

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Somodi Laura

**Celluláris XIII-as faktor trombocitákban és makrofág
eredetű habos sejtekben**

DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Celluláris XIII-as faktor trombocitákban és makrofág eredetű habos sejtekben

Somodi Laura

Témavezető: Dr. Muszbek László
emeritus professzor, az MTA rendes tagja



DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2023

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
1. BEVEZETÉS.....	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
2.1 XIII-as véralvadási faktor szerkezete, aktivációja és funkciója.....	9
2.2 FXIII-A a trombocitákban	13
2.3 FXIII-A a monocitákban és a makrofágokban.....	14
2.4 Ateroszklerotikus plakkok és a habos sejtek	15
3. CÉLKITŰZÉS.....	18
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	19
4.1 Etikai engedélyek.....	19
4.2 Gél-filtrált trombociták készítése és aktivációja.....	19
4.3 Felszíni FXIII-A és foszfatidilszerin detektálása.....	20
4.3.1 Áramlási citometriás analízis.....	20
4.3.2 Immunfluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok	21
4.3.3 Elektronmikroszkópos vizsgálatok	21
4.4 Ca^{2+} -ionofórral, kalcimicinnel indukált trombocita aggregáció	22
4.5 Intracelluláris Ca^{2+} szint meghatározása.....	22
4.6 Makrofágok tenyésztése és habos sejtekké való transzformálása.....	23
4.7 Makrofág eredetű habos sejtek immunfluoreszcens analízise	23
4.8 Enzimatikusan módosított LDL készítése	24
4.9 Humán aorta simaizom sejtek habos sejtekké való transzformálása	25
4.10 Humán aorta simaizom sejt eredetű habos sejtek immunfluoreszcens vizsgálata ...	25
4.11 Makrofág eredetű habos sejtek FXIII-A tartalmának meghatározása ELISA technikával	26
4.12 Western blot.....	26
4.13 Ateroszklerotikus plakkok vizsgálata immunhisztokémiával.....	26
4.14 Lipidek és FXIII-A pozitív sejtek kimutatása ateroszklerotikus plakkokban.....	27

4.15	Statisztikai analízis.....	27
5.	EREDMÉNYEK	29
5.1	Aktivációs markerek felszíni megjelenése trombocita stimulációt követően.....	29
5.2	A cFXIII transzpozíciója a receptor mediálta útvonalon aktivált trombociták és trombocita eredetű mikropartikulák esetén.....	31
5.3	A nem-receptor mediálta trombocita aktiváció nem indukálta a cFXIII trombociták és trombocita eredetű mikropartikulák felszínre történő transzlokációját.....	36
5.4	Citoszólikus szabad Ca^{2+} koncentráció változása trombocita aktivációt követően .	41
5.5	A RhoA és a transzglutamináz inhibitorok hatása a konvulxin+trombin által kiváltott cFXIII transzlokációjára	43
5.6	FXIII-A expresszió és LDL tartalom vizsgálata makrofág és simaizom sejt eredetű habos sejtekben immunfluoreszcens mikroszkópiával	45
5.7	A cFXIII expresszió változásának detektálása makrofágok habos sejtekké történő átalakulása során	46
5.8	Makrofágok és az FXIII-A kimutatása ateroszklerotikus plakkokban	47
5.9	FXIII-A és izopeptid keresztkötések detektálása immunhisztokémiával ateroszklerotikus plakkokban.....	48
5.10	Ateroszklerotikus plakkokban megjelenő FXIII-A tartalmú habos sejtek	51
6.	MEGBESZÉLÉS.....	53
6.1	FXIII-A a trombociták és a trombocita eredetű mikropartikulák felszínén.....	53
6.2	FXIII-A a makrofág eredetű habos sejtekben	56
7.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	59
8.	SUMMARY	60
	IRODALOMJEGYZÉK.....	61
	TÁRGYSZAVAK	71
	KEYWORDS.....	72
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	73
	FÜGGELÉK.....	74

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AP-FXIII	activation peptide of factor XIII A subunit; XIII-as faktor A alegységhez kapcsolódó aktivációs peptid
BSA	bovine serum albumin; szarvasmarha szérum albumin
cFXIII	cellular form of factor XIII; celluláris XIII-as faktor
CVX	convulxin; konvulxin
DAB	3,3'-diaminobenzidine; 3,3'-diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole; 4',6-diamidino-2-fenilindol
ECL	enhanced chemiluminescence; fokozott kemilumineszcencia
EDTA	ethylene-diamine-tetraacetic acid; etilén-diamin-tetraecetsav
ER	endoplasmic reticulum; endoplazmatikus retikulum
eLDL	enzyme-modified low density lipoprotein; enzimatikusan módosított alacsony sűrűségű lipoprotein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay; enzimhez kapcsolt immunoszorbens technika
FBS	fetal bovine serum; főtális borjú szérum
FITC	fluorescein-isothiocyanate; fluoreszcein-izotiocianát
Fluo-4-AM	Fluo-4-acetoxymethyl ester; Fluo-4-acetoxi-metilészter
FXIII	factor XIII; XIII-as faktor
FXIIIa	activated factor XIII; aktivált XIII-as faktor
FXIII-A	A subunit of factor XIII; XIII-as faktor A alegysége
FXIII-A₂	dimer of factor XIII A subunit; XIII-as faktor A alegység dimer formája
FXIII-A₂B₂	tetrameric form of factor XIII; XIII-as faktor tetramer komplexe
FXIII-B	B subunit of factor XIII; XIII-as faktor B alegysége
GFP	gel-filtered platelet; gél-filtrált trombocita
GP	glycoprotein; glikoprotein
GTPáz	guanosine-triphosphate hydrolase enzyme guanozin-trifosztátot hidrolizáló enzim
HAoSMC	human aortic smooth muscle cell; humán aorta simaizom sejt
HEPES	4-(2-hydroxy-ethyl)-1-piperazine-ethane-sulfonic acid; 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etán-szulfonsav
IEM	immune-electron microscopy; immun-elektronmikroszkópia

MFI	median fluorescence intensity; medián fluoreszcens intenzitás
MIT	2-methyl-4-isothiazolin-3-one; 2-metil-4-izotiazolin-3-on
MP	microparticle; mikropartikula
ORO	Oil Red O; olajvörös O
oxLDL	oxidized low density lipoprotein; oxidált alacsony sűrűségű lipoprotein
PAR	protease-activated receptor; proteáz aktiválta receptor
PE	phycoerythrin, fikoeritrin
PECy5	phycoerythrin-cyanine5; fikoeritrin-cianin5
PBS	phosphate-buffered saline; foszfáttal pufferolt sóoldat
pFXIII	plasmatic form of factor XIII; a plazma XIII-as faktora
PS	phosphatidylserine; foszfatidilszerin
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis; nátrium dodecyl szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
TG	transglutaminase; transzglutamináz
TG2	tissue transglutaminase; szöveti transzglutamináz
T101	1,3,4,5-tertramethyl-2-imidazolium chloride 1,3,4,5-tetrametil-2-[(2-oxopropil)tio]imidazolium klorid

1. BEVEZETÉS

A vérалvadás XIII-as faktora (FXIII) több szempontból is különleges alvadási faktor. Az FXIII kivételével valamennyi potenciálisan enzimatisz aktivitással rendelkező alvadási faktor proteolitikus enzimek zimogén prekursorai, melyek a vérálvadási kaszkád aktiválódása során alakulnak át aktív alvadási faktorokká és peptid kötéseket hasítanak. Az FXIII ezzel szemben egy transzglutamináz enzim (TG) elő-alakja, amely aktivált formában fehérjék glutamin és lizin oldalláncait izopeptid kötésekkel köti össze. A proteáz prekursor alvadási faktorok plazma fehérjék, az FXIII ezzel szemben mind a plazmában (pFXIII) mind intracelluláris lokalizációban (cFXIII) előfordul. Míg a proteolitikus prekursor plazma faktorok monomerek, addig a plazmában lévő FXIII kétféle alegységből, két potenciálisan aktív A (FXIII-A) és két gátló/stabilizáló B alegységből (FXIII-B) felépülő tetramer (FXIII-A₂B₂). Aktivációja trombin és Ca²⁺ hatására megy végbe, a trombin az FXIII-A-ról lehasít egy aktivációs peptidet, ezt követően Ca²⁺ jelenlétében az FXIII-B disszociál és kialakul az aktív transzglutamináz. Az aktivált plazma FXIII fő funkciója a fibrin α -, és γ -láncának a kovalens összekötése, illetve az α_2 -plazmin inhibitornak a fibrinhez való rögzítése, ezáltal a vérálvadás terminális fázisában kialakult fibrin háló stabilizációja és megvédeése a fibrinolitikus degradációtól.

A cFXIII két A alegységből álló dimer (FXIII-A₂), jelenlétét eddig mintegy 7 különböző sejttípusban (legnagyobb koncentrációban trombocitákban és monocitákban/makrofágokban) mutatták ki. Nem aktivált „nyugvó” sejtekben a cFXIII a citoszólban található, de a sejtaktiváció során kikerülhet a sejtfelszínre, vagy intracelluláris organelumokhoz kötődhet. Ennek során intra-, és extracelluláris funkciója is lehet. A cFXIII jelenléte a trombocitákban régóta ismert, de a funkciójának részletes megismerése még várat magára. Azt már tudjuk, hogy erőteljes receptor mediált trombocita aktiváció (a glikoprotein (GP) VI kollagén receptor és a proteázok által aktivált PAR1 és PAR4 receptorok együttes aktivációja) következtében a cFXIII legalább egy része a felszínre kerülhet, de ennek mechanizmusára még nem derült fény. Az egyik kulcskérdés, hogy ez bekövetkezik-e nem-receptor mediált aktiváció hatására is, amikor az intracelluláris Ca²⁺ szint szintén emelkedik, de a Ca²⁺ szint emelkedésétől független mechanizmusok hiányoznak. A trombocita aktiváció egyik fontos lépése a mikropartikulák lefűződése. Kérdés, hogy a receptor mediált és a nem-receptor mediált trombocita aktiváció során a mikropartikulák felszínére kerül-e a cFXIII. Úgy gondoltuk, hogy a fenti kérdések mélyebb biokémiai és immun-elektronmikroszkópos vizsgálata a trombocita aktiváció további részleteinek megismeréséhez vezethet.

A monociták és a makrofágok cFXIII tartalmának első leírása laboratóriumunkban történt. Ma már azt is tudjuk, hogy a makrofágok aktivációja során a cFXIII e sejtek felszínére kerülhet. A makrofágok és a simaizom sejtek az ateroszklerotikus plakkok meghatározó sejtpopulációi. Mindkét sejtípus képes módosított alacsony denzitású lipoprotein (LDL) felvételével, *in vitro* körülmények között úgynevezett habos („foam”) sejtekké transzformálódni, ami lényegesen befolyásolhatja a sejtek fehérje összetételét. A makrofágok tartalmazzák cFXIII-at, míg a vaszkuláris simaizom sejtek nem. Kérdés, hogy a habos sejtekké történő átalakulás befolyásolja-e a makrofágok cFXIII tartalmát, illetve a vaszkuláris simaizom sejtek habos sejtekké történő átalakulás hatására cFXIII-at expresszáló sejtekké válnak-e. További kérdés volt, hogy cFXIII-at expresszáló habos sejtek megjelennek-e az ateroszklerotikus plakkokban, illetve ha igen, a cFXIII kikerül-e az extracelluláris kompartmentbe és ott kifejti-e fehérjét kötő hatását.

Az FXIII struktúrájával és funkciójával kapcsolatos ismereteinket több részletes összefoglaló is tárgyalja [1-4], de a fentebb felsorolt kérdések megválaszolása lényegesen hozzájárul a cFXIII hatásának jobb megismeréséhez és fizio-patológiás szerepének megértéséhez.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 XIII-as véralvadási faktor szerkezete, aktivációja és funkciója

Az FXIII a fibrinháló mechanikai stabilitásáért felelős véralvadási faktor és a fibrinolízis egyik fő regulátora [5]. Az FXIII egy pro-transzzglutamináz, melynek aktív formája (FXIIIa) a TG-k családjába tartozik. Az FXIIIa-n kívül még hét további TG-t ismerünk, melyeket arab számokkal jelölünk (TG1-TG7) [6]. A TG-k, beleértve az FXIIIa-t, acil-transzfer reakciót katalizálnak, mely során egy peptid kötésben lévő glutaminhoz primer amin kötődik. A folyamat első lépésében a peptid kötésben lévő glutamin szubsztrát az enzim aktív centrumában megtalálható, 314-es pozíciójú ciszteinhez kapcsolódik tioészter kötésen keresztül, miközben ammónia szabadul fel. Második lépésben egy primer amin szubsztrát jelenlétében az acil csoport átkerül az acil akceptor aminra. Az amin hozzákapcsolódik a γ -glutamil oldallánchoz izopeptid kötésen keresztül, miközben az aktív centrum ciszteinje deacetilálódik. Amennyiben az amin szubsztrát egy peptid kötésben lévő lizin ϵ -amino csoportja a TG (FXIIIa), polipeptid láncok N ϵ -(γ -L-glutamil)-L-lizil izopeptid kötéssel történő keresztbe kötését katalizálja [7, 8]. Az acil-transzfer reakció során felszabaduló ammónia mérésén alapul a leggyakrabban használt FXIII aktivitás meghatározás [9, 10].

Az FXIII kétféle formában fordul elő: megtalálható a plazmában és egyes sejtekben intracellulárisan [1, 3, 4, 11]. A pFXIII heterotetramer szerkezetű [12, 13], két potenciálisan aktív FXIII-A alegység és két hordozó/gátló FXIII-B alegység komplexe [3, 7]. A pFXIII molekulatömege 326 kDa [14], koncentrációja a plazmában 14-28 mg/L [15].

Az FXIII-A más TG-kel ellentétben dimer szerkezetű (FXIII-A₂), mely a két monomer forma összekapcsolódása révén alakul ki. FXIII-A molekulatömege 83 kDa [16]. FXIII-A-t négy struktúrális domén alkotja: β -szendvics, katalitikus régió, β -hordó 1 és β -hordó 2. A β -szendvics N-terminális végéhez egy 37 aminosavból álló aktivációs peptid (AP-FXIII) kapcsolódik [16, 17]. Az FXIII-A monomerek egy-egy nagy affinitású Ca²⁺ kötőhellyel rendelkeznek, melyeknek az aktív forma kialakulásában kiemelt szerepe van. Feltehetően kisebb affinitású Ca²⁺ kötőhelyek is megtalálhatóak az A alegység felszínén, de ezek funkcionális szerepének tisztázásához további tanulmányok szükségesek [18].

Az FXIII-A több sejtben is előfordul: trombocitákban, monocitákban, makrofágokban, oszteoblasztokban, oszteocitákban, kondrocitákban, preadipocitákban és a corneában lévő keratocitákban [19-27]. Jóllehet az FXIII-A-t főleg csontvelő eredetű sejtek expresszálják [28],

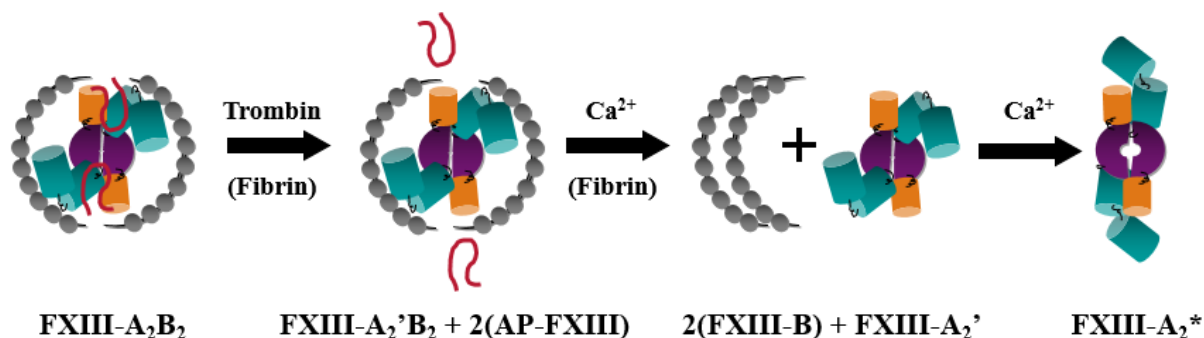
de a plazmában lévő A alegység forrása vitatott. Ezekben a sejtekben azonosították az A alegységet kódoló F13A1 gént, de a szekrécióhoz szükséges endoplazmatikus retikulum (ER) szignál szekvencia hiányzik, így nem tud bekapcsolódni a magvas sejtekre jellemző klasszikus ER-Golgi szekréciós útvonalba [29]. Feltételezték, hogy a vérlemezkék a plazma FXIII-A forrásai [28, 30], de ezt az állítást nem támasztották alá a trombocitopénias egereken végzett kísérletek eredményei, ahol csökkent trombocitaszám ellenére sem változott az FXIII-A szintje a plazmában [31]. A közelmúltban - szintén egér modellen - végzett megfigyelések alapján valószínűsítik, hogy a rezidens szöveti makrofágok felelősek a plazma FXIII-A szintjének biztosításáért [32].

Az FXIII-B egy hepatociták által termelt és szekretált 80 kDa-os glikoprotein, amely 8,5% szénhidrátot tartalmaz [33]. Legújabb kutatások szerint a fehérje szénhidrát tartalma felelős az FXIII-B és az FXIII-A₂B₂ hosszú féléletidejéért a plazmában [34]. Mozaik szerkezet jellemzi, 10 ismétlődő úgynevezett „sushi” doménből épül fel. Az egyes domének térszerkezetének kialakításában két diszulfid híd játszik lényeges szerepet [35]. A B alegység feladata a katalitikus alegység (FXIII-A) spontán aktivációjának és eliminációjának a megakadályozása plazma körülmények között, ezáltal növelve az FXIII-A élettartamát [3].

Az FXIII-A₂B₂ komplex kialakulása a plazmában történik. Az FXIII-A döntő többsége komplexben kötött formában található meg, és mindössze <1%-a kering szabadon a plazmában [36]. Ezzel szemben az FXIII-B feleslegben termelődik és 50%-a szabad formában van. Míg az FXIII-A dimer szerkezetét egyértelmű adatok támasztják alá, addig az FXIII-B szabad formájáról nem tudjuk biztosan, hogy dimer vagy monomer formában van-e jelen a plazmában. Az FXIII-A₂B₂ fibrinogénhez kötött állapotban fordul elő a plazmában. Ez a kötődés a B alegységen keresztül valósul meg [37].

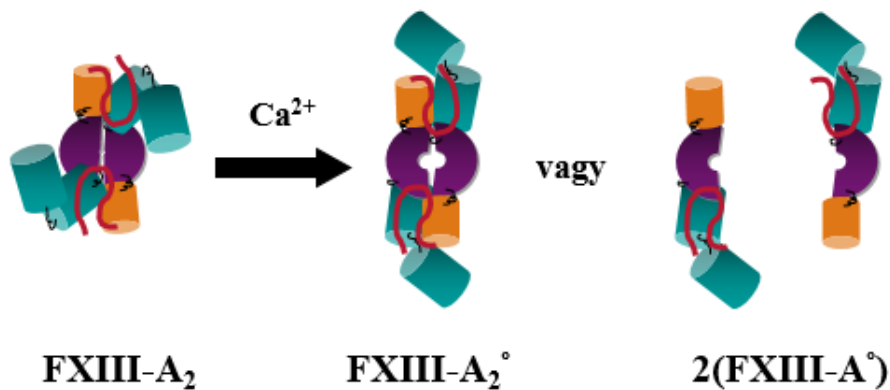
A pFXIII a véralvadási kaskád utolsó fázisában aktiválódik trombin és Ca²⁺ hatására (1. ábra). Első lépésben a trombin lehasítja az AP-FXIII-at az FXIII-A N-terminális végéről. Ezután Ca²⁺ jelenlétében az FXIII-B alegységek disszociálnak és az így létrejött trunkált FXIII-A dimer enzimatikusan aktív konformációt vesz fel. Lehetséges, hogy az így képződött dimer aktív monomerekké esik szét. Az aktív formára jellemző, hogy az eredetileg fedett aktív centrum elérhetővé válik a szubsztrátok számára. A konformáció változás szintén Ca²⁺ igényes folyamat [1-3, 38-40]. Polimerizált fibrin gyorsítja az aktivációt akár 100-szorosára [41, 42], illetve az újonnan képződő fibrin szálak felszín is biztosíthatnak az aktivációs folyamat számára [43]. Habár fiziológiás körülmények között proteáz (trombin) és Ca²⁺ révén alakul át a zimogén pFXIII aktív TG-vé (FXIIIa), extrém magas Ca²⁺ koncentráció (>100 mM) is

előidézheti az alegységek disszociációját és így a pFXIII nem-proteolitikus aktivációját [44, 45].



1. ábra A XIII-as faktor komplex (FXIII-A₂B₂) aktivációja a plazmában. Fiziológias körülmények között a trombin proteolitikusan lehasítja az aktivációs peptidet (AP-FXIII) az FXIII-A₂B₂ komplexben lévő A alegységről (FXIII-A₂'B₂). Ca²⁺ jelenlétében a B alegységek (FXIII-B) leválnak és a hasított A alegység (FXIII-A₂') aktív szerkezetet (FXIII-A₂*) vesz fel. Az FXIII₂* dimerként van ábrázolva, de jelenleg is kérdéses, hogy aktivációt követően dimer marad vagy monomerként funkcionál (lásd a 3. ábrán). A 10 gyöngyszerű képletből álló hosszúság, hajlított struktúra az FXIII-B-nek felel meg. Az AP-FXIII piros színű hurokként van ábrázolva. A zöld és a narancssárga henger alakzatok a β-hordókat és a β-szendvics doméneket reprezentálják. A lila félkörökkel az aktív centrumot tartalmazó, központi „core” domént jelöltük. Az ábra a [3] referenciából átvett struktúra némileg módosított változata.

Extracelluláris körülmények között a cFXIII trombinnal és Ca²⁺-al aktiválható hasonlóan a pFXIII-hoz, viszont FXIII-B hiányában nincs disszociációs lépés (2. ábra). Intracelluláris környezetben a cFXIII-nak nincs szüksége proteolitikus hasításra az aktív szerkezet kialakításához [46, 47]. Azonban az nem tisztázott, hogy ez a szerkezet továbbra is dimer (FXIII-A₂^o) formát jelent-e az aktiváció után vagy monomerekké (FXIII-A^o) disszociál. Kimutatták, hogy vérlemezke aktiváció során nem következik be FXIII-A proteolitikus módosítás, de az intracelluláris Ca²⁺ koncentrációja megemelkedik, ami elegendő a cFXIII enzimatisz aktív konfigurációjának létrehozásához. A celluláris forma nem-proteolitikus mechanizmussal történő aktiválódása fiziológiásnak tekinthető a vérlemezkékben [46, 48] és valószínűleg a monocitákban is [49]. Az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció a vérlemezkék esetében megemelkedik például trombin vagy Ca²⁺-ionofór indukálta stimuláció hatására [46, 47].



2. ábra A celluláris XIII-as faktor (cFXIII) nem-proteolitikus aktivációja. A cFXIII nem igényel proteolitikus hasítást az aktivációhoz, az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedése elegendő. Jelenleg nincs egységes álláspont az aktivált forma szerkezete kapcsán, vitatott, hogy valóban dimer marad-e vagy esetleg monomerekké esik szét és úgy fejt ki hatását. Az AP-FXIII piros színű hurokként van ábrázolva. A zöld és a narancssárga henger alakzatok a β -hordókat és a β -szendvics doméneket reprezentálják. A lila félkörök az aktív centrumnak tartalmazó központi doméneket ábrázolja. FXIII-A₂: homodimer XIII-as faktor A alegység; FXIII-A₂[°]: nem-proteolitikusan aktivált homodimer XIII-as faktor A alegység, FXIII-A[°]: nem-proteolitikusan aktivált monomer XIII-as faktor A alegység. Az ábra a [3] referenciából átvett struktúra némileg módosított változata.

