

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Celluláris prokoaguláns funkció vizsgálata thrombin generációval

Dr. Hudák Renáta

Témavezető: Dr. Kappelmayer János



Debreceni Egyetem
Laki Kálmán Doktori Iskola
Debrecen, 2018

CELLULÁRIS PROKOAGULÁNS FUNKCIÓ VIZSGÁLATA THROMBIN GENERÁCIÓVAL

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében az elméleti orvostudományok
tudományágban

Írta: dr. Hudák Renáta okleveles általános orvos

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

Témavezető: Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Kiss Róbert Gábor, PhD
Dr. Batár Péter, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet könyvtára
2018. március 29. (csütörtök) 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktora
Dr. Gergely Lajos, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktora
Prof. Dr. Kiss Róbert Gábor, PhD
Dr. Batár Péter, PhD
Dr. Gergely Lajos, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2018. március 29. (csütörtök) 13:00 óra

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

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

Az atherothrombotikus kórképek kialakításában a vérlemezkék fontos szerepet töltenek be. A folyamatosan fennálló endothel sérülés helyén a subendotheliális komponensek az érlumen felé szabadabbá válnak, melyekhez a vérlemezkék receptoraikkal kötődnek, majd aktiválódnak.

Kísérleti körülmények között thrombocytá dús plazmában vizsgáltuk aktiváció és/vagy gátlást követően a vérlemezkék foszfatidil-szerin expresszióját, az általuk kiváltott alvadék retrakciót, thrombin generációt és intracelluláris Ca^{2+} szint változást. Hipotézisünk az volt, hogy a calyculin-A gátolja a thrombocytá intracelluláris kalcium szint emelkedést, ezáltal a foszfatidil-szerin expressziót és a következményes thrombin generációt.

Ismert, hogy malignus szolid tumorokban és malignus hematológiai megbetegedésekben a vénás thromboembóliás szövődmények kialakulásának kockázata többszöröse az egészséges populációhoz képest. Ennek hátterében A) a malignus sejtek aktivációja, B) a sejtek felszínén lévő prokoaguláns fehérjék vagy a belőlük lefűződő mikropartikulák, vagy C) az általuk kibocsátott interleukinek, citokinek és egyéb mediátorok állnak. A leukémiák közül az akut promyelocytás leukémia esetében a gyakrabban előforduló thrombotikus és vérzéses szövődményeket már leírták, azonban ezen szövődmények kialakulásának valószínűsége más leukémiák esetében kevésbé ismert. Az akut monocytás leukémia esetén is feltehetően fennáll fokozott prokoaguláns aktivitás, amely a legtöbb esetben nem manifesztálódik thromboembóliás szövődményként, hanem szubklinikus marad, azonban idáig nem közöltek olyan sejtvonalakon végzett kutatási eredményeket, melyek a monocytás leukémia sejtek prokoaguláns hatását bizonyították volna.

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

A véralvadási kaszkád aktivációja atherothrombotikus állapotokban, a vérlemezkék szerepe

A vérlemezkék a fiziológiás hemosztázis biztosításában és a patológiás folyamatokban is fontos szerepet töltenek be, a kardiovaszkuláris megbetegedések alapjául szolgáló atherosclerotikus folyamatok fontos részvevői. Az atherosclerotikus plakk megrepedésekor, vagy endothelium sérülés esetén a subendothelialis mátrix fehérjéi (kollagén, fibronectin, laminin), köztük a von Willebrand faktor (vWF) szabadabbá válnak az ér lumen felé, melyhez a thrombocyták receptoraikon keresztül kötődnek (adhézió), ezáltal aktiválódnak, megváltozik az alakjuk, az intracelluláris granulumokból prokoaguláns anyagok szabadulnak fel és más subendothelialis komponensekkel reakcióba lépve elindítják a „thrombocytá dugó” (aggregáció) létrejöttét.

A thrombocytá aktiváció módjai

A vérlemezkék aktivációja számos mediátor hatása következtében, több útvonalon jöhet létre. A denz granulumokban tárolt adenosin-difoszfát (ADP) aktiválja a vérlemezkéket, főleg a P2Y₁₂ receptoron keresztül. A thromboxane-A₂ felszabadulása a primer „thrombocytá dugó” létrehozásában játszik szerepet és aktiválja a vérlemezkéket a thromboxane-A₂ receptoron keresztül. A kollagének, a glikoprotein Ib (GPIb), glikoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), glikoprotein Ia/IIa (GPIa/IIa) és glikoprotein VI (GPVI) receptorokon keresztül, a stabil thrombocytá-vWF és thrombocytá-thrombocytá adhézió kialakításában van szerepe. A thrombin a leghatásosabb thrombocytá agonista, már a véralvadási kaszkád aktivációjához szükségeseől alacsonyabb koncentrációban is aktiválja a vérlemezkéket a proteáz aktiválta receptor-1 (PAR-1)-en keresztül. A PAR-1 aktiválása thrombinnal vagy szintetikus thrombin receptor aktiváló peptiddel (TRAP) G_{12/13} fehérjéken keresztül történik. Ez az intracelluláris Ca²⁺ felszabadulása révén vezet a G_q fehérje által mediált intracelluláris jelátviteli útvonal és az intracelluláris Ca²⁺ raktárak membránjában található inozitol-trifoszfát (IP₃) aktiválásához. Az IP₃ receptorok direkt módon is aktiválhatók szintetikus anyagokkal, például thiomersal-al. A foszfatidil-szerin (PS) negatív töltésű foszfolipid, amely többek közt a tenáz és prothrombináz komplexek megfelelő működéséhez szükséges. Fiziológiás körülmények között a PS a sejtmembrán kettős foszfolipid rétegének az intracelluláris oldal felőli részén helyezkedik el. Thrombocytá aktiváció hatására, az intracelluláris Ca²⁺ szint emelkedik és a PS transzlokálódik a külső foszfolipid rétegbe, ezáltal negatív töltésű felszínt biztosít a véralvadási faktorok számára, propagálja az alvadék kialakulását.

