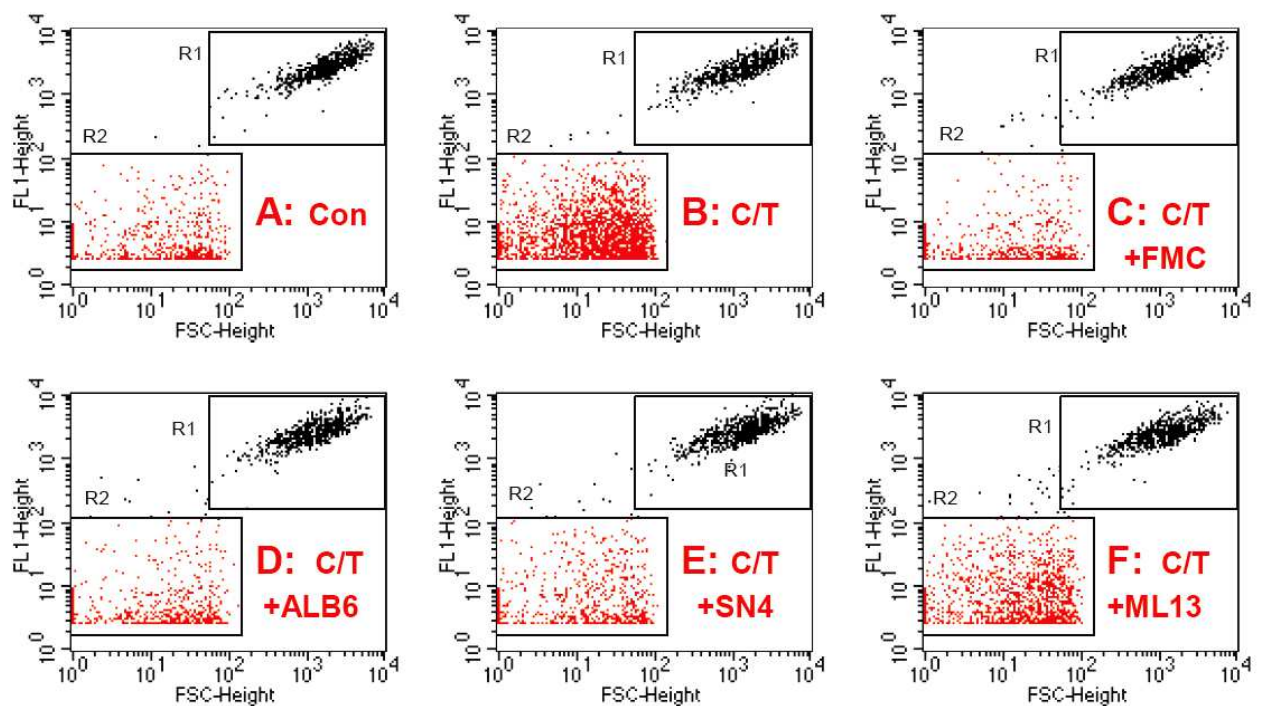
ALB6 + T



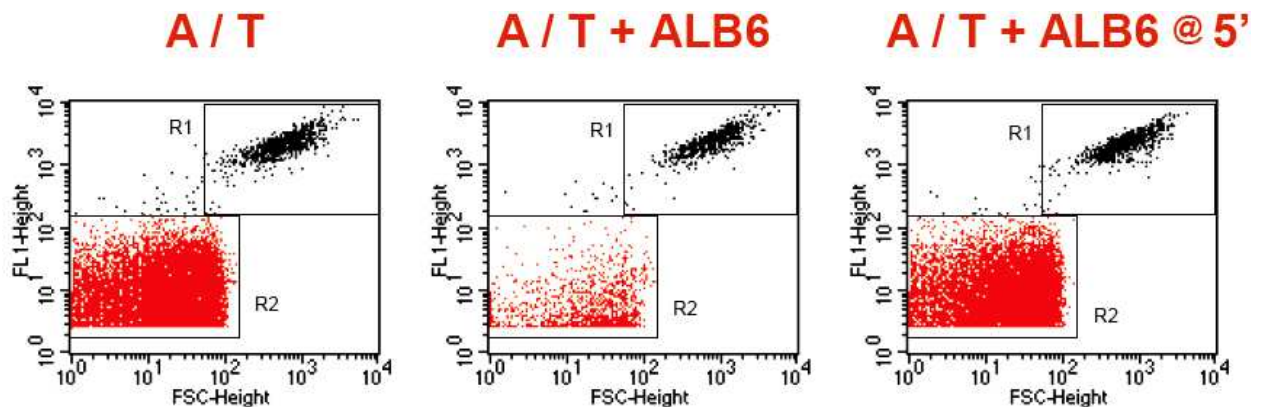
19. ábra *Coated-thrombocyt*a (A) és *thrombocyt*a mikropartikula (B) képződés vizsgálata flowcytometriával. A: Biotin-Fbg jelölés, B: Bodipy-maleimid jelölés. 1 oszlop: IV.3 monoklonális antitesttel gátolt *FcγRIIa*-t keresztkötő GAMG + thrombin aktiválással *coated-thrombocyt*ák (1A, R4 terület) és jelentős mennyiségű mikropartikula (1B, R2 terület) képződik. Az ALB6 anti-CD9 monoklonális antitest + thrombin agonista páros hasonló mennyiségű *coated-thrombocyt*át (2A, R4 terület) eredményez, azonban a mikropartikula képződés (2B, R2 terület) gátlódik (85%-kal kevesebb).

Eredmények

Ezután 4 másik CD9 ellenes antitestet vizsgáltunk a coated-thrombocytá és mikropartikula képződés szempontjából. A négy monoklonális antitest (FMC, ALB6, SN4, ML13) 3 különböző CD9 epitóphoz kapcsolódik, de mindegyik szignifikáns mértékben gátolta a mikropartikula képződést convulxin + thrombin agonisták esetén (20, 22. ábra). Ez a gátló hatás még kifejezettebb volt a kalcium ionofor A23187 + thrombin vérlemezke aktiválásánál ALB6 esetén. Az ALB6 gátló hatása a reakció 2-3 percéig tart, utána adva már nem befolyásolja a mikropartikula képződést, ami egybe vág azzal a megfigyeléssel, hogy a coated-thrombocyták is a reakció 2-3 percéig termelődnek [55](21. ábra).

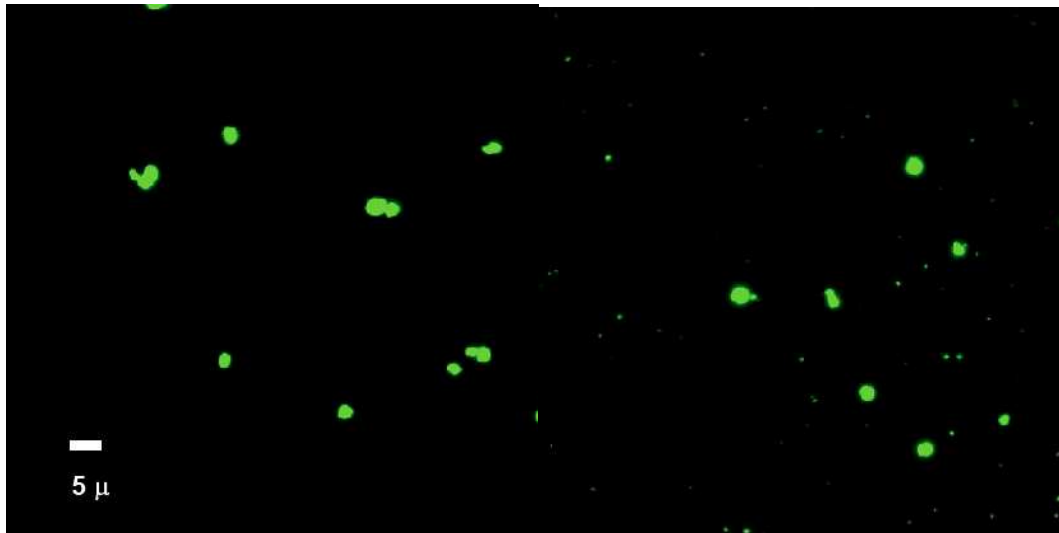


20. ábra [54] CD9 ellenes monoklonális antitestek gátolják a thrombocytá mikropartikula képződést. Bodipy-maleimid jelölés. R2 terület: mikropartikulák. A: kontroll, nyugvó vérlemezkék. B: convulxin + thrombin aktiváció mellett jelentős mikropartikula képződik. C, D, E, F: FMC, ALB6, SN4, ML13 antitest hozzáadása mellett a kontrollhoz képest nincs érdemi mikropartikula képződés.