Az FXIIIa elsődleges fehérje szubsztrátjai a fibrin α és γ láncai, illetve az α_2 -antiplazmin [50, 51]. A fibrin láncok keresztkötésével γ lánc dimerek és α lánc polimerek képződnek, ezzel és az α_2 -antiplazmin α lánchoz történő bekötődésével egy stabil, mechanikai hatásokkal és a fibrinolízissel szemben ellenálló alvadék jöhet létre [52]. Az elmúlt években további 23 FXIIIa szubsztrátot azonosítottak: véralvadási faktorok (pl. V-ös faktor), fibrinolitikus fehérjék (pl. plazminogén, lipoprotein A), adhézión és extracelluláris mátrix fehérjék (pl. trombospondin, fibronectin), citoskeletális fehérjék (pl. aktin és miozin) [53-59]. Ezen fehérjék egy részének, mint fiziológiás FXIIIa szubsztrátoknak a jelentősége további bizonyításra vár.

Az FXIIIa fő feladata az alvadék stabilizálása, de ezen kívül számos más funkciója ismert. Elengedhetetlen a terhesség fenntartásához [60, 61] és a megfelelő sebgyógyuláshoz [62, 63], de az FXIIIa részt vesz az érújdonképződésben is [64, 65]. Továbbá leírták, hogy az FXIIIa csökkenti a vaszkuláris permeabilitást [66]. Egereken kimutatták az FXIIIa védőhatását spontán kardiális ruptúrával szemben, valamint *in vitro* kísérletek arra engednek következtetni, hogy az FXIIIa részt vesz az extracelluláris mátrix kialakításában, stabilizálásában és mineralizációjában [67].

Az FXIII-A hiánya súlyos vérzési rendellenességgel jár. Ismerünk öröklött (autoszomális recesszív) és szerzett formákat is. Az öröklött FXIII-A deficiencia leggyakoribb tünete a csecsemőkorban fellépő köldökcsomkvérzés. FXIII-A hiányában különböző típusú vérzések jelentkezhetnek testszerte (pl. bőr alatti bevérvések, intracraniális vérzés, izomközi hematómák). FXIII hiány ismétlődő vetéléssel és elhúzódó sebgyógyulással is járhat [63, 68, 69].

2.2 *FXIII-A a trombocitákban*

Az 1950-es években mutatták ki először az FXIII-A jelenlétét a trombocitákban [19, 20]. E sejtek nagy mennyiségben tartalmazzák az FXIII-A-t a citoplazmában. Egy vérelemezékben körülbelül 60 ± 10 fg FXIII-A található, ami a teljes fehérjetartalom 3%-át teszi ki. Ez az érték a plazma FXIII koncentrációjának 100-150-szerese [70]. Jelenleg nem teljesen tisztázott, hogy miként is szabadulhat fel a sejtekből és fejtheti ki extracelluláris hatását az FXIII-A. Mitchell és munkatársai leírták, hogy erős stimulus esetén, mint például konvulxin (CVX) és trombin együttes hatására az FXIII-A a membránrétegbe kerül és megjelenik a trombociták felszínén. A trombociták ez esetben a membrán tágulása, és a sejtekbe gyorsan beáramló víz, nátrium és kloridionok miatt egy ballonszerű struktúrát vesznek fel („ballooning”). Az FXIII-A egy ehhez kapcsolódó sapkaszerű képletbe koncentrálnak [71]. Utóbbi számos egyéb hemosztatikus fehérjét tartalmaz, úgymint fibrinogént [72], plazminogént vagy plazminogén aktivátor inhibitor-1-t [73] és valószínűleg organellumok maradványaiból tevődik össze [74]. Leírták továbbá, hogy a felszínre került cFXIII TG aktivitást mutatott α_2 -antiplazminnal vagy α_2 -antiplazmin eredetű peptiddel végzett kísérletekben [71, 75], ami arra utal, hogy a trombocitákban lévő cFXIII extracellulárisan is kifejti hatását. A trombocita cFXIII tehát a pFXIII mellett részt vehet az alvadék stabilizációjában, amennyiben a plazma FXIII-A₂B₂ komplex szintje 20% alá csökken, akkor előtérbe kerül a trombocita FXIII-A antifibrinolitikus hatása [71].

A CVX és trombin a receptoraikhoz kötődve indukálnak trombocita aktivációt. A CVX stimulálja a kollagén receptort, a GPVI/FcR γ -át, míg a trombin proteáz által aktivált receptor 1-en (PAR1) és 4-en (PAR4), valamint GPIb-n keresztül fejti ki hatását [76]. Ezeknek a receptoroknak a CVX+trombin általi stimulálása egy robusztus jelátviteli mechanizmus beindítását jelenti. Számos jelátviteli útvonal aktiválódik, beleértve a fehérje foszforilációt és az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció emelkedését az intracelluláris raktárakból való

felszabadulás miatt. Ezek a jelátviteli események vérlemezke aggregációt és granulomok szekrécióját indukálják. Nyugvó trombocitáknál a foszfatidilszerin (PS) a kettős foszfolipid réteg intracelluláris oldal felőli részen található meg, de aktivációt követően transzlokálódik a membrán külső oldalára. A negatív töltésű, prokoaguláns PS felszínt biztosít a véralvadási faktorok számára és elősegíti az alvadék kialakulását, elsősorban a tenáz és protrombináz komplexek megfelelő működését [77, 78]. Az extracelluláris Ca^{2+} beáramlása is hozzájárul ezekhez a folyamatokhoz [79, 80]. Trombocita aktiváció nem-receptor mediálta útvonalon keresztül is végbe mehet. A Ca^{2+} -ionofór, kalcimicin (A23187) egy receptor független aktiváló ágens, mely megemeli a Ca^{2+} koncentrációját a trombociták citoplazmájában és beindítja az aktivációs rendszer Ca^{2+} -függő biokémiai útvonalait [81]. Emelkedett Ca^{2+} szint miatt a trombocitákban lévő cFXIII nem-proteolitikusan aktiválódik. Az intracellulárisan aktiválódott FXIII

1./ egyes a citoplazmában lévő fehérjéket (pl. aktint) keresztbe köt [58, 82],

2./ hozzájárul az alvadék retrakciójához, bár ezzel kapcsolatban nincs egységes álláspont. Kasahara és munkatársai leírták, hogy FXIII-A hiányos egerekben szignifikánsan gyengébb volt az alvadék retrakció [83], ezzel szemben Kattula és munkatársai azt találták, hogy a trombocita FXIII-A nem befolyásolja a retrakció folyamatát, csak csökkent pFXIII szint esetén van változás [84],

3./ szerepet játszik a sejtaktivációt követő trombocita szétterülés („spreading”) fázisában is [85].

Vérlemezke aktiváció a fent említett folyamatok mellett mikropartikula képződéssel is jár. A mikropartikulák különböző sejtek (pl. trombocita, monocita, vörösvérsejtek) aktivációja vagy apoptózisa során keletkező 0,1-1 μm átmérőjű, membránról lefüződő vezikulák [86]. Fiziológiás körülmények között is megtalálhatóak a keringésben, de számuk lényegesen növekedhet a sejtek aktivációjával járó különböző kórképekben, mint például kardiovaszkuláris betegségekben, szepszisben vagy daganatos megbetegedésben. A mikropartikulák főleg arra a sejtre jellemző tulajdonságokat hordozzák, amelyből származnak. Az aktivált trombocitákhoz hasonlóan PS jelenik meg az ezekből származó mikropartikulák felszínén, melyek így prokoaguláns tulajdonsággal rendelkeznek [87-89].

2.3 *FXIII-A a monocitákban és a makrofágokban*

A nyolcvanas években kutatócsoportunk írta le először, hogy a monociták és a peritoneális makrofágok FXIII-A-t expresszálnak, de FXIII-B-t nem [21, 22]. Ezeket az

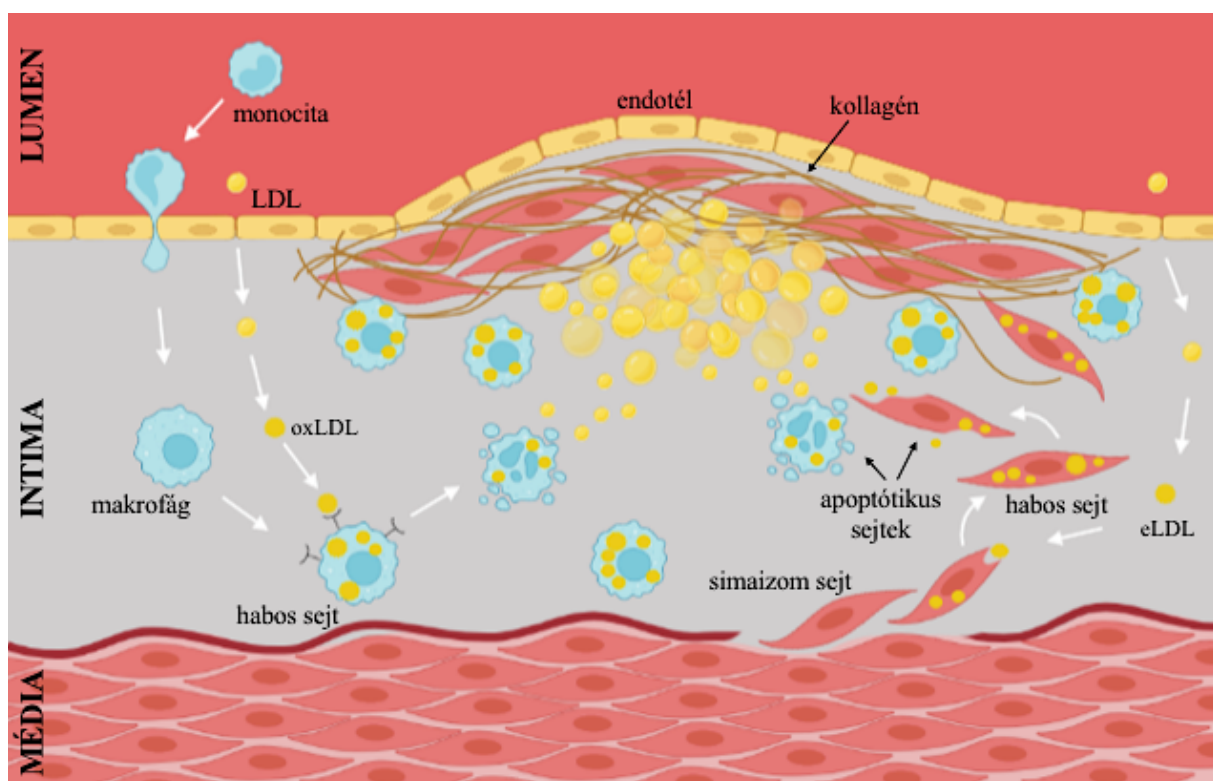
eredményeket McDonagh és munkatársai is megerősítették [90]. FXIII-A hiányos betegekből frissen izolált, nem stimulált monocitákban a TG aktivitás a detektálási határ alatt volt és a szöveti transzglutamináz (TG2) is csak nyomokban volt kimutatható [91, 92]. A TG2 azonban gyorsan nőtt a sejtek tenyésztése vagy stimulálása során [91]. A monocita/makrofág cFXIII-ra jellemző, hogy intracellulárisan is hatékony, de membrán felszínre való kikerülés esetén extracelluláris funkciót is betölthet. Az intracelluláris FXIIIa aktivitás hozzájárul az IgG Fc régió és a komplement receptorok mediálta fagocitózishoz [93]. Szignálpeptid hiányában nem történik cFXIII felszabadulás a monocitákból/makrofágokból a hagyományos szekréciós útvonalon keresztül, de Golgi vezikulákhoz kapcsolódva az FXIIIa a plazma membránhoz kerül, ami felveti egy alternatív szekréciós útvonal lehetőségét [31]. Nemrégiben kimutatták, hogy az FXIII-A externalizálódik humán monociták membránjának felszínén interleukin-4 vagy interleukin-10 általi stimuláció hatására, így képes extracellulárisan is funkcionálni [94].

2.4 Ateroszklerotikus plakkok és a habos sejtek

Az ateroszklerózis egy krónikus gyulladásos elváltozás, mely a szív- és érrendszeri betegségek fő oka világszerte. Multifaktoriális betegség, kialakulását számos tényező befolyásolja: stressz, dohányzás, életkor, magas vérnyomás, mozgásszegény életmód és a lipoproteinek felhalmozódása [95]. Elsősorban az artériákat érinti és éveken keresztül tünetmentes lehet [96]. Az ateroszklerotikus plakkok kialakulásának pontos mechanizmusa nem ismert. Erre vonatkozóan több elmélet is született: (a) infiltrációs elmélet (endotélkárosodás miatt megnövekszik az áteresztő képessége és a lipidek, illetve a makromolekulák a keringésből a subendoteliális térbe kerülnek, így ateroszklerózist iniciálnak), (b) trombogén elmélet (trombus alakul ki az erekben, endotél növi be és átkerül a subendoteliális térbe, ahol megváltozik a szerkezete makrofágok hatására), (c) sérülésre adott válasz elmélete (vírusfertőzésre adott gyulladásos folyamat eredménye), (d) lipidanyagcsere-zavar elmélete (lipidek és a koleszterin szintje megemelkedik, majd lerakódik az erek falán) [97].

Az ateroszklerózis patológiája hat fő szakaszra osztható: intima megvastagodás, lipid csík stádium, patológiás mértékű intima megvastagodás, fibroateroma, sérülékeny plakk, plakk ruptúra és következményes trombózis [98-100]. A folyamat már gyermekkorban elkezdődhet, amikor artériákban zsírlarakódások jelennek meg. A plazma koleszterinszint emelkedése az endotél réteg permeabilitásának megváltozásával jár, így a különböző típusú lipidek, elsősorban az LDL felhalmozódik az intimában [100, 101]. Oxidatív stressz miatt az LDL partikulumok

oxidálódnak (oxidált LDL; oxLDL), ami endotél diszfunkciót indukál [102]. A gyulladásos folyamat részeként adhéziós molekulák aktiválódnak (intercelluláris adhéziós molekula-1, vaszkuláris sejtadhéziós molekula-1) és kemokinek (makrofág kolónia stimuláló faktor, monocita kemoattraktáns fehérje-1) szabadulnak fel. Ennek következtében, a monociták átjutnak a fokozott permeabilitású érendotélra és makrofágokká differenciálódnak, oxLDL felvételét követően pedig habos sejtekké alakulnak [100, 101]. Az oxLDL felvétele CD36-on, scavenger receptor-A1-en vagy lektinszerű oxLDL receptor-1-en keresztül történik [103]. A fibrózus plak stádiumában a vaszkuláris simaizomsejtek az artériák média rétegéből szintén az intimához vándorolnak, és kollagén jelenlétében kialakul a fibrotikus sapka az ateroszklerotikus plakknál. Ez a vastag fibrotikus sapka hozzájárul a stabil plak létrehozásához. Az ateroszklerotikus folyamat előrehaladtával egyre több sejt vándorol az érfalba, sejtek aktivitása is fokozódik és a hidrolitikus enzimek szintje megemelkedik (pl. elasztáz). A túlzott felhalmozódás apoptotikus sejthalálhoz vezet és a sejtmarmadványok a plak lipiddús, mag régió kialakulását segítik elő (3. ábra).



3. ábra Ateroszklerotikus plak kialakulása. Magas plazma koleszterinszint esetén fokozódik az endotél permeabilitása, így a keringésből monociták és lipidek kerülnek be az érfalba. A monociták makrofágokká differenciálódnak, a lipidek pedig oxidálódnak. A módosult lipid partikulumokat a makrofágok receptorokon keresztül felveszik, és habos sejtekké alakulnak.

Simaizom sejtek szintén az intimához vándorolnak és módosított lipidet vehetnek fel. Az intimánál felhalmozódott sejteket és a lipidekből álló magrészt egy kollagénben gazdag fibrotikus sapka veszi körül, mely védelmet nyújt a plakk ruptúrával szemben. LDL: alacsony denzitású lipoprotein; oxLDL: oxidatív alacsony denzitású lipoprotein, eLDL: enzimatikusan módosított alacsony denzitású lipoprotein.

Az előrehaladott lézió és trombózis stádiumban a nekrotikus mag megnő, szövetközi állomány csökken és a fibrotikus sapka elvékonyodik. Az ilyen instabil plakkok könnyen megrepedhetnek, melynek következtében a nekrotikus mag komponensei kölcsönhatásba lépnek a vérárvadási faktorokkal és a vérsejtekkel, ami trombózishoz vezet [100, 101].

A plakknak vannak acelluláris és celluláris komponensei. Az acelluláris komponensek közül a lipideket (koleszterin, koleszterin észter, foszfolipidek) és a mátrix komponenseket (fibronektin, kollagén proteoglikánok) érdemes kiemelni. A celluláris komponensekhez tartoznak a plakokban lévő makrofágok, simaizom sejtek, dendritikus sejtek, mezenchimális őssejtek, endotél sejtek és T sejtek. Habos sejt kialakítására a makrofágokon és a simaizom sejteken kívül még a dendritikus sejtek, őssejtek, valamint endotél sejtek képesek [95]. Ateroszklerózis folyamata során kialakuló habos sejt populáció nagy többsége azonban makrofág és simaizom sejt eredetű [104]. A simaizomsejtek és a makrofág által történő lipid felvétel mechanizmusa eltérő. A makrofágok scavenger receptor függő endocitózis által könnyen felveszik az LDL oxidált, acetilált vagy akár a natív formáját [105]. Annak ellenére, hogy a simaizom sejtek is expresszálnak CD36 receptort [106] és vehetnek is fel oxLDL-t, nem ez lehet a habos sejtekké történő alakulásuk fő útvonala. Gyakoribb az LDL enzimekkel módosított formájának felvétele makropinocitózis révén. Ilyen módosítást indukálhat az ateroszklerotikus plakokban nagy koncentrációban lévő koleszterin-észter hidroláz és proteolitikus enzimek együttes hatása [105]. Ahogy már korábban említettük, mind a monociták, mind a makrofágok tartalmaznak FXIII-A-t, de munkánkat megelőzően arra vonatkozóan nem volt adat, hogy a habos sejtek rendelkeznek-e FXIII-A tartalommal.

3. CÉLKITŰZÉS

Kutatásunk célja volt vizsgálni az FXIII-A jelenlétét trombociták és trombocita eredetű mikropartikulák felszínén, valamint a makrofág eredetű habos sejtekben kvantitatív és kvalitatív módszerekkel.

Munkánk során az alábbi kérdésekre szerettünk volna választ kapni:

- A cFXIII korábban immunfluoreszcenciás módszerrel kimutatott, receptor mediált trombocita aktiváció során bekövetkező felszíni transzpozíciója megerősíthető-e immun-elektronmikroszkópos technikával?
- Megjelenik-e a trombocita eredetű mikropartikulák felszínén a cFXIII a sejtekhez hasonlóan?
- FXIII-A felszíni expressziója létrejön-e nem-receptor mediálta aktiváció esetén?
- Van-e összefüggés a PS és az FXIII-A membrán felszínen való megjelenése között?
- Az FXIII-A transzlokációjáért felelős mechanizmus igényel-e Ca^{2+} felszabadulást az intracelluláris raktárakból?
- Hogyan befolyásolja a cFXIII tartalmat a makrofágok habos sejtekké való átalakulása?
- Simaizom eredetű habos sejtek expresszálnak-e cFXIII-at?
- Milyen eloszlást mutat az FXIII-A az ateroszklerotikus plakkokban?
- Detektálhatók-e FXIIIa általi keresztkötött fehérje struktúrák az ateroszklerotikus plakkokban?

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Etikai engedélyek

A humán perifériás vérminták, vérkészítmények (határréteg – „buffy coat”) és a szöveti metszetek begyűjtése és felhasználása az Országos Világszövetség által megfogalmazott Helsinki Nyilatkozat irányelveinek megfelelően valósult meg. A vérmintákkal való munkát a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága is engedélyezte. A szöveti metszeteken elvégzett vizsgálatok a Marosvásárhelyi Megyei Klinikai Sürgősségi Kórház Intézményi Kutatásetikai Bizottság (29496/2019) jóváhagyásával és a donorok írásos beleegyező nyilatkozatainak birtokában történt.

4.2 Gél-filtrált trombociták készítése és aktivációja

Vérlemezkék izolálásához olyan egészséges önkéntesek vérmintáit használtuk, akik a vérvételt megelőző 14 napban nem szedtek trombocita funkciót befolyásoló gyógyszert. A perifériás vénás vért 0,109 M Na-citrátot tartalmazó vérvételi csövekbe (Vacutainer®, Becton Dickinson, Plymouth, UK) vettük le, majd 1:1 arányban kihígítottuk módosított 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etán-szulfonsav (HEPES) pufferrel (10 mM HEPES, 136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1% glükóz, pH 7,45). Trombocita gazdag plazma kinyerése céljából a hígított vérmintákat 170 g-n, 25 °C-on, 10 percig centrifugáltuk. Ezt követően a trombocitákat egy módosított HEPES pufferrel ekvilibrált Sepharose CL-2B oszlopon (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) választottuk el a plazmától. A kromatográfiás oszlopon történő áthaladás során a vérlemezkék deformálódnak, ezért az izolálást követően a gél-filtrált trombocitákat (GFP) 30 percig inkubáltuk 37 °C-on, a sejtek így visszanyerték a nyugvó állapotra jellemző diszkoid alakjukat.

GFP-t aktiválás előtt 2 mM CaCl₂-dal és 0,1% szarvasmarha szérum albuminnal (BSA) egészítettük ki. Az aktiváció 125 ng/ml CVX (Pentapharm, Basel, Svájc) és/vagy 0,5 U/ml trombin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) hozzáadásával 15, 30 vagy 45 percig 37 °C-on történt. Kísérleteink egy részében a GFP-k stimulálásához kalcimicint (Ca²⁺-ionofór; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) használtunk különböző koncentrációban (0,1-1 µM). Bizonyos kísérletekben a CVX és trombin aktivációt megelőzően, a trombocitákat RhoA inhibitor Rozin-hidrokloriddal (10-100 µM; Tocris Bioscience, Bristol, UK) vagy 1,3,4,5-tetrametil-2-[(2-

oxopropil)tio]imidazolium klorid (T101; 10-200 μ M; Zedira, Darmstadt, Németország) TG inhibitorral kezeltük.

4.3 *Felszíni FXIII-A és foszfatidilszerin detektálása*

4.3.1 *Áramlási citometriás analízis*

A trombocita aktiváció egyik legérzékenyebb markere a P-szelektin expresszió, így a mi esetünkben is ez alapján történt a sejtaktiváció mértékének a meghatározása. Receptor és nem-receptor mediálta módon aktivált trombocitákon a felszíni P-szelektint fikoeritrinnel (PE) konjugált anti-CD62-vel jelöltük (1:35 hígítás; Becton Dickinson, Plymouth, UK). Izotípus kontrollként PE-vel jelzett egér IgG₁-t (Becton Dickinson, Plymouth, UK) használtuk.

