

Batár Péter

**KÉT AGONISTÁVAL EGYSZERRE AKTIVÁLT VÉRLEMEZKÉK:
A PRIMÉR HEMOSZTÁZIS ÚJABB ELEMEI**

Témavezető: Prof. Dr. Udvardy Miklós

Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Belgyógyászati Intézet
II. Belgyógyászati Klinika
Hematológiai Tanszék
Debrecen
2007

BEVEZETÉS

A vérlemezék két igen fontos mechanizmussal vesznek részt a véralvadás folyamatában. Aktivációjukkor egyrészt a sérült érfalhoz, illetve egymáshoz tapadva létrehozzák az úgynevezett primér hemosztatikus dugót. Másrészt az aktiváció során megszűnő vérlemezke membrán aszimmetria révén, melynek során a külső membrán felszínén negatív töltésű amino-phospholipidek halmozódnak fel, megfelelő katalitikus felszínt biztosítanak a koagulációs kaszkád két kulcsfontosságú enzim-komplexének, a tenase illetve a prothrombinase komplexek létrejöttéhez. Ez a dolgozat az aktivált vérlemezék egy speciális, korábban fel nem ismert alcsoportját mutatja be. Az egy időben, kétféle agonistával egyszerre aktivált vérlemezék a primér hemosztatikus fentebb vázolt, mindkét kulcslépésében fontos szerepet játszhatnak.

A vérlemezke aktiváció különböző fiziológias illetve adott esetben patofiziológias agonistáknak, a vérlemezék felszínén található specifikus receptorokhoz történő kapcsolódása révén jön létre dinamikus, térben és időben szigorúan meghatározott módon. Számtalan kutatócsoport vizsgálta már és írta le pontosan ezen agonista-receptor rendszerek kinetikáját, jelátviteli mechanizmusát. Részletesen feltárták a különböző (pl. gyenge vagy erős) agonisták vérlemezke aktivációt előidéző szinergizmusát, jellemezték a szolubilis adhezív fehérjék interakcióját szuszpendált, szilárd felszínhez kötött vagy áramlási kamrában vizsgált vérlemezékkel.

A vérlemezék elsődleges feladata a vérzés megállítása és az érstruktúra integritásának helyreállítása. Ezen funkciók ellátásában a vérlemezék plazmamembránja, valamint a thrombocyt receptorok és adhezív fehérjék (integrinek, selectinek) játszanak központi szerepet. A vérlemezék membránját foszfolipidek, koleszterol és fehérjék alkotják. A kettős lipidrétegben a foszfolipidek asszimmetrikus elhelyezkedésűek. A nyugalomban lévő vérlemezék membránjában a neutrális foszfolipidek (foszfatidil-kolin) főként a sejt külső felszíne felé néznek, míg a negatív töltésűek (foszfatidil-szerin és foszfatidil-etanolamin) főként a belső felszínen helyezkednek el. Aktiváció hatására a foszfatidil-szerin (PS) és a foszfatidil-etanolamin (PE) molekulák, Ca^{++} dependens módon, a plazmamembrán külső felszínére transzlokálódnak. Az aktivált thrombocyták plazmamembránjának külső lipidrétegében túlsúlyba kerülő PS hatására a vérlemezék felszínén negatív töltés alakul ki, ami a koagulációs kaszkád két fontos enzim

komplexének (tenase és prothrombinase) kialakulását segíti elő. Mind a nyugalmi plazmamembrán asszimmetria fenntartása, mind pedig az aktiváció hatására bekövetkező foszfolipid átrendeződés energiaigényes folyamat.

A thrombocyta aktiváció és aggregáció kulcsfontosságú eseményei, az extracelluláris tér és a vérlemezék közötti kapcsolat, a különböző agonisták és adhezív fehérjék specifikus hatásai és nem utolsósorban a plazmamembránhoz kötött jelátviteli mechanizmusok, mind receptorhoz kötött folyamatok. A vérlemezék felszínén és intracelluláris organelleiben számos, eltérő funkciójú és eloszlású receptor család került eddig leírásra, melyek a thrombocytákat képessé teszik a különböző fiziológias vagy patológias körülményekhez való megfelelő adaptációra. A primer hemosztázis kritikus pontja a „fiziológias” véralvadás és a „patológias” thrombosis közötti igen törékeny egyensúly fenntartása. Ez a folyamat a vérlemezke aktiváció állandó és az adott körülménynek éppen legmegfelelőbb szabályozása révén valósulhat meg, melyben a receptorhoz kötött pozitív, illetve negatív feedback mechanizmusok játszzák a fő szerepet.