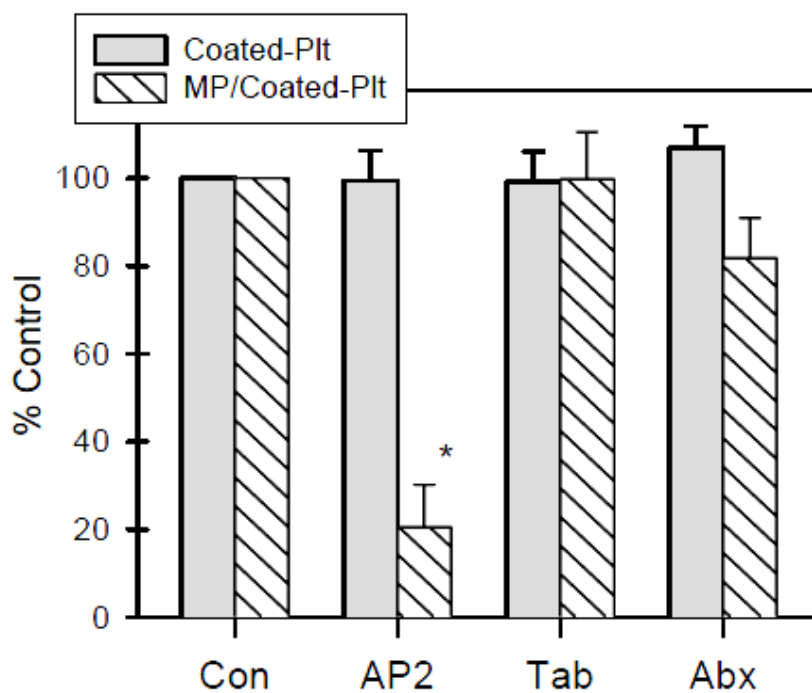


21. ábra Az anti-CD9 ALB6 hatékonyan gátolja az A23187 + thrombin agonisták által kiváltott mikropartikula képződést. Bodipy-maleimid jelölés. A/T: A23187 Ca^{++} ionofor + thrombin aktiváció maximális mennyiségű mikropartikulát eredményez (R2 terület). A/T + ALB6: a CD9 ellenes antitest a 0. perckor a reakcióelegyhez adva jelentősen gátolja a mikropartikula képződést, míg az 5. percnél alkalmazva (A/T + ALB6 @ 5') már ilyen hatása nincs.

A thrombocytá mikropartikulákat konfokális mikroszkóppal vizsgálva „szemmel látható” a különbség: az ALB6 alkalmazása mellett nem volt kimutatható mikropartikula convulxin + thrombinnal aktivált vérlemezkék esetén. (22. ábra) Az eredmények tehát amellet szólnak, hogy a CD9 tetraspanin szükséges feltétele a thrombocytá mikropartikula képződésnek. A különböző biológiai folyamatokban azonban a CD9 nem magában, hanem a tetraspanin hálóban vesz részt pl. integrinekhez kapcsolódva. Ezért megvizsgáltuk, hogy az anti-GPIIb/IIIa monoklonális antitesteknek (AP2, Tab, abciximab) és kis molekulájú GPIIb/IIIa inhibitoroknak (eptifibatide, tirofiban and DMP-802) van-e hatása a mikropartikula képződésre. Az antitestek közül a AP2 szignifikáns ($p < 0.01$) mértékben csökkentette a mikropartikula képződést, míg a többi antitest és kis molekulájú integrin gátlónak nem volt ilyen hatása, ugyanakkor a coated-thrombocytá termelődést egyik sem akadályozta. (23. ábra)



22. [54]ábra Konfokális mikroszkópos kép, Bodipy-maleimid jelölés. A: convulxin + thrombin aktiváció után átlagosan 0.4 μm átmérőjű mikropartikulák képződnek. B: anti-CD9 ALB6 mellett nincs mikropartikula képződés.



23. ábra [54] Anti-GPIIb/IIIa monoklonális antitestek hatása a coated-thrombocyta (coated-plt, szürke oszlop) és a mikropartikula (MP/Coated-Plt, csíkozott oszlop) képződésre a kontrollhoz képest (Con). Míg egyik antitest sem befolyásolta a coated-thrombocyta képződést, addig az AP2 szignifikánsan (*) csökkentette a mikropartikula képződést.[54]

Megbeszélés

A CD 9 tetraspanin molekula és a thrombocytá mikropartikulákkal kapcsolatban összefoglalásként elmondhatjuk:

A CD9 szerepe a vérlemezke működésben még homályos. Korábbi kutatásaink eredményeként tudjuk, hogy a CD9 gátló ABL6 a mikropartikula képződést is gátolja. A coated-thrombocytá képződés lezajlása 2-3 perc után már a CD9 gátlóknak ez a hatása megszűnik, ami újabb közvetett bizonyíték a coated-thrombocyták a mikropartikula képződés kapcsolatára. A CD9 molekula egymással és egyéb membrán fehérjével, pl. integrinokkal összekapcsolódva egy tetraspanin hálót képez, ami a biológiai hatásért felelős. Négy, összesen 3 különböző epitóra specifikus anti-CD9 monoklonális antitest is hasonlóan viselkedett. A különböző epitópokon is hasonló hatás mellett szól, hogy nem egy meghatározott CD9-fehérje kapcsolat blokkolódik, hanem sztérikusan gátolják a tetraspanin háló kialakulását. A CD9 az GPIIb/IIIa integrinnel bizonyított kapcsolatban van, ezért az GPIIb/IIIa gátlókat is megvizsgáltuk. Az AP2 anti-GPIIb/IIIa monoklonális antitest hatékonyan gátolta a mikropartikula képződést, míg a többi megvizsgált integrin gátló nem. Ismert, hogy a CD9 molekula, ill. a tetraspanin háló a sejtfúzióban részt vesz, azonban ez az első eset, hogy a sejtszétesés, darabolódás, mikropartikula képződésben betöltött szerepe is bizonyítást nyert.

II. A coated-thrombocyták vizsgálata essentiális thrombocythaemiában

Bevezetés

Coated-thrombocyták különböző betegségeken

A coated-thrombocyták felfedezése, alapvető tulajdonságaik feltérképezése az elmúlt bő évtizedben történt. [7,10] A coated-thrombocyták fémjele az α -granulum eredetű fehérjék felszíni retenciója, a foszfatidil-szerin expresszió és ezekkel összefüggésben a fokozott prothrombináz aktivitás. Ezen hiperaktív vérlemezkéknek fontos szerepe lehet különböző ischémiás, tromboembóliás betegségeken. Ezen kézenfekvő feltételezések ellenére a klinikai kutatások még gyermekcipőben járnak. Ennek több oka lehet, egyik hogy a tudományos világ számára még kevésbé ismert, elismert entitás a coated-thrombocyta. A másik, hogy a vizsgálata nem rutin labor eljárás, valamint a különböző laborok eredményei nem standardizáltak.

Néhány eredmény azonban már elérhető:

Coronariakatéterezés után [56], corticalis stroke-ban [57], átmeneti ischémiás attack (TIA) esetén [58], különösen magasvérnyomás esetén [59] mértek magasabb coated-thrombocyta értékeket az egészséges kontrollokhoz képest. Mint, ahogy rekuráló non-lacunaris stroke-nál [60] is. Érdekes, meglepő megfigyelés, hogy Alzheimer kórban is hasonló eredményeket kaptak. [61,62] Cukorbetegségben [63] és krónikus hemodialízisben [64] szintén emelkedett volt a coated-vérlemezkék aránya.

Alacsonyabb coated-thrombocyta értékeket észleltek spontán cerebrális vérzés [65], lacunaris stroke [57], valamint súlyos A haemophilia esetén. [66] Állatkísérletben kimutatták, hogy Scott szindrómában alacsony a coated-thrombocyták aránya, ami magyarázhatja a hemosztázis zavart. [67]

Essentialis thrombocythaemia

A coated-thrombocyták és malignus hematológiai betegségek kapcsolata még nem ismert. Kézenfekvő volt, hogy ezt megvizsgáljuk a magas vérlemezkeshámmal járó essentiális thrombocythaemiában.