A felszíni FXIII-A, PS és CD41a detektálása hármass immunfluoreszcens jelölés formájában valósult meg. Az FXIII-A jelölésére az intézetünkben előállított fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált anti-humán FXIII-A ellenes antitestet (2 μ g/ml) használtuk [70]. PE-vel jelzett annexin V fehérje (1:35 hígítás; Becton Dickinson, Plymouth, UK) a felületi PS detektálására szolgált, míg a PE-cianin5-tel (PECy5) konjugált anti-CD41a (1:35 hígítás; Becton Dickinson, Plymouth, UK) antitest a felületi CD41a-val (GPIIb/IIIa komplex) reagál. Ebben az esetben FITC-el jelzett egér IgG_{2a} (Becton Dickinson, Plymouth, UK) szolgált izotípus kontrollként. A GFP és a mikropartikulák, valamint az antitestek és az aktiváló ágensek együttesen voltak jelen, majd az 1.2 bekezdésben jelzett inkubációs idők letelte után 12-szeresére hígítottuk ki a mintákat annexin V kötő pufferrel (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH 7,4; Becton Dickinson, Plymouth, UK). A mérést Beckman Coulter FC500 típusú áramlási citométeren végeztük (Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA, $\lambda_{\text{excitáció}} = 488$ nm, fluoreszcens csatornák: $\lambda_{\text{emisszió}} = 525/40$ FITC esetén, $\lambda_{\text{emisszió}} = 675/30$ PE esetén, $\lambda_{\text{emisszió}} = 695/30$ PECy5 esetén), az eredmények értékeléséhez pedig CXP analízis programot (Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA) használtunk. Trombociták kapuzása CD41a pozitivitásuknak megfelelően történt, míg az aggregátumok kizárása az előre és az oldalra szórt fény alapján. Trombocita eredetű mikropartikulának a CD41a pozitív és 1 μ m-nél kisebb eseményeket tekintettük. A méretkalibráció 0,6, 1,1 és 3 μ m nagyságú referencia gyöngyök (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) segítségével történt. Az eredményeket az FXIII-A pozitív vérlemezkék és mikropartikulák %-os arányában adtuk meg.

4.3.2 *Immunfluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok*

Mikroszkópos kísérleteinkhez GFP-k egy részét 2 mM CaCl_2 -dal és 0,1% BSA-val előzetesen kiegészített, módosított HEPES pufferben inkubáltuk, másik részét pedig 125 ng/ml CVX + 0,5 U/ml trombinnal vagy 0,7 μM kalcimicinnel aktiváltuk 37 °C-on, 15 percig. Ezt követően a mintákat a sejt aktiváció leállítása érdekében 10-szeresére hígítottuk.

A vérlemezkéket és az aktiváció során képződött mikropartikulákat az intézetünkben előállított nyúl anti-humán FXIII-A (1:200 hígítás) [107] és egér anti-humán CD41a (1:25 hígítás; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ellenes antitestekkel, illetve Alexa-fluor 568-al konjugált annexin V fehérjével (1:20 hígítás; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) jelöltük 60 percig szobahőmérsékleten, sötétben. Ezt követően a trombocitákat és a vezikulákat üveg tárgylemezekre immobilizáltuk (4×10^4 sejt/lemez) 72 g-n, 4 percig centrifugálva a mintákat Cytospin 3 citocentrifuga (Shandon, Pittsburg, UK) segítségével, majd hagytuk megszáradni. Minták egy részét acetonnal fixáltuk 15 percig permeabilizálás céljából, majd BSA-val blokkoltunk további 15 percig. Immun jelölés vizualizálásának érdekében DyLight 405-tel konjugált kecske anti-egér (1:100 hígítás; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) és DyLight 488-al konjugált ló anti-nyúl (1:100 hígítás; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) másodlagos antitestekkel inkubáltuk a mintákat 45 percig szobahőmérsékleten, sötétben. Végül a lemezeket mostuk és Vectashield® kiegészítéssel ellátott médiummal (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) fedtük. Mosási lépéseknél és az antitestek hígításához foszfáttal pufferolt sóoldatot (PBS) használtunk. A képeket Plan-Apokromát 63x/1.40 olajimmerziós objektívvel ellátott ZEISS LSM 700 típusú konfokális mikroszkóppal (Zeiss, Oberkochen, Németország) rögzítettük és Zen programmal analizáltuk.

4.3.3 *Elektronmikroszkópos vizsgálatok*

GFP előkészítése az immunfluoreszcens mikroszkópos vizsgálatoknál leírtakkal megegyező módon történt. Egyenlő mennyiségű aktivált vagy nem aktivált GFP-t óvatosan összekevertünk 0,01 M-os PBS-ben oldott 8%-os paraformaldehiddel és egy éjszakán át 4 °C-on tároltuk. Az elegyből 5 μl -t vittünk fel szénfilmmel bevont 200 mesh nikkel rácra (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), majd 10 percet vártunk, hogy a vérlemezkék és az extracelluláris vezikulák leülepedjenek a rác felszínére. A felesleges folyadékot szűrőpapírral leitattuk, a rácokat mostuk és 0,01 M-os PBS-ben oldott 1%-os ovalbumint pipettáztunk a rácokra, s az így kezelt mintákat további 30 percig inkubáltuk. A vérlemezkéket és a

mikropartikulákat nyúl anti-FXIII-A (1:20 hígítás) és egér anti-CD41a (1:20 hígítás) antitestekkel jelöltük 90 percig. Többszöri mosást követően, a mintákat 15 nm nagyságú arany szemcsékkel konjugált kecske anti-nyúl IgG-vel (1:20 hígítás; BBI Solutions, Cardiff, UK) és 10 nm nagyságú szemcsékkel konjugált kecske anti-egér IgG-vel (1:20 hígítás; BBI Solutions, Cardiff, UK) reagáltattuk 120 percig. Mind az elsődleges, mind a másodlagos antitestet 1%-os normál kecske szérumot (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) tartalmazó, 0,01 M-os PBS-sel hígítottuk. Az inkubációk szobahőmérsékleten mentek végbe. Újbóli mosásokat követően, a mintákat 30 percig uranil-acetáttal (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) és 5 percig ólom-citráttal (VWR International Ltd., Radnor, PA, USA) festettük. A vérlemezkéket és az extracelluláris vezikulákat JEOL 1010 transzmissziós elektronmikroszkóppal (JEOL, Tokyo, Japán) vizsgáltuk, míg a felvételeket Olympus Valeta CCD kamera segítségével készítettük.

4.4 Ca^{2+} -ionofórral, kalcimicinnel indukált trombocita aggregáció

2 mM $CaCl_2$ -ot és 0,1% BSA-t tartalmazó HEPES pufferben lévő GFP-t stimuláltunk különböző koncentrációjú kalcimicinnel (0,1-1 μ M). Az aggregáció mértékét Chrono-Log 700 lumiaggregométerrel (Chrono-Log Corp., Havertown, PA, USA) detektáltuk. Negatív kontroll esetében az aktiváló ágenszt HEPES pufferrel helyettesítettük.

4.5 Intracelluláris Ca^{2+} szint meghatározása

Első lépésben a trombocitaszámot 30 000 sejt/ μ l-re állítottuk HEPES- Ca^{2+} pufferrel (2 mM $CaCl_2$) és Ca^{2+} érzékeny, 3 mM Fluo-4-acetoxi-metilészter (Fluo-4-AM; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) festékkel töltöttük fel a sejteket. Óvatosan szuszpendáltuk a mintákat és 15 percig, szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk. Ezt követően PECy5-tel konjugált anti-CD41a-val (1:20 hígítás) jelöltük a trombocitákat további 15 percig, majd 6 000 sejt/ μ l-re állítottuk a trombocitaszámot szintén HEPES- Ca^{2+} pufferrel. Az intracelluláris Ca^{2+} szintek követése Novocyt 3000 RYB áramlási citométerrel (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; $\lambda_{excitáció} = 488$ nm, fluoreszcens csatornák: $\lambda_{emisszió} = 530/30$ nm Fluo-4-AM esetén, $\lambda_{emisszió} = 660/20$ nm PECy5 esetén) történt. Alapvonal meghatározásának céljából először 60 másodpercig gyűjtöttük az eseményeket, majd megszakítottuk a mérést és hozzáadtuk a sejtekhez az aktiváló ágenseket: 125 ng/ml CVX + 0,5 U/ml trombin elegyét vagy

0,7 μM kalcimicint, és a Ca^{2+} szint változását legalább 7,5 percig követtük. Az alapvonal és az azt követő esemény gyűjtése között, 91 sec technikai időzés volt. Az eredmények kiértékeléséhez FlowJo programot (Becton Dickinson, Plymouth, UK) használtunk.

4.6 Makrofágok tenyésztése és habos sejtekké való transzformálása

Az egészséges önkéntesektől származó, a monocitákat is tartalmazó határréteg preparátumokat, úgynevezett „buffy coat”-okat a Debreceni Regionális Vérellátó Központtól igényeltük. Monocita szeparálás céljából a buffy coat-ot 5 mM EDTA-val kiegészített PBS-sel kétszeresére hígítottuk. 30 ml sejtszuszpenziót óvatosan 15 ml Histopaque-1077® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oldatra rétegeztünk és centrifugáltuk 400 g fordulatszámon, 30 percig, 25 °C-on. A sűrűség alapú gradiens centrifugálást követően összegyűjtöttük a Ficoll réteg fölött lévő perifériás mononukleáris sejteket, majd kétszer mostuk PBS-EDTA-val. Monocitákat egy negatív szelekción alapuló, mágneses izolálás (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Németország) révén nyertük, melynek kivitelezése a gyártó által meghatározott módon történt. Az izolált sejteket (10^6 sejt/ml sűrűséggel) 2 mM L-glutamint és 25 mM HEPES-t tartalmazó RPMI 1640 médium (Life Technologies, Waltham, MA, USA), 10 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin (Krka, d. d., Novo mesto, Szlovénia), 10% főtális borjú szérum (FBS; Life Technologies, Grand Island, NY, USA) jelenlétében, 50 ng/ml granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) hozzáadásával differenciáltattuk makrofágokká. Ezt követően a makrofágok habos sejtekké való transzformálása céljából 50 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL (Life Technologies, Eugene, OR, USA) adtunk a sejtekhez. Mindkét esetben 3 napig inkubáltuk a sejteket 37 °C-on, 5% CO_2 tartalmú termosztátban. Ezen sejtszuszpenzióban vizsgáltuk a cFXIII mennyiségét enzimhez kapcsolt immunoszorbens technikával (ELISA) és Western blot módszerrel. A tenyésztés során teflonbevonatú edényekkel dolgoztunk, hogy megakadályozzuk a sejtek felszínhez való kitapadását. A monociták izolálása és a sejtek tenyésztése steril körülmények között történt.

4.7 Makrofág eredetű habos sejtek immunfluoreszcens analízise

Immunfluoreszcens vizsgálatokhoz kezeletlen felületű, 8 cellára osztott Lab-Tek™ tárgylemezen (Nunc™, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) differenciáltattuk a sejteket 5×10^5 sejt/cella sűrűséggel. RPMI 1640 médium eltávolítása után háromszor mostuk

a sejteket PBS-sel. A letapadt makrofágokat és habos sejteket 3,7%-os paraformaldehiddel fixáltuk 30 percig, melyet egy újbóli PBS mosás követett. A nem-specifikus IgG kötődést normál humán szérum (EMD Millipore Corporation, Burlington, MA, USA) használatával akadályoztuk meg. A 15 perces blokkolási idő leteltével a sejteket nyúl anti-humán FXIII-A (1:200 hígítás) ellenes antitesttel 60 percig jelöltük, majd DyLight 488-al konjugált kecske anti-nyúl másodlagos antitesttel (1:100 hígítás; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 45 percig. Következő lépésben PBS mosással távolítottuk el a nem kötődött antitesteket és a lipid felhalmozódás specifikus markereként, olajvörös O (ORO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) festék 6:4 arányban desztillált vízzel hígított oldatával 15 percig inkubáltuk a mintákat. Végül desztillált vízzel történő mosás után 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) festéket tartalmazó Vectashield® fedő médiummal (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) fedtük a mintákat, melynek köszönhetően a sejtmagok is láthatóvá válnak. A habos sejteket szolid fázisú dióda lézerekkel ellátott, ZEISS LSM 700 típusú konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A fluoreszcens szignálok gerjesztése szelektív dióda lézer excitációs hullámhosszokkal (DAPI esetén: 405 nm, FITC esetén: 488 nm, olajvörös O esetén: 555 nm) történt, a kibocsátott fény detektálása változtatható hullámhosszú dikroikus nyalábosztó tükrök segítségével zajlott.

4.8 *Enzimatikusan módosított LDL készítése*

Bhakdi és munkatársai által leírt módszer [108] szerint - kisebb változtatásokkal - végeztük az LDL enzimátikus módosítását. Humán natív LDL-t (4 mg/ml) ultracentrifugálással nyertük egészséges önkéntesek plazma mintáiból. Ezután a natív LDL koncentrációját 2 mg/ml-re állítottuk módosított HEPES pufferrel (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,0). Az enzimátikus módosítás első lépéseként az LDL-t 4 µg/ml szarvasmarha hasnyálmirigy eredetű tripszinnel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) emésztettük 37 °C-os inkubátorban, 6 órán keresztül, majd további 6 órán át 24 µg/ml *Pseudomonas* sp. eredetű koleszterin-észterázzal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Második lépésben 4 µg/ml tripszinnel és 36 µg/ml koleszterin-észterázzal együttesen kezeltük az LDL-t 37 °C-on, 24 óráig. Végül, 10 µg/ml szója tripszin inhibitorral (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) gátoltuk a tripszin aktivitását 37 °C-on, 1 órán keresztül és az enzimátikusan módosított LDL-t (eLDL) PBS-sel szemben dializáltuk.

4.9 Humán aorta simaizom sejtek habos sejtekké való transzformálása

A kísérletekhez szükséges humán aorta simaizom sejtek (HAoSMC) az American Type Culture Collection cégtől (ATCC; Manassas, VA, USA) kerültek beszerzésre. A naív sejteket (donor: 38 éves, egészséges férfi) 1 mM nátrium-piruvátot, 2 mM L-glutamint, 10% FBS-t és 1% gentamicint tartalmazó Dulbecco-féle módosított sejtenyészítő médiumban (DMEM; Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) vettük fel és T75 flaskában tenyésztettük 37 °C-os, 5% CO₂ tartalmú termosztátban. Sejtek passzálására 90%-os konfluencia esetén került sor. Elérve a 8 passzázs számot, a HAoSMC-ket kezeletlen felületű, 4 cellára osztott Lab-Tek™ tárgylemezen (Nunc™, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) tenyésztettük további 24 óráig az előzőkkel azonos körülmények között. Az inkubációs idő leteltével a lemezeket háromszor mostuk PBS-sel és az adherens simaizom sejtekhez 75 µg/ml koncentrációjú eLDL-t vagy natív LDL-t (negatív kontroll) adtunk DMEM médium jelenlétében 24 óráig.

4.10 Humán aorta simaizom sejt eredetű habos sejtek immunfluoreszcens vizsgálata

A 24 órás eLDL kezelést követően, eltávolítottuk a DMEM médiumot és a lemezeket háromszor mostuk PBS-sel. Fixáláshoz metanol és ecetsav 58:2 arányú keverékét használtuk 15 percig. Újbóli mosás után normál humán szérummal blokkoltunk 15 percig. Sejteket nyúl anti-humán FXIII-A (1:200 hígítás) és egér anti-humán alfa-simaizom aktin (1:250 hígítás; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ellenes antitestekkel jelöltük 60 percig. PBS-sel való mosást követően, DyLight 488-al konjugált kecske anti-nyúl (1:100 hígítás) vagy DyLight 488-al konjugált kecske anti-egér (1:100 hígítás) másodlagos antitestekkel inkubáltuk a mintákat 45 percig, sötétben. A simaizom sejtek által felvett eLDL-t ORO festéssel (15 perc) mutattuk ki, majd a feleslegben lévő festéket desztillált vízzel távolítottuk el. Végül, sejtmag jelölésre alkalmas DAPI festéket tartalmazó Vectashield® fedő médiummal fedtük a mintákat és ZEISS LSM 700 típusú konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a sejtek cFXIII és zsír tartalmát.

4.11 Makrofág eredetű habos sejtek FXIII-A tartalmának meghatározása ELISA technikával

Szuszpenzióban lévő makrofágok és a makrofág eredetű habos sejt kultúrákból minden nap mintát vettünk, melyeket 200 g-n, 10 percig centrifugáltunk 25 °C-on. A lecentrifugált sejteket 1% Triton, 120 µg/ml 2-metil-4-izotiazolin-3-on (MIT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1x SIGMAFAST™ proteáz inhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és PBS elegyében vettük fel. FXIII-A antigén koncentrációjának meghatározása az intézetünkben kifejlesztett szendvics ELISA módszerrel történt [70]. Az eredményeket 10⁶ sejtszámra korrigáltuk. A statisztikai értékelést követően kapott átlag értékek 5 különböző kísérlet eredményét tükrözi.

4.12 Western blot

A Western blot kivitelezéséhez szintén minden nap vettünk mintát a sejtszuszpenziókból az ELISA meghatározásokhoz hasonlóan. Ebben az esetben viszont a sejteket nátrium dodecil szulfát poliakrilamid gélelektroforetikus (SDS-PAGE) mintapufferben (62,5 mM Tris, 2% SDS, 8 M urea, pH 6,8) vettük fel és forralásban lévő vízben denaturáltuk 5 percig. A mintákat 5%-os 2-merkaptotanol redukáló szerrel egészítettük ki. Ezután a lizátumokból - sejtszámoknak megfelelően - egyenlő mennyiségű mintát felhasználva, a fehérjéket SDS-PAGE segítségével választottuk el, majd a mintákat elektroforetikus úton polivinilidén fluorid membránra vittük át. A fehérjéket tisztított birka anti-humán FXIII-A ellenes antitesttel (1:3000 hígítás; Affinity Biologicals, Ancaster, Hamilton, ON, Kanada), biotinált nyúl anti-birka IgG-vel (1:1000 hígítás; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) és avidin-biotin komplexszel inkubáltuk. Az immunreakciót fokozott kemilumineszcens (ECL) reagenssel (ECL Plus+, Amersham, Little Chalfont, UK) tettük láthatóvá. Az eredményeket a mintákkal együtt felvitt rekombináns FXIII-A-hoz (100 ng; Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dánia) hasonlítottuk. Az FXIII-A azonosításának érdekében Precision Plus Protein Standards, Dual Color molekulásúly markert (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) használtunk.

4.13 Ateroszklerotikus plakkok vizsgálata immunhisztokémiával

A szöveti mintákat hagyományos transzluminális angioplasztika beavatkozás révén nyertük olyan betegektől (7 fő), akik tünetekkel járó arteria carotist érintő ateroszklerózisban

szenvedtek. A mintákat 4%-os formaldehiddel fixáltuk és paraffinba ágyztuk. A carotis plakkok hisztológiai tulajdonságainak meghatározásához 5 µm-es metszeteket festettünk hematoxilín-eozin elegyével. American Heart Association által megfogalmazott kritérium rendszer alapján [99] klinikailag releváns IV-es típusú plakkok („aterómák”) kerültek kiválasztásra. Makrofágok azonosításához egér anti-CD68 monoklonális antitestet (Immunologic, Duiven, Hollandia) használtunk. A cellulárisan és extracellulárisan elhelyezkedő FXIII-A kimutatása nyúl anti-FXIII-A antitest (Thermo Fisher Scientific, Ferment, CA, USA) segítségével történt. Ezzel párhuzamosan vizsgáltuk az Nε-(γ-L-glutamil)-L-lizil izopeptid kötések jelenlétét a Covalab (Villeurbanne, Franciaország) cég által forgalmazott, a kötéssel reagáló antitesttel. Másodlagos antitestként az EnVision FLEX/HRP (Agilent, Dako Santa Clara, CA, USA) szolgált, melyet 3,3'-diaminobenzidín (DAB) kromogén szubsztráttal kombináltunk. Negatív kontroll esetében az elsődleges antitestet normál humán szérummal helyettesítettük.

4.14 Lipidek és FXIII-A pozitív sejtek kimutatása ateroszklerotikus plakkokban

A neutrális lipidek és a citoplazmatikus FXIII-A együttes jelenlétének kimutatásához fagyasztott metszeteket készítettünk. Ebben az esetben az anti-FXIII-A elleni elsődleges antitestet ORO festéssel kombinálva alkalmaztuk. Röviden, izopropil-alkohollal való fixálás és endogén peroxidáz blokkolása után, nyúl anti-FXIII-A ellenes poliklonális antitesttel inkubáltuk együtt a metszeteket 56 °C-os termosztátban egy éjszakán át. Többszöri mosás után másodlagos antitesttel (EnVision FLEX/HRP) jelöltük a mintákat 30 percig. Ezt követően a tárgylemezeket 5 percre ORO oldatba merítettük és csapvízzel mostuk. A színreakció kiváltásához PolyDetector HRP Green-t (Bio SB, Santa Barbara, CA, USA) használtunk a gyártó által meghatározott módon.