A vérlemezke glycoprotein receptorok a lipidrétgben vannak lehorgonyozva, glycozilált részük tekint a citoplazma felé. A nyugalmi állapotban levő vérlemezék felszínén specifikus antitestekkel számos glycoprotein kimutatható. A három glycoprotein alegység által alkotott komplex (GPIb-IX-V), mint adhéziós receptor, a subendotheliális vWF-hoz és a vérlemezke aktiváció során képződő thrombinhoz kapcsolódik. Az α Ib β 3 (glycoprotein IIb/IIIa) integrin a vérlemezék legfőbb aggregációs receptora. Elsődleges fibrinogén receptor, de *high shear* körülmények között a vWF molekulához is kapcsolódik. Az integrineknek nyugalmi és aktivált állapota különíthető el. Vérlemezke aktiváció hatására az integrinek térszerkezetében olyan konformáció változás következik be, melynek hatására ligand-kötő kapacitásuk nagyságrendekkel megnő. A GPVI receptor mind az adhéziós, mind pedig az aggregációs folyamatokban fontos szerepet játszik. Lényeges a vérlemezke aktiváció jelátviteli folyamatainak szabályozásában is.

Megfigyeléseink különlegességét és újszerűségét az adta, hogy megpróbáltuk az *in vivo* viszonyokat még jobban jellemző körülmények modellezését, amennyiben egyszerre aktiváltuk a vérlemezkéket thrombinnal és kollagénnal, az érfal sérülés helyén szabaddá

váló kollagént és a lokális thrombin generációt leginkább jellemző megközelítésbe hozva így.

Kísérleteinkben gél-filtrált vérlemezkéket aktiváltunk kollagénnel illetve thrombinnal majd α -granulum specifikus aktivációs marker (p-selectin), foszfatidil-szerin (annexin-V) illetve prohemosztatikus fehérje (V-ös faktor, fibrinogén, von Willebrand faktor, α_2 -antiplazmin, fibronectin, thrombospondin) expressziót vizsgáltunk flow cytométerben. Az agonistákat önmagukban alkalmazva, teljes vérlemezke aktiváció ellenére (100% p-selectin expresszió) sem sikerült α -granulum eredetű prokoaguláns fehérjéket kimutatni az aktivált vérlemezkek felszínén. Ugyanakkor a vérlemezkéket két erős agonistával egyszerre aktiválva egy olyan aktivált vérlemezke szubpopulációt észleltünk, amelyek felszínükön igen nagy mennyiségben kötnek meg α -granulum eredetű prohemosztatikus fehérjéket. A vérlemezkek ezen speciális, az összes aktivált vérlemezke kb. 20-40%-át kitevő szubpopulációját COAT-vérlemezkeknek (*collagen and thrombin activated platelets*) neveztük el.

Alberio és munkatársai írták le először, hogy kollagénnel és thrombinnal aktivált vérlemezkek egy adott csoportjának felszínén igen magas α -granulum eredetű V-ös faktor lehet kimutatni. Az ilyen módon aktivált vérlemezkek mintegy 20-40%-a kötött meg felszínén nagy koncentrációban V-ös faktort. Hasonló eredményeket lehetett elérni akkor is, amikor az aktiváció során convulxinnal helyettesítették a kollagént. A kígyóméregből előállított convulxin a vérlemezkek GPVI receptorának specifikus aktivátora. Kísérleteinkben a kollagént (nehéz oldhatósága miatt) technikai okokból magunk is convulxinnal helyettesítettük. Az általunk elvégzett kísérletek során nem csak az V-ös faktort, hanem további, α -granulum eredetű prohemosztatikus fehérjét (fibrinogént, von Willebrand faktort, α_2 -antiplazmint, fibronectint, thrombospondint) is sikerült kimutatni a COAT-vérlemezkek felszínén. Ezen két agonistával egyidőben aktivált vérlemezkeken az α -granulumokban raktározott IgG és albumin azonban nem volt megfigyelhető. A COAT vérlemezkek felszínén felhalmozott prokoaguláns, ill. prohemosztatikus fehérjékről ismert, hogy mindannyian a transzglutaminázok szubsztrátjai és transzglutamináz inhibitorokkal a COAT-vérlemezkek kialakulása megakadályozható volt.

Alberio és munkatársai korábban már igazolták azt is, hogy a fiatal, tiazol-narancs (TO) pozitív, retikulált vérlemezkék nagyobb arányban képesek COAT-vérlemezkék kialakítására. Annexin V segítségével azt is kimutatták, hogy a COAT-vérlemezkék felszínén maximális aminofoszfolipid (foszfatidil-szerin) expresszió figyelhető meg, jóllehet erre az ionofor A23187 kivételével, önmagában alkalmazva egyetlen vérlemezke agonista sem képes. Kollagénnel (vagy convulxinnal) és thrombinnal egyszerre aktivált vérlemezkék felszínén ugyanakkor maximális annexin V kötődés mutatható ki és kettős jelöléssel igazolni lehetett, hogy ugyanaz az aktivált vérlemezke populáció volt annexin V pozitív, amely felszínén nagy mennyiségben faktor V-öt kötött meg (COAT-vérlemezkék).