A prekoncepció az volt, hogy eltérést lesz az essentialis thrombocythaemiás betegek coated-thrombocyta számában az egészséges kontrollhoz képest. Feltételeztük, hogy a magasabb értékeket fogunk kapni.

A krónikus myeloproliferatív betegségek közé tartozó essentialis thrombocythaemia jellegzetessége a tartósan magas (>450 G/L) vérlemezkeszám, ami trombotikus és vérzéses szövődményekkel is járhat. Maga a betegség diagnózisa kizárásos diagnózis: az egyéb myeloproliferatív betegségek (Polycythaemia vera, Krónikus myelofibrosis, Krónikus myeloid leukémia), myelodysplasia, vashiány, gyulladásozó állapotok, paraneoplázia kizárása szükséges [68]. Az esetek 50%-ban a JAK-2 kináz V617F mutációja is kimutatható. A betegség lefolyása során ritkán myelofibrosisba mehet át, még ritkábban klonális evolúcióval akut leukémiás transzformáció is kialakulhat. A morbiditás és a mortalitás legnagyobb százalékkal a tromboembóliás szövődmények számlájára írhatók. Mind artériás oldalon (stroke, szívinfarktus, artériás okklúziók), mind vénás oldalon (mélyvénás trombózis, pulmonális embólia) az átlag populációhoz képest nagyobb arányban fordulnak elő trombózisok. Vérzéses szövődmények ritkábban fordulnak elő, általában a nagyon magas thrombocyta-számhoz (>1500 G/L) társulnak és bőr, valamint nyálkahártya-vérzések formájában jelentkeznek [69]. A trombózis és vérékenység kettősségére utal a betegség neve is: Essentialis haemorrhagiás thrombocythaemia.

Az ET-ban észlelhető thrombocytopathiával kapcsolatban számos, gyakran egymásnak ellentmondó közlés létezik. Fokozott aggregációs készség [70] mellett csökkent epinefrin és kollagén érzékenységet is kimutattak [71,72], alacsonyabb ristocetin kofaktor/vWF antigén aránnyal és a nagy vWF multimerek csökkent szintjével [69]. A PFA záródási idő (CT) rendszerint megnyúlt, függetlenül attól, hogy vannak-e trombotikus, vagy vérzéses szövődmények [73]. Ez a reaktív thrombocytosistól való elkülönítésben is felhasználható [72]. A különösen JAK2 V617F pozitív ET-ben gyakoribb trombotikus események háttérében szerepelhet még a thrombocyta-monocyta, thrombocyta-neutrophil komplexek és a P-selectin (CD62) emelkedett szintje [74,75], a több fiatal, éretlen vérlemezke [76], a fokozott thrombin termelés is [77]. Az ET-ben észlelhető szerzett thrombophilia háttérében még kimutatták az antithrombin III, protein C és S hiányát is. [78,79] Ezek ellenére még nincsen olyan ex vivo teszt, ami megadná a trombózis/vérzés rizikó mértékét [73].

Eredmények

A kontroll személyek kiválasztásánál, hasonlóan a beteg populációnál, a cukorbetegség, NSAID szedés kizáró tényező volt. Míg a dohányzók (11 vs. 14), nemek (nő/férfi: 32/11 vs. 24/7) arányát tekintve a két csoport nem különbözött, addig a betegek szignifikánsan idősebbek voltak (61 ± 11.5 év vs. 49 ± 9.7 év, $p < 0.006$). A betegek 79%-a (34 fő) volt JAK-2 pozitív. (5. táblázat)

| | dohányos | nő | férfi | kor (év) | Jak-2 mut. |
|--------------------|----------|----------|----------|--------------|------------|
| ET betegek n=43 | 11 (25%) | 32 (75%) | 11 (25%) | 61 ± 11.5 | 34 (79%) |
| Kontroll N=31 | 14 (13%) | 24 (77%) | 7 (23%) | 49 ± 9.7 | 0 |

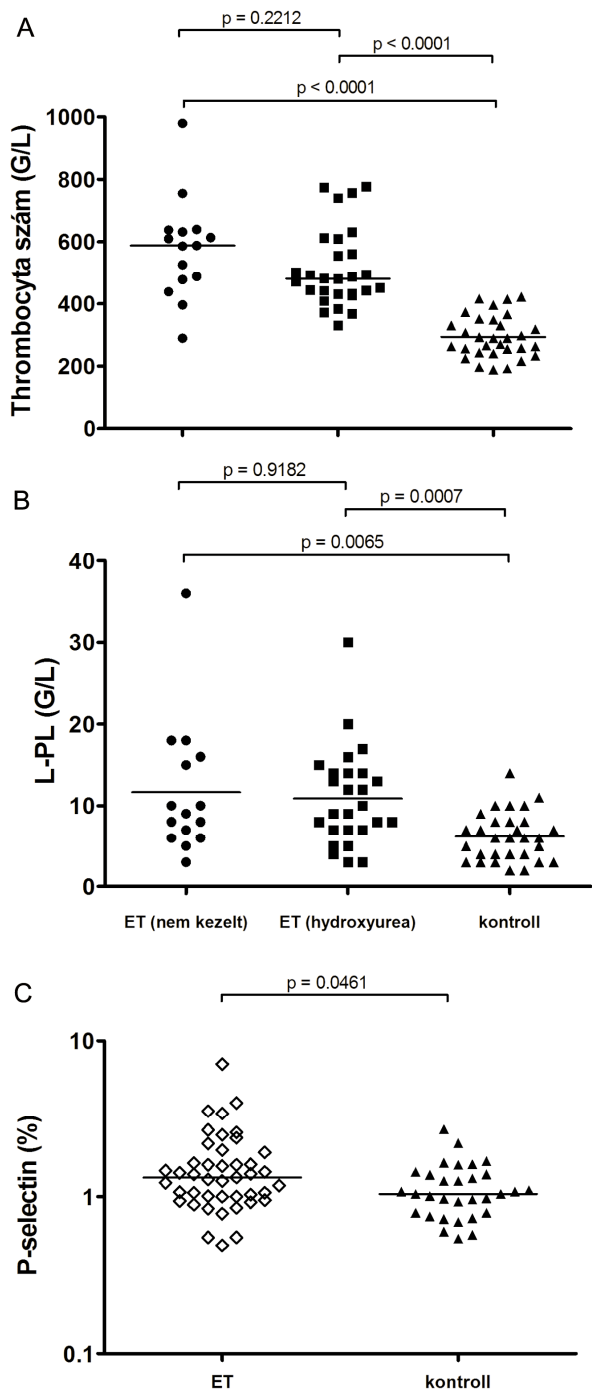
5. táblázat Az ET betegek és a kontroll csoport tulajdonságai

Mint ahogy az a 24/A és B ábrán látható az ET betegeknél magasabb vérlemezke-számot találtunk (577 ± 161 G/L, 513 ± 127 G/L vs. 294 ± 67 G/L) és a nagy thrombocytá arány (L-PL) is magasabb volt a kontrollhoz képest (11.7 ± 8.2 G/L, 10.9 ± 6.0 G/L vs. 6.2 ± 3.0 G/L), akár kezelt, akár nem kezelt betegről volt szó, míg a kezelt/nem kezelt közt nem volt különbség. A vérlemezkek átlagos nagysága (MPV) azonos volt minden csoportban (9.5 ± 0.6 fL, 9.0 ± 0.8 fL vs. 9.2 ± 0.8 fL). A beteg csoport vérlemezkéi nagyobb százalékban mutattak P-selectin pozitivitást. CD62%: $1.64\pm 1.16\%$ vs. $1.15\pm 0.48\%$, $p=0.0461$) (24/C ábra). Hasonló szignifikáns különbség volt a PFA-100 értékek esetén: az ET-s csoportok egymástól nem, de a kontrolltól szignifikánsan különböztek. (PFA coll/ADP: 98 ± 16 s, 102 ± 33 s vs. 88 ± 14 s; PFA coll/adr: 163 ± 55 s, 152 ± 26 s vs. 127 ± 27 s) (25/A, B ábra).

