

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

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

Dr. Reményi Gyula

Témavezető: Prof. Dr. Udvardy Miklós



DEBRECENI EGYETEM

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2013

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

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Reményi Gyula okleveles általános orvosdoktor

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Udvardy Miklós, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Demeter Judit, az MTA doktora
Dr. Soltész Pál, PhD

A doktori szigorlat időpontja és helye: 2013 szeptember 10. 11 óra, a Gyermekklinika Könyvtára

Az értekezés bírálói: Dr. Vezendi Klára, PhD
Dr. Bagoly Zsuzsa, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Demeter Judit, az MTA doktora
Dr. Soltész Pál, PhD
Dr. Vezendi Klára, PhD
Dr. Bagoly Zsuzsa, PhD

Az értekezés védésének időpontja és helye: 2013 szeptember 10. 13 óra, a Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

Bevezetés

Ha a vérlemezkéket egyszerre thrombinnal és kollagénnel aktiváljuk, akkor annak ellenére, hogy az összes thrombocytá maximumális aktiváció esett át 2 populáció alakul ki a vérlemezkék felszínén kimutatható alfa-granulum eredetű fehérjék alapján. A thrombocyták mintegy 30%-án 10-100x több ilyen alvadás aktív anyag halmozódik fel. Mivel ez kettős stimulusra (collagén és thrombin) alakult ki, ezért korábban COllagen And Thrombin= COAT thrombocytáknak nevezték. A kollagén helyett a szintén a GPVI receptort aktiváló kígyméreg, a convulxin is ugyanolyan hatásos. 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, hanem coated (fedett) thrombocytának nevezzük. Coated-thrombocytát hoz létre a convulxin + thrombin aktiváció mellett például thrombin + Fc receptor kötés, nagy dózisu thrombin, thrombin receptor agonista peptid (TRAP) vagy az immobilizált kollagénnel történő thrombocytá aktiválás. 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-thrombocytá képződik, mint 37 °C-on. Az újonnan képződött vérlemezkék szintén nagyobb százalékban ($\approx 70\%$) alakulnak fedett vérlemezkékké. Fontos kihangsúlyozni két dolgot a coated-thrombocytá kialakulásával kapcsolatban:

1. A vérlemezke aktiváció során olyan koncentrációban van jelen az aktivátor thrombin és convulxin, hogy a reakció során az **összes** thrombocytá 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.

A coated-thrombocyták az V Faktoron kívül más, α -granulum eredetű, alvadásaktív anyagokat is prezentálnak a felszínükön úgymint: fibrinogén, von Willebrand faktor (vWF), α_2 anti-plazmin (α_2 AP), fibronektin, thrombospondin. Az α -granulum eredetű fehérjék a coated-vérlemezke képződés során szerotoninálódnak, majd transzglutamináz reakciót igénybe véve thrombocytá felszínén található fibrinogénhez és thrombospondinhoz kötődnek, ezáltal egy hálózatos, összefonódott struktúrát, bevonatot hoznak létre. Másik jellegzetessége a coated-thrombocytáknak foszfatidil-szerin megjelenése a vérlemezke sejtmembrán extracelluláris oldalán. 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.

Célkitűzések

I. A coated-vérlemezékkel végzett alapkutatás

I/1 A cink és a coated-vérlemezke kapcsolata

A vérlemezék nagy mennyiségű cink iont tartalmaznak. A cinknek számos biológiai folyamatban van szerepe, ugyanakkor a hiánya többek között vérzékenységhez vezet. A coated-thrombocyták, hiperaktív vérlemezék, 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 vérlemezékéből. 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-vérlemezék kapcsolata

A vérlemezke eredetű mikropartikulák a szervezetben előforduló leggyakoribb mikropartikulák. Mind a normális hemosztázis fenntartásában, mind patológiás állapotokban bizonyított a szerepük. Az aktivált thrombocytákról fűződnék 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 essentialis thrombocytáemiában

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-thrombocytá arányt találtak ez eddigi irodalom alapján. A nagy vérelemzke számmal járó essentialis thrombocytáemiában még eddig senki sem vizsgálta a coated-thrombocytákat. A klinikánkon gondozott ET-s betegekből kialakított homogén betegcsoport coated-thrombocytá arányait hasonlítottuk egészséges kontrollokéhoz. Vizsgáltuk, hogy a hydroxyurea kezelés hogyan befolyásolja az észlelt alacsony coated-thrombocytá szintet?