Vénás thromboembóliás szövődmények kialakulása malignus kórképekben

Amennyiben hemosztázis pro- és antikoaguláns mechanizmusainak egyensúlya felborul, a prokoaguláns hatás lehet szubklinikus vagy manifesztálódhat VTE eseményként vagy érintheti az egész szervezetet pl. súlyos, vérzéssel járó disszeminált intravaszkuláris koaguláció formájában. A malignus daganatos betegségben szenvedőknél a VTE kialakulása akár hétszer gyakoribb a nem daganatos populációhoz hasonlítva. Számos tényező, köztük a thrombózis klasszikus rizikófaktorai (pl. immobilitás, életkor, műtéti beavatkozás), valamint a daganatra specifikus jellemzők jelenléte (a daganat típusa, a daganat stádiuma, a daganat ellenes terápia) befolyásolja a VTE kialakulásának esélyét. A legújabb kutatások szerint a tumoros szövet sejteiben megjelenő különböző prokoaguláns anyagok (pl. TF) képesek aktiválni a hemosztázis rendszert és a gazdaszervezet más sejtjeit. A malignus sejt által vagy a szervezet aktivált sejtjei által képzett mikropartikulák, az intracelluláris granulumokból felszabaduló gyulladáscsökkentő citokinek (pl. $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$), adhéziós molekulák és proangiogén faktorok is hozzájárulhatnak a prokoaguláns hatás fokozásához. A daganatos sejtek direkt módon vagy indirekten, a daganatos sejtek által szekretált agonista ágensek révén aktiválják a vérlemezkéket a véráramban és ezáltal az aktivált vérlemezkék felszíne prokoagulánssá válik a koagulációs kaskád számára. Ez mikropartikulák lefűződése révén tovább fokozza a prokoaguláns hatást.

Vénás thromboembóliás szövődmény kialakulása malignus hematológiai betegségekben

Malignus hematológiai megbetegedésekben, köztük az akut leukémiákban a VTE kockázatát jóval alacsonyabbnak vélték és inkább a vérzéssel járó eseményeket tartották valószínűnek, azonban újabb tanulmányok kimutatták, hogy onkohematológiai, akut leukémiás betegekben is legalább olyan gyakran alakulnak ki VTE-ás szövődmények, mint szolid tumoros betegekben. Számos tényező játszhat szerepet a VTE szövődmények kialakulásában akut leukémiákban. Sok esetben leírták a terápiás beavatkozások, a centrális vénás katéter jelenlétéhez társuló prothrombotikus hatást vagy a kemoterápiához, például az L-aszparagináz terápiához köthető fokozott thrombotikus hatást, mely a természetes antikoagulánsok, mint például az antithrombin vagy plazminogén csökkenéséhez vezet és növeli a vWF szintet. Régóta ismert, hogy az akut myeloid leukémia (AML) egyik altípusában, az akut promyelocytás leukémiában (APL) gyakoriak mind a vérzéssel, mind a thrombotikus komplikációk különösen a diagnózis idején. A vérzéssel járó szövődmények hátterében az APL-

ban tapasztalt hypofibrinogenémia, esetleg az elasztáz hatás áll. A fokozott thrombosis hajlam pedig leginkább a leukémiás promyelocyták TF expressziójának tudható be. A hemosztázis szövődmények tekintetében az APL egy külön entitás, azonban kevésbé ismert, hogy más akut leukémiákban, az AML egyéb altípusaiban és az akut lymphoid leukémiában (ALL) milyen gyakoriak a VTE szövődmények illetve mennyi szubklinikus thrombotikus szövődmény fordul elő.

Mikropartikulák eredete és jelentősége a prokoaguláns hatás kialakításában

A mikropartikulák (MP) 0,1-1,0 µm átmérőjű, aktivált vagy apoptotikus sejtek membránjának felszínéről, a citoskeletonról proteolitikus úton lefüződő foszfolipid tartalmú membránnal határolt partikulák. Egészséges egyének vérében fiziológiás körülmények között is megtalálhatók, de számuk növekedhet különböző betegségekben, pl. kardiovaszkuláris kórképekben, diabetesben, szepszisben vagy daganatos megbetegedésekben. A vérben a thrombocytá eredetű MP-k vannak jelen a legnagyobb mennyiségben (kb. 80%), de előfordulnak granulocytá, endothelsejt, vörösvértest és monocytá eredetű MP-k is. Mivel a MP-ák a sejteket ért stressz (pl. aktiváció) hatására képződnek, a felszínükön expresszálódó, negatív töltésű PS felelős a MP-k prokoaguláns hatásáért azáltal, hogy a negatív töltésű foszfolipid felszín tenáz és prothrombináz komplexek kialakulását segíti elő. Korábban igazolták, hogy az NB4 sejtvonal eredetű MP-k kifejezett thrombin generációs potenciállal rendelkeznek.