4.15 Statisztikai analízis

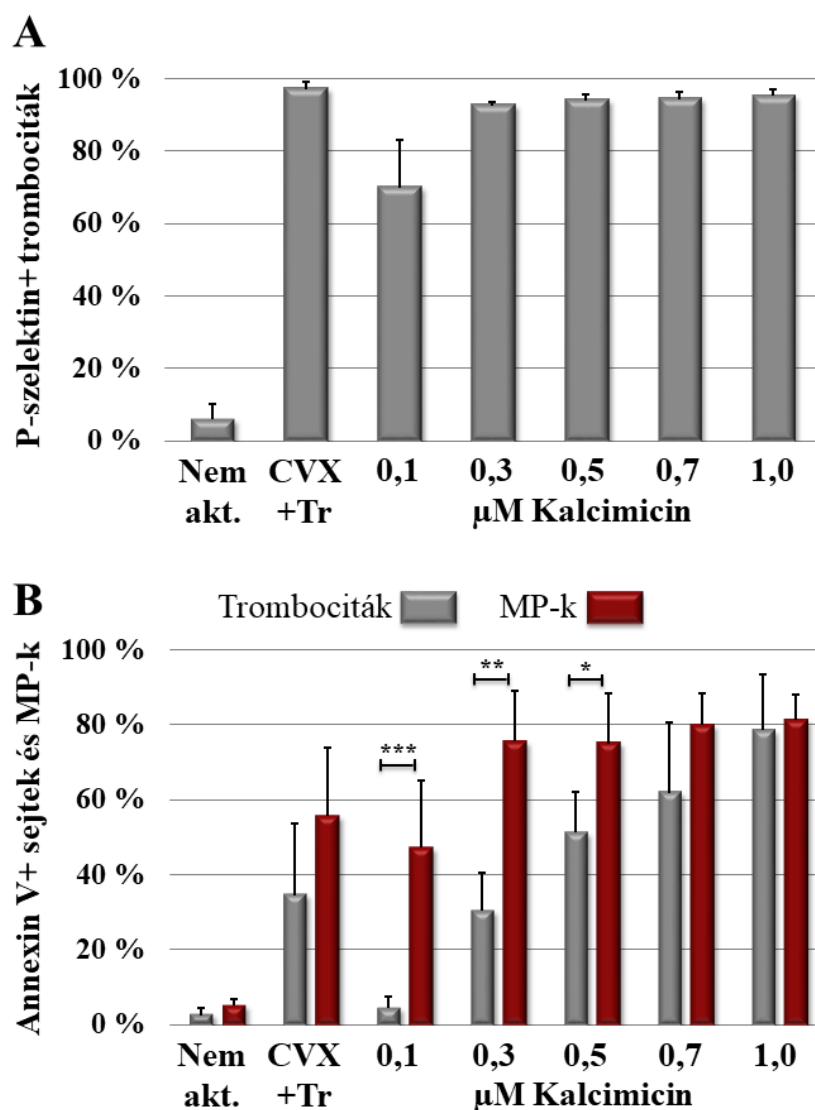
Eredményeink statisztikai elemzésére GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Prism Inc., La Jolla, CA, USA) szoftvert használtunk. Az adatok normalitásának meghatározása Kolmogorov-Smirnov teszttel történt. Az áramlási citométerrel meghatározott FXIII-A pozitív trombociták és a trombocita eredetű mikropartikulák összehasonlításához, illetve a különböző aktiváló ágensek hatásának vizsgálatához – normalitástól függően - nem-párosított t-próbát vagy Mann-

Whitney tesztet alkalmaztunk. A makrofágok és a makrofág eredetű habos sejtek ELISA technikával meghatározott cFXIII tartalmának összehasonlítása párosított t-próbával történt. Amennyiben a p érték nem haladta meg a 0,05-t az eredményeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

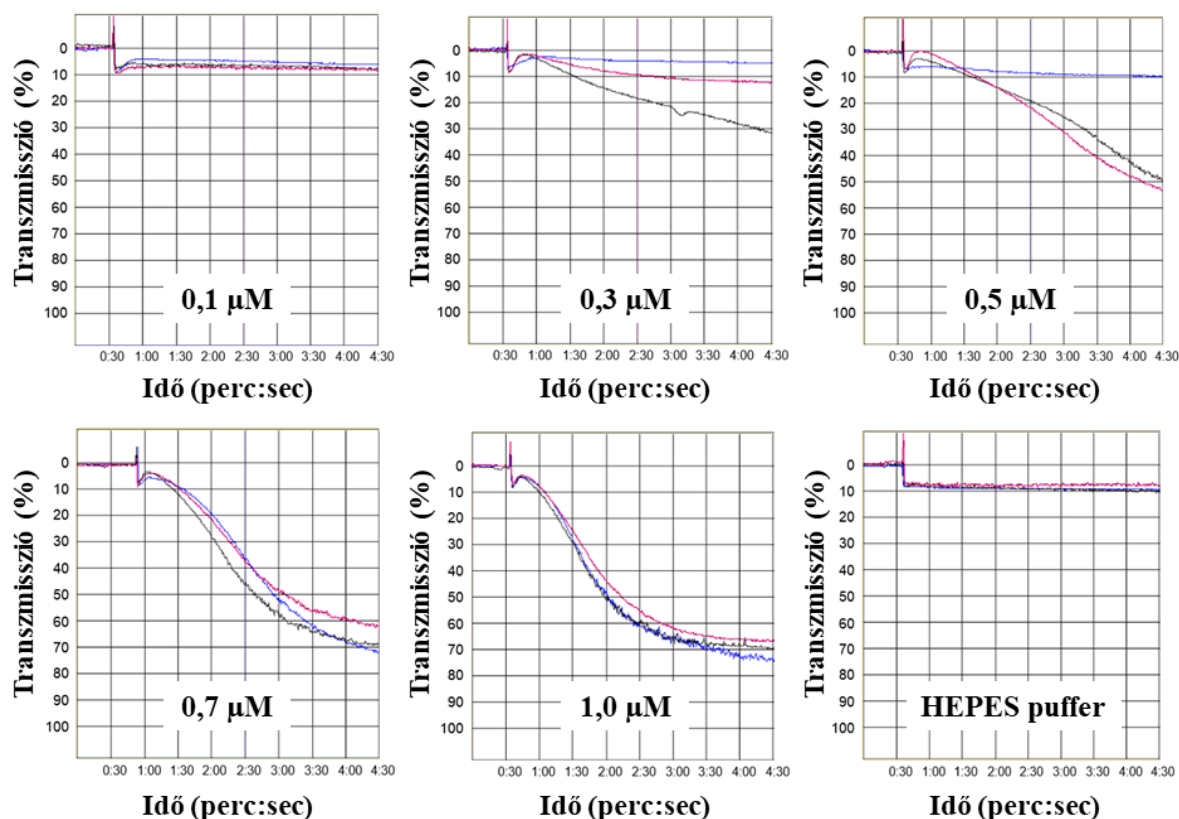
5. EREDMÉNYEK

5.1 *Aktivációs markerek felszíni megjelenése trombocita stimulációt követően*

Áramlási citometriás vizsgálatok azt mutatták, hogy mind a CVX+trombin által kiváltott receptor mediálta vérlemezke aktiváció, mind a Ca^{2+} -ionofór indukálta nem-receptor mediálta aktiváció az α -granuláris P-szelektin felszíni expozícióját eredményezte (4.A ábra). Már 0,3 μM kalcimicin elegendő volt ahhoz, hogy a trombociták több mint 90%-ánál megjelenjen a felszínen a P-szelektin, ami hasonló a CVX+trombin által kiváltott stimulációhoz. Az anionos foszfolipid, PS aktivált trombociták felszínén való megjelenését az annexin V kötődésével határoztuk meg. Kimutattuk a PS transzpozícióját a CVX+trombin aktiválta vérlemezék egyharmadánál és a 0,7 μM kalcimicinnel aktivált sejtek 61%-ánál (4.B ábra). Alacsony kalcimicin koncentráció esetén a PS pozitív mikropartikulák aránya szignifikánsan magasabb volt, mint a PS pozitív trombocitáké. Trombocita aggregáció vizsgálatánál megfigyeltük, hogy a közel maximális aggregáció kiváltásához magasabb kalcimicin koncentrációra (0,7 μM) volt szükség (5. ábra).



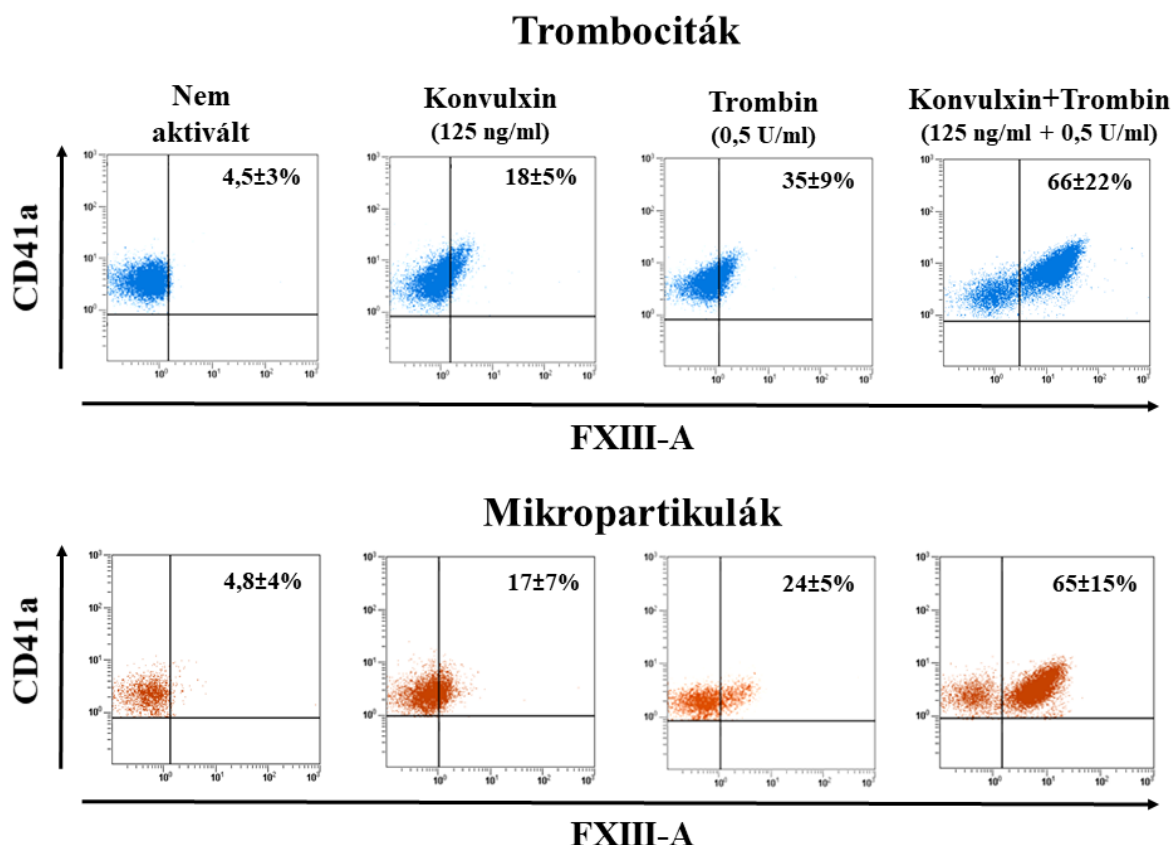
4. ábra Az aktivációs markerek receptor és nem-receptor mediálta expozíciója trombociták felszínén. Gél-filtrált trombocitákat konvulxin+trombin (CVX+Tr; receptor mediálta aktiváció) keverékével vagy különböző koncentrációjú kalcimicinnel (nem-receptor mediálta aktiváció) aktiváltuk, a felszínen megjelenő aktivációs markereket pedig áramlási citometriával detektáltuk. Az ábrán a nem aktivált vérlemezkével (Nem akt.) nyert eredményeket is feltüntettük. **(A)** P-szelektin az aktivált vérlemezék felületén, **(B)** foszfatidil-szerin expozíciója aktivált vérlemezkéknél és trombocita eredetű mikropartikuláknál (MP) annexin V kötődése alapján. Az oszlopok és a hibasávok öt különböző donor eredményeiből számított átlag $\pm$ SD értékeknek felelnek meg. A vérlemezék és a mikropartikulák közötti szignifikáns különbségeket az alábbi módon jelöltük: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



5. ábra Ca^{2+} -ionofór (kalcimicin) indukálta gél-filtrált trombocita aggregáció. A három különböző színű aggregációs görbe különböző egyénektől származó vérlemezkékhez tartozik. A kalcimicin koncentrációk (0,1 – 1,0 μM) félkövéren vannak szedve. Negatív kontrollként az aktiváló ágenszt helyettesítő, HEPES pufferrel kezelt mintát használtuk.

5.2 A cFXIII transzpozíciója a receptor mediálta útvonalon aktivált trombociták és trombocita eredetű mikropartikulák esetén

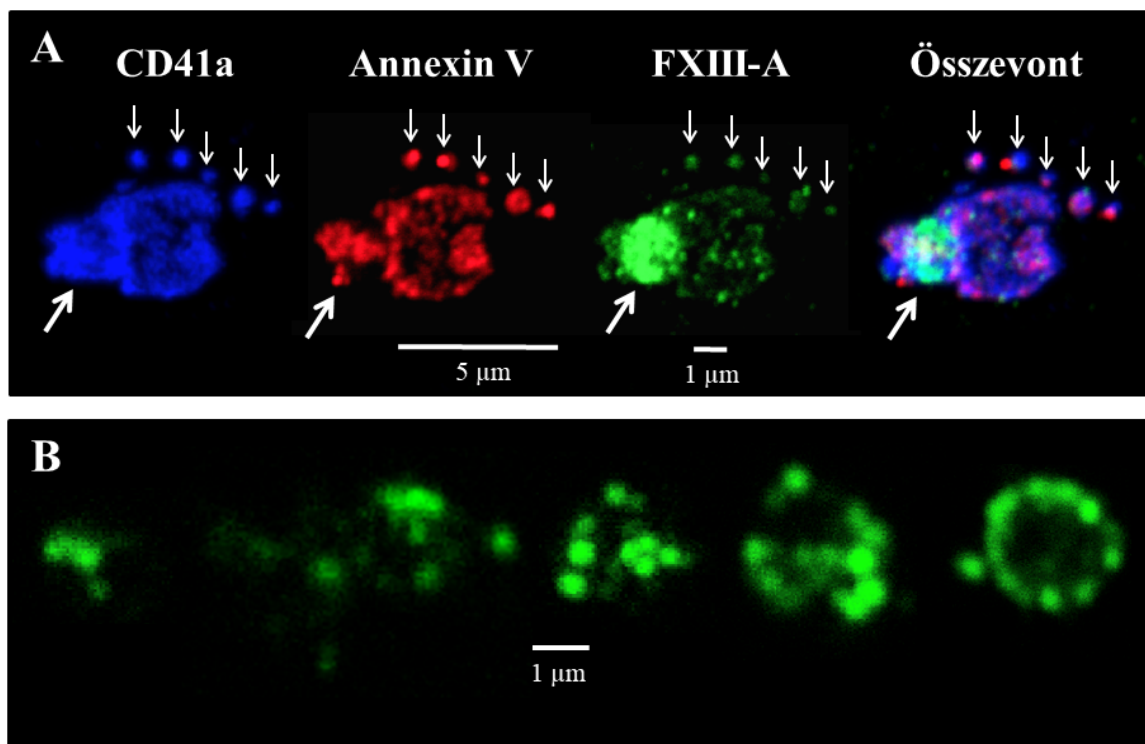
Áramlási citometriával végzett kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy a CVX és a trombin önmagukban is képesek a cFXIII transzpozíciójának kiváltására aktivált vérlemezkék és az aktiváció során képződött extracelluláris vezikulák egy részénél (6. ábra). Azonban ahhoz, hogy egy robusztus hatást tudjunk kiváltani a GPVI/FcR γ és a PAR1+PAR4 receptorokon keresztül történő kettős stimulusra volt szükség. Az öt különböző donortól származó minták eredményeiből számított átlag értékeket a felhőképeken úgynevezett „dot-plot”-okon is feltüntettük. Eredményeink továbbá arra engednek következtetni, hogy csak a CVX+trombin együttese tudott egy elkülönülő aktivált vérlemezke populációt létrehozni. Ebben az esetben az aktivált trombociták és a mikropartikulák több mint 60%-a mutatott FXIII-A pozitivitást. Ehhez hasonló felületi eloszlást figyeltek meg az α -granulumokban lévő V-ös faktor esetében is [109].



6. ábra XIII-as faktor A alegységének (FXIII-A) felszíni megjelenése receptor mediálta útvonalon keresztül aktivált trombociták és képződött mikropartikulák esetén. A vérlemezkéket minden esetben 15 percig aktiváltuk és CD41a antigén alapján azonosítottuk a sejteket, illetve a trombocita eredetű vezikulákat. A mikropartikula kapuba az 1 μ m-nél kisebb események kerültek. A felső sor demonstrálja a trombocitákhoz tartozó eredményeket, míg az alsó sorban a mikropartikulák esetén kapott eredményeket tüntettük fel. A reprezentatív dot-plot-ok jobb felső sarkában lévő adatok 5 különböző egyéntől származó mintákkal végzett kísérletek alapján számított átlag $\pm$ SD értékek felelnek meg. A trombin aktiváció kivételével, nem volt szignifikáns különbség a trombociták és a mikropartikulák között FXIII-A pozitivitás tekintetében.

A CD41a, annexin V és cFXIII CVX+trombin-nal stimulált vérlemezkéken végzett hármass immunfluoreszcens festés eredménye a 7.A ábrán látható. A trombocita marker CD41a sejtek teljes felületén kimutatható volt. A membránok felületén megjelenő PS erős festődést mutatott, mely összhangban van a prokoaguláns vérlemezke képződéssel. A PS az aktivált trombocitákon körkörös a membránra, illetve a nyúlvány területére lokalizálódott. A rendkívül intenzív festődést mutató cFXIII döntően a sejtől kiálló sapkaszerű struktúrában

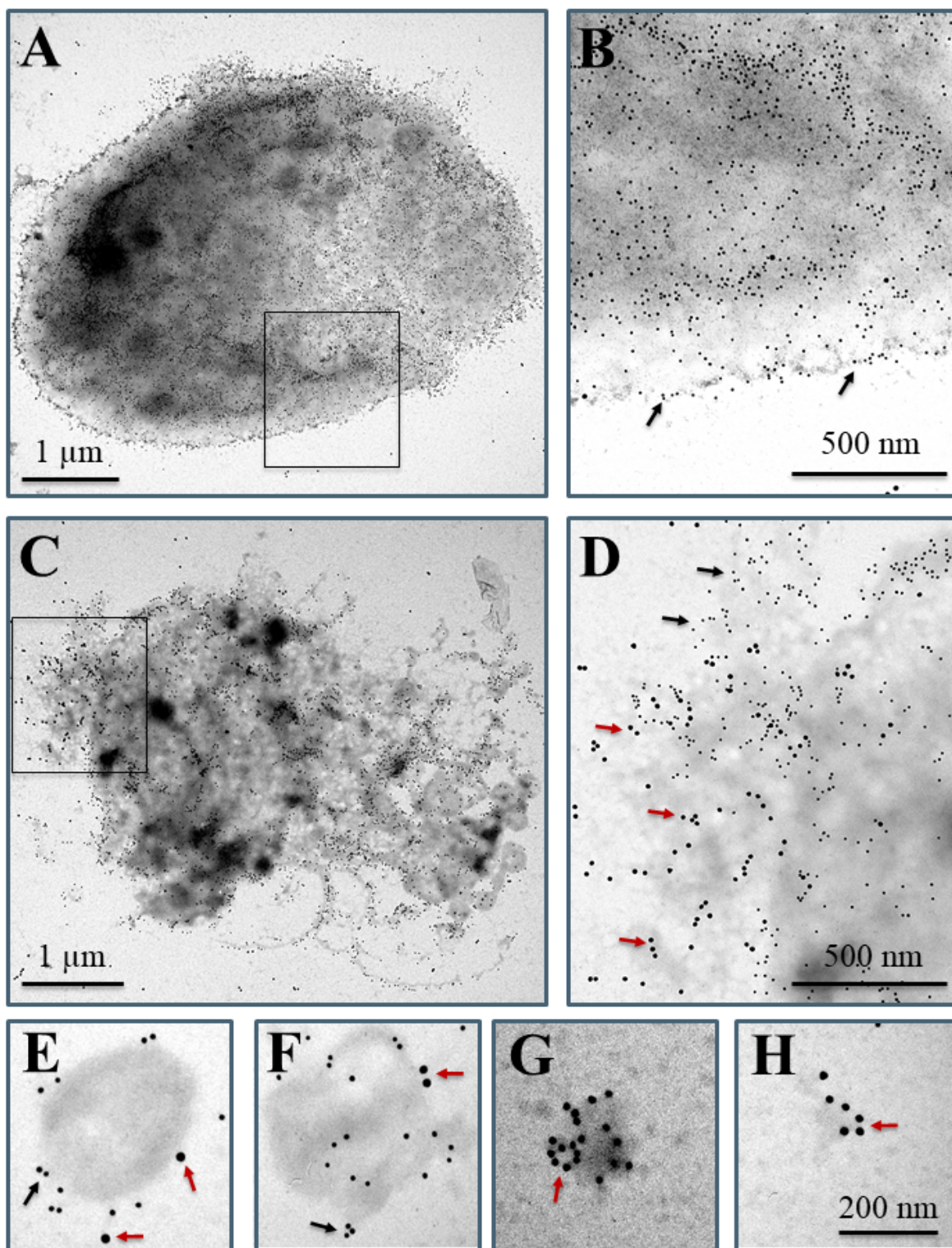
koncentrálódott. Az ábrán körülbelül 700-900 nm méretű, CD41a és PS pozitív mikropartikulák is megfigyelhetők. Az áramlási citometriás adatokkal összhangban ezek a vezikulák FXIII-A-ra is felületi festődést mutattak. Az immunfluoreszcens mikroszkópok felbontó képessége nem elegendő a kisebb méretű vezikulák megfelelő detektálására, ennek ellenére a citocentrifugálással készített minták esetében akár 2 μm átmérőjű összezsapzódott mikropartikulákat is tudtunk kimutatni, amelyek intenzíven festődtek FXIII-A-ra (7.B ábra).



7. ábra Receptor mediálta úton aktivált trombociták és képződött mikropartikulák felszíni jelölése immunfluoreszcens markerekkel. **(A)** CVX+trombin aktiválta trombociták festődést mutattak CD41a-ra (kék), annexin V kötődésre (PS detektálása; piros) és a XIII-as faktor A alegységére (FXIII-A; zöld). A kis fehér nyilak jelzik a mikropartikulákat, míg a nagy fehér nyíl az aktivált trombocitán megjelenő sapkaszerű struktúrára utal. **(B)** A CVX+trombin dual agonista által kiváltott sejtaktiváció egyik következménye FXIII-A pozitív, összezsapzódott mikropartikulák. A bemutatott ábrák három különböző donor mintáján végzett kísérletek reprezentatív eredményeit reprezentálják.

Következő lépésben az FXIII-A lokalizációját nagy felbontású immun-elektronmikroszkópiával (IEM) vizsgáltuk. Az 8.A és 8.B ábrán jól látszik, hogy a nem aktivált (nyugvó) trombociták felszínén nem jelenik meg az FXIII-A, miközben intenzíven jelölődnek

a CD41a felszíni membrán markerre. A vérlemezkék CVX+trombin-al történő stimulációja azt mutatja, hogy a citoplazmában lévő FXIII-A kikerül a membrán külső oldalára (8.C és 8.D ábrák). Az immunfluoreszcens felvételekhez hasonlóan, az IEM-mel is kimutatható volt a cFXIII felhalmozódása a sapkaszerű struktúrában (8.D ábra). Különböző méretű (200 és 800 nm között) FXIII-A pozitív mikropartikulákat is sikerült detektálnunk (8.E-H ábrák). A nagyobb méretű vezikulák megőrizték membránszerkezetüket, amit a CD41a jelölés is bizonyít, de egyúttal felületi FXIII-A jelölődést is mutattak (8.E és 8.F ábrák). Érdekes továbbá megjegyeznünk, hogy a minták analízise során olyan kisebb méretű vezikulákat is detektáltunk, melyek ép membrán hiányában nem mutatnak CD41a pozitivitást, miközben erősen jelölődnek FXIII-A-ra (8.G és 8.H ábrák). Feltehetően ezek olyan extracelluláris citoplazmatikus fragmensek lehetnek, amiket kontraktilis fehérjék (pl. aktin) tartanak össze.