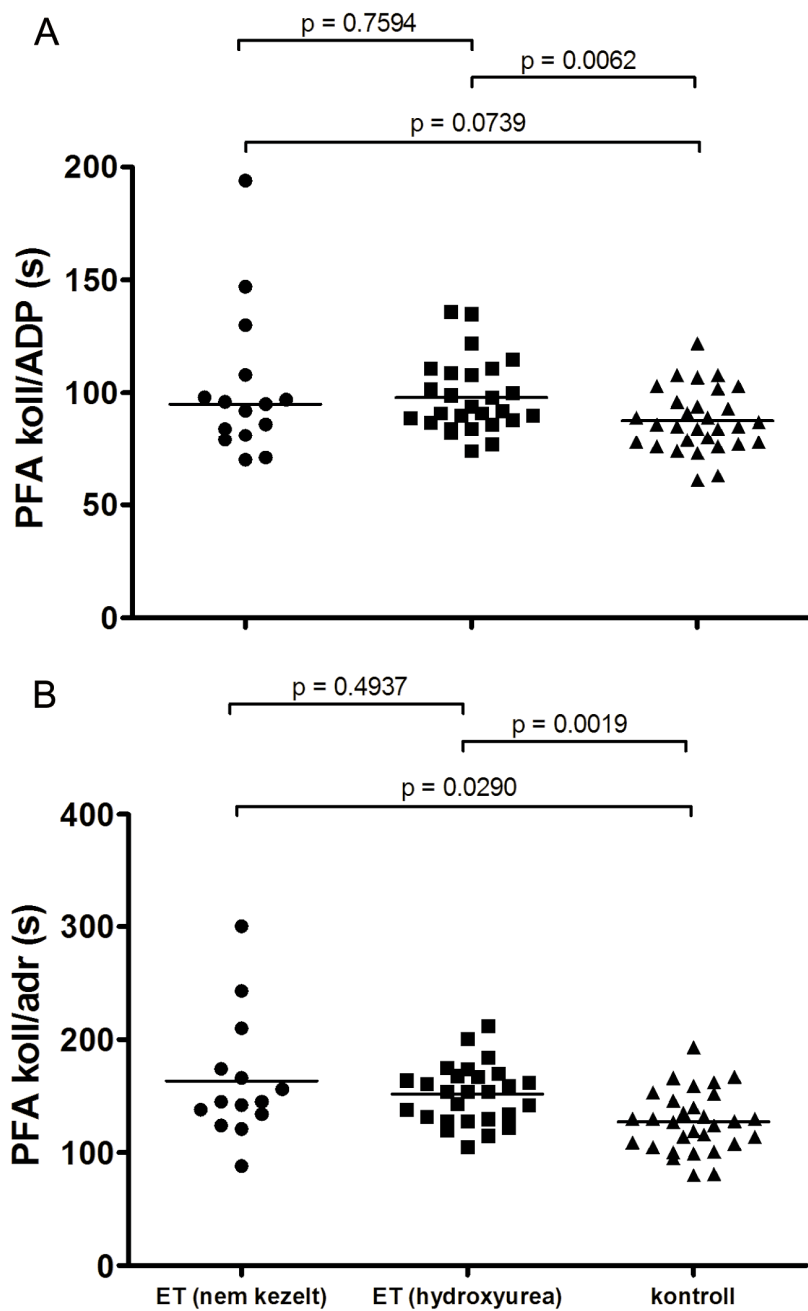
A nem kezelt ET csoportban a coated-thrombocytá aránya szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll ($23.1\pm 8.8\%$ vs. $37.6\pm 12.7\%$; $p=0.0008$), ugyanakkor a HU kezelték coated-thrombocytá aránya már nem különbözött a kontrollokétól ($34.1\pm 12.3\%$, $p=0.3799$), míg a nem kezelt csoporttól szignifikánsan ($p=0.0008$) eltért. (26. ábra)

Ha JAK2-V617F mutáció megléte alapján csoportosítottuk a betegpopulációt akkor a coated-thrombocytá aránya még alacsonyabbnak bizonyult a mutáció

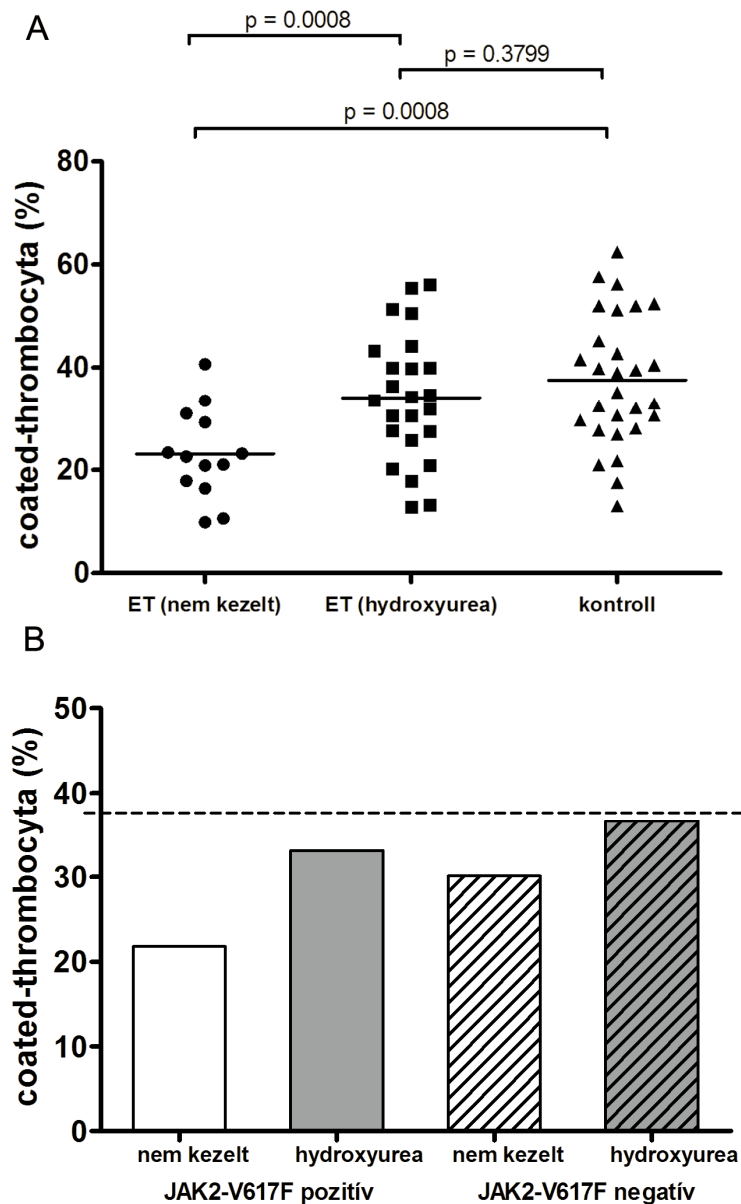
pozitív esetekben, azaz a nem kezelt ET-s betegeknek volt a legalacsonyabb coated-thrombocytá aránya (21.8%), amit a HU kezelés a kontroll közelébe emelt (33.1%), míg JAK2-V617F negatív esetekben a bár a kontrollhoz képest alacsony, de a mutáció pozitív eseteknél magasabb coated-thrombocytá arány adódott (30.1%), amit a HU kezelés tovább emelt (36.6%). (26. ábra)



24. ábra [82] Nem kezelt és hydroxyureát kapó ET-s betegek vérlemezke száma, nagy-thrombocyt aránya (L-PL) és a P-selectin expresszió a kontrollhoz képest. Az ET-s csoport szignifikánsan különbözik a kontrolltól, de a két ET-s kohort egymástól nem.



25. ábra [82] PFA-100 eredmények. A: kollagén/ADP aktiválással, B: kollagén/adrenalin aktiválással. A záródási idők az ET-s és a kontroll csoportoknál szignifikánsan különböznek, míg a kezelt/nem kezelt kohortok egymástól nem különböznek.



26. ábra [82] A coated-thrombocytosis arány a nem kezelt, HU-t kapó (hydroxyurea) és egészséges kontroll, valamint JAK2-V617F mutáció pozitív és negatív esetekben. A nem kezelt ET-s betegek coated-thrombocytosis aránya alacsonyabb, mint a kontroll. HU kezelés megemeli a coated-thrombocytosis arányt, ami már nem különbözik a kontrolltól. A JAK2-V617F pozitív esetekben a coated-thrombocytosis arány még alacsonyabb.

Megbeszélés

Az elmúlt 10 évben egyre szaporodik a coated-thrombocyttal kapcsolatos közlemények száma. [7,9,10,11,17,18] Ezek nagy része az alapkutatással foglalkozik, azonban a klinikai megfigyelések is gyarapodnak. [56-67] Mind az emelkedett, mind a csökkent coated-thrombocyta számra vannak példák: emelkedett arány figyelhető meg cukorbetegségben, TIA-ban, koronária betegségben [56,58,63]. A magas trombotikus hajlammal járó emelkedett coated-thrombocyta aránnyal szemben a vérzéses komplikációkat figyeltek meg alacsony coated-thrombocyta esetén agyvérzésnél, nem lacunaris agyi infarktusnál és súlyos haemophilia A-nál [57,65,66]. Ugyanakkor vérlemezke eltérésekkel járó hematológiai betegségeknél még nem vizsgálták a coated-thrombocytták szerepét.