Globális thrombin generációs teszt és alkalmazása

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

A teljes képződő thrombin mennyiség kevesebb, mint 5%-a elegendő a fibrinogén fibrinné történő átalakításához, vagyis az alvadék létrejöttéhez. A rutin hemosztázis diagnosztikában használt alvadási szűrőtesztek, mint a prothrombin idő, az aktivált parciális thromboplastin idő vagy thrombin idő esetében a mérés végpontja a fibrin, valamint alvadék képződés, melyet kevesebb, mint az teljes thrombin mennyiség 5%-a befolyásol. Azaz a képződött

thrombin legnagyobb része (>95%) az alvadék létrejöttét követően képződik, ezért az alvadási időket mérő tesztek nem adnak pontos információt a képződött thrombin mennyiségéről.

A thrombin generációs teszt (TGT) egy globális hemosztázis teszt, mely egy adott idő intervallum alatt képződött teljes thrombin mennyiséget és a képződés kinetikáját méri.

A tesztet eredetileg thrombocytaszegény plazma (PPP) vizsgálatára fejlesztették ki és továbbra is a legelterjedtebb a PPP mintából történő thrombin generáció mérése. Azonban a thrombocytaszegény plazma mérésén túl alkalmas thrombocytadús plazma és teljes vér vizsgálatára is.

A különböző minták mérésére úgy válik alkalmassá a teszt, hogy a mintákhoz kis mennyiségű aktivátort (trigger) hozzáadva vizsgálható az *ex vivo* keletkezett thrombin mennyisége.

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

CÉLKITŰZÉSEK

1. Calyculin-A hatása a vérlemezke aktivációra

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

2. Akut monocytás leukémia sejtvonalak prokoaguláns hatásának meghatározása

Kísérleteinkben három akut monocytás leukémia sejtvonal prokoaguláns hatását vizsgáltuk. Izolált humán monocytákat negatív kontrollként, pozitív kontrollként egy ismert akut

promyelocytás leukémia sejt vonalat használtunk. A hipotézisünk az volt, hogy akut monocytás leukémia sejt vonalak prokoaguláns hatása fokozott a normál humán monocytákhoz képest.

3. Celluláris modellek vizsgálata thrombin generációs teszttel

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

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Thrombocytá-szegény kevert plazma készítése

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

Thrombocytá-dús plazma készítése thrombocytá kísérletekhez

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

1. Nem aktivált minta (NA)

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

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

Normál humán monocyták szeparálása

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

Sejtvonalak és sejtenyésztés

Három akut monocytás (THP-1, MOLM-13, MV4-11) és egy akut promyelocytás (NB4) leukémia sejtvonalat vizsgáltunk. A THP-1 sejtvonalat Prof. Dr. Vereb Györgytől (Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizika és Sejtbiológia Intézet) kaptuk. A MOLM-13 és MV4-11 sejtvonalakat a German Collection of Microorganism and Cell Cultures-től (DSMZ, Braunschweig, Németország) vásároltuk. Az akut monocytás leukémia sejtvonalakkal egyidejűleg vizsgált, NB4 sejtvonalat (DSMZ, Braunschweig, Németország) Dr. Balajthy Zoltántól (Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biokémia és

Molekuláris Biológia Intézet) kaptuk. Mind a négy sejtvonalat 15% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) tartalmú RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) médiumban tenyésztettük, 37 °C-os inkubátorban, 5%-os CO₂ és 95%-os relatív páratartalom mellett. A monocytás leukémia sejtvonalak kettőződési ideje 35-48 óra volt, melyet 48 óránként történő sejtszámlálással és a 0., a 24., valamint a 48. órában vizsgált sejtciklus analízissel határoztunk meg. A sejteket kétnaponta passzáltuk, passzálások során a monocytás leukémia sejtvonalak sejt számát 0,5 x 10⁶/mL-re, míg az NB4 sejtvonal sejt számát 0,3 x 10⁶/mL-re állítottuk be. Minden 7. napon a teljes médiumot eltávolítottuk és friss médiumba vettük fel a sejteket. A sejtek életképességének meghatározása tripánkék festéssel történt, kísérletekhez azokat a sejtszuspenziókat használtuk, amikben a sejtek >90%-a élnek bizonyult.

Leukémiás sejtek immunfenotípusának meghatározása áramlási citometriai módszerrel

A leukémiás sejtek immunfenotípusának meghatározása standard felszíni 8 színű jelöléssel történt. Ötven mikroliter 1 x 10⁷/mL PBS-ben lévő sejtet inkubáltunk antitestekkel 15 percig, szobahőmérsékleten, sötétben. Az alábbi antitestekkel történt a felszíni antigének detektálása: CD14-FITC, CD11b-PE, HLA-DR-PerCPCy5.5, CD4-PB, CD15-FITC, CD34-PerCPCy5.5, CD71-FITC, CD117-PE, CD38-APCH7 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA), CD34-APC, CD13-PECy7, CD64-APCAF750, CD33-PECy5.5, CD56-PECy7 (Beckman Coulter, Marseille, Franciaország), CD45-PO (Invitrogen, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA), MPO-PE (Dako, Glostrup, Dánia). A FXIII-A-FITC antitesttel történő jelölés a sejtek fixálása és permeabilizálása után történt. A sejtek immunfenotípusának meghatározása FACSCanto II (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA) áramlási citométerrel történt, minden minta esetén azonos beállításokkal. Mintánként 50 000 eseményt gyűjtöttünk be és az eredményeket FACSDiva szoftver (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA) segítségével értékeltük.