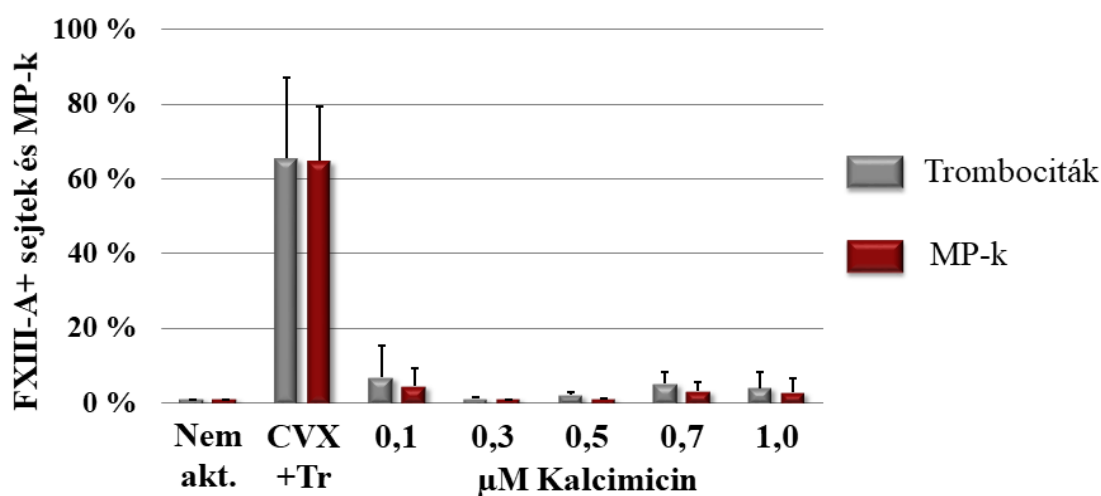
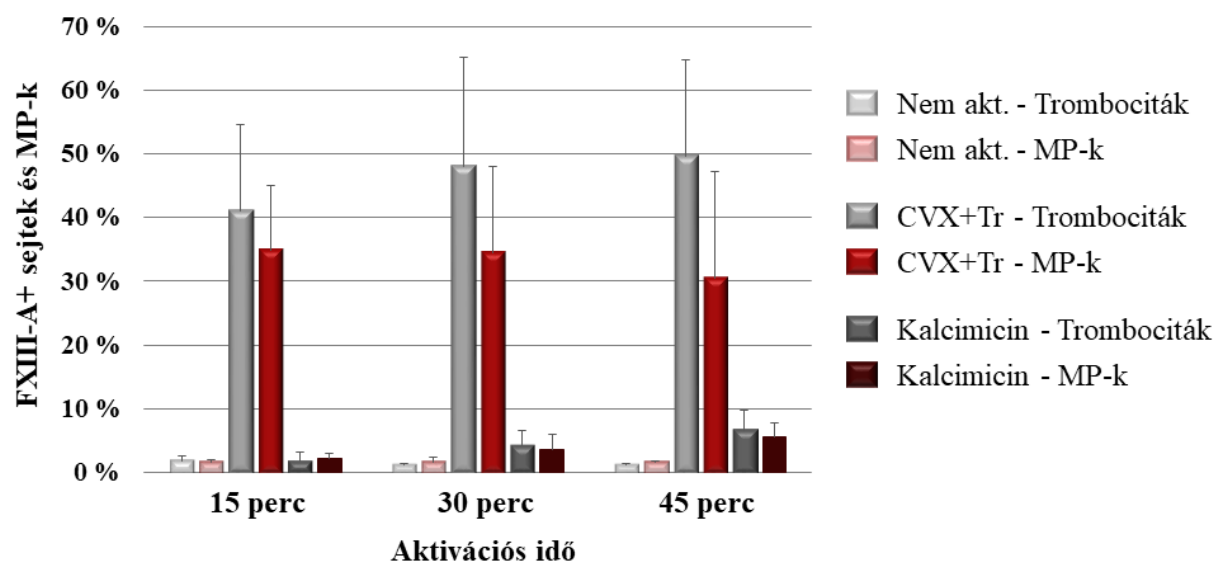


8. ábra Nyugvó és CVX+trombin-nal aktivált trombociták felszíni jelölése immunarany technikával. A CD41a antigént 10 nm-es, az FXIII-A-t 15 nm-es aranyszemcsék szemléltetik. Néhány 15 nm-es aranyszemcsét kis piros nyilakkal jelöltünk, míg a kis fekete nyilakkal néhány 10 nm-es aranyszemcsét emeltünk ki. **(A)** Nem aktivált teljes trombocita, **(B)** az A ábrarészen kiválasztott terület látható nagyobb nagyításban, **(C)** CVX+trombin-nal stimulált teljes

trombocita, **(D)** a C ábrarészen kiválasztott terület nagyobb nagyítása. Az E-H ábrák a CVX+trombin indukálta sejtaktiváció eredményeképpen képződött mikropartikulákat mutatja be. **(E, F)** Mikropartikulák legalább részben ép membránnal, **(G, H)** cFXIII pozitív vezikulák, CD41a membránjelölés nélkül. A bemutatott ábrák három különböző donor mintáján végzett kísérletek eredményeit reprezentálják.

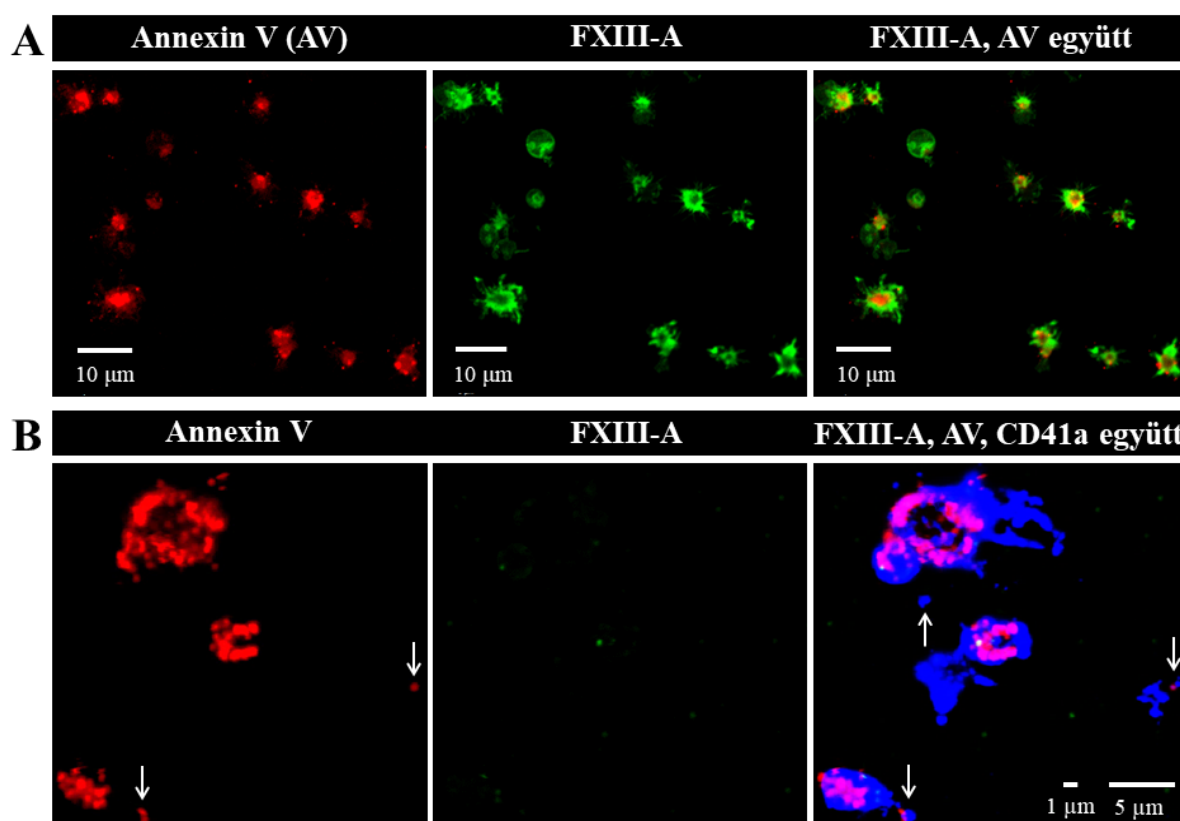
5.3 *A nem-receptor mediálta trombocita aktiváció nem indukálta a cFXIII trombociták és mikropartikulák felszínre történő transzlokációját*

A 9.A ábrán bemutatott áramlási citometriás kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a Ca^{2+} -ionofór, kalcimicin indukálta vérlemezke aktiváció, vagyis az intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentráció közvetlen emelése nem képes bekapcsolni azokat a mechanizmusokat, amelyek felelősek a cFXIII trombociták és mikropartikulák felszíni transzlokációjáért. Kísérleteinket megismételtük hosszabb aktivációs idővel, de ez sem befolyásolta lényegesen az FXIII-A pozitív események számát (9.B ábra). Még 45 perces aktiválási idő alatt is a trombocitáknak csak $6,6 \pm 3\%$ -a, mikropartikuláknak pedig $5,5 \pm 2,2\%$ -a mutatott pozitivitást felszíni FXIII-A jelölésre. Összehasonlításképpen az ábrákon a receptor mediálta aktiváció (CVX+trombin) hatását is feltüntettük.

A**B**

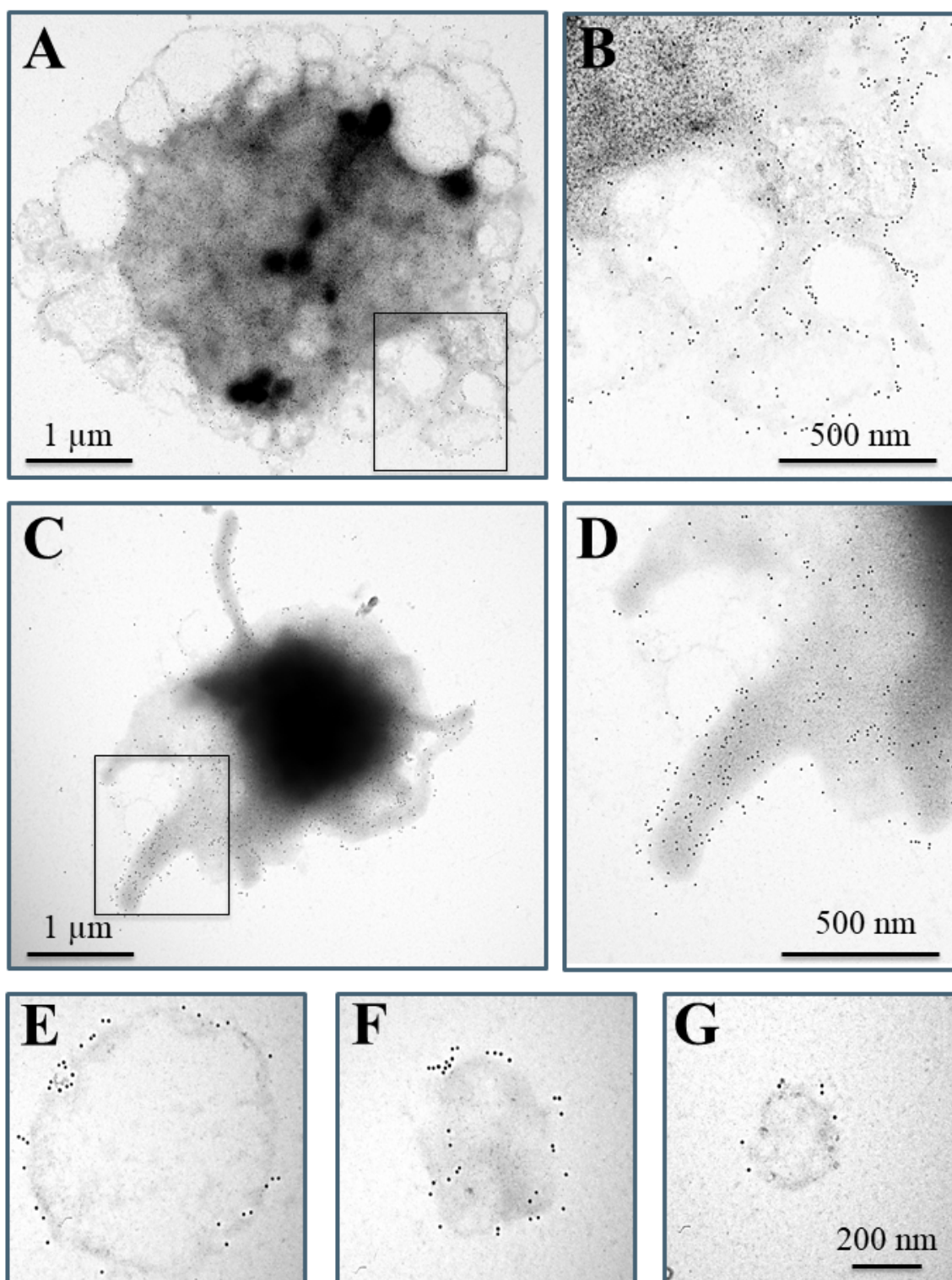
9. ábra A XIII-as faktor A alegységének (FXIII-A) transzlokációjának hiánya nem-receptor mediálta úton aktivált trombociták és mikropartikulák esetében. (A) A nem-receptor mediálta trombocita aktiváció indukálásához különböző koncentrációjú kalcimicint használtunk 15 perces aktivációs idővel. (B) Ugyanaz a kísérlet, csak a 15 perces aktivációs időt 30, illetve 45 percre növeltük és a nem aktivált trombocitákkal kapott eredményeket is feltüntettük. Összehasonlításképpen a receptor mediálta aktiváció (konvulxin+trombin; CVX+Tr) eredménye is szerepel az ábrákon. Az oszlopok és a hibasávok az (A) öt és (B) három különböző kísérlet eredményeiből számított átlag $\pm$ SD értékeket mutatják. MP-k: mikropartikulák; Nem akt.: nem aktivált vérlemezkék.

Ca^{2+} -ionofór indukálta nem-receptor mediálta aktiváción átesett vérlemezék PS és FXIII-A festődést mutattak permeabilizációt követően (10.A ábra), de az FXIII-A a sejtek citoplazmájában helyezkedik el. Ezzel szemben a nem permeabilizált trombociták nem mutattak felületi festődést FXIII-A-ra, annak ellenére, hogy PS-re és CD41a-ra intenzív festődést tapasztaltunk (10.B ábra). A trombocitákhoz hasonlóan a kalcimicinnel való stimulációt követően az immunfluoreszcens felvételeken sem találtunk FXIII-A pozitív mikropartikulákat.



10. ábra Ca^{2+} -ionofórral aktivált permeabilizált és nem permeabilizált trombociták jelölése. A vérlemezékét 0,7 μM kalcimicinnel stimuláltuk 15 percig. **(A)** A trombociták membránját aceton fixálással tettük permeabilissá és foszfatidilszerinhez kötődő annexin V fehérjével (piros) és XIII-as faktor A alegység (FXIII-A) ellenes antitesttel (zöld) jelöltük. **(B)** Nem permeabilizált trombocitákat szintén annexin V fehérjével, FXIII-A és CD41a (kék) ellenes antitestekkel reagáltattuk. A függőleges fehér nyilak a mikropartikulákat mutatják. Megjegyzendő, hogy a nem permeabilizált vérlemezék nem mutattak felszíni FXIII-A pozitivitást, szemben a permeabilizált vérlemezékkel. A bemutatott ábrák három különböző donor mintáján végzett kísérletek eredményeit reprezentálják.

Az IEM vizsgálataink során két típusú kalcimicin aktiválta vérlemezkét találtunk (11. ábra). A 11.A és 11.B ábrák két különböző nagyításban mutatnak be egy vérlemezkét a vezikula képződés folyamatában, míg a 11.C és 11.D ábrák intenzív állábképződéssel jellemezhető trombocitát demonstrálnak. Mindkét típusú aktivált trombocitán erős CD41a jelölődés volt jellemző, de FXIII-A felületi expozíciót egyik esetben sem tapasztaltunk. Ca^{2+} -ionofór különböző méretű mikropartikulákat eredményezett (11.E-G ábrák). Ebben az esetben a membrán és annak CD41a jelölése sértetlen maradt, és felszíni FXIII-A jelölés sem volt kimutatható. Megjegyzendő továbbá, hogy az általunk használt kalcimicin aktiváló ágens hatására nem képződött a CVX+trombin stimulációnál is tapasztalt, membránmentes FXIII-A pozitív mikropartikula/extracelluláris citoplazmatikus fragment.

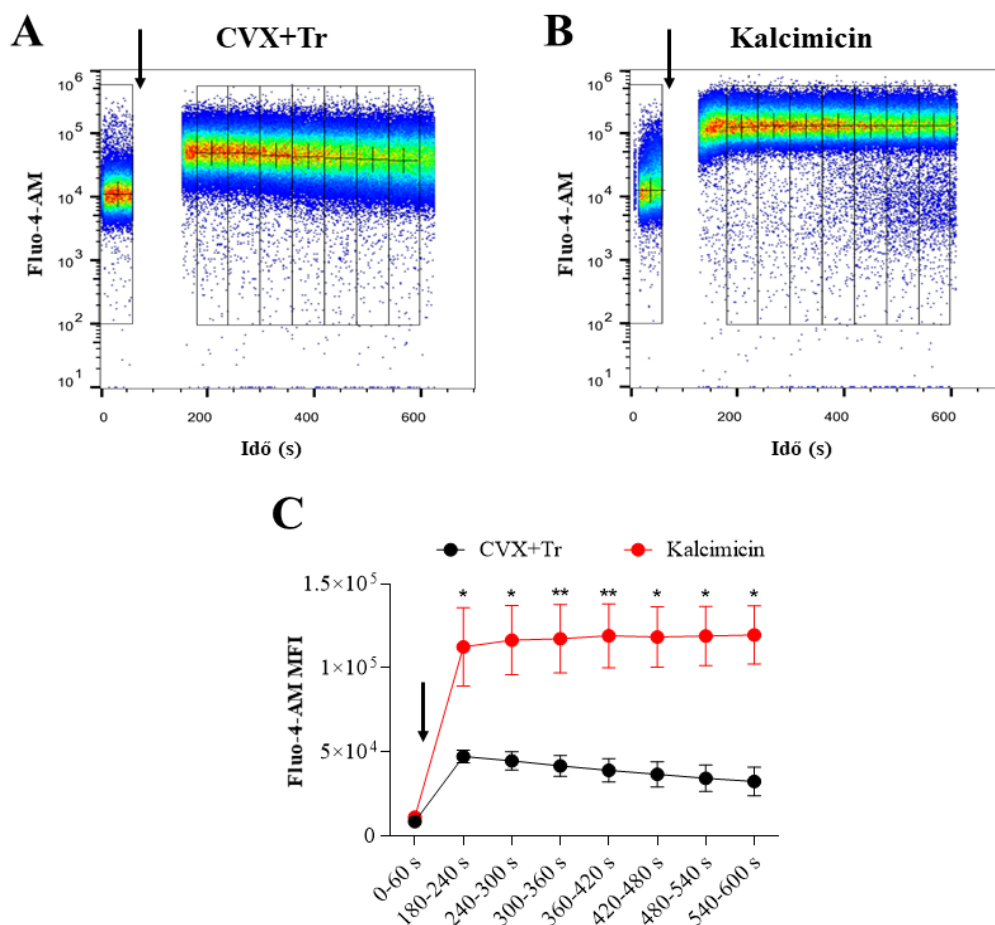


11. ábra Ca^{2+} -ionofórral aktivált trombociták felületi jelölése immunarany technikával. *A* vérlemezkéket $0,7 \mu\text{M}$ kalcimicinnel stimuláltuk. **(A-D)** Két különböző szerkezetű aktivált vérlemezkét találtunk és mind a két esetben CD41a pozitivitást (10 nm-es arany szemcsék) detektáltunk. **(A, C)** Teljes trombocita, **(B, D)** az A és C ábrarészen kiválasztott terület nagyobb nagyítása. A 15 nm nagyságú arany szemcsék hiánya az FXIII-A felszíni megjelenése hiányának felel meg. **(E-G)** FXIII-A-ra nem, de CD41a antigénre erősen jelölődő, különböző méretű

mikropartikulák. A bemutatott ábrák három különböző donor mintáján végzett kísérletek eredményeit reprezentálja.

5.4 Citoszólíkus szabad Ca^{2+} koncentráció változása trombocita aktivációt követően

A CVX+trombin és a kalcimicin kezelésnek a citoszól szabad Ca^{2+} koncentrációjára kifejtett hatását áramlási citometriával tanulmányoztuk (12.A-C ábrák). A trombocitákat Fluo-4-AM Ca^{2+} indikátorral töltöttük fel és fluoreszcens festékkel konjugált anti-CD41a antitesttel jelöltük. Utóbbi alapján történt a sejtek kapuzása is. A 12.A és a 12.B ábrák mutatják a Fluo-4-AM-hez tartozó fluoreszcens jel eloszlását az első 60 másodpercben HEPES- Ca^{2+} pufferben lévő nyugvó trombociták esetén. A mérést ezután rövid időre megszakítottuk, majd az agonisták mintákhoz való hozzáadását követően (fekete nyilak) folytattuk az események gyűjtését. A CVX+trombin elegy hozzáadásakor a Fluo-4-AM-hez tartozó fluoreszcens jel körülbelül 5-szörösére emelkedett, ami a citoszól szabad Ca^{2+} koncentrációjának emelkedését mutatja. A 12.A ábrán látható továbbá, hogy a sejtek CVX+trombin stimulusra adott válasza homogén volt, a legtöbb sejt azonnali és jelentős Ca^{2+} koncentráció növekedést mutatott. A medián fluoreszcens intenzitás (MFI) kvantitatív, 60 másodperces beosztásonként történő analízise alapján elmondható, hogy a citoszólíkus Ca^{2+} koncentráció növekedése átmeneti volt, hiszen az MFI értékek az idő függvényében csökkentek. Ugyanezt az adatgyűjtési protokollt alkalmaztuk, amikor kalcimicint használtunk aktiváló ágensként (12.B ábra). A Ca^{2+} koncentráció növekedése a CVX+trombin aktiválta mintákhoz hasonlóan, kalcimicin hozzáadását követően is azonnali és homogén volt. Ez az emelkedés a követési idő végéig (600 másodpercig) fennmaradt és a fluoreszcencia növekedés mértéke szignifikánsan nagyobb volt, mint a CVX+trombin által történő aktiváció esetén.

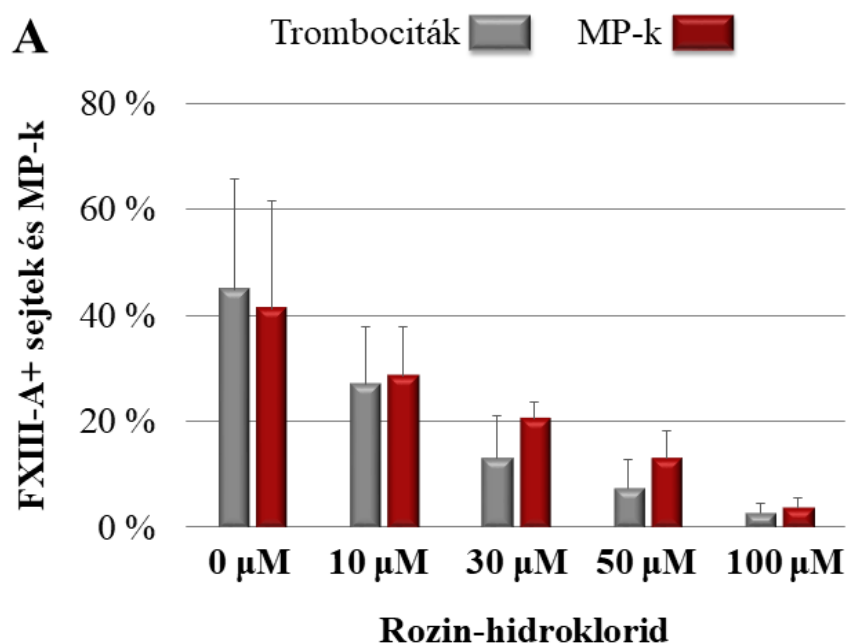


12. ábra Intracelluláris Ca^{2+} szintek változása receptor és nem-receptor mediálta aktivációt követően. Intracelluláris Ca^{2+} -hoz tartozó jelet Fluo-4-acetoxi-metilészter (Fluo-4-AM) fluoreszcencia vizsgálatával detektáltuk. Reprezentatív dot-plot-ok **(A)** 125 ng/ml konvulxin (CVX) és 0,5 U/ml trombin elegyével vagy **(B)** 0,7 μM kalcimicinnel kezelt trombociták eredményeit mutatják. Aktiváló ágensek mintákhoz való hozzáadását a fekete nyilak jelzik a 60 másodperces alapvonal felvételét követően. A fluoreszcens jelekből származó adatokat 60 másodpercenként cellákra osztottuk, „+” jelek az egyes cellákhoz tartozó medián értékeknek felelnek meg. Az alapvonal után kialakult időrés az agonisták hozzáadásának és a mérés újbóli elindításának felel meg. **(C)** Medián fluoreszcencia intenzitás (MFI) ábrázolása az idő függvényében CVX+trombin-nal (fekete) és kalcimicinnel (piros) kezelt trombociták esetében. A csillagok a fluoreszcens jel szignifikáns eltérésének felel meg CVX+trombin vs. kalcimicin összehasonlításában (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Az adatok három különböző kísérlet eredményeiből számított átlag $\pm$ SD értékeket jelentik.