Ez a vizsgálat az első, ami a coated-thrombocytták szerepét kutatja ET-ben. Az ET-re jellemző, hogy mind a trombotikus, mind a vérzéses szövődmények gyakoribbak az átlag populációhoz képest, ezért feltételeztük, hogy eltérést fogunk kapni a coated-thrombocyta vonatkozásában is. Olyan betegeket kerestünk, akik anamnézise negatív vérzés, trombózis irányában. ET leggyakrabban az idősebbeknél alakul ki, ezért volt nehéz korban illő egészséges kontrollokat találni. Ez magyarázza, hogy a kontroll csoport tagjai szignifikánsan fiatalabbak, míg egyéb tekintetben nem különböznek. A meglévő adatokból azonban sikerült egy korban egyező alcsoportot létrehozni (6 ET beteg és 6 kontroll, 52.2 ± 13.2 év vs. 49 ± 9.7 év, $p=0.322$).

A vérlemezke-szám az ET-s (kezelt, nem kezelt) csoportban szignifikánsan magasabb volt a kontrollhoz viszonyítva és bár a nagy thrombocyta ráta (L-PL) is hasonlóan magasabb volt, ez nem érte el azt az értéket, hogy az MPV-ben is megnyilvánuljon, azaz, az MPV nem különbözött a egyes csoportokban. Ismert, hogy a nagyobb, fiatalabb vérlemezkek aktívabbak [83], valamint a fokozott vérlemezke pusztulással járó autoimmun thrombocytopeniában (ITP) az L-PL általában magasabb, az aplasticus anaemiában észlelt L-PL-nél [84]. A retikulált thrombocyta ill. a reticulocyta vonatkozásában nem találtunk különbséget.

Thrombocytopátiára utalnak a PFA-100 eredmények az ET csoportban, amit a megnyúlt záródási idő jelez. Az irodalomban is vannak erről közlések. [72] A vérlemezkek aktivitásának mértékét jelzi a P-selectin (CD62) expresszió [20]. Hasonlóan a korábbi tanulmányok eredményéhez [75,77] mi is emelkedett P-selectin értékeket kaptunk a flowcytometriás vizsgálatok során az ET-s csoportban a kontrollhoz képest.

A legszembetűnőbb eltéréseket a coated-thrombocyttal kapcsolatban nyertük. A nem kezelt ET-s betegek coated-thrombocyta aránya szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll ($p=0.0008$), ugyanakkor a kezelt csoportnak már szignifikánsan emelkedett a coated-thrombocyta aránya a nem kezeltékhez képest ($p=0.0008$) és majdnem elérte a kontroll értékeket. Ebből az következik, hogy a HU kezelésnek hatása van a coated-thrombocyta képződésre ET-ben. Mindez olyan betegeknél, akik anamnézisében nem szerepel trombotikus, vagy vérzéses szövődmény. Három betegnél meg tudtuk nézni a HU kezelés előtti és utáni állapotot és ezekben az esetekben is a HU kezelés átlagosan 18 %-kal emelte a coated-thrombocytták arányát. Egy, az életkorban is a kontrollal megegyező ET-s alcsoportot is vizsgáltunk, ahol szintén az ET-s betegek coated-thrombocyta aránya volt szignifikánsan alacsonyabb, mint a kontroll csoportban ($n=6$, $25.1\pm 5.2\%$, $p=0.018$). Ez amellet szól, hogy ez a tulajdonság nem életkor függő.

Végezetül még a JAK2-V617F mutáció megléte és a coated-thrombocytták összefüggését is vizsgáltuk. A 175 általunk gondozott ET beteg 64.6%-a pozitív erre a mutációra nézve, ami megfelel az irodalmi adatoknak [68]. A vizsgált betegpopulációban azonban ez magasabbnak bizonyult (79%), ami valószínűleg a kis betegszám és a szigorú betegbeválogatási szempontok miatt alakulhatott ki. Figyelemre méltó megfigyelés az a tendencia, hogy a legalacsonyabb coated-thrombocyta értékeket a JAK2-V617F mutáció pozitív, nem kezelt betegeknél mértük (21.8%), míg a kezelt, mutáció pozitív (33.1%) és a JAK2-V617F negatív kezeletlen (30.1%) és kezelt (36.6%) betegek értékei egymáshoz hasonlóak és a kontroll közeli (37.6%) (26. ábra) Korábbi közlések szólnak a JAK2-V617F mutáció és a vérlemezkék P-selectin expressziója [83], valamint a thrombocyta-leukocyta interakciókról [86]. A coated-thrombocyta képződésben részt vevő mechanizmusok részben azonosak az apoptózisban megfigyelhető folyamatokkal. A proapoptotikus hatások (pl. BAX aktivátor) emelik, míg az apoptózis gátlók (pl. caspase inhibitorok, MPTP gátlók) csökkentik a coated-thrombocyta képződést. [37,87] ET-ben legújabbban az apoptózis zavarát mutatták ki [88]. Tekintve, hogy a HU a dózissal egyenes arányban fokozza az apoptózist [89] feltételezzük, hogy a HU az apoptózis fokozásával emeli a coated-thrombocytták arányát.

ET-ben mind trombotikus, mind a vérzéses szövődmények előfordulhatnak, különösen nagy-rizikójú betegeknél (60 éve felett, trombotikus betegség az anamnézisben, vagy >1500 G/L vérlemezke szám) [90] Az általunk vizsgált

betegpopulációban nem fordult elő 1500 G/L feletti thrombocyta szám. Huszonhat beteg volt 60 évesnél idősebb, de ezek coated-thrombocyta aránya nem különbözött szignifikánsan a fiatalabb ET betegekétől ($28.9 \pm 11.6\%$ vs. $32.6 \pm 10.4\%$)

Az ET-s betegekben megfigyelt alacsonyabb coated-thrombocyta arány hozzájárulhat a vérlemezkek működészavarához, aminek a tisztázása még további vizsgálatokat kíván.

Irodalomjegyzék

1. Webber AJ, Firkin BG. Two populations of platelets. *Nature* 1965; 205: 1332.
2. Behnke O, Forer A. Blood platelet heterogeneity. Evidence for two classes of platelets in man and rat. *Br J Haematol* 1993; 84: 686–93.
3. Behnke O. Blood platelet heterogeneity: a functional hierarchy in the platelet population. *Br J Haematol* 1995; 91: 991–9.
4. Pasquet JM, Dachary-Prigent J, Nurden AT. Microvesicle release is associated with extensive protein tyrosine dephosphorylation in platelets stimulated by A23187 or a mixture of thrombin and collagen. *Biochem J* 1998; 333: 591–9.
5. Feng P, Tracy PB. Not all platelets are equivalent procoagulants. *Blood* 1998;92:350a.
6. Patel D, Väänänen H, Jirousková M, Hoffmann T, Bodian C, Collier BS. Dynamics of GPIIb/IIIa-mediated platelet–platelet interactions in platelet adhesion/thrombus formation on collagen in vitro as revealed by videomicroscopy. *Blood* 2003; 101: 929–36.
7. Alberio L, Safa O, Clemetson KJ, Esmon CT, Dale GL. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen and convulxin. *Blood*. 2000;95:1694–1702.
8. Hamilton SF, Miller MW, Thompson CA, Dale GL. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors increase COAT-platelet production in vitro. *J Lab Clin Med*. 2004; 143(5):320-6.
9. Dale GL. Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2185–92.
10. Dale GL, Friese P, Batar P, Hamilton SF, Reed GL, Jackson KW, Clemetson KJ, Alberio L. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature* 2002; 415: 175–9.
11. Batar P, Dale GL. Simultaneous engagement of thrombin and Fc-gamma-RIIA receptors results in platelets expressing high levels of procoagulant proteins. *J Lab Clin Med*. 2001;138:393–402.
12. London FS, Marcinkiewicz M, Walsh PN. A Subpopulation of platelets responds to thrombin- or SFLLRN-stimulation with binding sites for factor IXa. *J Biol Chem* 2004; 279: 19854–9.
13. Kulkarni S, Jackson SP. Platelet factor XIII and calpain negatively regulate integrin alphaIIb beta3 adhesive function and thrombus growth. *J Biol Chem*. 2004;279:30697–30706.
14. Kuijpers MJE, Schulte V, Oury C, Lindhout T, Broers J, Hoylaerts MF, Nieswandt B, Heemskerk JW. Facilitating roles of murine platelet glycoprotein Ib and alpha IIb beta 3 in phosphatidylserine exposure