Thrombocyta sejtfelszíni foszfatidil-szerin expresszió vizsgálata áramlási citometriai módszerrel

Thrombocyta dús plazmát - 250 G/L-es thrombocyta számot használva - előinkubáltunk 0,5%-os dimetilszulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) tartalmú HEPES pufferrel (15 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH 7,4) vagy a protein foszfatáz inhibitor CLA-val 30 percig,

37°C-os vízfürdőben, sötétben. A CLA-t 50 nM-os végkoncentrációban használtuk. Az előinkubációt követően a PRP-t 20 µM-os végkoncentrációjú TRAP-pal vagy 200 µM végkoncentrációjú Thiomersal-lal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 15 percig, 37°C-os vízfürdőben, sötétben aktiváltuk. Majd 5 µL PRP-t 5 µL CD41-PE antitesttel (Dako, Glostrup, Dánia), 5 µL Annexin-V-FITC antitesttel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) és 35 µL Annexin-kötő pufferrel (10-szeres hígítású, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) jelöltünk 15 percig, szobahőmérsékleten, sötétben. A kísérletek során a mintákat az FC500 áramlási citométerrel (Beckman Coulter, CA) analizáltuk, a thrombocytá kapuba 10 000 eseményt gyűjtöttünk be, melyet a Kaluza szoftver (Beckman Coulter, CA) segítségével értékeltünk.

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

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

Mikropartikulák szeparálása és mikropartikula szám meghatározása áramlási citometriai módszerrel

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

sejttörmelékét a felülúszó (MP tartalmú) ismételt rövid ideig tartó centrifugálásával (13 000 g, 2 perc, szobahőmérséklet) távolítottuk el. A felülúszóból a MP-kat magas fordulatszámú (16 100 g, 30 perc, szobahőmérséklet) hosszú idejű centrifugálással szeparáltuk, majd PBS-ben mostuk és centrifugáltuk (16 100 g, 30 perc, szobahőmérséklet), végül 1 mL PBS-ben vettük fel. A MP-k áramlási citometriai mérése előtt Megamix-Plus SSC kalibrációs gyöngyöket (Biocytex, Marseille, Franciaország) használtunk a mérési protokoll beállításához. A kalibrációs gyöngyök fluoreszcensek és különböző átmérőjűek, a MP mérettartományok nagy részét lefedik. Az áramlási citométert ezekkel a fluoreszcens gyöngyökkel kalibráltuk, a MP-k számát méretük és PS pozitivitásuk alapján határoztuk meg.

Leukémiás sejtek prokoaguláns hatásának meghatározása prokoaguláns aktivitás teszttel (PCA)

A leukémiás sejtek prokoaguláns aktivitásának vizsgálata során normál, valamint külön-külön VII-es és XII-es alvadási faktor hiányos plazmákat használtunk. Továbbá vizsgáltuk a leukémiás sejtek prokoaguláns hatását humán szöveti faktor ellenes antitest (blokkolás) jelenlétében. A különböző körülmények segítségével bővebb információt kaptunk arról, hogy a sejtek mely útvonalon befolyásolhatják az alvadást, illetve thrombin valamint fibrin képződést. A PCA során 100 μ L normál, VII-es faktor vagy XII-es faktor hiányos plazmát (mindegyik Siemens, Marburg, Németország) inkubáltunk 100 μ L PBS-sel vagy izolált monocytákkal vagy leukémiás sejtekkel 37°C-on 3 percig. Blokkoló antitestként poliklonális kecske IgG anti-humán szöveti faktor ellenes antitestet (ahu-TF antitest, R&D Systems, Minneapolis, MN) használtunk. A leukémiás sejteket 15 percig, 37°C-on inkubáltuk ahu-TF antitesttel (25 μ g/mL végkoncentrációban), majd 100 μ L blokkolt mintát 100 μ L normál plazmával inkubáltunk 3 percig, 37°C-on. A blokkolt minta negatív kontrolljaként kecske szérumot használtunk (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 45 μ g/mL végkoncentrációban. Az inkubációt követően 100 μ L 20 mM-os CaCl_2 adtunk a mintákhoz, hogy beindítsuk az alvadást. A fibrin képződést KC-1 koagulométeren mértük és másodpercben fejeztük ki. Rekombináns tromboplasztin (Dade Innovin, Siemens, Marburg, Németország) 1:10 arányú hígítását választottuk 12 800 mU-nak, sorozatos hígítást használtunk a tromboplasztin kalibrációs görbe elkészítéséhez egy dupla logaritmusos skálán. Az alvadási időt $\text{mU}/10^5$ monocyta mértékegységű prokoaguláns aktivitássá konvertáltuk.

Alvadék retrakció vizsgálata

Hétszázhusz μL PRP-t pufferrel (DMSO tartalmú HEPES puffer) vagy CLA-val előinkubáltuk 30 percig, 37°C -os vízfürdőben, sötétben, majd TRAP-pal aktiváltuk 15 percig 37°C -os vízfürdőben, sötétben. Egy üvegcsőbe mind a 4 mintából (NA, NA + CLA, TRAP, TRAP + CLA) 800-800 μL -t inkubáltunk CaCl_2 -dal (25 mM-os végkoncentrációban) 60 percig, 37°C -os vízfürdőben, sötétben. A mintákról a 0., 20., 40. és 60. percekben fényképes dokumentációt készítettünk. A kísérlet végén a kiszorított szérum mennyiségét analitikai mérleggel határoztuk meg. A kiszorított szérum fibrin monomer mennyiségét kvantitatív immunoassay (Diagnostica Stago, Asnières, Franciaország) segítségével ACL-TOP (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA) véralvadási analizátorral határoztuk meg.