Vizsgálati módszerek

A gélfiltrált thrombocytá előkészítése:

Mind az alapkutatóban, 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 pufferelt 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 használhatunk (ill. egyéb FITC jelölt antitestet) jelölésként. Bodipy jelölésnél közvetlenül a használata előtt 5 mM bodipy-maleimid-et 1:10-re felhígítottuk HEPES/fiz. sóban és ebből 5 μL -t adtunk 1 mL gélfiltrált thrombocytához, amit 37 C fokon, 5 percig inkubáltunk. A bodipy-maleimid végkoncentrációja 2.5 μM volt. 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 a Fc γ RIIa receptor blokkolásával gátoljuk a vérlemezkék anti-CD9 általi aktiválódását. Anti-GPIIb/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/fiz. só 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 következett a korábbiak szerint, majd PBS-ben reszuszpendáltuk a jelölt thrombocytákat. A P-selectin (CD62) meghatározás a korábbi módon leírtak szerint történt.

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 thrombocytába, ahol az intracitoplazmatikus észteráz az észter gyököt lehasítja, ami után már membrán impermeábilissá válik. A gélfiltrált nyugvó, vagy aktivált

thrombocytákat PBS pufferben 30 percig 37 °C-on inkubáltuk 25 µM NG-Ac festékkel. PBS mosás után a mintákat microwell lemezen fluorofotométerrel (Fluorocount; Packard, Rungis, Franciaország) mértük 485 és 530 nm hullámhosszon, PBS/25 µM NG-AC blank mellett.

b-BSA-(5-HT)₆ ELISA

A gélfiltrált thrombocytákat a MIX reakcióelegyben 10 µg/mL b-BSA-(5-HT)₆-azido-tetrafluoro-benzolsavval és az aktivátorokkal inkubáltuk 37 °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). Chymotrypsin 1 µg/mL 30 percig, 37 °C-on emésztés után a sejteket lizáltuk 0.5%-os Triton X-100 oldattal. 10 µg/mL anti-fibrinogénnel fedett és 2 mg/mL BSA-val blokkolt microtiter ELISA lemezeket 100 µL thrombocytá lizátummal töltöttük fel 90 percre szobahőn. A lekötődött BSA-(5-HT)₆-t streptavidin-peroxidázzal mutattuk ki.

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.

Betegek és módszerek

Klinikánkon gondozott, 175 ET-s betegből, flowcytometriás módszerrel 43, nem diabéteszes, NSAID-ot nem szedő 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.

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 vettünk. A vérminta további feldolgozása és a coated-thrombocyták kimutatása megegyezett a humán kísérleteknél alkalmazott eljárással.

Statisztika:

Az adatokat a Student t-tesztel hasonlítottuk össze és a statisztikai szignifikancia $P < 0.05$ volt. Az MPTP-s mikropartikula termelődési adatokat páros t-tesztel 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-számmal. A csoportok közti variancia analízis Kruskal-Wallis tesztel 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, hajszálban 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. Ennek fiziológiás 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. A cink hiány ugyanakkor vérzéses diatézishez vezet. Ezek miatt felmerült, hogy a cinknek szerepe lehet a coated-vérlemezkék kialakulásánál, működésénél.

Eredmények

Cinkkelátorok 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.

A thrombocyták intracelluláris cink tartalma ugyanakkor a 40 \pm 17%-kal csökkent a hármas aktiváció során. A μM 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. A cink szerepe mellett szól az is, hogy 40 napig cinkmentes diétán tartott patkányok szignifikánsan kevesebb coated-thrombocytát képeztek kettős agonista stimulusra.