A vérlemezkék GPVI (kollagén) receptorának jelátviteli rendszere számos ponton megegyezik a vérlemezkék felszínén található Fc γ IIA osztályba tartozó immunglobulin receptor aktivációs jelátviteli rendszerével. Kísérleteinkben igazoltuk, hogy az Fc γ IIA receptor megfelelő antitestekkel történő aktivációja vagy keresztkötése egyidejű thrombin aktivációval a COAT-vérlemezkékkel megegyező, aktivált vérlemezke szubpopulációt hoz létre. Az ilyen módon aktivált vérlemezkéket **Fc**-receptor és **t**hrombin aktivált vérlemezkéknek neveztük el (FcRT-vérlemezkék). Az FcRT-vérlemezkék számos hasonlóságot mutattak a COAT-vérlemezkékkel: aminofoszfolipid, valamint adhezív és prokoaguláns fehérjék fokozott expressziója, fiatal vérlemezkék esetén nagyobb számban való előfordulásuk és a transzgultamináz inhibitorokkal szembeni érzékenységük. Eredményeink azt igazolták, hogy az egyidejű thrombin aktiváció mellett az Fc γ IIA receptor anti-CD9 antitestekkel (ALB-6 és ML-13) történő aktivációja vagy a receptorok direkt keresztkötése egyaránt képes volt FcRT-vérlemezkék létrehozására. Az FcRT-vérlemezkéket a fiziológiás körülményeknek jobban megfelelő thrombocytadús plazmában is megvizsgáltuk. Eredményeink teljes mértékben hasonlóak voltak a gél-filtrát rendszerben megfigyelt FcRT-vérlemezke képződéssel. A korábban leírt COAT-vérlemezkék mind fiziológiás mind pedig patofiziológiás körülmények között létrejövő agonista aktiváció (trombin és kollagén) kapcsán alakulnak ki. Az általunk leírásra került FcRT-vérlemezkék azonban az első olyan feltételezett bizonyítékát szolgáltatották a COAT-vérlemezkék létrejöttének, ahol az ilyen formában létrejövő vérlemezkék egyértelműen patofiziológiás körülmények között alakulhatnak ki.

A COAT-vérlemezkeken megfigyelt fehérjék lehetséges kötődési helyének megállapítása céljából egy transzglutamináz szubsztátot szintetizáltunk (CP₁₅). A β -casein transzglutamináz specifikus glutaminját is magában foglaló, 15 aminosavból álló peptidet biotinilált (biotin-CP₁₅), ill. fluoresceinnel jelezett formában (Fl-CP₁₅) állítottuk elő. COAT-vérlemezkek kialakulása során a biotin-CP₁₅ a COAT-vérlemezkek felszínén kiumtatható volt és ezt a reakciót a transzglutamináz inhibitorok specifikusan gátolni tudták. Az ilyen módon, biotin-CP₁₅-nel „megjelölt” COAT-vérlemezkek sodium dodecylsulfate polyacrylamide gél elektroforézise (SDS-PAGE) során nem sikerült nagy molekulatömegű, vérlemezke membrán eredetű fehérjét azonosítanunk. A továbbiakban Fl-CP₁₅-nel jelezett COAT-vérlemezkek alkoholban extrahált oldatát vizsgáltuk reverz fázisú HPLC-n, majd az eluált frakciókat tömegspektroszkóppal elemeztük. A kiindulási, ill. a végtermék között 176 Da eltérés igazolódott, amely pontosan megegyezik a vérlemezkek denz granulumában raktározott szerotonin molekulatömegével. Ezt követően sikerült igazolnunk, hogy a COAT-vérlemezkek felszínéről származó makromolekuláris frakciójához, illetve konkrétan a fibrinogénhez az aktivációt követően, transzglutaminázok hatására szerotonin kapcsolódik.

CÉLKITŰZÉSEK

1. További α -granulum eredetű fehérjék kimutatása a COAT-vérlemezkék felszínén:

Alberio és munkatársai eredetileg az V-ös faktort vizsgálva írták le és jellemezték a COAT-vérlemezkéket. Kísérleteinkben igazolni kívántuk, hogy nem csak az V-ös faktor, hanem más, α -granulum eredetű prohemostatikus fehérje is kimutatható a thrombinnal és kollagénnel (convulxinnal) aktivált vérlemezkék felszínén.

2. Mikropartikulumok jelentősége:

A vérlemezke aktiváció során mért prokoaguláns aktivitás meghatározásával azt szerettük volna tisztázni, hogy a vérlemezke eredetű mikropartikulumok milyen mértékben járulnak hozzá a teljes prokoaguláns aktivitáshoz.