Leukémiás sejtek és mikropartikuláik prokoaguláns hatásának meghatározása thrombin generációs teszttel

A thrombin generációs tesztet (TGT) a korábban leírtaknak szerint a Thrombinoscope CAT (Calibrated Automated Thrombogram, Maastricht, Hollandia) segítségével a gyártó utasításainak (Diagnostica Stago, Asnières, Franciaország) megfelelően végeztük. Röviden, egy kerek aljú, 96-lyukú, fekete lemezbe pipettáztunk 80 μL normál plazmát vagy VII-es faktor, XI-es faktor, XII-es alvadási faktor hiányos plazmát majd hozzápipettáztunk 20 μL PBS-t/izolált monocytát vagy leukémiás sejtet ($5 \times 10^6/\text{mL}$). A MP thrombin generációs vizsgálat során 80 μL normál plazmához 20 μL szeparált MP-t pipettáztunk. A mintákat 10 percig 37°C -on inkubáltuk. Minden plazma mintához kalibrátort (Calibrator reagent, Thrombinoscope BV, Maastricht, Hollandia) - α_2 -makroglobulin és thrombin stabil komplexe - használtunk. A thrombin generációt 20 μL FluCa-KitTM (Fluo-puffer és fluorogén CaCl_2 tartalmú szubsztrát keveréke) hozzáadásával indítottuk el és a mintákat duplikátumban mértük. A fluoreszcenciát a Fluoroskan Ascent fluoriméterrel (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) detektáltuk és thrombin generációs görbéket a Thrombinoscope szoftverrel értékeltük. A thrombin generációs görbéket az alábbi paraméterekkel (az elnevezések magyar nyelvű konszenzusának hiányában):

1. lagtime (perc): a thrombin képződés kezdetéig eltelt idő
2. endogén thrombin potenciál (ETP, nM x perc): a görbe alatti terület
3. peak thrombin (nM): a legmagasabb thrombin koncentráció
4. time to peak (perc): a legmagasabb thrombin koncentráció létrejöttéig eltelt idő

5. start tail (perc): a thrombin generáció végpontja
6. velocity index (nM/perc): a lagtime és time to peak közötti görbe.

Thrombocyta funkció moduláció és CLA hatás vizsgálata thrombin generációs teszttel

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

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

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

Statisztikai elemzések

A statisztikai analízist a GraphPad Prism szoftver 5.0-ás (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) verziójával végeztem. A normalitás vizsgálata Kolmogorov-Smirnov és Shapiro-Wilk

tesztekkel történt. Az átlag \pm 2 SD-n kívül eső értékeket kizártam. Két összetartozó csoport összehasonlítására, amennyiben a változó mindkét csoportban normál eloszlást mutatott, egymintás t-próbát (paired t-test), nem normál eloszlású változó esetén Wilcoxon signed rank tesztet (párosított Wilcoxon-teszt) alkalmaztam. Két független csoport összehasonlítására nem párosított t-próbát (normál eloszlás) és Mann-Whitney tesztet (nem normál eloszlás) alkalmaztam. Több független csoport összehasonlítása ANOVA és Bonferroni poszt teszt (Gaussi eloszlás) valamint Kruskal-Wallis és Dunn's poszt teszt (nem Gaussi eloszlás) segítségével történt. A 0,05-nál kisebb *p*-értéket tekintettem statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

TRAP és thiomersal aktiváció és CLA gátlás hatása a thrombocyta sejtfelszíni foszfatidil-szerin expresszióra és MP régió eseményeire

Az áramlási citometriai mérés során először a vérlemezkéket azonosítottuk a mintáinkban CD41-PE jelölődés alapján. A NA és CLA-val előkezelt mintákat aktiváltuk 200 μ M végkoncentrációjú thiomersal-lal vagy 20 μ M végkoncentrációjú TRAP-pal, majd a PS-expressziót áramlási citometriai módszerrel határoztuk meg.

A nem aktivált minták PS-expressziója alacsony, $3,0 \pm 0,8\%$ (átlag \pm SD) volt, melyet a CLA előkezelés tovább csökkentett (átlag \pm SD: $1,8 \pm 0,7\%$, $p=0,0004$). A PAR-1 receptor agonista, TRAP szignifikánsan növelte a PS-expressziót mutató thrombocyták számát (átlag \pm SD: $18,7 \pm 3,2\%$) összehasonlítva a NA mintával ($p=0,0001$). A PAR-1 receptoron keresztül ható TRAP-al ellentétben, a thiomersal a vérlemezkék 96%-án indukált PS-expressziót, melyet a CLA-előkezelés nem befolyásolt. A thrombocyta fényszórási képeken a vérlemezke FSC alatti mikropartikula (MP) régió eseményeit százalékosan elemeztük. A CLA előkezelés teljesen meggátolta a PS-expressziót valamint a MP régióban megjelenő események kialakulását TRAP-aktiválta thrombocyták esetén.

CLA hatása az alvadék retrakcióra

Az üvegcsövekben az alvadék kialakulása már a 20. percben látható, a 60. perben a NA és TRAP aktivált mintákban intenzív alvadék retrakció figyelhető meg. A CLA-előkezelt minták

esetében az alvadék retrakció kisebb mértékű. A szabad szemmel látható alvadék képződésnek megfelelően, a CLA-val előkezelt minták esetében a kiszorított szérumszám mennyisége szignifikánsan kevesebb volt, mint a NA (754,4 mg vs. NA + CLA: 653,2 mg, $p=0,0085$) és TRAP aktivált (647,4 mg vs. TRAP + CLA: 570,0 mg, $p=0,005$) minták esetében. A fibrinogén szint a mintákban nephelometriás módszerrel mérve is mérhetetlenül alacsony volt a 60. percben. A kiszorított szérumszám fibrin monomer (FM) szintje a CLA-előkezelt minták esetében magasabb tendenciát mutatott a nem CLA előkezelt mintákhoz viszonyítva (NA vs. NA + CLA: 3,65 $\mu\text{g/mL}$ vs. 5,23 $\mu\text{g/mL}$, $p=0,44$ és TRAP vs. TRAP + CLA: 3,26 $\mu\text{g/mL}$ vs. 5,16 $\mu\text{g/mL}$, $p=0,39$).