Megbeszélés

A cink ion szerepe a vérlemezke 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 vérlemezkéknél.

I/2. pórus képződés a coated-vérlemezke 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.

Eredmények

Mivel a Newport-green molekulamérete ismert, a pórus legalább akkora kell legyen, hogy az átférjen rajta. A folyamat fordítva is működik: a gyilkos galóca mérgeének 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. 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. A pórus ezen meghatározás szerint 2100-3400 dalton maximális tömegű molekulák átengedésére képes. Ilyen méretű csatorna a mitokondrium membránjában lévő, az apoptózis során átmenetileg kialakuló pórus az *átmeneti mitokondrium permeabilitási pórus* (mitochondrial permeability transition pore, MPTP). Apoptózis szignálkor többek között ez a csatorna aktiválódik, ami együtt jár a mitokondrium duzzadásával, a mitokondrium potenciál a ($\Delta\Psi_m$) csökkenésével és a citokró-m-c citoplazmába áramlásával és a caspas-3 és caspas-9 aktivációval. Az MPTP és a coated-thrombocyták közötti kapcsolatot az MPTP gátló cyclosporin-A, coenzym Q, bongkrekic sav, valamint az MPTP aktiváló atractyloside, fenil-arzénoxid (PAO) és diamide-dal vizsgáltuk egy, a mitokondrium potenciálra ($\Delta\Psi_m$) érzékeny fluoreszcens festékkel (JC-1) együtt a coated-thrombocytára jellegzetes, próbákkal, úgy, mint: a fibrinogén retenció, a phalloidin

beáramlás és a foszfatidil-szerin jelölődés. Az MPTP inhibitorok egyidejűleg a coated-thrombocyták termelődését is meggátolták, míg az MPTP aktivátorok fokozták a coated-thrombocyták termelődését.

Megbeszélés

A coated-thrombocyták 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 gátolók 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 thrombocyták mikropartikulák és a coated vérlemezkék kapcsolata

Bevezetés

A thrombocyták mikropartikulák 0.1-1 μm átmérőjű, szabálytalan alakú részecskék, melyek thrombocyták 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, caspáz, citokrom-C. További tulajdonságuk a felszíni foszfatidil-szerin pozitívitás, ezáltal a felszíni negatív töltés. Ezeknek köszönhetően fokozzák a tenáz, prothrombináz aktivitást, a koagulációt. Számos betegségben észlelték a thrombocyták mikropartikulák emelkedett szintjét: SLE, sarlósejtes vérszegénység, paroxysmális nocturnal haemoglobinuria, krónikus myeloproliferatív betegségek, cukorbetegség, veseelégtelenség, magasvérnyomás. Mivel a

coated-vérlemezkék is foszfatidil-szerinrel rendelkeznek az extracelluláris felszínükön kézenfekvő a lehetséges kapcsolat a coated-thrombocyták és a thrombocyták mikropartikulák közt. A thrombocyták mikropartikulák vizsgálatára egy erősen fluoreszkáló citoplazmatikus festéket a bodipy-maleimidet használtuk.

Eredmények

Konfokális mikroszkópos vizsgálat alapján, hogy ha a bodipyvel előinkubált sejteket convulxinral és thrombinnal aktiváljuk, akkor nagy mennyiségű 0.3-0.5 μm átmérőjű mikropartikula képződik. FITC-anti GPIIb/IIIa antitestet használva látható, hogy az összes vérlemezke és mikropartikula felszínén megtalálható ez az integrin, míg Alexa-568-annexinnel az összes mikropartikula, ugyanakkor a thrombocyták csak egy része (a coated-thrombocyták) bizonyult pozitívnak, azaz foszfatidil-szerint expresszálnak. Szólv convulxin és thrombin aktiváció csak kevés mikropartikulát képez, ugyanakkor a Ca-ionofor A23187 már önmagában is és thrombinnal együtt is nagymennyiségű mikropartikulát generál. Flowcytometriás vizsgálattal meg tudjuk adni a mikropartikula mennyiségét, darabra, ami különböző stimulusokra (kontroll, convulxin és thrombin, convulxin, thrombin, Ca-ionofor + thrombin, Ca-ionofor) képződött. 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. 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 thrombocyták mikropartikula mennyisége között.