3. Transzglutaminázok hatása a COAT-vérlemezkék kialakulása során:

A COAT-vérlemezkék felszínén megfigyelt α -granuláris fehérjék mind potenciális acyl-donorok transzglutaminázok számára. Ennek megfelelően megvizsgáltuk, hogy különböző, nem specifikus transzglutamináz gátlók milyen hatással vannak a COAT-vérlemezke kialakulására. Megvizsgáltunk továbbá két, a vérlemezkékben is előforduló transzglutaminázt (XIII, szöveti transzglutamináz), hogy jelen vannak-e a COAT-vérlemezke aktiváció során, ill. megfelelő specifikus inhibitoraik milyen hatással vannak a COAT-vérlemezkék kialakulására.

4. Fibrinogén a COAT-vérlemezkéken:

A vérlemezke aktiváció egy fontos lépése a glycoprotein IIb/IIIa receptor térszerkezetének megváltozása és a fibrinogén molekula kapcsolódása. Miután az egyéb α -granulum eredetű fehérjék mellett a fibrinogén is kimutatható a COAT-vérlemezkék felszínén, ezért megvizsgáltuk, hogy milyen szerepet játszhat a glycoprotein IIb/IIIa receptor fibrinogén kötő tulajdonsága a COAT-vérlemezkék létrejötté során.

5. COAT-vérlemezkék megfigyelése thrombocyta-dús plazmában

A fentebb részletezett kísérleteinket nem csak gél-filtrált vérlemezkék szuszpenziójában, hanem az *in vivo* körülményeket jobban megközelítő thrombocyta-dús plazmában is megismételtük.

6. FcRT-vérlemezkék:

A vérlemezkék GPVI (kollagén) receptorának jelátviteli rendszere számos ponton megegyezik a vérlemezkék felszínén található Fc γ IIA osztályba tartozó immunglobulin receptor (CD32) aktivációs jelátviteli rendszerével. Megvizsgáltuk, hogy az Fc γ IIA receptor specifikus antitestekkel vagy direkt keresztkötéssel, egyidejű thrombin aktiváció mellett létre tud-e hozni a COAT-vérlemezkékhez hasonló aktivált vérlemezke szubpopulációt.

7. A β -kazein peptid kötődésének vizsgálata COAT-vérlemezkéken:

A COAT-vérlemezkét felszínéhez kötődő fehérjék pontos kapcsolódási helyének meghatározása céljából egy olyan 15 aminosavból álló peptidet szintetizáltunk (CP₁₅), amely a β -kazein transzglutamináz specifikus glutaminját is magában foglalta. A peptidet biotinilált (biotin-CP₁₅) és fluoreszcenciával jelezett (Fl-CP₁₅) formában készítettük el. Ennek segítségével azt vizsgáltuk, hogy a COAT-vérlemezkék képződése során milyen esetleges membrán alkotóelemekhez kapcsolódhatnak a megfigyelt prohemostatikus fehérjék.

8. A szerotonin transzglutamináz függő konjugációja és annak jelentősége a COAT-vérlemezkék kialakulása során:

A COAT-vérlemezkék felszínén megfigyelt prohemostatikus fehérjék transzglutamináz dependens szerotonin konjugációját az aktivált vérlemezkékből származó fibrinogén, ill. makromolekuláris fehérje frakció savas hidrolízisével, valamint HPLC és elektrokémiai módszerek felhasználásával próbáltuk meg igazolni. Szöveti transzglutamináz felhasználásával pedig szintetikus úton szerotoninnal konjugálnunk és biotinnal jelöltük meg a β -kazeinből származó peptidet (biotin-CP₁₅-Q⁷-5'-HT (B-CP₁₅-(5-HT))) és megvizsgáltuk, hogyan kapcsolódik a B-CP₁₅-(5-HT) a COAT-vérlemezkék felszínéhez. Továbbá, marha szérum albuminnal derivatizált szerotoninnal (biotin-BSA-(5-HT)₆) végztünk COAT-vérlemezke aktivációs és inhibitoros kísérleteket.

EREDMÉNYEK

1. További α -granulum eredetű fehérjék kimutatása a COAT-vérlemezkék felszínén:

A kezdeti megfigyelések a COAT-vérlemezkék felszínén az V-ös faktor igen nagy mennyiségben történő előfordulásáról számoltak be. Kísérleteinkben igazoltuk, hogy nem csak az V-ös faktor, hanem más, α -granulum eredetű prohemosztatikus fehérje (von Willebrand faktor, fibrinogén, α_2 -antiplazmin, thrombospondin és fibronectin) is kimutatható a thrombinnal és kollagénnel (convulxinnal) aktivált vérlemezkék felszínén. Önmagában egyetlen agonista sem képes COAT-vérlemezkéket létrehozni. Thrombinnal valamint I-es, V-ös és VI-os típusú kollagénnel vagy convulxinnal egy időben aktivált vérlemezkék felszínén azonban igen nagy mennyiségben sikerült kimutatnunk α -granulum eredetű fehérjéket. Az egyébként szintén α -granulum eredetű IgG, illetve albumin nem volt megfigyelhető az ilyen módon ko-aktivált vérlemezkék felszínén.