5.5 *A RhoA és a transzglutamináz inhibitorok hatása a konvulxin+trombin által kiváltott cFXIII transzlokációjára*

Eredményeinkből jól kitűnik, hogy a kalcimicin nem képes felületi cFXIII transzlokációt indukálni. Ennek alapján feltételezzük, hogy a Ca^{2+} független mechanizmusok fontos szerepet játszanak az FXIII-A CVX+trombin aktiválta trombociták és mikropartikulák membránjának felszínén való megjelenésben. A kisméretű, guanozin-trifosztátot hidrolizáló enzimek (GTPáz) csoportjába tartozó RhoA-nak fontos szerepe van a G-fehérjékhez kapcsolt receptor és az integrin-közvetített jelátvitel Ca^{2+} független részében [81, 110]. Így célunk volt megvizsgálni a RhoA inhibitor, rozin hatását a cFXIII transzlokációra (13.A ábra). FXIII-A transzlokáció rozinnal történő koncentráció függő erőteljes gátlása azt mutatja, hogy a RhoA által mediált Ca^{2+} független utak fontosak az FXIII-A-nak a kollagén és PAR receptorokon keresztül kiváltott trombocita aktiváció hatására bekövetkező felszínre való kikerüléséhez.

További kérdés volt, hogy szükséges-e a cFXIII aktív TG-vé (FXIIIa) történő alakulása ahhoz, hogy a cFXIII a trombociták membránján áthaladjon. Irodalomból ismert, hogy a trombin indukálta vérlemezke aktiváció során az intracellulárisan lokalizálódó FXIII-A egy része nem-proteolitikusan aktiválódik [46, 48]. A T101 a TG2 és az FXIIIa hatékony inhibitora, körülbelül 0,25 μM -os IC_{50} értékkel rendelkezik. Azonban a membránon nem tud áthatolni és csak azt az aktív cFXIII frakciót képes gátolni, amely a külső membránrétegbe kerül. Kísérleteink egy részében vizsgáltuk a T101 cFXIII externalizációra kifejtett hatását (13.B ábra). Az FXIII-A expozíció koncentráció függő részleges gátlása a T101 inhibitor által arra utal, hogy a cFXIII aktív formája növeli a transzlokáció hatékonyságát. Ugyanakkor a kísérletekben alkalmazott gátló koncentrációk lényegesen magasabbak voltak, mint az IC_{50} , ami felveti a T101 aspecifikus hatásának a lehetőségét. A táblázatban bemutatott adatok alapján nehéz lenne eldönteni, hogy a csökkent transzlokáció valóban összefüggésben áll-e a felszínre kikerült cFXIIIa gátlásával.



B

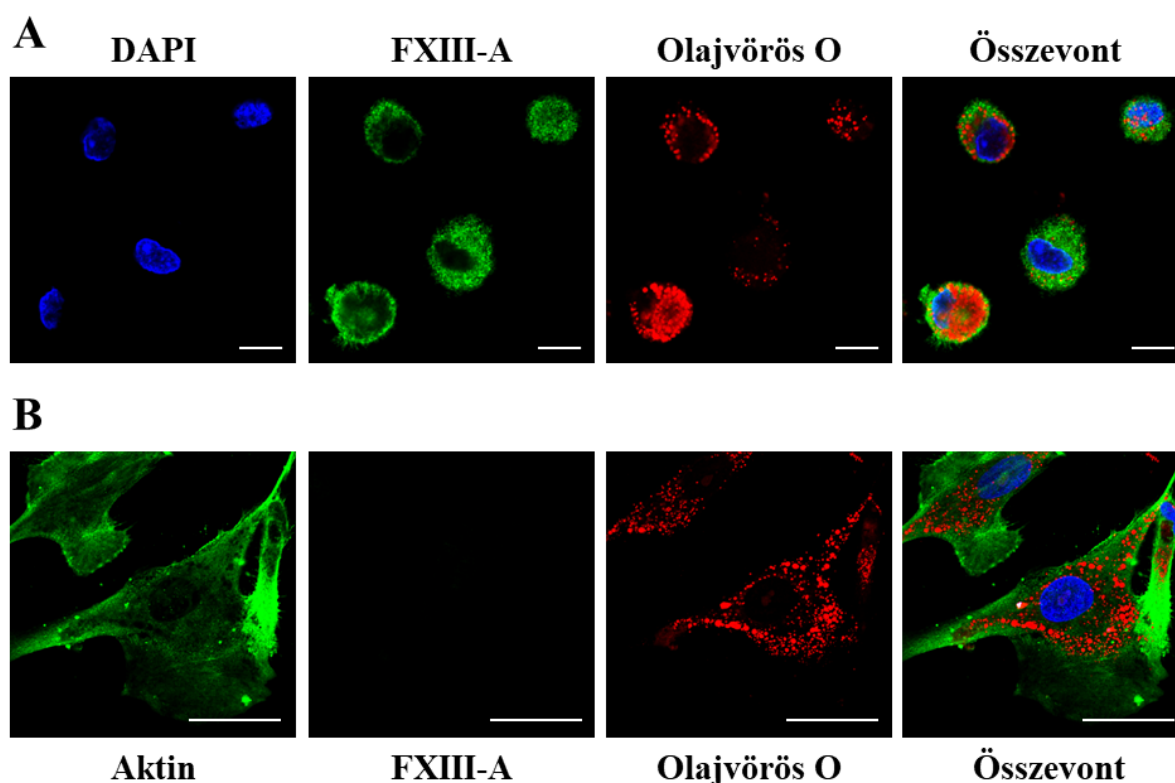
T101 koncentrációk	Trombociták Átlag $\pm$ SD	Mikropartikulák Átlag $\pm$ SD
0 μ M	49 $\pm$ 18	54 $\pm$ 6
10 μ M	30 $\pm$ 16	33 $\pm$ 14
20 μ M	25 $\pm$ 13	28 $\pm$ 16
50 μ M	26 $\pm$ 18	26 $\pm$ 16
100 μ M	17 $\pm$ 15	19 $\pm$ 14
200 μ M	16 $\pm$ 13	20 $\pm$ 15

13. ábra RhoA és TG inhibitorok hatása az FXIII A alegységének (FXIII-A) membrán felületen való megjelenésére a CVX+trombin-nal történő sejtaktiváció során. Gél-filtrált trombocitákat különböző koncentrációjú rozinnal (RhoA inhibitor) vagy T101 gátlószerezrel (TG inhibitor) kezeltük, majd a sejteket receptor mediálta útvonalon keresztül aktiváltuk és a mintákat áramlási citometriával vizsgáltuk. **(A)** A rozin és **(B)** a T101 koncentráció függő módon csökkentette az FXIII-A pozitív trombociták és mikropartikulák (MP-k) %-os arányát. Az adatok három különböző kísérlet eredményeiből számított átlag $\pm$ SD értékeket jelentik.

5.6 *FXIII-A expresszió és LDL tartalom vizsgálata makrofág és simaizom sejt eredetű habos sejtekben immunfluoreszcens mikroszkópiával*

A makrofág eredetű habos sejtek esetében először vizsgálni kívántuk, hogy az átalakulás folyamata során is megőrzik-e a sejtek az FXIII-A tartalmukat. Kísérleteinkhez humán perifériás vérből izolált monocitákat differenciáltattunk makrofágokká, majd azokat oxLDL-lel inkubáltuk habos sejtekké történő átalakulás céljából. Az immunfluoreszcens felvételeken (14.A ábra) négy makrofág látható, amelynek mindegyike intenzíven festődött FXIII-A-ra. Ezek a makrofágok különböző mértékben vették fel az oxLDL-t. Azokban a sejtekben, ahol jelentősebb mennyiségben halmozódott fel a lipid (14.A ábra bal oldalán lévő két makrofág), a citoplazmában lévő FXIII-A perifériára szorult. Jól látszik, hogy a felvett lipidrészecskék elfoglalták a citoplazma centrális részét és más citoplazma komponenseket a membrán alatti régió felé toltak.

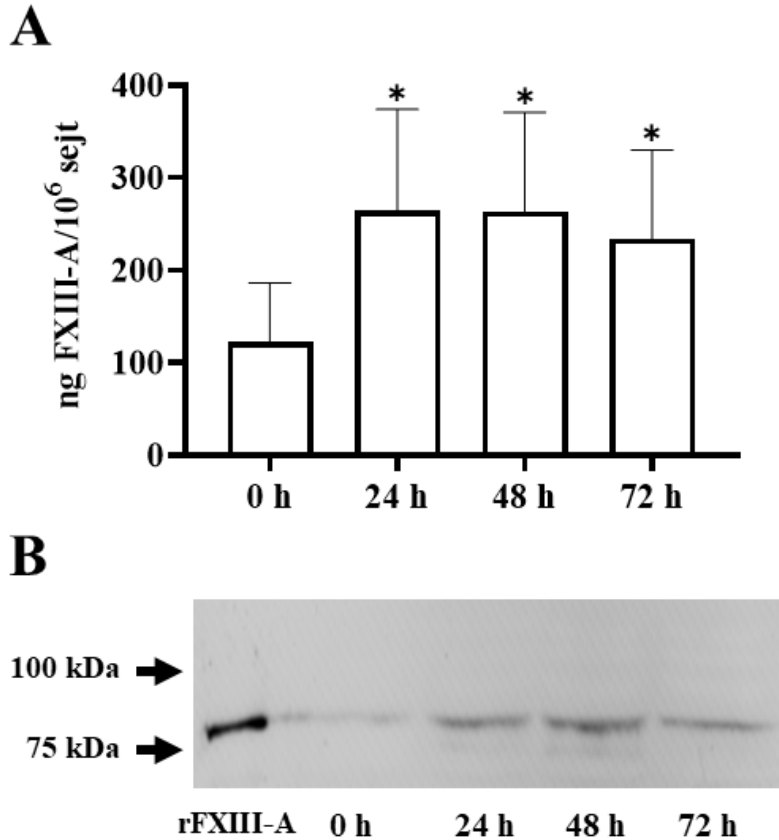
A makrofágokon kívül számos más, az ateroszklerotikus plakkban megjelenő sejtípus potenciálisan vehet fel lipideket és alakulhat habos sejtekké. A vaszkuláris simaizom sejtek az ateroszklerotikus plakk másik fő alkotórészei, melyek szintén képesek habos sejtekké transzformálódni. Az oxLDL viszonylag gyenge induktora a simaizom eredetű habos sejtkepződésnek, de a tripszin és koleszterin-észter hidroláz enzimek által módosított LDL-t már könnyen felveszik a simaizom sejtek is [105]. Ennek megfelelően humán aorta eredetű simaizom sejteket tenyésztettünk és vizsgáltuk az eLDL felvételét. Amint az a 14.B ábrán látható, ezek a sejtek intenzív festődést mutattak a simaizom marker aktinra és jelentős mennyiségű lipidet vettek fel, azonban habos sejtekké történő átalakulásukat nem kísérte FXIII-A expresszió.



14. ábra XIII-as faktor A alegységének (FXIII-A) vizsgálata különböző eredetű habos sejtekben. (A) FXIII-A az oxLDL hatására létrejött makrofág eredetű habos sejtekben. Az FXIII-A kimutatására FITC-cel jelezett antitestet (zöld), míg az oxLDL detektálására olajvöröst (piros) használtunk. A jobboldali ábra a két festést egymásra vetítve mutatja. Az ábrák jobb alsó sarkában elhelyezett skálák a 10 μ m-es méret tartománynak felelnek meg. (B) Az FXIII-A hiánya a vaszkuláris simaizomsejtekben, melyek enzimmel módosított, eLDL felvételével alakultak habos sejtekké. A simaizmokban lévő aktint zöld, míg a módosított LDL-t piros színnel mutatjuk. FXIII-A ellenes antitesttel nem kaptunk reakciót. A skálák ebben az esetben 50 μ m-nek felelnek meg.

5.7 A cFXIII expresszió változásának detektálása makrofágok habos sejtekké történő átalakulása során

Következő kérdésünk az volt, hogy az oxLDL felvétele befolyásolja-e a makrofágok FXIII-A tartalmát. ELISA módszerrel kimutattuk, hogy az FXIII-A több mint kétszeresére növekedett 24 órával az oxLDL egyszeri adását követően a nem transzformált sejtekhez képest (15.A ábra). A megemelkedett FXIII-A tartalom csak kismértékben csökkent a következő 48 órában. Ezeket az eredményeket Western blot technikával is megerősítettük (15.B ábra).

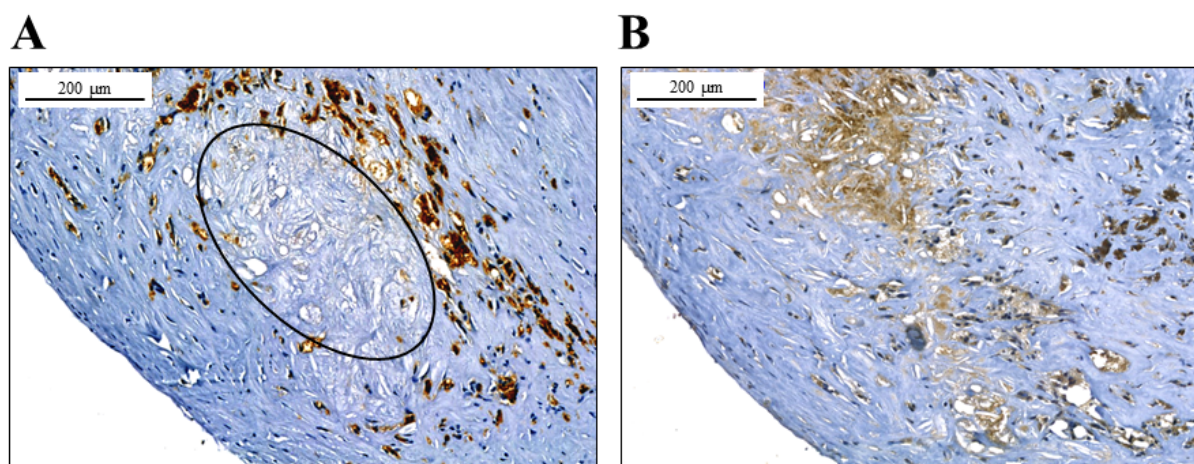


15. ábra A XIII-as faktor A alegységének (FXIII-A) intracelluláris szintjének emelkedése makrofágok habos sejtekké való átalakulása során egyszeri 50 µg/mL oxLDL adását követően. (A) A cFXIII mennyiségét ELISA-val határoztuk meg nem kezelt makrofágok (0 h) lizátumaiban, valamint oxLDL hozzáadását követően 24, 48 és 72 órával. A szignifikancia mértékét az oxLDL-lel kezelt és nem kezelt sejtek eredményeinek összehasonlításával számítottuk ki ($n=5$, $*p<0,05$). **(B)** A reprezentatív Western blot emelkedett FXIII-A szinteket mutat a habos sejtekké differenciálódott makrofágokban. A fekete nyilak a Precision Plus Protein molekulaszúly markerek 75 kDa-os és 100 kDa-os komponenseit jelzik. rFXIII-A: rekombináns FXIII-A.

5.8 Makrofágok és az FXIII-A kimutatása ateroszklerotikus plakkokban

A jelentős mennyiségű FXIII-A makrofág eredetű habos sejtekben való kimutatását követően vizsgálni kívántuk, hogy az FXIII-A jelen van-e az ateroszklerotikus plakkban, és ha igen, milyen típusú lokalizációt mutat. A 16.A ábra egy IV-es típusú arteria carotis eredetű plakkot mutat be lipidmaggal és az azt körülvevő CD68 pozitív makrofágokkal. Egy másik, hasonló szerkezetű plakkon pedig FXIII-A festődése látszódik (16.B ábra). Itt az FXIII-A-t

expresszáló sejtek mellett az FXIII-A extracellulárisan is megfigyelhető. Az FXIII-A plakkokban való részletesebb előfordulását a 17. és 18. ábrákon mutatjuk be.

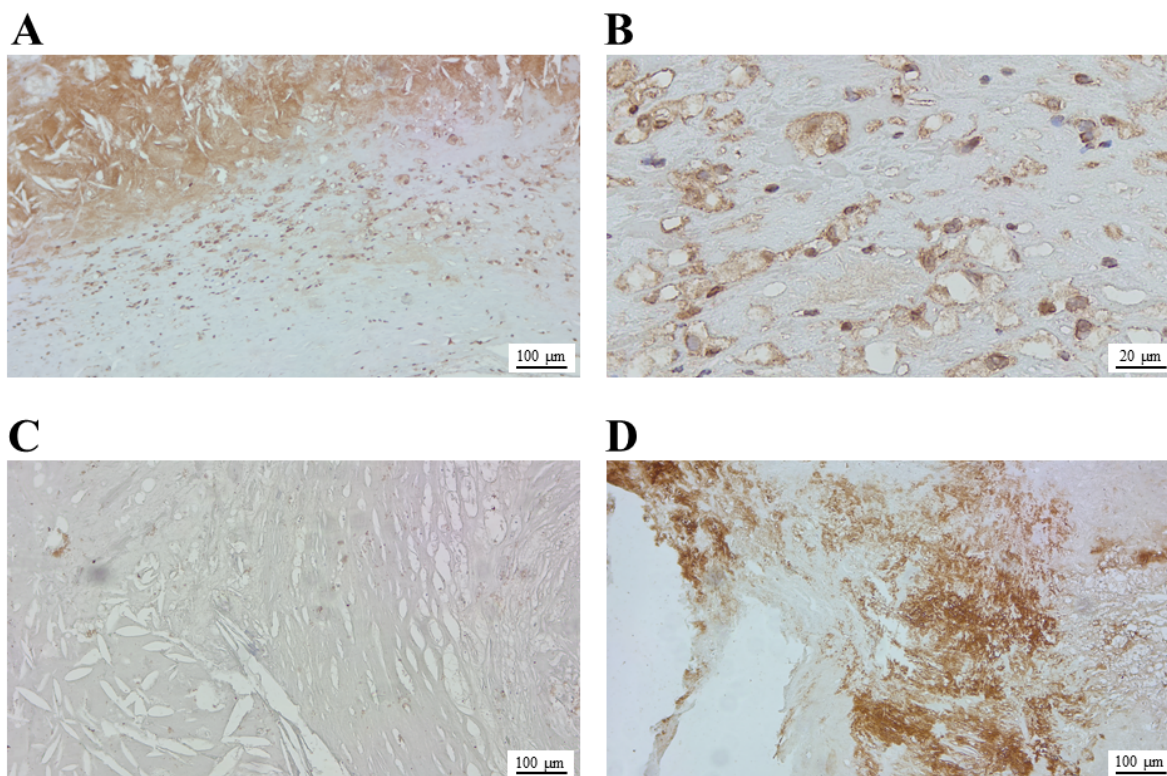


16. ábra Makrofágok arteria carotisban kialakult plakkban. (A) IV-es típusú plakk az arteria carotisban, jól látható lipidmaggal, melynek nagy része az elliptikus alakzattal jelölt területen belül van. A lipidmagot CD68 pozitív makrofágok veszik körül. (B) FXIII-A tartalmú sejteket immun-peroxidáz festéssel mutattuk ki az ateroszklerotikus plakkokban. A lipidmag régióban az FXIII-A extracelluláris formában is jelen van. További részletek a 17. és 18. ábrákon láthatóak.

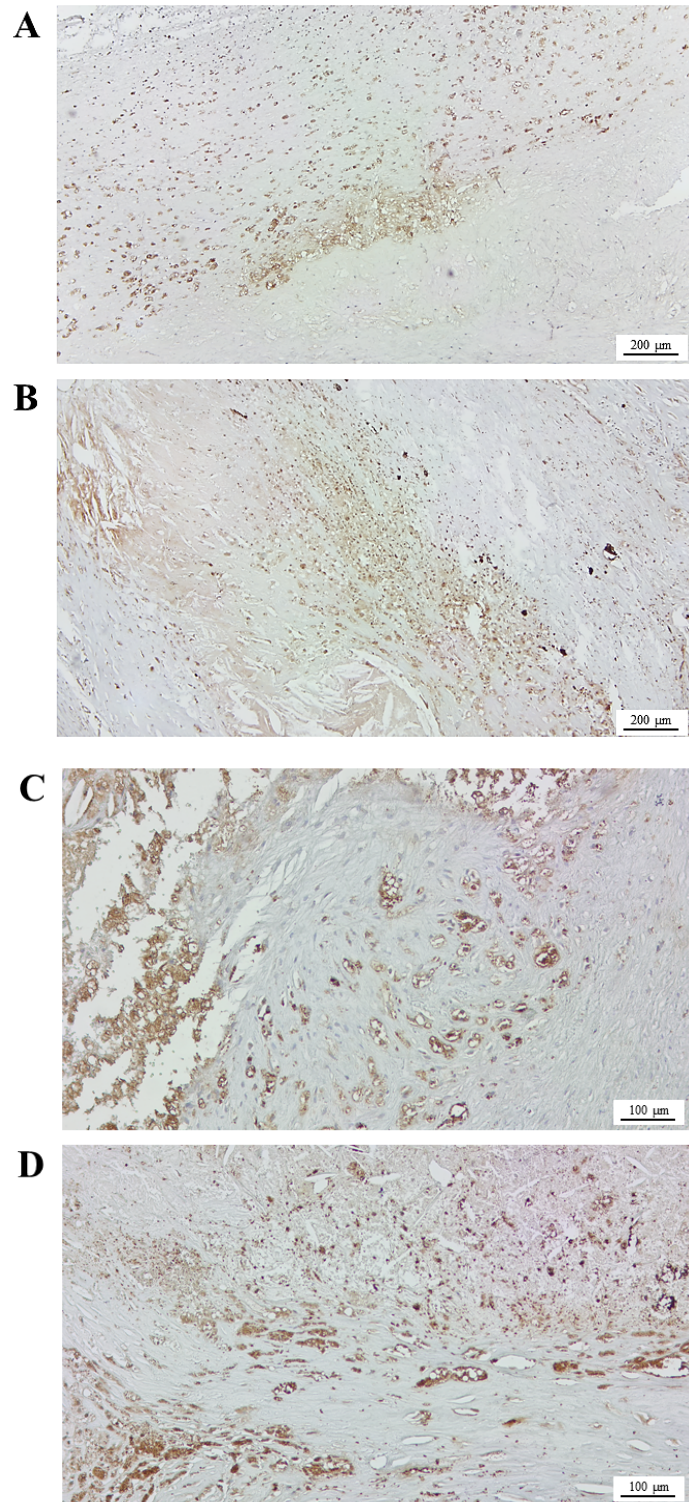
5.9 FXIII-A és izopeptid keresztkötések detektálása immunhisztokémiával ateroszklerotikus plakkokban

A 17. ábra részletes áttekintést ad az FXIII-A immunhisztokémiai módszerrel kimutatott lokalizációjáról az ateroszklerotikus plakkokban. Az intenzív, intracitoplazmatikus, barna színű immun-peroxidáz festődés azt mutatja, hogy az FXIII-A számos makrofágszerű sejtben van jelen a lipidmag alatti részben (17.A és 18.A-D ábrák). A sejtek többségében a citoplazma üres, nem festett része (17.B, 18.C és 18.D ábrák) azt jelzi, hogy a sejtek által felvett lipideket a fixálási/festési lépéseknél használt oldószerek kioldották. A lipidmagban az FXIII-A intenzív extracelluláris festődését is tapasztaltuk, ami arra utal, hogy a plazmából származó és/vagy az apoptotikus/nekrotikus makrofágokból felszabaduló FXIII-A a mag alkotóelemeihez kötődik. Az FXIII-A detektálásához használt primer vagy szekunder antitestek nem specifikus kötődésének lehetőségét a festődés negatív kontrollonál tapasztalt hiánya zárta ki (17.C ábra).