Megbeszélés

A thrombocytá aktiváció során képződött mikropartikuláknak fontos szerepe lehet a hemosztázisban, különösen ITP-ben, tekintettel arra, hogy a negatív felszíni töltésükkel ideális helyet teremtenek a prothrombináz komplexnek. Méretüknél fogva a thrombocytá mikropartikulák megjelenítése, vizsgálata nehézségekbe ütközik. 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.

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

Bevezetés

A CD9 fehérje (p24, motility related protein 1) a transzmembrán 4 vagy másként tetraspanin szupercsalád tagja (TM4SF). A vérlemezkék 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. A CD9 számos biológiai folyamatban vesz részt, úgymint sejt növekedés, motilitás, sejtadhézió, sejtaktiváció és a jelátvitel. A tetraspanin molekulák hálózatos szerkezete, a tetraspanin háló, a sejt-fúzióban vesz még részt. Ehhez szükséges a sejt-felszíni integrinekhez történő kapcsolódás, komplex képződés. Ilyen sejt-fúzió pl. a petesejt és a spermium összeolvadása. A CD9 fehérje a thrombocyták felszínén nagy mennyiségben fordul elő. 40000

kópia/vérlemezke számmal a harmadik leggyakoribb fehérje. A CD9 szerepe a vérlemezke működésében nem ismert. A megakaryocyták érésében részt vesz, valamint a GPIIb/IIIa-hoz és a Fc γ RIIa-hoz kapcsolódva szükséges az előbbi aktiválásához. CD9 hiányos egereknél azonban nincs kimutatható hemosztázis zavar. Korábban kimutattuk, hogy thrombin + ALB6 (egy anti-CD9 monoklonális antitest) agonista pár esetén, bár átlagos mennyiségű coated-thrombocytát eredményezett, a mikropartikula képződés azonban szinte teljes mértékben elmaradt. Ebből az következik, hogy a mikropartikula képződéshez esszenciális a CD9 molekula.

Eredmények

Négy 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. Ez a gátló hatás még kifejezettebb volt a kalcium ionofor A23187 + thrombin vérlemezke aktiválásnál. 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. Konfokális mikroszkóppal is látható, hogy ALB6 alkalmazása mellett nem volt kimutatható mikropartikula convulxin + thrombinnal aktivált vérlemezkek esetén. 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 és 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.

Megbeszélés

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 háló képez, ami a biológiai hatásért felelős. Négy, összesen 3 különböző epitópra specifikus anti-CD9 monoklonális antitest is hasonlóan viselkedett. A különböző epitópon 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 α_{IIb}/β_3 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 sejtszétválás, darabolódás, mikropartikula képződésben betöltött szerepe is bizonyítást nyert.

II. A coated-thrombocyták vizsgálata essentialis thrombocythaemiában.

Bevezetés

A coated-thrombocyták felfedezése, alapvető tulajdonságaik feltérképezése az elmúlt bő évtizedben történt. Ezen hiperaktív vérlemezéknek fontos szerepe lehet különböző ischémiás, tromboembóliás betegségekben. Ezen kézenfekvő feltételezések ellenére a klinikai kutatások még gyermekcipőben járnak. Néhány eredmény azonban már elérhető: Coronariakatéterezés után, corticalis stroke-ban, átmeneti ischémiás attack (TIA) esetén, különösen magasvérnyomás esetén mértek magasabb coated-thrombocytá értékeket az egészséges kontrollokhöz képest. Mint, ahogy rekurráló non-lacunar stroke-nál is. Érdekes, meglepő megfigyelés, hogy Alzheimer kórbán is hasonló eredményeket kaptak. Cukorbetegségben és krónikus hemodialízisben szintén emelkedett volt a coated-vérlemezék aránya. Alacsonyabb coated-thrombocytá értékeket észleltek spontán cerebrális vérzés, lacunar stroke, valamint súlyos A hemofília esetén. Állatkísérletben kimutatták, hogy Scott szindrómában alacsony a coated-thrombocyták aránya, ami magyarázhatja a hemosztázis zavart. Essentialis thrombocythaemiában (ET) vizsgáltuk a coated-thrombocyták szerepét. A krónikus myeloproliferatív betegségek közé tartozó essentialis thrombocythaemia jellegzetessége a tartósan magas (>450 G/L) vérlemezke-szám, ami trombotikus és vérzéses szövődeményekkel is járhat. Az esetek 50%-ban a JAK-2 kináz V617F mutációja is kimutatható. A morbiditás és a mortalitás legnagyobb százalékkal a tromboembóliás szövődemények 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 szövődemények ritkábban fordulnak elő, általában a nagyon