2. Mikropartikulumok jelentősége:

A vérlemezke aktiváció során mért prokoaguláns aktivitás a primer hemosztázis egyik legfontosabb funkcionális jellemzője, melynek alapját elsősorban az aktiváció során, a vérlemezkék membránjából képződő, jelentős mennyiségű mikropartikulum adja. Annak érdekében, hogy pontosan meghatározhassuk, hogy maguk a COAT-vérlemezkék milyen mértékben járulnak hozzá a ko-aktiváció során mérhető teljes prokoaguláns aktivitáshoz, a thrombinnal és convulxinnal aktivált vérlemezkéket, illetve az aktiváció során képződött mikropartikulumokat ultracentrifugálást követően szeparáltuk, majd az egyes frakciókhoz prothrombint, illetve aktivált X-es faktort adva meghatároztuk az időegység alatt képződött thrombin mennyiségét. Az ilyen módon mért teljes prokoaguláns aktivitás kevesebb, mint 20%-a bizonyult COAT-vérlemezke eredetűnek.

3. Transzglutaminázok hatása a COAT-vérlemezkék kialakulása során:

A COAT-vérlemezkék felszínén felhalmozódó α -granulum eredetű fehérjék valójában mind potenciális transzglutamináz szubsztrátok. Ugyanakkor az α -granulumokban szintén jelenlévő albumin illetve immunglobulin (IgG) nem volt kimutatható a COAT-vérlemezkék felszínén, ami arra engedett következtetni, hogy valamilyen transzglutamináz reakcióhoz köthető aktivitás szükséges a COAT-vérlemezkék kialakulásához. Az aktiváció során bekövetkező esetleges transzglutamináz aktivitás

igazolására aspecifikus, illetve specifikus inhibitoros kísérleteket végeztünk. A ko-aktiváció kapcsán képződő, felszínükön prohemosztatikus fehérjéket koncentráló vérlemezkék kialakulása nem specifikus transzglutamináz inhibitorokkal (casein, dansyl cadaverine) gátolható volt. A vérlemezkékben is megtalálható transzglutaminázok (XIII-as faktor és szöveti transzglutamináz) ellen termelt gátló hatású specifikus ellenanyagok szintén gátolták a COAT-vérlemezkék kialakulását. A COAT-vérlemezkék kialakulása során feltételezett transzglutamináz reakció jelentőségét egy másik megfigyelés is igazolta. Egy általunk szintetizált, a β -casein glutamin donor helyét is magában foglaló, 15 aminosavból álló peptid (CP₁₅), a két agonistával egyszerre aktivált vérlemezkék felszínéhez "COAT-szerűen" kapcsolódott, ami arra utalt, hogy a COAT-vérlemezkék létrejöttéhez aktív transzglutamináz reakció szükséges.

4. Fibrinogén a COAT-vérlemezkéken:

A vérlemezke aktiváció során a glycoprotein IIb/IIIa receptor térszerkezetének megváltozása a fibrinogén molekula receptor iránti aktivitását többszörösére növeli. Mivel az egyéb α -granulum eredetű fehérjék mellett a fibrinogén is kimenthető volt a COAT-vérlemezkék felszínén, ezért arra voltunk kíváncsiak, hogy az vajon milyen módon kötődik a glycoprotein IIb/IIIa receptorhoz. A PAC-1 egy olyan monoklonális antitest, amely csak a GP IIb/IIIa receptor aktivált formájához képes kötődni, de a receptorhoz kapcsolódott ligandot már nem képes kiszorítani a helyéről. Affinitása ötvenszer haladja meg a fibrinogén GP IIb/IIIa iránti affinitását. A PAC-1 *in vitro* GP IIb/IIIa inhibitoraként sikeresen gátolja a vérlemezke aggregációt. A LIBS-6 egy másik GP IIb/IIIa specifikus monoklonális antitest. Jellemzője, hogy csak akkor képes kapcsolódni a GP IIb/IIIa receptorhoz, ha az aktív állapotában éppen ligandot (fibrinogén) köt meg. Thrombinnal és convulxinnal aktivált vérlemezkéket vizsgálva azt találtuk, hogy a PAC-1 nem befolyásolta a fibrinogén kötődését a COAT-vérlemezkék felszínén. További, LIBS-6 antitestekkel végzett kísérletek pedig azt igazolták, hogy PAC-1 jelenléte ellenére a COAT-vérlemezkék GPIIb/IIIa receptorai fibrinogént kötnek meg felszínükön. Ezen eredményeink arra engedtek következtetni, hogy a COAT-vérlemezkék felszínén észlelt prohemosztatikus fehérjék az eddig megfigyeltektől eltérő mechanizmussal kapcsolódnak a thrombocytá membránhoz.