A vérlemezke funkció modulációjának hatása a thrombocytadús plazma thrombin generációjára

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

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

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

vérlemezekben egy alkalommal sem alakult ki kalcium tranziens. Összesen 117 vérlemezkét vizsgáltunk a TRAP aktivált mintákban. Nem előkezelt minták esetében (NA minta) a vérlemezek 22,2%-ában alakult ki intracelluláris kalcium tranziens TRAP aktivációt követően. A CLA-val előkezelt 122 thrombocyta közül egyben sem volt megfigyelhető kalcium tranziens létrejötte TRAP aktivációt követően. A CLA előkezelés nem befolyásolta a nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} szintet (erről további adatokat az értekezés nem tartalmaz).

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

A leukémiás sejtvonalak immunfenotípusa és genetikai jellemzői

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

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

A negatív kontroll, izolált normál monocyták $73,4 \pm 20,3\%$ -a (átlag \pm SD) mutatott TF-expressziót. A leukémiás sejtvonalak esetében a TF-expresszió mértéke eltérő volt. A THP-1 sejtvonal TF-expressziója (átlag \pm SD: $73,1 \pm 11,6\%$) a monocytákétól szignifikánsan nem különbözött. A MOLM-13 sejtvonal mutatta a legalacsonyabb TF-expressziót (átlag \pm SD: $3,9 \pm 0,6\%$). Mind a MOLM-13, mind az MV4-11 (átlag \pm SD: $21,2 \pm 7,4\%$) sejtvonal TF-

expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a monocyták, a THP-1 és az NB4 sejtvonalakétól ($p < 0,001$), a két sejtvonal között nem volt szignifikáns különbség ($p > 0,05$). A pozitív kontroll, NB4 sejtvonal átlag \pm SD: $64,2 \pm 16,4\%$ -os TF-expressziót mutatott, mely a monocyták és THP-1 sejtvonalétól szignifikánsan nem különbözött. A három akut monocytás leukémia sejtvonal közül a THP-1 PS-expressziója volt a legalacsonyabb (átlag \pm SD: $6,5 \pm 2,3\%$). A MOLM-13 (átlag \pm SD: $12,1 \pm 3,3\%$) és MV4-11 (átlag \pm SD: $21,8 \pm 8,4\%$) sejtvonalé kissé magasabb, azonban ezek a különbségek nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak. A negatív kontroll, monocyták (átlag \pm SD: $12,1 \pm 4,9\%$) és a pozitív kontroll, NB4 sejtvonal (átlag \pm SD: $9,8 \pm 2,2\%$) PS-expressziója sem különbözött a monocytás leukémias sejtvonalakétól ($p > 0,05$).

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

Mikropartikula szám meghatározás

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

Leukémiás sejtek prokoaguláns aktivitása (PCA)

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

Leukémiás sejtek thrombin generációja

A TGT során az egy óra alatt képződött thrombin mennyiségéről és a képződés kinetikájáról kapunk információt. A pozitív kontroll, NB4 sejtvonal esetén indult a leggyorsabban a thrombin képződés, a peak thrombin érték is az NB4 sejtvonal esetében volt a legmagasabb. A monocyták thrombin generációja jóval később indult el, mint a sejtvonalaké. A három akut monocytás sejtvonal thrombin generációja hasonló.

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

$\pm 0,2$ perc; MOLM-13: $4,1 \pm 1,3$ perc; MV4-11: $4,6 \pm 1,4$ perc) lagtime értékei között nem volt szignifikáns különbség. Az NB4 sejtvonal lagtime-ja (átlag \pm SEM: $2,1 \pm 0,2$ perc) volt a legrövidebb, azonban a másik három sejtvonalhoz hasonlítva az eltérés nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. A VII-es alvadási faktor mentes plazmában és az ahu-TF-al blokkolt mintában mindhárom akut monocytás leukémia sejtvonal lagtime értékei megnyúltak, a thrombin képződés szignifikánsan lassabban következett be a VII-es alvadási faktor hiányában, valamint a TF blokkolása esetén. A XI-es és XII-es alvadási faktor hiányának nem volt hatása a thrombin generáció kezdetére. A MOLM-13 sejtvonal time to peak értéke XI-es faktor mentes plazmában szignifikánsan hosszabb volt a normál plazmáéhoz képest.

A peak thrombin érték THP-1 sejtvonal esetében nem volt szignifikánsan magasabb a monocytákéhoz képest, a másik két monocytás leukémia sejtvonal esetén a különbség szignifikáns volt, normál plazmában. A monocytás leukémia sejtek peak thrombin értékét a VII-es, XI-es, valamint XII-es alvadási faktorok hiánya szignifikánsan csökkentette, a MOLM-13 sejtvonal kivételével, ahol a peak thrombin értéket a VII-es alvadási faktor hiánya nem befolyásolta. A peak thrombin értéket, vagyis a képződött thrombin mennyiségét az ahu-TF-el történő blokkolás egyik sejtvonal esetében sem befolyásolta.