magas thrombocyta-számhoz (>1500 G/L) társulnak és bőr, valamint nyálkahártya-vérzések formájában jelentkeznek. Az ET-ban észlelhető thrombocytopathiával kapcsolatban számos, gyakran egymásnak ellentmondó közlés létezik. Fokozott aggregációs készség mellett csökkent epinefrin és kollagén érzékenységet is kimutattak, alacsonyabb ristocetin kofaktor/vWF antigén aránnyal és a nagy vWF multimerok csökkent szintjével. A PFA záródási idő (CT) rendszerint megnyúlt, függetlenül attól, hogy vannak-e trombotikus, vagy vérzéses szövődmények. 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, a több fiatal, éretlen vérlemezke, a fokozott thrombin termelődés is. Az ET-ben észlelhető szerzett thrombophilia háttérében még kimutatták az antithrombin III, protein C és S hiányát is. Ezek ellenére még nincsen olyan ex vivo teszt, ami megadná a trombózis/vérzés rizikó mértékét.

Eredmények

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. Az ET betegeknél magasabb vérlemezkeszámot találtunk (577 ± 161 G/L, 513 ± 127 G/L vs. 294 ± 67 G/L) és a nagy thrombocyta 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 vérlemezkekéi 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) 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 kezelt coated-thrombocytá aránya már nem különbözött a kontrolltól ($34.1\pm 12.3\%$, $p=0.3799$), míg a nem kezelt csoporttól szignifikánsan ($p=0.0008$) eltért. 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%).

Megbeszélés

Mind az emelkedett, mind a csökkent coated-thrombocytá számra vannak klinikai példák: emelkedett arány figyelhető meg cukorbetegségben, TIA-ban, koronária betegségben, míg csökkent arányt találtak agyvérzésnél, nem lacunaris agyi infarktusnál és súlyos haemophilia A-nál. Ez a vizsgálat az első, ami a coated-thrombocyták szerepét kutatja ET-ben. ET leggyakrabban az idősebbeknél alakul ki, ez magyarázza, hogy a kontroll csoport tagjai szignifikánsan fiatalabbak azonban sikerült egy korban egyező alcsoportot létrehozni (6 ET beteg és 6 kontroll, 52.2 ± 13.2 év vs. 49 ± 9.7 év, $p=0.322$). Az ET-s csoportban szignifikánsan magasabb volt a thrombocytá-szám és a nagy thrombocyták aránya. Hasonlóan a korábbi tanulmányok eredményéhez mi is emelkedett P-selectin értékeket kaptunk a flowcytometriás vizsgálatok során az ET-s csoportban a kontrollhoz képest. A legszembetűnőbb eltéréseket a coated-thrombocytákkal kapcsolatban