5. COAT-vérlemezkek megfigyelése thrombocyta-dús plazmában

A fentebb részletezett kísérleteinket nem csak gél-filtrált vérlemezkek szuszpenziójában, hanem az *in vivo* körülményeket jobban megközelítő, thrombocyta-dús plazmában is megismételtük. Annak megerősítésére, hogy a thrombocyta-dús plazmában megfigyelt aktivált thrombocyták valóban COAT-vérlemezkek, transzglutamináz inhibitorokkal végzett kísérleteinket ismételtük meg. A thrombocyta-dús plazmában megfigyelt COAT-vérlemezkek kialakulása ugyanis, hasonlóan a gél-filtrált vérlemezkek esetén tapasztaltakhoz, transzglutamináz inhibitorokkal specifikusan gátolhatónak bizonyult. A thrombocyta-dús plazma eredetű COAT-vérlemezkek felszínén kevesebb α -granulum eredetű prohemosztatikus fehérje (FV, Fbg) volt kimutatható, amely a gél-filtrált thrombocyták esetén megfigyelt COAT-vérlemezkek mintegy 60-70%-át jelentette.

6. FcRT-vérlemezkek:

A vérlemezkek GPVI (kollagén) receptorának jelátviteli rendszere számos ponton megegyezik a vérlemezkek felszínén található Fc γ IIA osztályba tartozó immunglobulin receptor (CD32) aktivációs jelátviteli rendszerével. Kísérleteinkben azt igazoltuk, hogy az Fc γ IIA receptor specifikus antitestekkel vagy direkt keresztkötéssel, egyidejű thrombin aktiváció mellett COAT-vérlemezkekhez hasonló, aktivált vérlemezke szubpopulációt lehet létrehozni. Az ilyen módon aktivált vérlemezkeket Fc-receptor és thrombin aktiválta vérlemezkeknek (FcRT-vérlemezkek) neveztük le. Az COAT-vérlemezkek minden tulajdonságát (α -granulum eredetű prohemosztatikus fehérje kötődés, negatív töltésű aminofoszfolipid expozíció, kialakulásuk transzglutamináz szenzitív gátlása, nagyobb arányuk fiatal vérlemezkek között) sikerült igazolnunk az FcRT-vérlemezkek esetében is. Az Fc γ IIA receptor az IgG molekula egyetlen specifikus (ún. alacsony affinitású) receptora a vérlemezkek felszínén. Immunkomplexek az Fc γ IIA receptoron keresztül vérlemezke aktivációt válthatnak ki. Számos vérlemezke ellenes (auto)antitestről is igazolták továbbá, hogy direkt módon képesek az Fc γ IIA receptorokat, illetve ennek megfelelően a vérlemezkeket aktiválni. Kísérleteinkben mi is kétféle módon értük el az Fc γ IIA receptoron keresztül kiváltott vérlemezke aktivációt. Egyrészt Fc γ IIA receptort direkt módon aktiváló specifikus monoklonális antitesteket (ALB-6, ML-13) alkalmaztunk, másrészt egy anti-CD32 monoklonális antitesttel (IV.3) szaturáltuk az Fc γ IIA receptorokat, majd Fc-specifikus anti-IgG-vel kötöttük keresztbe azokat. Önmagában egyik módszer sem volt alkalmas COAT-vérlemezkeket létrehozni.

Thrombin egyidejű hozzáadása mellett viszont a COAT-vérlemezkék minden korábban megfigyelt és fentebb felsorolt jellemzőit mutató FcRT-vérlemezkéket tudunk produkálni. Az egyetlen eltérés, amit a COAT- és az FcRT-vérlemezkék között találtunk az volt, hogy az FcRT-vérlemezkék abszolút mennyisége csak a fele volt annak, amit a thrombinnal és convulxinnal aktivált vérlemezkék esetében figyeltünk meg. Ezt az eltérést valószínűleg az okozza, hogy a vérlemezkék felszínén jóval több GP VI receptor található, mint Fc γ IIA receptor. Az aktiváció szeptontjából lényeges receptorok abszolút mennyisége ugyanis befolyásolhatja az aktiváció által kiváltott jelátviteli folyamatok során képződő másodlagos messengerek időbeli és térbeli eloszlását, amely így eltérő módon hat ki azokra a komplex eseményekre, amelyek a COAT-, illetve az FcRT-vérlemezkék kialakulásához szükségesek.