További kérdés volt, hogy az ateroszklerotikus plakkban jelenlevő FXIII aktív-e és ha igen, részt vesz-e a fehérjék keresztkötésében. Az N ϵ -(γ -glutamil)-L-lizil kovalens kötéseket detektáló specifikus antitest alkalmazásával kimutattuk, hogy a plakk nem sejtes részét keresztkötött fehérje struktúrák egészítik ki (17.D ábra). Ezen eredmények alapján elmondható, hogy az FXIII-A nemcsak jelen van az ateroszklerotikus plakkban, hanem aktívan hozzá is járul a struktúrájának kialakításához.



17. ábra Az FXIII-A és a keresztkötött fehérje struktúrák vizsgálata ateroszklerotikus plakkokban immunhisztokémiával. (A) FXIII-A sejtes és extracelluláris lokalizációja ateroszklerotikus plakkban, (B) plakkban megjelenő FXIII-A tartalmú makrofágok nagyobb nagyításban, (C) FXIII-A festés negatív kontrollja, (D) N ϵ -(γ -L-glutamil)-L-lizil kötésekkel keresztkötött fehérjék a plakk nem sejtes részében.

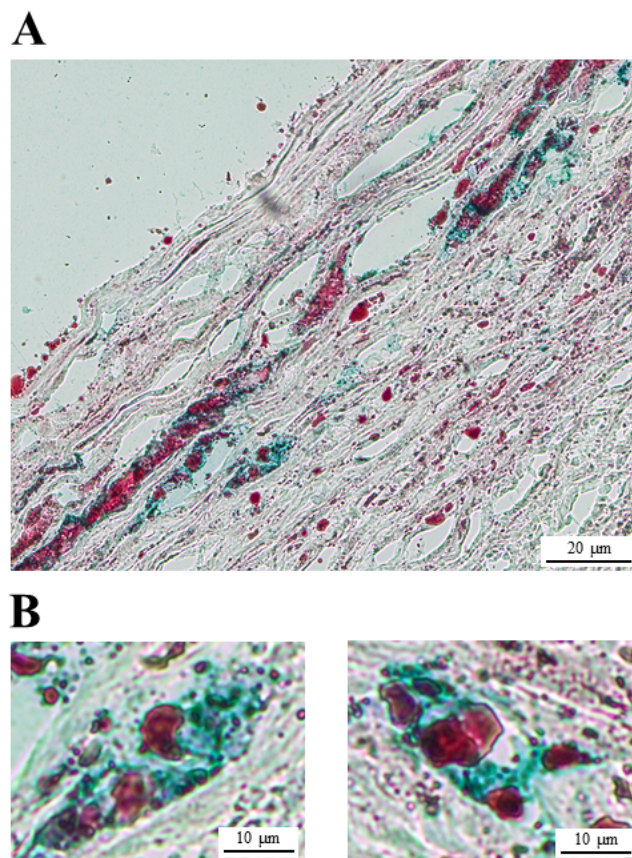


18. ábra A cFXIII megjelenése négy különböző arteria carotis eredetű ateroszklerotikus plakkban. (A, B) Két plakk kisebb és (C, D) további két plakk nagyobb nagyításban. Immunhisztokémiai eljárás segítségével azonosítottuk az FXIII-A intracitoplazmatikus és extracelluláris előfordulását az előzőekben prezentált ábrákhoz hasonlóan. A makrofágok citoplasmájában lévő üres, nem festődő területek a sejtek által felvett lipidek jelenlétére utal, amiket a festéshez/fixáláshoz szükséges oldószerek kioldottak. Az ilyen típusú, eredetileg

lipidben gazdag makrofágok (habos sejtek) a fibrotikus területeken is megjelennek és intenzíven festődnek FXIII-A-ra. Az FXIII-A expressziója sokkal erősebb a sejtek periferiáján a lipid cseppekkel való együttes intracitoplazmatikus lokalizáció miatt.

5.10 Ateroszklerotikus plakkokban megjelenő FXIII-A tartalmú habos sejtek

FXIII-A tartalmú sejtek és keresztkötött fehérje struktúra azonosítása után, célunk volt vizsgálni, hogy a plakkot alkotó FXIII-A-t tartalmazó makrofágok képesek-e habos sejtekké átalakulni. Fagyasztott metszeteken ORO-val festett zsírcseppek figyelhetők meg mind az intracelluláris, mind az extracelluláris kompartmentekben (19.A ábra). Számos sejt együtt festődött ORO-val és anti-FXIII-A antitesttel. A nagyobb nagyítással ábrázolt sejtek egyértelműen ezt a kombinációt demonstrálják (19.B ábra). Megállapítható, hogy az FXIII-A tartalmú habos sejtek nem csak *in vitro* körülmények között fordulnak elő, de *in vivo* is jelen vannak az ateroszklerotikus plakkban.



19. ábra Ateromatózus plakkból készített kriometszetek kombinált olajvörös O (ORO) és FXIII-A festéssel (PolyDetector HRP Green kromogén). (A) Számos makrofág, néhányan

közülik habos citoplazmával, melyekben ORO (magenta) pozitív vakuólumok jelenléte figyelhető meg. Az extracelluláris kompartmentben is megjelennek az ORO pozitív lipid cseppek. (B) Példa két FXIII-A (zöld) pozitív makrofágra, amelyek ORO-ra is festődnek.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1 *FXIII-A a trombociták és a trombocita eredetű mikropartikulák felszínén*

A CVX+trombin indukálta receptor mediált és a Ca^{2+} -ionofórral kiváltott nem-receptor mediálta vérlemezke aktiváció néhány hasonlóságot mutat, beleértve a PS-nek a membrán külső oldalán való megjelenését és a degranulációt, ami az α -granulumokban lévő P-szelektin fehérje expressziójaként figyelhető meg. Ezzel szemben a sejtek morfológiája lényegesen eltérő. A CVX+trombin stimulust követően a vérlemezkék körülbelül 2/3-a gömbszerű alakot vesz fel, amihez egy sapkaszerű struktúra tartozik [71, 72, 111], míg a Ca^{2+} -ionofórral aktivált trombociták vakuolizált struktúrát vagy pszeudopódiumokat alakítanak ki. A cFXIII lokalizációjában is eltér a két típusú aktiváció. Receptor mediálta stimuláció hiányában a cFXIII nem transzlokálódik az aktivált trombociták és a képződött mikropartikulák felszínére. Elvileg, a jelentős különbség hátterében a két útvonalon keresztül kiváltott, eltérő mértékű intracelluláris Ca^{2+} felszabadulásból adódhat. A kalcimicin indukálta aktiváció következtében az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedése szignifikánsan magasabb volt, mint a CVX+trombin mediátorokkal kiváltott Ca^{2+} szint emelkedés. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a cFXIII-at nem a citoszól Ca^{2+} szintjének emelkedése irányítja a membrán külső felszínére, hanem a receptor stimuláció által aktivált komplex intracelluláris jelátviteli mechanizmusok. Mattheij és munkatársai leírták [75], hogy egy másik típusú Ca^{2+} -ionofór, ionomicin hatására TG aktivitás mutatható ki a trombociták egy részének felszínén. Az általuk használt ionomicin koncentrációja, azonban 10-szer magasabb volt a mi kísérleteinkben alkalmazott kalcimicin koncentrációnál, és az aktivációs idő is hosszabb volt. E két tényező a trombocita membrán megnövekedett permeabilitását és az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció megemelkedését okozhatta.

A cFXIII transzlokáció formájában megvalósuló robosztus válaszhoz kollagén és PAR receptorokon keresztül történő egyidejű szignalizációra van szükség [81]. Mindkét szignalizációs útvonal Ca^{2+} független biokémiai lépések/mechanizmusok sorozatát foglalja magába. A kollagén receptoron, GPVI-on keresztül zajló aktiváció a foszfortirozin jelátviteli kaszkádon keresztül megy végbe [112], ami végül diacil-glicerol képződéshez vezet, amely aktiválja a protein-kináz C család szerin/treonin kinázait. A PAR receptorok heterotrimer G-fehérjékhez (G_q és $G_{12/13}$) kapcsolódva találhatók meg a membrán citoplazmatikus oldalán. A $G\alpha_q$ részt vesz a foszfolipáz $C\beta$ aktiválásában, ami inozitol-trifoszfát és diacil-glicerol

képződést idéz elő, míg a $G\alpha_{12/13}$ a RhoA aktivációján keresztül fejti ki hatását. A cFXIII transzlokációt a RhoA inhibitor, rozin gátolta, ami azt sugallja, hogy a jelátviteli útvonalnak egy Ca^{2+} független részével áll kapcsolatban.

A vérlemezkék felszínén megjelenő PS körkörös a membránon és nagy mennyiségben a sapkaszerű struktúrában helyezkedik el [111]. FXIII-A hiányos betegekből származó trombociták is képesek a gömbszerű megjelenésre és a sapkaszerű struktúra kialakítására [72], ami azt mutatja, hogy a cFXIII nem vesz részt ezekben a folyamatokban. A trombin generációért felelős faktorok, úgymint aktivált IX-es faktor, X-es és aktivált X-es faktor, VIII-as faktor, aktivált V-ös faktor, illetve a protrombin és a fibrinogén, egyéb adhéziós molekulákkal együtt a negatív töltésű foszfolipid felszínhez kapcsolódnak a kollagén+trombin aktiválta trombociták felületén megjelenő PS miatt [113]. Az ilyen prokoaguláns felszínhez kötődő X-es faktor és protrombin aktív formává való átalakulása nagyon felgyorsul. A legtöbb trombin generációban résztvevő alvadási faktor extracelluláris eredetű, míg a fibrinogén és az V-ös faktor egy része az α -granulumokból szabadul fel. A citoplazmatikus cFXIII nem szekretálódik a klasszikus szekréciós útvonalon és nem kerül ki a vérlemezkékből a degranuláció során [114]. Ennek ellenére a granuláris V-ös faktorhoz hasonló felszíni megjelenés jellemzi [109].

Mitchell és munkatársai áramlási citometriás és immunfluoreszcens módszerekkel kimutatták, hogy a CVX+trombin aktiválta trombocitákon az FXIII-A a felszínre kerül és ezen prokoaguláns sejteken a sapkaszerű struktúrába koncentrálnak [71, 115]. Ezeket az eredményeket nagy felbontású IEM-mel mi is megerősítettük és a kalcimicin aktiváció vizsgálatával kiegészítettük. Nemrégiben megjelent közlemény szerint a cFXIII megjelenik a monociták membránjának külső oldalán is interleukin-4 és 10 együttesével végzett monocita stimuláció esetén [94]. Cordell és munkatársai leírták, hogy a monocita eredetű makrofágokban a cFXIII Golgi fehérjékhez kapcsolódik, melyek szerepet játszanak a nem klasszikus úton szekretált fehérjék plazmamembránba való eljuttatásában [31]. Ezen az útvonalon keresztül valósulhat meg az FXIII-A aktivált trombociták felületén való megjelenése is, azonban további vizsgálatok szükségesek a cFXIII kettős foszfolipid rétegen való áthaladásának feltárásához. További kérdés, hogy a felületre került cFXIII milyen mechanizmus révén jut el a sapkaszerű struktúrába. A plazmában lévő zimogén FXIII kötődhet az aktivált trombocitákhoz [116, 117], azonban a mi kísérleti rendszerünk nem tartalmazott extracelluláris FXIII-at.

Trombin/trombin receptor aktiváló peptid vagy kollagén/CVX agonisták és ezek kombinációjával kiváltott vérlemezke aktiváció eltérő méretű és morfológiájú extracelluláris vezikulákat szabadítanak fel [88]. Kísérleteinkben az aktiváció során képződött 100-1000 nm

nagyságú mikrovezikulákat vizsgáltunk. Az 1990-es évek elején mutatták ki, hogy a trombocita eredetű mikropartikulák is tartalmaznak cFXIII-at [118], de felszíni megjelenését nem vizsgálták. Áramlási citometriával, immunfluoreszcens mikroszkóppal és IEM-mel kapott eredményeinkből egyértelműen kitűnik, hogy a CVX+trombin stimulációt követően a képződött mikropartikulák döntő többsége felszíni FXIII-A pozitivitást mutatott. Ezek a típusú mikropartikulák aggregátumok kialakítására is hajlamosak, akár körkörös, akár szabálytalanul összeállt alakzatban. A részletes, nagy felbontású IEM felvételek két típusú FXIII-A-val jelölt mikropartikulákat azonosítottak. A nagyobb, 400-800 nm átmérőjű vezikulák megtartották a CD41a pozitivitásukat, ami ép membránra utal. A kisebbek, 200 nm alattiak CD41a-ra negatívak voltak, de intenzíven jelölődtek FXIII-A-ra, ami a citoplazmatikus eredetre utal. Sem a nyugvó, sem a kalcimicinnel aktivált trombocita populációban nem lehetett ilyen típusú mikropartikulákat detektálni. Eredményeink arra utalnak, hogy ezek a mikropartikulák egy erősebb trombocita aktivációs stimulus hatására képződnek.

Kimutatták, hogy a CVX+trombin aktiválta vérlemezkék felszínére kikerülő cFXIII képes az α_2 -anti-plazmin és az α_2 -anti-plazmin eredetű peptidet fibrinhez kötni. Ez azt jelzi, hogy a membrán felszínre transzlokálódó cFXIII aktív TG formájában van jelen [71, 75]. Egy korábbi tanulmányban TG indukálta szerotonin kötődést mutattak ki számos fehérje szubsztráthoz, ami szintén az aktív cFXIII jelenlétére utal a trombociták membránján [119]. Ismert, hogy az FXIII nem proteolitikusan is aktiválódik az intracelluláris kompartmentben trombin indukálta vérlemezke aktiváció során [46, 47]. Valószínűleg ez a stimuláció egyidejűleg transzlokálja a cFXIII aktív formáját a membrán külső oldalára intracelluláris jelátvitel beindítása következtében. Elvileg elképzelhető, hogy a nem aktivált FXIII kikerül a sejtől és ezt követően a trombin proteolitikusan aktiválja, amikor a trombociták külső felszínéhez kötődik. Ennek ellenére, trombin receptor aktiváló peptid-6 és kollagén stimulus alkalmazásakor hasonló TG aktivitást figyeltek meg exogén trombin hozzáadása nélkül is [71]. Ezek az adatok együttesen arra utalnak, hogy a cFXIII legalább egy része aktivált formában transzlokálódik a felületre. Az FXIII-A pozitív trombociták a trombuszhoz szállíthatják, a már aktív cFXIII-at, ami elősegítheti a keresztkötések kialakulását, így stabilizálhatja a trombocita-fibrin aggregátumot [71]. További kérdés volt, hogy szükséges-e a cFXIII aktiválása a transzpozícióhoz. TG inhibitor jelenlétében csökkent a cFXIII felszíni megjelenése, ami az aktív forma szerepére utal. Habár nem találtunk közvetlen bizonyítékot, de valószínű, hogy a mikropartikulák felszínén detektált cFXIII szintén aktív formában van jelen, így szintén részt vehetnek az alvadék stabilizálásában. Jó kutatási célpontok lehetnek a kis citoplazmatikus fragmentek, melyek nem rendelkeznek membránnal, de intenzív FXIII-A jelölést mutatnak. Kialakulásuk és pontos szerkezetük még

további feltárásra vár és az alvadék stabilizálásban való részvételükkel kapcsolatos vizsgálatok akár további érdekes, új mechanizmusokat tárhatnak fel.

Tanulmányunk eredményeit összefoglalva az alábbi új megállapításokat fogalmazhatjuk meg:

- 1./ Receptor mediálta aktivációnak szerepe van a cFXIII membrán külső felszínén való megjelenésében és ez a folyamat nincs összefüggésben a prokoaguláns PS expozíciójával.
- 2./ Elsőként mutattuk ki a cFXIII jelenlétét a trombocita eredetű mikropartikulák felszínén.
- 3./ A Ca^{2+} -ionofór, kalcimicin indukálta emelkedett intracelluláris Ca^{2+} szint ellenére, a kalcimicin nem tudott cFXIII transzlokációt előidézni.
- 4./ A Ca^{2+} független jelátviteli mechanizmus(ok) fontos szerepet töltenek be a citoplazmatikus fehérjének a membrán felületére történő transzpozíciójában.
- 5./ RhoA inhibitor, rozin hatására csökkent a cFXIII felszíni megjelenése CVX+trombin stimulált vérlemezkéknél, ami szintén alátámasztja a Ca^{2+} független mechanizmusok fontosságát.

6.2 FXIII-A a makrofág eredetű habos sejtekben

A makrofágok multipotens és multifunkcionális sejtek, amelyek jelentős átalakuláson mennek keresztül különböző induktorok hatására. Különböző körülmények között maradhatnak nem-polarizált formában vagy polarizáló ágensek hatására pro-inflammatórikus M1 vagy anti-inflammatórikus M2 fenotípusú sejtekké alakulhatnak át [120]. Legújabb tanulmányok a makrofágok három fő klaszterét különböztetik meg az ateroszklerotikus plakkban [101, 121]. A rezidens makrofágok, M2 fenotípusra emlékeztető tulajdonságokkal, bejuthatnak a plakkba. Számos olyan tényező befolyásolhatja a makrofágokat az érfalban, melyek hatással vannak a polarizációs állapotukra [122]. Habár Romanic és munkatársai 1998-ban leírták az FXIII jelenlétét az ateroszklerotikus léziókban [123], azóta csak néhány tanulmány jelent meg e témában. FXIII-at expresszáló, alternatív úton aktiválódó makrofágokat azonosítottak aorta sztenózisban szenvedő betegek aorta billentyűjében, így valószínűleg ezek a sejtek szerepet játszanak a billentyű sztenózis progressziójában [124].

A makrofágok képesek lipidek felvételére, ezáltal habos sejtekké való átalakulásra. A habos sejtek fontos szerepet töltenek be az érlemezés kialakulásában és progressziójában. Apoptózis, autofágia, nekroptózis vagy piroptózis esetén az ateroszklerotikus plakk magjának fő forrását adják. A makrofágokon kívül, bizonyos körülmények között, a vaszkuláris simaizom sejtek, az őssejtek/progenitor sejtek és az endotél sejtek is felvehetnek lipideket és habos

sejtekké alakulhatnak [125, 126]. A fenotípus átalakuláson átmenő simaizom sejt eredetű habos sejtek nagyjából az ateroszklerotikus plakk felét teszik ki [127]. A lokális környezet változásaira válaszul a vaszkuláris simaizom sejtek kontraktilis fenotípusról szekréciónsra váltanak, és a makrofágokra jellemző expressziós jegyeket és viselkedést mutatnak [128]. A makrofág markerek expresszálationa és a makrofágszerű viselkedés elvileg magába foglalhatja az FXIII-A szintézisét is. Konfokális mikroszkóppal készített felvételeken jól látszik, hogy mind a makrofágok, mind a HAoSMC-k lipid partikulumokat vettek fel. A HAoSMC-k nem expresszálnak FXIII-A-t és habos sejtekké való transzformálásuk sem változtatott ezen a helyzeten. Ezek alapján elmondható, hogy a habos sejtekké való átalakulás nem felelős a makrofág eredetű habos sejtek emelkedett FXIII-A tartalmáért; a habos sejt fenotípus nem jár citoplazmatikus FXIII-A tartalommal.

A makrofágokban az FXIII-A mennyisége drasztikusan megnövekszik interleukin-4-el való stimulációkor, míg a γ -interferonnak nincs ilyen hatása [129, 130], azaz a sejtek FXIII-A tartalma lényegesen különbözik az M1 és M2 fenotípusokban. Mivel az oxLDL felvétele makrofágok differenciálódását és M2 fenotípus felé történő aktivációt is indukál [131], kíváncsiak voltunk arra, hogy a sejtekben lévő FXIII-A mennyiségét hogyan befolyásolja a makrofágok habos sejtekké történő átalakulása. Kísérleteink során a nem-polarizált makrofágok FXIII-A szintje több mint kétszeresére nőtt az oxLDL partikulumok felvételét követően. Van olyan közlés miszerint az interleukin-4 hosszabb és erőteljesebb stimulációja lényegesen nagyobb FXIII-A szintet eredményezett [129], érdekes lenne ilyen irányú vizsgálatok kivitelezése, ami alapján bővíthetnénk a polarizáló ágenseknek a habos sejtek FXIII-A tartalmára kifejtett hatásával kapcsolatos ismereteinket.

Szöveti metszetek tanulmányozása során nagy mennyiségű FXIII-A pozitív sejt populációt találtunk az ateromákban. Ezeknek a sejteknek a többsége makrofág eredetű habos sejtnek jelenik meg. A sejtek citoplazmájában lévő üres részek a fixálási/festési procedura során kioldódott lipid jelenlétére utalnak. Az FXIII-A és az ORO zsírfestés kombinációja egyértelműen azt mutatta, hogy az FXIII-A és a lipidcseppek ugyanabban a sejt populációban találhatóak. A fagyasztott metszeteken az ateroszklerotikus plakk jelentős acelluláris területe is intenzív FXIII-A festődést mutatott. A szklerotikus magban megjelenő FXIII-A nagy valószínűséggel olyan habos sejtekből származik, amelyek elvesztették integritásukat és részt vesznek a nekrotikus mag felépítésében. További kérdés volt, hogy az ateroszklerotikus plakkban jelenlevő FXIII aktív formában van-e, azaz funkcionális-e és képes-e fehérjék között keresztköteket kialakítani. Az a tény, hogy az FXIII-A megjelenik a monociták felszínén interleukin-4 és 10 hatására [94], azt sugallja, hogy a felülethez kötött formában, aktív TG-ként

van jelen a plakokban. Feltehetően a cFXIII már aktív formában szabadul fel a széteső sejtekből. Az FXIII fő extracelluláris funkciója a szövetekben a szubsztrát fehérjék izopeptid kötésekén keresztül történő keresztkötése. Az izopeptid kötések specifikusan detektáló antitest segítségével, olyan térhálós fehérje szerkezetet tudunk kimutatni az ateroszklerotikus plakokban, melyek azt jelzik, hogy az FXIIIa TG aktivitását az extracelluláris kompartmentekben is kifejti. Ezek az eredmények fontosak a lipidmag kialakulásának mechanizmusa és a plakk struktúráldódása szempontjából.

Tanulmányunk eredményeit összefoglalva az alábbi új megállapításokat fogalmazhatjuk meg:

- 1./ A makrofágok habos sejtekké történő átalakulása növeli azok intracelluláris FXIII-A tartalmát, míg a HAoSMC-k hasonló transzformációja nem vált ki FXIII-A termelődést.
- 2./ Az FXIII-A nagy mennyiségben található az ateroszklerotikus plakk makrofágaiban és az extracelluláris kompartmentben. Az FXIII-A tartalmú makrofágok *in vivo* is habos sejtekké alakulnak át az ateroszklerotikus plakokban.
- 3./ Az izopeptid kötésekkel térhálósított fehérje szerkezet jelenléte arra utal, hogy az FXIII-A legalább egy része aktív TG-ként működik a plakkon belül.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A véralvadás XIII-as faktorának A alegysége (FXIII-A), egy potenciális transzglutamináz, mely a plazma mellett bizonyos sejtek citoplazmájában is megtalálható (celluláris FXIII; cFXIII). A trombociták különösen nagy mennyiségben tartalmazzák (az összfehérje tartalom 3%-a). A konvulxin (CVX)+trombin aktiváció hatására az FXIII-A a membrán felszínére kerül. A monociták és az ateroszklerotikus plakkokban is megjelenő makrofágok szintén tartalmazznak FXIII-A-t. Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az FXIII-A jelenlétét trombociták és trombocita eredetű mikropartikulák felszínén, valamint a makrofág eredetű habos sejtekben kvantitatív és kvalitatív módszerekkel.