- during vWF-collagen-induced thrombus formation. *J Physiol (London)*. 2004; 558:403–415.
15. Puszkin EG, Raghuraman V. Catalytic properties of a calmodulin regulated transglutaminase from human platelet and chicken gizzard. *J Biol Chem* 1985; 260: 16012–20.
 16. Devine DV, Bishop PD. Platelet associated factor XIII in platelet activation, adhesion and clot stabilization. *Sem Thromb Hemost* 1996; 22: 409–13.
 17. Szasz R, Dale GL. Thrombospondin and fibrinogen bind serotonin-derivatized proteins on COAT-platelets. *Blood* 2002;100:2827-2831.
 18. Szasz R, Dale GL. COAT-platelets. *Curr Opin Hematol*. 2003;10:351–355.
 19. Sims, J.P., Wiedmer, T., Unraveling the Mysteries of Phospholipid Scrambling. *Thromb Haemost* 86, 266-75.
 20. Kappelmayr J, Nagy B Jr, Miszti-Blasius K, Hevessy Z, Setiadi H. The emerging value of P-selectin as a disease marker. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:475-486.
 21. Gorodetsky R, Mou X, Blankenfeld A and Marx G. Platelet multielemental composition, lability and subcellular localization. *Am J Hematol* 1993;42:278-283.
 22. Iotova P, Ionova D, Kuleva V, Antonov S, Tzachev K, Nachev C. Zinc in plasma and platelets in patients on regular haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12(2):370-1.
 23. Whiss PA, Andersson RG. Divalent cations and the protein surface coordinate the intensity of human platelet adhesion and P-selectin surface expression. *J Biol Chem*. 2002;277(41):38462-7.
 24. Gordon, P. R., Woodruff, C. W., Anderson, H. L., and O'Dell, B. L. (1982) Effects of acute zinc deprivation on plasma zinc and platelet aggregation in adult males. *Am. J. Clin. Nutr.*, 35:113-118.
 25. Gordon, P. R., and O'Dell, B. L. (1980) Short-term zinc deficiency and hemostasis in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 163:240-244.
 26. Faure P, Durand P, Blache D, Favier A, Roussel AM. Influence of a long-term zinc-deficient diet on rat platelet function and fatty acid composition. *Minerva Med*. 1994;85(12):647-54.
 27. Kowalska MA, Juliano D, Trybulec M, Lu W, Niewiarowski S. Zinc ions potentiate adenosine diphosphate-induced platelet aggregation by activation of protein kinase C. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1993;203(4):480-4.
 28. Remenyi G, Szasz R, Friese P, Dale GL. Extruded zinc promotes COAT-platelet formation. *Blood* 2003; 102: 291a (Abstract).
 29. Wolf BB, Goldstein JC, Stennicke HR, Beere H, Amarante-Mendes GP, Salvesen GS, Green DR. Calpain functions in a caspase-independent

- manner to promote apoptosis-like events during platelet activation. *Blood*.1999;94:1683–1692.
- 30.Piguet PF, Vesin C, Da Kan C. Activation of platelet caspases by TNF and its consequences for kinetics. *Cytokine*. 2002;18:222–230.
 - 31.Rand ML, Wang H, Bang KWA, Poon KS, Packham MA, Freedman J. Procoagulant surface exposure and apoptosis in rabbit platelets: association with shortened survival and steady-state senescence. *J Thromb Haemostasis*. 2004;2:651– 659.
 - 32.De Botton S, Sabri S, Daugas E, Zermati Y, Guidotti JE, Hermine O, Kroemer G, Vainchenker W, Debili N. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*. 2002;100:1310–1317.
 - 33.Clarke MC, Savill J, Jones DB, Noble BS, Brown SB. Compartmentalized megakaryocyte death generates functional platelets committed to caspase-independent death. *J Cell Biol*. 2003;160:577–587.
 - 34.Bertino AM, Qi XQ, Li J, Xia Y, Kuter DJ. Apoptotic markers are increased in platelets stored at 37°C. *Transfusion*. 2003;43:857– 866.
 - 35.Perrotta PL, Perrotta CL, Snyder EL. Apoptotic activity in stored human platelets. *Transfusion*. 2003;43:526 –535.
 - 36.Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora’s box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:67–71.
 - 37.Remenyi G, Szasz R, Friese P, Dale GL. Role of mitochondrial permeability transition pore in coated-platelet formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:467-471.
 - 38.Garcia BA, Smalley DM, Cho H, Shabanowitz J, Ley K, Hunt DF. Platelet Microparticle Proteome. *Journal of Proteome Research* 2005, 4, 1516-1521.
 - 39.Böing AN, Hau CM, Sturk A, Nieuwland R. Platelet microparticles contain active caspase 3. *Platelets*, 2008; 19(2): 96–103.
 - 40.CP Chang, J Zhao, T Wiedmer, PJ Sims. Contribution of platelet microparticle formation and granule secretion to the transmembrane migration of phosphatidylserine *J. Biol. Chem.* Vol. 268, Issue 10, 7171-7178, 04, 1993.
 - 41.Susan F Lynch and Christopher A Ludlam. Plasma microparticles and vascular disorders. *British Journal of Haematology*, 137, 36–48, 2007.
 - 42.Dale GL, Remenyi G, Friese P. Quantitation of microparticles released from coated-platelets. *J Thromb Haemostasis* 2005;3:2081–2088.
 - 43.Rubinstein E, Le Naour F, Lagaudriere-Gesbert C, Billard M, Conjeaud H, Boucheix C. CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur J Immunol*. 1996;26(11):2657-65.

44. Gachet, C., A. Astier, H. de la Salle, C. de la Salle, W. H. Fridman, J. P. Cazenave, D. Hanau, J. L. Teillaud. 1995. Release of Fc RIIa2 by activated platelets and inhibition of anti-CD9-mediated platelet aggregation by recombinant Fc RIIa2. *Blood* 85:698.
45. Hemler ME. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Ann Rev Cell Develop Biol* 2003;19:397–422.
46. Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1189–1205.
47. Higginbottom A, Takahashi Y, Bolling L, Coonrod SA, White JM, Partridge LJ, Monk PN. Structural requirements for the inhibitory action of the CD9 large extracellular domain in sperm/oocyte binding and fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:208–214.
48. Schmid E, Zurbriggen A, Gassen U, Rima B, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. Antibodies to CD9, a tetraspan transmembrane protein, inhibit canine distemper virus-induced cell-cell fusion but not virus-cell fusion. *J Virol* 2000;74:7554–7561.
49. Clay D, Rubinstein E, Mishal Z, Anjo A, Prenant M, Jasmin C, Boucheix C, Bousse-Kerdiles MC. CD9 and megakaryocyte differentiation. *Blood* 2001;97:1982–1989.
50. Worthington RE, Carroll RC, Boucheix C. Platelet activation by CD9 monoclonal antibodies is mediated by the Fc gamma II receptor. *Br J Haematol* 1990;74:216–222.
51. Brisson C, Azorsa DO, Jennings LK, Moog S, Cazenave JP, Lanza F. Co-localization of CD9 and GPIIb-IIIa (alpha IIb beta 3 integrin) on activated platelet pseudopods and alpha-granule membranes. *Histochem J* 1997;29: 153–165.
52. Mangin PH, Kleitz L, Boucheix C, Gachet C, Lanza F. CD9 negatively regulates integrin alpha(IIb)beta(3) activation and could thus prevent excessive platelet recruitment at sites of vascular injury. *J Thromb Haemost* 2009;7:900–902.
53. Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A. et al. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* 2000;287:321–324.
54. Dale GL, Remenyi G, Friese P. Tetraspanin CD9 is required for microparticle release from coated-platelets. *Platelets*. 2009;20(6):361-6.
55. Jobe SM, Leo L, Eastvold JS, Dickneite G, Ratliff TL, Lentz SR, Di PJ. Role of FcR-gamma and factor XIIIa in coated platelet formation. *Blood* 2005;106:4146–4151.
56. Norgard NB, Saya S, Hann CL, Hennebry TA, Schechter E, Dale GL. Clopidogrel attenuates coated-platelet production in patients undergoing elective coronary catheterization. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008;52:536-539.