Leukémiás sejt eredetű mikropartikulák thrombin generációja

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

MEGBESZÉLÉS

Thrombocyta funkciók modulációjának lehetőségei

Az artériás atherosclerotikus kórképek kulcsfontosságú szereplői a vérlemezkék. A vérlemezkék in vitro körülmények között történő vizsgálatára és modulációjára ezért egy „sejtes modellt” hoztunk létre. Kísérleteinkben vizsgáltuk a thrombocyták aktivációját PS-expressziójuk révén, valamint funkcionális tesztekkel (alvadék retrakciós teszt, thrombin

generációs teszt) a véralvadásra és thrombin képződésre kifejtett hatásukat. Ezen túlmenően tanulmányoztuk a protein foszfatáz gátló (CLA) vérlemezke PS-expresszióra, vérlemezke funkcióra és intracelluláris Ca^{2+} szint változásra kifejtett hatását.

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

A szerin/threonin protein foszfatázok fontos szerepet töltenek be a sejtek, köztük a thrombocyták jelátvitelének, metabolizmusának és sejtciklusának szabályozásában, valamint a thrombocytá szekréció és aggregáció iniciációjában.

Kísérleti körülmények között a protein foszfatáz inhibitorral kezelt vérlemezkék aktin polimerizációját az inhibitor gátolta, a mikrotubulusok hosszú pseudopodiumokba rendeződtek, a miozin könnyűlánc foszforilációja pedig elmaradt thrombinnal stimulált vérlemezkékben. A miozin könnyűlánc foszforilációja nélkülözhetetlen az aktomiozin komplex létrejöttéhez, ezáltal a vérlemezkék szekréciójához és a következményes aktivációhoz.

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

létre. Mi a vizsgálataink során a CLA gátló hatását mindkét thrombocytá funkciók tesztben ki tudtuk mutatni.

A PS-expresszió vizsgálata során az intracelluláris kalcium méréseknél tapasztalt vérlemezke heterogenitást láttuk sejtfelszíni PS-expresszió vizsgálata során is, hasonlóan az intracelluláris kalcium mérésnél látottakhoz, a vérlemezkék közel 20%-a volt PS-pozitív. Thiomersal aktivációt követően a vérlemezkék 96%-a mutatott felszíni PS-expressziót, melyet nem befolyásolt a CLA előkezelés. Az intracelluláris kalcium mérések során thiomersal aktivációt követően a kalcium tranziens minden vérlemezkében létrejött, melyet a CLA – a PS-expresszióhoz hasonlóan - nem tudott meggátolni. A thiomersal aktivációval kapott eredményeink azt mutatják, hogy a CLA foszfatáz gátló hatását valahol intracellulárisan még az intracelluláris raktárak, illetve az IP₃ receptor előtti útvonalon fejt ki, a direkt IP₃ receptor aktivációt nem tudta meggátolni.

Az intracelluláris Ca²⁺ szint emelkedés hatására a PS a thrombocyták külső membrán rétegébe transzlokálódik, amely negatív töltésű felszint biztosít az extrinsic tenáz és prothrombináz komplexek számára hozzájárulva a thrombin képződéshez. A thrombin generáció jellemzésére a vérlemezkék TRAP aktivációját és CLA gátlását követően leginkább a lagtime, time to peak, peak thrombin és velocity index paraméterek voltak informatívak. A CLA gátolta a TRAP indukálta thrombin generációt. A CLA gátolta továbbá azt a thrombocytá szubpopulációt is, amely feltehetően az alvadék retrakcióban vesz részt.

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

Akut monocytás leukémia sejtek fokozott prokoaguláns hatása

A koaguláció iniciációjának sejtfelszíni kulcsfehérjéje a TF, amely a FVIIa-hoz kötődve aktiválja a véralvadási kaskád extrinsic útvonalát és végül thrombin, fibrin képződéshez vezet. A tradicionális elképzelés szerint a TF a keringő vérben nincs jelen, az ér endothel által elzárta az extravascularis térben található meg. Korábbi tanulmányokban leírták, hogy a monocyták aktivációt követően rendelkeznek TF aktivitással, azonban az aktivált intakt monocyták és a monocytá lizátum TF aktivitása között jelentős különbség van, a monocytá lizátum erősebb prokoaguláns hatást mutatott, mint az intakt sejtek. Amikor akut myeloid leukémiás betegek intakt és lizált mononukleáris sejtjeit vizsgálták, akkor is a lizált sejtek mutattak erősebb prokoaguláns hatást. Egy másik tanulmányban lizált daganatos sejt vonalakat

vizsgáltak, leírták a promyelocytás, NB4 leukémia sejtvonal és az emlőtumorból származó, MCF7 sejtvonal FVII függő véralvadás aktivációját, de más sejtvonalak lizátumából (pl. krónikus myeloid leukémia, K562 sejtvonal, erythro-leukémia sejtvonal, HEL-sejtek) nem tudtak kimutatni TF aktivitást és a FVII-től függő aktivációt.