7. A β -kazein peptid kötődésének vizsgálata COAT-vérlemezkéken:

A COAT-vérlemezkét felszínéhez kötődő fehérjék pontos kapcsolódási helyének meghatározása céljából egy olyan 15 aminosavból álló peptidet szintetizáltunk (CP₁₅), amely a β -kazein transzglutamináz specifikus glutaminját is magában fogalalta. A peptidet biotinilált (biotin-CP₁₅) és fluoreszcinnel jelezett (Fl-CP₁₅) formában is előállítottuk. COAT-vérlemezke generálása során a biotin-CP₁₅ a COAT-vérlemezkék felszínén kiemelt volt és ezt a reakciót a transzglutamináz inhibitorok specifikusan gátolták. Az ilyen módon, biotin-CP₁₅-nel „megjelölt” COAT-vérlemezkék sodium dodecylsulfate polyacrylamide gél elektroforézise (SDS-PAGE) során nem sikerült nagy molekulatömegű, vérlemezke membrán eredetű fehérjét azonosítanunk. Feltételeztük, hogy a kapcsolódásért egy jóval kisebb molekulatömegű membrán komponens lehet a felelős. Ezért a továbbiakban így Fl-CP₁₅-nel jelezett COAT-vérlemezkék alkoholban extrahált oldatát vizsgáltuk reverz fázisú HPLC-n, majd az eluált frakciókat tömegspektroszkóppal elemeztük. A kiindulási, ill. a végtermék között 176 Da eltérés igazolódott, amely pontosan megegyezik a vérlemezkék denz granulumában raktározott szerotonin molekulatömegével.

8. A szerotonin transzglutamináz függő konjugációja és annak jelentősége a COAT-vérlemezkék kialakulása során:

A COAT-vérlemezkék felszínén megfigyelt prohemosztatikus fehérjék közül a fibrinogén esetében közvetlen bizonyítékot találtunk arra, hogy a szerotonin

transzglutamináz függő módon konjugálódik a fehérjékkel. Először szulfonsavval hidrolizáltuk a COAT-vérlemezekből tisztított fibrinogén oldatát, annak érdekében hogy a konjugált szerotonin felszabaduljon. Ezt követően reverz fázisú HPLC, ill. elektrokémiai módszereket alkalmazva pontosan meghatároztuk, hogy mennyi szerotonin molekula kapcsolódik a fibrinogénhez. A továbbiakban HPLC segítségével izoláltuk a COAT-vérlemezek teljes makromolekuláris frakcióját és igazoltuk, hogy hasonlóan a fibrinogénhez, a teljes makromolekuláris frakció is azonos arányban konjugálódik szerotoninnal. Érdekes módon a nem aktivált, kontroll vérlemezek makromolekuláris frakciója, illetve fibrinogénje is tartalmazott, a COAT-vérlemezke szerotoninjához képest elenyésző mennyiségben, szerotonint. Ezen szerotonin konjugátumok valószínűleg a fibrinogén α -granulumokba való transzportja során képződhetnek. A plazmából ugyanakkor nem sikerült fibrinogén-szerotonin konjugátumokat kimutatni.

Szöveti transzglutamináz felhasználásával, szintetikus úton sikerült szerotoninnal konjugálnunk és biotinnal jelölnünk a β -kazeinből származó peptidet (biotin-CP₁₅-Q⁷-5'-HT (B-CP₁₅-(5-HT))). Thrombinnal és convulxinnal aktivált COAT-vérlemezek dóziszfüggő módon kötöttek meg felszínükön biotin-CP₁₅-(5-HT)-t, míg a nyugalomban lévő trombocyták felszínén nem sikerült biotin-CP₁₅-(5-HT)-t kimutatnunk. További, marha szérum albuminnal derivatizált szerotoninnal (biotin-BSA-(5-HT)₆) végzett megfigyeléseink azt igazolták, hogy a biotin-BSA-(5-HT)₆, dóziszfüggő módon képes volt a thrombinnal és convulxinnal aktivált vérlemezek felszínéhez kötődni. A két agonistával egyszerre aktivált vérlemezek felszínén megfigyelt biotin-BSA-(5-HT)₆ mennyisége megegyezett a COAT-vérlemezek felszínén mért fehérjék mennyiségével. Továbbá a biotin-BSA-(5-HT)₆ képes volt meggátolni az α -granulum eredetű fehérjék retencióját a COAT-vérlemezek felszínén.

ÖSSZEFOGLALÁS

Megfigyeléseinket az alábbi, négy lépésből álló aktivációs modell jellemezheti leginkább. Először, a két agonistával egyszerre aktivált vérlemezek α -granulumaiból az aktiváció során szabaddá váló (*release* reakció) prohemosztatikus fehérjék a már korábban felismert és jól meghatározott specifikus receptoraikhoz kötődnek (pl. a fibrinogén a GP IIb/IIIa receptorhoz, az V-ös faktor a PS-hez, stb.). Másodsor, ezen

fehérjék az aktiváció során egy transzglutamináz függő reakció útján szerotoninnal konjugálódnak. Harmadszor, az egyes, szerotoninnal konjugálódott fehérjék, más prohemostatikus fehérjék konjugált szerotonin-kötő helyeihez kapcsolódnak. Negyedszer, az ilyen módon összekapcsolódott fehérjék a specifikus receptoraikkal együtt egy igen stabil fehérje hálózatot hoznak létre a COAT-vérlemezkék külső cytoplazma membránján.