57. Prodan CI, Joseph PM, Vincent AS, Dale GL. Coated-platelets in ischemic stroke: Differences between lacunar and cortical stroke. *J Thromb Haemost* 2008;6:609-614.
58. Prodan CI, Vincent AS, Dale GL. Coated-platelet levels are elevated in patients with transient ischemic attack. *Transl Res* 2011;158:71-75.
59. Prodan CI, Vincent AS, Dale GL. Higher coated-platelet levels are associated with chronic hypertension in patients with transient ischemic attack. *Platelets*. 2012 Jun 21. [Epub ahead of print]
60. Prodan CI, Stoner JA, Cowan LD, Dale GL. Higher coated-platelet levels are associated with stroke recurrence following nonlacunar brain infarction. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012 Nov 14. [Epub ahead of print]
61. Prodan CI, Ross ED, Vincent AS, Dale GL. Rate of progression in Alzheimer's disease correlates with coated-platelet levels-a longitudinal study. *Transl Res* 2008;152:99-102.
62. Prodan CI, Szasz R, Vincent AS, Ross ED, Dale GL. Coated-platelets retain amyloid precursor protein on their surface. *Platelets* 2006;17:56-60.
63. Jenkins AJ, Gosmanova AK, Lyons TJ, May KD, Dashti A, Baker MZ, Olansky L, Aston CE, Dale GL. Coated-platelet levels in patients with Type 1 and with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008;81(2).
64. Valaydon ZS, Lee P, Dale GL, Januszewski AS, Rowley KG, Nandurkar H, Karschimkus C, Best JD, Lyons TJ, Jenkins AJ. Increased coated-platelet levels in chronic haemodialysis patients. *Nephrology (Carlton)*. 2009;14(2):148-54.
65. Prodan CI, Vincent As, Dale GL. Coated platelet levels correlate with bleed volume in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2010;41:1301-1303.
66. Saxena K, Pethe K, Dale GL. Coated-platelet levels may explain some variability in clinical phenotypes observed with severe hemophilia. *J Thromb Haemost* 2010;8:1140-1142.
67. Brooks MB, Catalfamo JL, Friese P, Dale GL. Scott syndrome dogs have impaired coated-platelet formation and calcein release but normal mitochondrial depolarization. *J Thromb Haemost* 2007;5:1972-1974.
68. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, Barosi G, Verstovsek S, Birgegard G, Mesa R, Reilly JT, Gisslinger H, Vannucchi AM, Cervantes F, Finazzi G, Hoffman R, Gilliland DG, Bloomfield CD, Vardiman JW. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 2007;110:1092-1097.
69. van Genderen PJ, Budde U, Michiels JJ, van Strik R, van Vliet HH. The reduction of large von Willebrand factor multimers in plasma in essential

- thrombocytopenia is related to the platelet count. *Br J Haematol* 1996;93:362-365.
70. Balduini CL, Bertolino G, Noris P, Piletta GC. Platelet aggregation in platelet-rich plasma and whole blood in 120 patients with myeloproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 1991;95:82-86.
 71. Yamamoto K, Sekiguchi E, Takatani O. Abnormalities of epinephrine-induced platelet aggregation and adenine nucleotides in myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost* 1984;52:292-296.
 72. Tsantes AE, Dimoula A, Bonovas S, Mantzios G, Tsigotis P, Zoi K, Kalamara E, Kardoulaki A, Sitaras N, Travlou A, Dervenoulas J, Vaiopoulos G. The role of the Platelet Function Analyzer (PFA)-100 and platelet aggregometry in the differentiation of essential thrombocytopenia from reactive thrombocytosis. *Thromb Res* 2010;125:142-146.
 73. Petrides PE, Siegel F. Thrombotic complications in essential thrombocytopenia (ET): clinical facts and biochemical riddles. *Blood Cells Mol Dis* 2006;36:379-384.
 74. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocytopenia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica* 2006;91:169-175.
 75. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter JC, Villamor N, Jou JM, Cervantes F. Automated assessment of the neutrophil and platelet activation status in patients with essential thrombocytopenia. *Platelets* 2012;23:336-343.
 76. Panova-Noeva M, Marchetti M, Buoro S, Russo L, Leuzzi A, Finazzi G, Rambaldi A, Ottomano C, Ten Cate H, Falanga A. JAK2V617F mutation and hydroxyurea treatment as determinants of immature platelet parameters in essential thrombocytopenia and polycythemia vera patients. *Blood* 2011;118:2599-2601.
 77. Panova-Noeva M, Marchetti M, Spronk HM, Russo L, Diani E, Finazzi G, Salmoiraghi S, Rambaldi A, Barbui T, Ten Cate H, Falanga A. Platelet-induced thrombin generation by the calibrated automated thrombogram assay is increased in patients with essential thrombocytopenia and polycythemia vera. *Am J Hematol* 2011;86:337-342.
 78. Bucalossi A, Marotta G, Bigazzi C, Galieni P, Dispensa E. Reduction of antithrombin III, protein C, and protein S levels and activated protein C resistance in polycythemia vera and essential thrombocytopenia patients with thrombosis. *Am J Hematol* 1996;52:14-20.
 79. Dienava-Verdoold I, Marchetti MR, te Boome LC, Russo L, Falanga A, Koene HR, Mertens K, Brinkman HJ. Platelet-mediated proteolytic down

- regulation of the anticoagulant activity of protein S in individuals with haematological malignancies. *Thromb Haemost* 2012;107:468-476.
80. Prodan CI, Joseph PM, Vincent AS, Dale GL. Coated-platelet levels are influenced by smoking, aspirin and selective serotonin reuptake inhibitors. *J Thromb Haemost* 2007;5:2149-2151.
 81. Norgard NB, Hann CL, Dale GL. Cangrelor attenuates coated-platelet formation. *Clin Appl Thromb Hemost* 2009;15:177-182.
 82. Reményi G, Szász R, Debreceni IB, Szarvas M, Batár P, Nagy B Jr, Kappelmayer J, Udvardy M. Comparison of coated-platelet levels in patients with essential thrombocythemia with and without hydroxyurea treatment. *Platelets*. 2012 Dec 5. [Epub ahead of print] PMID: 23216455
 83. Grotto HZ, Noronha JF. Platelet larger cell ratio (P-LCR) in patients with dyslipidemia. *Clin Lab Haematol* 2004;26:347-349.
 84. Kaito K, Otsubo H, Usui N, Yoshida M, Tanno J, Kurihara E, Matsumoto K, Hirata R, Domitsu K, Kobayashi M. Platelet size deviation width, platelet large cell ratio, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2005;128:698-702.
 85. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Russo L, Guerini V, Barbui T. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol* 2007;35:702-711.
 86. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Barbui T. Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol* 2005;33:523-530.
 87. Dale GL, Friese P. Bax activators potentiate coated-platelet formation. *J Thromb Haemost* 2006;4:2664-2669.
 88. Trelinski J, Chojnowski K, Cebula-Obrzut B, Smolewski P. Impaired apoptosis of megakaryocytes and bone marrow mononuclear cells in essential thrombocythemia: correlation with JAK2V617F mutational status and cytoreductive therapy. *Med Oncol* 2012;29(4):2388-95. Epub 2012 Mar 15.
 89. Johnson CA, Forster TH, Winterford CM, Allan DJ. Hydroxyurea induces apoptosis and regular DNA fragmentation in a Burkitt's lymphoma cell line. *Biochim Biophys Acta* 1992;1136:1-4.
 90. Cervantes F. Management of essential thrombocythemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:215-221.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom azoknak, akik segítették a kutatómunkámat és ezen dolgozat létrejöttében ilyen formában is részt vettek:

W.K. Warren Medical Research Institute, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, Oklahoma, USA:

Prof. George L. Dale PhD
Paul Friese

DEOEC Laboratóriumi Medicina Intézet:

Bekéné Debreceni Ildikó
Prof. Dr. Kappelmayer János
Dr. Nagy Béla Ph.D.

DEOEC Belintézet, Hematológiai Tanszék:

Dr. Batár Péter Ph.D.
Szarvas Marianna
Dr. Szász Róbert
Prof. Dr. Udvardy Miklós

Függelék

A függelék az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények különlenyomatait tartalmazza.