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

A negatív kontrollként használt, izolált, nem aktivált humán monocyták átlagosan 73%-a mutatott TF expressziót, azonban a felszíni TF expresszió nem járt a PCA és TGT tesztekben kimutatható fokozott prokoaguláns hatással, annak mértéke a sejteket nem tartalmazó, pufferes kontrollal megegyező volt. Ennek hátterében több mechanizmus állhat, a legújabb irodalmi adatok alapján a sejtfelszíni TF két formában lehet jelen a vérben lévő sejteken: „cryptic”, azaz funkcionálisan inaktív formában vagy „decryptic” vagyis funkcionálisan aktív formában. A monocytás leukémia sejtvonalak különböző mértékű TF expressziót mutattak és szignifikáns különbség nem volt kimutatható normál plazmában az egyes sejtek funkcionális teszttel mért prokoaguláns hatása között. Újabb kutatási eredmények szerint a TF aktiváció különböző mechanizmusok révén jöhet létre. A legtöbb bizonyíték amellet szól, hogy a plazmamembrán külső felszínén expresszálódó negatív töltésű foszfolipidek, mint például a PS expressziója aktiválja a TF-t ezáltal iniciálva az alvadászt. Akut monocytás leukémia sejtvonalaink között a PS-expresszió mértékében nem volt szignifikáns különbség, azonban a PS-expresszió intenzitása a MOLM-13 sejtvonal esetén statisztikailag szignifikánsan nagyobbak bizonyult, mint a THP-1 vagy MV4-11 sejtvonalaké.

A normál monocytákhoz hasonlítva a leukémiás sejtvonalak prokoaguláns aktivitása jelentős mértékű volt. Ennek hátterében feltételeztük az in vitro folyamat elindulásához nélkülözhetetlen alvadási faktorok szerepét. Ezért vizsgáltuk az intrinsic és extrinsic útvonal elindításában szerepet játszó alvadási faktorok szerepét is, vagyis XII-es és VII-es alvadási faktor mentes plazmában vizsgáltuk sejtvonalaink prokoaguláns aktivitását. A PCA teszt során nagyon kevés thrombin elegendő a fibrin képződés elindításához, néhány perc alatt végbemegy a folyamat, amely FVII mentes plazmában és anti-humán TF antitesttel gátolt plazmában a sejtek fibrin képződésének teljes gátlásához vezetett. A thrombin generációs teszt során a thrombin képződést 1 órán keresztül követjük, lehetővé téve a különböző alvadási faktorok közreműködésének tanulmányozását a hiányplazmák révén. Eredményeink

alapján a fibrin- és thrombin képződés szempontjából a FVII-nek fontos szerepe van a fokozott prokoaguláns hatás elindításában. A további thrombin generáció inkább FXI és részben FXII függő, mely a time to peak és peak thrombin paraméterekben észrevehető. A peak thrombin kialakításában kifejezett szerepe a FXI-nek van a MOLM-13 és részben az MV4-11 sejtvonalak esetében, így feltételezzük, hogy a FXI-et a képződött thrombin feedback mechanizmus útján aktiválja - függetlenül a FVII-és FXII-től -, ezáltal tovább triggerelve a thrombin generációt.

A sejtvonalak peak thrombin értékeinek alakulása FVII hiányplazma hatására és ezen eredmények összefüggése a TF expresszióval azt mutatta, hogy a legalacsonyabb felszíni TF expressziót mutató MOLM13 sejtvonal, bár szignifikánsan több thrombint képzett mint a monocyta, de VII-es hiányplazmával ez a hatás nem volt érdemben befolyásolható, mely összefügghet az alacsony TF-expresszió általi thrombin képződéstől független hemosztatikus aktivációval.

Szisztémás és hematológiai betegségekben egyaránt leírták a különböző eredetű, endothelből vagy a vér sejtjes elemeiből származó mikropartikulák jelentőségét a prokoaguláns hatás kialakításában, illetve szabályozó szerepüket a véralvadásban. Az általunk vizsgált leukémiás sejtvonalak esetében feltételeztük, hogy a sejtek által létrehozott mikropartikulák fokozott prokoaguláns hatással rendelkeznek. Azt találtuk, hogy 48 órás tenyésztési idő alatt egy intakt leukémiás sejtből átlagosan 4-10 mikropartikula képződött.

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

A monocytás leukémia sejtvonalak és mikropartikuláik szignifikánsan erősebb prokoaguláns hatással rendelkeznek, mint a normál monocyták. Ez a hatás elsősorban TF függőnek

bizonyult, de más faktorok is szerepet játszhatnak benne. Az általunk használt funkcionális tesztek alkalmasak lehetnek akut myeloid leukémiákban a sejtek által létrehozott thrombin generáció vizsgálatára.

ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

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

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

FŐBB ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK, MEGFIGYELÉSEK

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

KULCSSZAVAK

Véralvadás, trombózis, vérlemezke, calyculin-A, akut monocytás leukémia, leukemia, szöveti factor, mikropartikula, alvadék retrakció, thrombin generáció



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





További közlemények

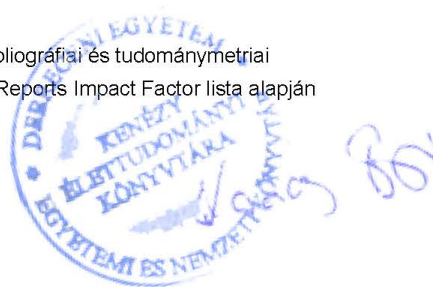
3. **Hudák, R.**, Székely, E. G., Czuriga-Kovács, K. R., Nagy, A., Hofgárt, G., Berényi, E., Csiba, L., Kappelmayer, J., Bagoly, Z.: Low thrombin generation predicts poor prognosis in ischemic stroke patients after thrombolysis.
PLoS One. 12 (7), 1-13, 2017.
IF: 2.806 (2016)
4. Frendl, I., Katkó, M.,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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,343

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

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

Debrecen, 2017.10.25.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

Köszönöm Bagoly Zsuzsának a kísérletekhez adott hasznos tanácsait és ötleteit.

Köszönöm Antal-Szalmás Péternek, hogy konzultációkkal segítette munkámat.

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

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

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