nyertük. A nem kezelt ET-s betegek coated-thrombocytá aránya szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll ($p=0.0008$), ugyanakkor a kezelt csoportnak már szignifikánsan emelkedett a coated-thrombocytá 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-thrombocytá képződésre ET-ben. Mindez olyan betegeknél, akik anamnézisében nem szerepel trombotikus, vagy vérzéses szövődmény. Az életkorban is a kontrollal megegyező ET-s alcsoportban szintén az ET-s betegek coated-thrombocytá 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. Figyelemre méltó megfigyelés az a tendencia, hogy a legalacsonyabb coated-thrombocytá értékeket a JAK2-V617F mutáció pozitív, nem kezelt betegeknél mértük (21.8%), míg a kezelt, mutáció pozitív (33.1%) és a JAK2-V617F negatív kezelt (30.1%) és kezelt (36.6%) betegek értékei egymáshoz hasonlóak és a kontroll közeli (37.6%) Korábbi közlések szólnak a JAK2-V617F mutáció és a vérlemezkék P-selectin expressziója, valamint a thrombocytá-leukocytá interakciókról. A coated-thrombocytá képződésben részt vevő mechanizmusok részben azonosak az apoptózisban megfigyelhető folyamatokkal. A proapoptótikus hatások (pl. BAX aktivátor) emelik, míg az apoptózis gátlók (pl. caspase inhibitorok, MPTP gátlók) csökkentik a coated-thrombocytá képződést. ET-ben legújában az apoptózis zavarát mutatták ki. Tekintve, hogy a HU a dózissal egyenes arányban fokozza az apoptózist feltételezzük, hogy a HU az apoptózis fokozásával emeli a coated-thrombocyták 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) általunk vizsgált betegpopulációban nem fordult elő 1500 G/L feletti thrombocytá szám. Huszonhat beteg volt 60 évesnél

idősebb, de ezek coated-thrombocytá 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-thrombocytá arány hozzájárulhat a vérlemezkék működészavarához, aminek a tisztázása még további vizsgálatokat kíván.

Összefoglalás – Új megállapítások

- A coated-thrombocyták képződését a szérumban ill. a vérlemezkék cink tartalma befolyásolja. A szerotoninált α -granulum eredetű fehérkék sejtfelszíni kovalens kötődését facilitálja. A cinkhiány következményében kialakult vérzészavar hátterében a csökkent coated-thrombocytá arány is állhat.
- A coated-thrombocyták képződésében az apoptózisban szerepet játszó mechanizmusok is részt vesznek. Ilyen pl. a mitokondrium permeabilitási átmeneti pórus, aminek gátlása, vagy aktiválása a coated-vérlemezkék arányát csökkenti, ill. növeli.
- Minden coated-thrombocytá átlagosan 15-25 thrombocytá-mikropartikulát hoz létre. Ezen mikropartikulák aktív szereplői a hemosztázisnak.
- A CD9 tetraspanin szükséges a thrombocytá-mikropartikulák képződéséhez, gátlása esetén nem jönnek létre mikropartikulák. A CD9-nek ismert szerepe van a sejtfúzióban, ez az első példa, hogy a sejt darabolódásban is részt vesz.
- Essentialis thrombocytáemiában a coated-thrombocyták aránya szignifikánsan alacsonyabb, az egészséges kontrollokhoz képest, mely arányt az apoptózist is gátló hydroxyurea csaknem normalizál. Ez az alacsonyabb coated-thrombocytá arány független a kortól, a thrombocytá-számtól. A JAK2V617F mutáció pozitív esetekben még alacsonyabb értékeket találtunk.

Az alacsony coated-vérlemezke arány hozzájárulhat az ET-ben észlelt thrombocytopeniához.

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

Jelölt: Reményi Gyula

Neptun kód: BSY8F1

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

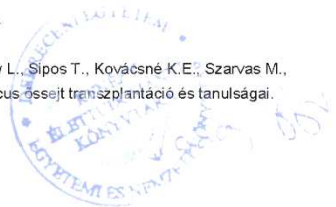
A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

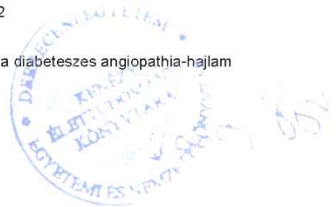


További Közlemények

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., Schlammadinger, 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., Magyarai 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 haemopoieticus 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 folliculáris 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 vasculáris 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 nocturnal is 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., Altörjay 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