Iktatószám: DEENKÉTK/94/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Reményi Gyula

Neptun kód: BSY8F1

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

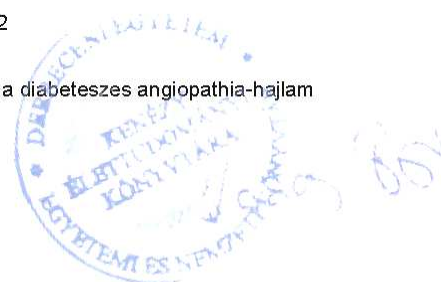
1. **Reményi, G.**, Szász, R., Bekéné Debreceni, I., Szarvas, M., Batár, P., Nagy, B., Kappelmayer, J., Udvardy, M.: Comparison of coated-platelet levels in patients with essential thrombocythemia with and without hydroxyurea treatment.
Platelets. Epub ahead of print (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/09537104.2012.731112>
IF:1.847 (2011)
2. Dale, G.L., **Reményi, G.**, Friese, P.: Tetraspanin CD9 is required for microparticle release from coated-platelets.
Platelets. 20 (6), 361-366, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/09537100903096692>
IF:2.272
3. Dale, G.L., **Reményi, G.**, Friese, P.: Quantitation of microparticles released from coated-platelets.
J. Thromb. Haemost. 3 (9), 2081-2088, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01528.x>
IF:5.262
4. **Reményi, G.**, Szász, R., Friese, P., Dale, G.L.: Role of mitochondrial permeability transition pore in coated-platelet formation.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 25 (2), 467-471, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000152726.49229.bf>
IF:7.053



További Közlemények

5. Telek B., Rejtő L., Kiss A., Batár P., **Reményi G.**, Szász R., Ujj Z.Á., Udvardy M.: A felnőttkori heveny myeloid leukaemia korszerű kezelése.
Orv. Hetil. 153 (7), 243-249, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2012.29304>
6. Telek B., Rejtő L., Batár P., **Reményi G.**, Szász R., Kiss A., Udvardy M.: Gyakorlati szempontok és kérdések a krónikus lymphoid leukaemia kezelésében.
Orvosi Hetilap. 152 (24), 958-963, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2011.29135>
7. Jakó J., Kiss A., Szerafin L., **Reményi G.**: Russel-testek és Mott-sejtek tömeges megjelenése myeloma multiplexben.
Hematológia-Transzfuziológia. 43 (4), 305-311, 2010.
8. Kiss, A., **Reményi, G.**, Batár, P., Szász, R., Rejtő, L., Radványi, G., Fodor, Z., Galuska, L., Udvardy, M.: Zevalin-BEAM conditioning treatment followed by stem cell rescue in follicular lymphoma patient: Single-centre experiences.
Bone Marrow Transplant. 45 (Suppl. 2), S259-S260, 2010.
9. Rejtő, L., Schlamadinger, Á., Ilonczai, P., Tornai, I., Batár, P., **Reményi, G.**, Kiss, A., Udvardy, M.: Treatment of mantle cell lymphoma with autologous stem-cell transplantation in a patient with severe congenital haemophilia-A and chronic (B and C virus) hepatitis.
Haemophilia. 16, 706-709, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2516.2010.02243.x>
IF:2.364
10. **Reményi G.**, Gál A., Magyar F., Miltényi Z., Garai I., Illés Á., Udvardy M.: Pre- és poszttranszplantációs 18FDG-PET/CT prognosztikai jelentősége Hodgkin- (HL) és non-Hodgkin-lymphomákban (NHL).
Hematológia-Transzfuziológia. Suppl. 43 (1), 51, 2010.
11. Kiss A., **Reményi G.**, Szász R., Batár P., Rejtő L., Váróczy L., Sipos T., Kovácsné K.E., Szarvas M., Udvardy M.: Százötven autológ perifériás haemopoeticus őssejt transzplantáció és tanulságai.
Orv. Hetil. 150 (27), 1251-1257, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2009.28557>

12. Kiss, A., **Reményi, G.**, Szász, R., Batár, P., Rejtő, L., Váróczy, L., Sipos, T., Kovács, E., Szarvas, M., Udvardy, M.: One hundred and fifty autologous peripheral haemopoietic stem cell transplantations performed at the department of medicine, Debrecen University Medical Centre and lessons drawn from them.
Clin. Exp. Med. J. 3 (3), 431-442, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/CEMED.3.2009.28557>
13. Rejtő, L., Biró, S., Vargha, G., Ujj, Z., Batár, P., Szász, R., Telek, B., Kiss, A., **Reményi, G.**, Méhes, L., Udvardy, M.: Exploring wilms tumor gene (*wt1*) in acute myeloid leukemia: Initial experiences.
Haematologica. Suppl. 94, 554, 2009.
14. Telek B., Pfliegler G., **Reményi G.**, Méhes L., Batár P., Udvardy M.: Krónikus lymphoid leukaemia transzformációja myelodysplasticus szindrómába: Betegismertetés és az irodalom áttekintése.
Orv. Hetil. 150 (15), 689-692, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2009.28597>
15. Kiss A., **Reményi G.**, Batár P., Rejtő L., Radványi G., Fodor Z., Galuska L., Udvardy M.: Zevalin-Beam kondicionáló terápia autolog perifériás haemopoetikus őssejt transzplantációban follikuláris non-Hodgkinn lymphomás betegekben.
Orvostud. Ért. 81 (2), 108-111, 2008.
16. Gergely, L., Zombori, L., Rész, Z., Váróczy, L., **Reményi, G.**, Baráth, S., Illés, Á.: Regulatory T cells in non-Hodgkin lymphoma patients (P127).
Blood Rev. Suppl. 21 (1), S127. p., 2007.
17. Kiss, A., Ujfalusi, A., Csépany, T., **Reményi, G.**, Batár, P., Balogh, E., Udvardy, M.: Central nervous system involvement in blastic phase of chronic myeloid leukaemia during imatinib treatment.
Hematológia-transzfuziológia. 40 (3), 255-258, 2007.
18. Rejtő, L., Biró, S., Telek, B., Kiss, A., Batár, P., **Reményi, G.**, Szász, R., Méhes, L., Udvardy, M.: Exploring WILMS tumour gene in acute leukemias: Initial experiences.
Blood Rev. Suppl. 21 (1), S109, 2007.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0268-960X\(07\)70149-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-960X(07)70149-2)
19. Udvardy M., **Reményi G.**, Rejtő L., Káplár M.: Gondolatok a diabeteszes angiopathia-hajlam vascularis hematológiai vizsgáló módszereiről.
Diabetol. Hung. 9 (4), 205-211, 2004.



20. Méhes, L., Simon, Á., Rejtő, L., Kiss, A., **Reményi, G.**, Batár, P., Telek, B., Udvardy, M.: CD38 sejtfelszíni marker prognosztikai jelentősége krónikus lymphoid leukaemiában =Prognostic value of CD38 cell surface marker in chronic lymphocytic leukemia.
Orv. Hetil. 144 (31), 1531-1535, 2003.
21. **Reményi G.**, Udvardy M., Kiss A., Telek B.: Paroxysmalis nocturnalis haemoglobinuria.
Orv. Hetil. 143 (17), 887-890, 2002.
22. Telek, B., Rejtő, L., Kiss, A., Batár, P., **Reményi, G.**, Rák, K., Udvardy, M.: Fludarabinkezeléssel szerzett tapasztalataink és az irodalom áttekintése =Experience with fludarabine treatment and review of the literature.
Orv. Hetil. 143 (24), 1459-1465, 2002.
23. Udvardy M., Rejtő L., **Reményi G.**, Káplár M.: A B28ASP (insulin B 28) és a Lispro (Lispro) analóg inzulinok in vitro thrombocyt-aggregációs és fibrinolyticus hatásai.
Diabetol. Hung. 10 (3), 189-191, 2002.
24. Szűcs-Farkas Z., Horkay E., Tóth J., Szluha K., **Reményi G.**, Péter M.: Tanulságok malignus fibrosus histiocytoma (MFH) kapcsán.
Magyar Radiol. Suppl. Suppl. 1., 153, 2000.
25. Pásztor É., Décsy J., Dévényi K., Sikula J., Altorjay I., Mikita J., Palatka K., **Reményi G.**, Péter M.: A gyomor leiomyomájának diagnosztikai lehetőségeiről: Két esetünk kapcsán.
Orv. Hetil. 140 (45), 2525-2527, 1999.

Összesített impact faktor: 18.798

Összesített impact faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 16.434

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

Debrecen, 2013.03.04