Bár a COAT-vérlemezkék pontos fiziológiai jelentősége továbbra sem tisztázott, számos megfigyelés szól amellett, hogy ezek az aktivált vérlemezkék fontos alkotóelemi lehetnek a primer hemosztázisnak. Ezt azok a megfigyeléseink támasztják alá, melyek szerint a COAT-vérlemezkék felszínén teljes mértékű PS expozíciót mutattunk ki, valamint az itt mért protrombináz aktivitás többszöröse volt az egyetlen agonistával aktivált vérlemezkék protrombináz aktivitásának. A COAT-vérlemezkék felszínén felhalmozódó prokoagunáls fehérjék ugyanis nem csak fizikailag mutathatóak ki, hanem funkcionálisan is aktívak, mivel a *prothrombinase assay* igazolta, hogy ezen különleges vérlemezkék felszínén jelen lévő V-ös faktor funkcionálisan is aktív. A PS jelenléte az aktivált vérlemezkék külső felszínén egyértelműen a primer hemosztázis másik alapvető mozzanata. Mivel kizárólag a kollagénnel (convulxin) és trombinnal aktivált vérlemezkék felszínén figyelhető meg a PS ilyen mértékű jelenléte, ez azt igazolja, hogy a COAT-vérlemezkék fontos szerepet játszhatnak a primer hemosztázisban. Így a COAT-vérlemezkék olyan „hemostatikus bombáknak” képzelhetőek el, amelyek az érfalsérülés helyén jelentős mértékben facilitálják a véralvadás celluláris és humorális folyamatait.

A dolgozathoz felhasznált saját közlemények

Batar P., Dale G.L.: 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.

Batar P., Dale G.L.: Platelet turnover and aging. In: Michelson A.D. ed. *Platelets* 1st ed. London, UK: Academic Press; 2002: 37-64.

Batár P.: A thrombocyták szerepe a haemostasisban. In: Boda Z. ed. *Thrombosis és vérzékenység*. 1st ed. Budapest: Medicina Könyvkiadó Rt; 2006: 25-48.

Dale G.L., Friese P., **Batar P.**, Hamilton S.F., Reed G.L., Jackson K.W., Clemetson K.J., Alberio L.: Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature*, 2002, *415*: 175-179.

Udvardy M., Telek B., Mezey G., **Batar P.**, Altorjay I.: Successful control of massive coumarol-induced acute upper gastrointestinal bleeding and correction of prothrombin time by recombinant active factor VII (Eptacog-alpha, NovoSeven) in a patient with a prosthetic aortic valve and two malignancies (chronic lymphoid leukaemia and lung cancer). *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2004, *15*: 265-267.

Batar P., Dale GL.: Platelets activated simultaneously with thrombin plus Fc receptor engagement exhibit high levels of procoagulant proteins on their surface. Abstract: P1903. *Thromb Haemost.* 2001 Jul; suppl.

Egyéb közlemények

Telek B, **Batar P.**, Udvardy M, Laszlo R.: Chronic neutrophilic leukemia: a long-term analysis of seven cases and review of the literature. *Orv Hetil.* 2006 May 7;147(18):827-30.

Telek B, **Batar P.**, Udvardy M.: Successful combined treatment with rituximab and high dose immunoglobulin in a patient with chronic lymphocytic leukemia with fludarabine-induced severe immune thrombocytopenia. *Orv Hetil.* 2005 Aug 21;146(34):1791-3.

Telek B, Rejto L, Kiss A, Mehes L, **Batar P.**, Udvardy M.: New perspectives in the evolution of prognosis and treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Orv Hetil.* 2004 Aug 29;145(35):1795-800.

Mehes L, Simon A, Rejto L, Kiss A, Remenyi G, **Batar P.**, Telek B, Udvardy M.: Prognostic value of CD38 cell surface marker in chronic lymphocytic leukemia. *Orv Hetil.* 2003 Aug 3;144(31):1531-5.

Telek B, Rejto L, Kiss A, **Batar P.**, Remenyi G, Rak K, Udvardy M.: Experience with fludarabine treatment and review of the literature. *Orv Hetil.* 2002 Jun 16;143(24):1459-65.

Telek B, Kiss A, Ujj G, Rejto L, Kappelmayer J, **Batar P.**, Nemes Z, Rak K.: Hairy cell leukemia: authors' own experience (1977-1998). *Orv Hetil.* 1999 May 2;140(18):987-91.