A CVX+trombin által kiváltott receptor mediálta aktiváció a trombocitáknak és a trombocita eredetű mikropartikulának több mint 60%-ánál eredményezett cFXIII expozíciót. Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal ép membrán struktúrájú és CD41a membrán glikoprotein jelölést nem mutató mikropartikulákat identifikáltunk. Mindkét típusú vezikula rendelkezett felszíni FXIII-A-val, ami nagyobb mennyiségben volt jelen a CD41a negatív partikulákon. A RhoA inhibitor, rozin szignifikánsan csökkentette a cFXIII transzlokációt. A nem-receptor mediálta aktiváció kiváltására használt Ca^{2+} -ionofór jelentősen megemelte az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt, indukálta a foszfatidilszerin transzlokációját a trombociták és a vezikulák felszínére, de cFXIII felületi megjelenését nem tudta kiváltani. Eredményeink alapján elmondható, hogy az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedése elegendő a foszfatidilszerin transzlokációjához a membrán belső rétegéből, míg a cFXIII trombocita citoplazmából történő felszíni expozíciójához receptor mediálta mechanizmus(ok) is szükségesek.

A makrofág eredetű habos sejtek immunfluoreszcens mikroszkópos vizsgálata kimutatta, hogy az FXIII-A jelen van a makrofágok habos sejtekké való átalakulását követően is. ELISA és Western blot technikák segítségével azt találtuk, hogy a transzformáció megnövelte a sejtek cFXIII tartalmát. Ez a változás csak a makrofágokból származó habos sejtekre volt jellemző, a vaszkuláris simaizomsejtek habos sejtekké történő átalakulása nem járt FXIII-A expresszióval. Az FXIII-A nem csak intracellulárisan volt jelen a plakkban, de az extracelluláris kompartmentben is kimutatható volt. Ateroszklerotikus plakkokból készített szöveti metszetek FXIII-A és oxidált LDL kombinált festése azt mutatta, hogy az FXIII-A tartalmú makrofágok a plakkon belül is habos sejtekké alakulhatnak. Az izopeptid kötéseket specifikusan detektáló antitest segítségével, olyan térhálós fehérje szerkezetet tudtunk kimutatni a plakkban, melyek azt jelzik, hogy az FXIII-A aktív formában van jelen. Az FXIII-A tartalmú habos sejtek hozzájárulhatnak a lipid mag kialakulásához és a plakk struktúrájához.

8. SUMMARY

The A subunit of coagulation factor XIII (FXIII-A), a potential transglutaminase, which in addition to plasma, is also found in the cytoplasm of certain cells (cellular FXIII; cFXIII). Platelets represent a huge reservoir of cFXIII (3% of total protein content). As a result of convulxin (CVX)+thrombin activation, FXIII-A becomes translocated to the surface. Monocytes and macrophages present in atherosclerotic plaque, also contain FXIII-A. The aim of our study was to investigate the externalization of FXIII-A on platelets and platelet derived microparticles and evaluate the FXIII-A content of macrophage derived foam cells by quantitative and qualitative methods.

Receptor mediated activation by CVX+thrombin exposed cFXIII to the surface of more than 60% of platelets and platelet derived microparticles. Electron microscopy revealed microparticles with preserved membrane structure and microparticles devoid of labeling for membrane glycoprotein CD41a. cFXIII was observed on both types of vesicles but was more abundant in the absence of CD41a. Rhosin, a RhoA inhibitor, significantly decreased cFXIII translocation. Non-receptor mediated activation of platelets by Ca^{2+} -ionophore elevated intracellular Ca^{2+} concentration, induced the translocation of phosphatidylserine to the surface of platelets and vesicles, but failed to expose cFXIII. The elevation of intracellular Ca^{2+} concentration is sufficient for the translocation of phosphatidylserine from the internal layer of the membrane, while the translocation of cFXIII from the platelet cytoplasm requires additional receptor mediated mechanism(s).

Immunofluorescent studies on macrophage derived foam cells demonstrated that FXIII-A is retained during the transformation of macrophages into foam cells. ELISA and Western blotting techniques revealed that the transformation elevated the intracellular FXIII-A content. This phenomenon seems specific for macrophage derived foam cells, the transformation of vascular smooth muscle cells into foam cells fails to induce the expression of FXIII-A. FXIII-A containing macrophages are abundant in the atherosclerotic plaque and FXIII-A is also present in the extracellular compartment. Cells showing combined staining for FXIII-A and oxidized LDL in tissue sections demonstrated that FXIII-A-containing macrophages within the atherosclerotic plaque are also transformed into foam cells. The protein cross-linking activity of FXIII-A in the plaque was demonstrated using an antibody labeling the iso-peptide bonds. FXIII-A containing foam cells may contribute to the formation of lipid core and the plaque structurization.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Komaromi, I., Bagoly, Z. and Muszbek, L., Factor XIII: novel structural and functional aspects. *J Thromb Haemost*, 2011. 9(1):9-20.
2. Mitchell, J.L. and Mutch, N.J., Let's cross-link: diverse functions of the promiscuous cellular transglutaminase factor XIII-A. *J Thromb Haemost*, 2019. 17(1):19-30.
3. Muszbek, L., et al., Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev*, 2011. 91(3):931-72.
4. Schroeder, V. and Kohler, H.P., Factor XIII: Structure and Function. *Semin Thromb Hemost*, 2016. 42(4):422-8.
5. Muszbek, L., et al., The involvement of blood coagulation factor XIII in fibrinolysis and thrombosis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2008. 6(3):190-205.
6. Facchiano, A. and Facchiano, F., Transglutaminases and their substrates in biology and human diseases: 50 years of growing. *Amino Acids*, 2009. 36(4):599-614.
7. Muszbek, L., Yee, V.C. and Hevessy, Z., Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res*, 1999. 94(5):271-305.
8. Iismaa, S.E., et al., Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiological reviews*, 2009. 89(3):991-1023.
9. Fickenscher, K., Aab, A. and Stuber, W., A photometric assay for blood coagulation factor XIII. *Thromb Haemost*, 1991. 65(5):535-40.
10. Karpati, L., et al., A modified, optimized kinetic photometric assay for the determination of blood coagulation factor XIII activity in plasma. *Clin Chem*, 2000. 46(12):1946-55.
11. Alshehri, F.S.M., Whyte, C.S. and Mutch, N.J., Factor XIII-A: An Indispensable "Factor" in Haemostasis and Wound Healing. *Int J Mol Sci*, 2021. 22(6).
12. Schwartz, M.L., et al., The subunit structures of human plasma and platelet factor XIII (fibrin-stabilizing factor). *J Biol Chem*, 1971. 246(18):5851-4.
13. Greenberg, C., Sane, D. and Lai, T., Factor XIII and fibrin stabilization. *Hemostasis and thrombosis*, 2006:317-466.
14. Schwartz, M.L., et al., Human Factor XIII from plasma and platelets. Molecular weights, subunit structures, proteolytic activation, and cross-linking of fibrinogen and fibrin. *J Biol Chem*, 1973. 248(4):1395-407.

15. Katona, É., et al., A simple, quick one-step ELISA assay for the determination of complex plasma factor XIII (A2B2). *Thrombosis and haemostasis*, 2000. 83(02):268-273.
16. Yee, V.C., et al., Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(15):7296-300.
17. Weiss, M.S., Metzner, H.J. and Hilgenfeld, R., Two non-proline cis peptide bonds may be important for factor XIII function. *FEBS letters*, 1998. 423(3):291-296.
18. Ambrus, A., et al., Calcium binding of transglutaminases: a ⁴³Ca NMR study combined with surface polarity analysis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2001. 19(1):59-74.
19. Buluk, K., [An unknown action of blood platelets; preliminary communication]. *Pol Tyg Lek (Wars)*, 1955. 10(6):191.
20. Luscher, E.F., [Fibrin-stabilizing factor from thrombocytes]. *Schweiz Med Wochenschr*, 1957. 87(39-40):1220-1.
21. Muszbek, L., et al., Factor XIII of blood coagulation in human monocytes. *Thromb Res*, 1985. 37(3):401-10.
22. Adany, R., et al., Identification of blood coagulation factor XIII in human peritoneal macrophages. *Eur J Cell Biol*, 1985. 38(1):171-3.
23. Adany, R. and Bardos, H., Factor XIII subunit A as an intracellular transglutaminase. *Cell Mol Life Sci*, 2003. 60(6):1049-60.
24. Al-Jallad, H.F., et al., Transglutaminase activity regulates osteoblast differentiation and matrix mineralization in MC3T3-E1 osteoblast cultures. *Matrix Biol*, 2006. 25(3):135-48.
25. Nurminskaya, M. and Kaartinen, M.T., Transglutaminases in mineralized tissues. *Front Biosci*, 2006. 11:1591-606.
26. Myneni, V.D., Hitomi, K. and Kaartinen, M.T., Factor XIII-A transglutaminase acts as a switch between preadipocyte proliferation and differentiation. *Blood*, 2014. 124(8):1344-53.
27. Orosz, Z.Z., et al., Cellular Factor XIII, a Transglutaminase in Human Corneal Keratocytes. *Int J Mol Sci*, 2019. 20(23):5963.
28. Poon, M.C., et al., Hemopoietic origin of factor XIII A subunits in platelets, monocytes, and plasma. Evidence from bone marrow transplantation studies. *J Clin Invest*, 1989. 84(3):787-92.

29. Kaetsu, H., et al., Expression and release of the a and b subunits for human coagulation factor XIII in baby hamster kidney (BHK) cells. *J Biochem*, 1996. 119(5):961-9.
30. Inbal, A., et al., Platelets but not monocytes contribute to the plasma levels of factor XIII subunit A in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2004. 15(3):249-53.
31. Cordell, P.A., et al., Association of coagulation factor XIII-A with Golgi proteins within monocyte-macrophages: implications for subcellular trafficking and secretion. *Blood*, 2010. 115(13):2674-81.
32. Beckers, C.M.L., et al., Cre/lox Studies Identify Resident Macrophages as the Major Source of Circulating Coagulation Factor XIII-A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017. 37(8):1494-1502.
33. Nagy, J.A., Henriksson, P. and McDonagh, J., Biosynthesis of factor XIII B subunit by human hepatoma cell lines. *Blood*, 1986. 68(6):1272-9.
34. Hurjak, B., et al., N-glycosylation of blood coagulation factor XIII subunit B and its functional consequence. *J Thromb Haemost*, 2020. 18(6):1302-1309.
35. Sourì, M., Kaetsu, H. and Ichinose, A., Sushi domains in the B subunit of factor XIII responsible for oligomer assembly. *Biochemistry*, 2008. 47(33):8656-64.
36. Katona, E., et al., Interaction of factor XIII subunits. *Blood*, 2014. 123(11):1757-63.
37. Uitte de Willige, S., et al., The pleiotropic role of the fibrinogen gamma' chain in hemostasis. *Blood*, 2009. 114(19):3994-4001.
38. Lorand, L. and Konishi, K., Activation of the Fibrin Stabilizing Factor of Plasma by Thrombin. *Arch Biochem Biophys*, 1964. 105:58-67.
39. Lorand, L., et al., Human plasma factor XIII: subunit interactions and activation of zymogen. *Methods Enzymol*, 1993. 222:22-35.
40. Byrnes, J.R. and Wolberg, A.S., Newly-Recognized Roles of Factor XIII in Thrombosis. *Semin Thromb Hemost*, 2016. 42(4):445-54.
41. Greenberg, C.S. and Miraglia, C.C., The effect of fibrin polymers on thrombin-catalyzed plasma factor XIIIa formation. *Blood*, 1985. 66(2):466-469.
42. Naski, M.C., Lorand, L. and Shafer, J.A., Characterization of the kinetic pathway for fibrin promotion of. alpha.-thrombin-catalyzed activation of plasma factor XIII. *Biochemistry*, 1991. 30(4):934-941.
43. Shemirani, A.H., et al., The combined effect of fibrin formation and factor XIII A subunit Val34Leu polymorphism on the activation of factor XIII in whole plasma.

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2006. 1764(8):1420-1423.
44. Credo, R., Curtis, C. and Lorand, L., Ca²⁺-related regulatory function of fibrinogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1978. 75(9):4234-4237.
 45. Lorand, L., Credo, R. and Janus, T., [27] Factor XIII (fibrin-stabilizing factor), in *Methods in enzymology*. 1981, Elsevier, 333-341.
 46. Muszbek, L., Haramura, G. and Polgár, J., Transformation of cellular factor XIII into an active zymogen transglutaminase in thrombin-stimulated platelets. *Thrombosis and haemostasis*, 1995. 73(04):702-705.
 47. Muszbek, L., Polgár, J. and Boda, Z., Platelet factor XIII becomes active without the release of activation peptide during platelet activation. *Thrombosis and haemostasis*, 1993. 69(03):282-285.
 48. Polgar, J., Hidasi, V. and Muszbek, L., Non-proteolytic activation of cellular protransglutaminase (placenta macrophage factor XIII). *Biochem J*, 1990. 267(2):557-60.
 49. AbdAlla, S., et al., Factor XIIIa transglutaminase crosslinks AT1 receptor dimers of monocytes at the onset of atherosclerosis. *Cell*, 2004. 119(3):343-54.
 50. Lorand, L., Konishi, K. and Jacobsen, A., Transpeptidation mechanism in blood clotting. *Nature*, 1962. 194:1148-9.
 51. Sakata, Y., Mimuro, J. and Aoki, N., Differential binding of plasminogen to crosslinked and noncrosslinked fibrins: its significance in hemostatic defect in factor XIII deficiency. *Blood*, 1984. 63(6):1393-401.
 52. Mosesson, M.W., Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost*, 2005. 3(8):1894-904.
 53. Francis, R.T., McDonagh, J. and Mann, K.G., Factor V is a substrate for the transamidase factor XIIIa. *J Biol Chem*, 1986. 261(21):9787-92.
 54. Bendixen, E., Borth, W. and Harpel, P.C., Transglutaminases catalyze cross-linking of plasminogen to fibronectin and human endothelial cells. *J Biol Chem*, 1993. 268(29):21962-7.
 55. Borth, W., et al., Lipoprotein (a) is a substrate for factor XIIIa and tissue transglutaminase. *J Biol Chem*, 1991. 266(27):18149-53.
 56. Lynch, G.W., et al., Characterization of thrombospondin as a substrate for factor XIII transglutaminase. *J Biol Chem*, 1987. 262(4):1772-8.

57. Fesus, L., et al., Transglutaminase-sensitive glutamine residues of human plasma fibronectin revealed by studying its proteolytic fragments. *Eur J Biochem*, 1986. 154(2):371-4.
58. Cohen, I., et al., Factor XIIIa-catalyzed cross-linking of platelet and muscle actin. Regulation by nucleotides. *Biochim Biophys Acta*, 1980. 628(3):365-75.
59. Cohen, I., et al., Fibrinogenase-catalyzed cross-linking of myosin from platelet and skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys*, 1979. 192(1):100-11.
60. Inbal, A. and Muszbek, L., Coagulation factor deficiencies and pregnancy loss. *Semin Thromb Hemost*, 2003. 29(2):171-4.
61. Hayano, Y., Imai, N. and Karasawa, T., [Studies on the physiological changes of blood coagulation factor XIII during pregnancy and their significance (author's transl)]. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 1982. 34(4):469-77.
62. Inbal, A., et al., Impaired wound healing in factor XIII deficient mice. *Thromb Haemost*, 2005. 94(2):432-7.
63. Duckert, F., Jung, E. and Shmerling, D.H., A hitherto undescribed congenital haemorrhagic diathesis probably due to fibrin stabilizing factor deficiency. *Thromb Diath Haemorrh*, 1960. 5:179-86.
64. Dardik, R., et al., Novel proangiogenic effect of factor XIII associated with suppression of thrombospondin 1 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(8):1472-7.
65. Dardik, R., et al., Factor XIII mediates adhesion of platelets to endothelial cells through alpha(v)beta(3) and glycoprotein IIb/IIIa integrins. *Thromb Res*, 2002. 105(4):317-23.
66. Noll, T., et al., Effect of factor XIII on endothelial barrier function. *J Exp Med*, 1999. 189(9):1373-82.
67. Nahrendorf, M., et al., Dual channel optical tomographic imaging of leukocyte recruitment and protease activity in the healing myocardial infarct. *Circ Res*, 2007. 100(8):1218-25.
68. Karimi, M., et al., Factor XIII Deficiency. *Semin Thromb Hemost*, 2009. 35(4):426-38.
69. Schroeder, V., et al., Congenital factor XIII deficiency in Switzerland: from the worldwide first case in 1960 to its molecular characterisation in 2005. *Swiss Med Wkly*, 2007. 137(19-20):272-8.
70. Katona, E.E., et al., Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J Immunol Methods*, 2001. 258(1-2):127-35.

71. Mitchell, J.L., et al., Functional factor XIII-A is exposed on the stimulated platelet surface. *Blood*, 2014. 124(26):3982-90.
72. Abaeva, A.A., et al., Procoagulant platelets form an alpha-granule protein-covered "cap" on their surface that promotes their attachment to aggregates. *J Biol Chem*, 2013. 288(41):29621-32.
73. Whyte, C.S., et al., Plasminogen associates with phosphatidylserine-exposing platelets and contributes to thrombus lysis under flow. *Blood*, 2015. 125(16):2568-78.
74. Agbani, E.O., et al., Coordinated Membrane Ballooning and Procoagulant Spreading in Human Platelets. *Circulation*, 2015. 132(15):1414-24.
75. Mattheij, N.J., et al., Coated platelets function in platelet-dependent fibrin formation via integrin α IIb β 3 and transglutaminase factor XIII. *Haematologica*, 2016. 101(4):427-36.
76. Estevez, B., et al., Signaling-mediated cooperativity between glycoprotein Ib-IX and protease-activated receptors in thrombin-induced platelet activation. *Blood*, 2016. 127(5):626-36.
77. Zwaal, R.F., Comfurius, P. and Bevers, E.M., Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochim Biophys Acta*, 1998. 1376(3):433-53.
78. Lentz, B.R., Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res*, 2003. 42(5):423-38.
79. Alberio, L., et al., Delayed-onset of procoagulant signalling revealed by kinetic analysis of COAT platelet formation. *Thromb Haemost*, 2017. 117(6):1101-1114.
80. Keuren, J.F., et al., Synergistic effect of thrombin on collagen-induced platelet procoagulant activity is mediated through protease-activated receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(7):1499-505.
81. Lee, R.H., Stefanini, L. and Bergmeier, W., Platelet signal transduction, in *Platelets*, A.D. Michelson, Editor. 2019, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 329-348.
82. Mui, P.T. and Ganguly, P., Cross-linking of actin and fibrin by fibrin-stabilizing factor. *Am J Physiol*, 1977. 233(3):H346-9.
83. Kasahara, K., et al., Impaired clot retraction in factor XIII A subunit-deficient mice. *Blood*, 2010. 115(6):1277-9.
84. Kattula, S., et al., Factor XIII in plasma, but not in platelets, mediates red blood cell retention in clots and venous thrombus size in mice. *Blood Adv*, 2018. 2(1):25-35.
85. Serrano, K. and Devine, D.V., Intracellular factor XIII crosslinks platelet cytoskeletal elements upon platelet activation. *Thromb Haemost*, 2002. 88(2):315-20.

86. Owens, A.P. and Mackman, N., Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res*, 2011. 108(10):1284-97.
87. Dale, G.L., Remenyi, G. and Friese, P., Quantitation of microparticles released from coated-platelets. *J Thromb Haemost*, 2005. 3(9):2081-8.
88. De Paoli, S.H., et al., Dissecting the biochemical architecture and morphological release pathways of the human platelet extracellular vesiculome. *Cell Mol Life Sci*, 2018. 75(20):3781-3801.
89. Gasecka, A., Nieuwland, R. and Siljander, P.R.-M., Platelet-derived extracellular vesicles, in *Platelets*, M. A.D., Editor. 2019, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands., 329-348.
90. Henriksson, P., et al., Identification of intracellular factor XIII in human monocytes and macrophages. *J Clin Invest*, 1985. 76(2):528-34.
91. Murtaugh, M.P., Arend, W.P. and Davies, P., Induction of tissue transglutaminase in human peripheral blood monocytes. *The Journal of experimental medicine*, 1984. 159(1):114-125.
92. Muszbek, L., et al., Monocytes of patients congenitally deficient in plasma factor XIII lack factor XIII subunit A antigen and transglutaminase activity. *Thrombosis and haemostasis*, 1988. 59(02):231-235.
93. Sarvary, A., et al., Possible role of factor XIII subunit A in Fcγ and complement receptor-mediated phagocytosis. *Cell Immunol*, 2004. 228(2):81-90.
94. Alshehri, F.S.M., et al., Monocytes Expose Factor XIII-A and Stabilize Thrombi against Fibrinolytic Degradation. *Int J Mol Sci*, 2021. 22(12):6591.
95. Kloc, M., Kubiak, J.Z. and Ghobrial, R.M., Macrophage-, Dendritic-, Smooth Muscle-, Endothelium-, and Stem Cells-Derived Foam Cells in Atherosclerosis. *Int J Mol Sci*, 2022. 23(22).
96. Weber, C. and Noels, H., Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*, 2011. 17(11):1410-22.
97. Minelli, S., Minelli, P. and Montinari, M.R., Reflections on Atherosclerosis: Lesson from the Past and Future Research Directions. *J Multidiscip Healthc*, 2020. 13:621-633.
98. Stary, H.C., et al., A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb*, 1994. 14(5):840-56.

99. Stary, H.C., et al., A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 1995. 92(5):1355-74.
100. Bergheanu, S.C., Bodde, M.C. and Jukema, J.W., Pathophysiology and treatment of atherosclerosis : Current view and future perspective on lipoprotein modification treatment. *Neth Heart J*, 2017. 25(4):231-242.
101. Gui, Y., Zheng, H. and Cao, R.Y., Foam Cells in Atherosclerosis: Novel Insights Into Its Origins, Consequences, and Molecular Mechanisms. *Front Cardiovasc Med*, 2022. 9:845942.
102. Poznyak, A.V., et al., Overview of OxLDL and Its Impact on Cardiovascular Health: Focus on Atherosclerosis. *Front Pharmacol*, 2020. 11:613780.
103. Chistiakov, D.A., et al., Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)*, 2017. 95(11):1153-1165.
104. Dubland, J.A. and Francis, G.A., So Much Cholesterol: the unrecognized importance of smooth muscle cells in atherosclerotic foam cell formation. *Curr Opin Lipidol*, 2016. 27(2):155-61.
105. Chellan, B., Sutton, N.R. and Hofmann Bowman, M.A., S100/RAGE-Mediated Inflammation and Modified Cholesterol Lipoproteins as Mediators of Osteoblastic Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells. *Front Cardiovasc Med*, 2018. 5:163.
106. Kwok, C.F., Juan, C.C. and Ho, L.T., Endothelin-1 decreases CD36 protein expression in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. 292(2):E648-52.
107. Adany, R., et al., Factor XIII of blood coagulation as a nuclear crosslinking enzyme. *Thromb Haemost*, 2001. 85(5):845-51.
108. Bhakdi, S., et al., Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(10):2348-54.
109. Alberio, L., et al., Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood*, 2000. 95(5):1694-702.
110. Aslan, J.E. and McCarty, O.J., Rho GTPases in platelet function. *J Thromb Haemost*, 2013. 11(1):35-46.

111. Podoplelova, N.A., et al., Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood*, 2016. 128(13):1745-55.
112. Haining, E.J., Nicholson, P.L.R. and Onselae, M.-B., GPVI and CLEC-2, in *Platelets*, M. A.D., Editor. 2019, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 213-226.
113. Dale, G.L., Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response. *J Thromb Haemost*, 2005. 3(10):2185-92.
114. Joist, J.H. and Niewiarowski, S., Retention of platelet fibrin stabilizing factor during the platelet release reaction and clot retraction. *Thromb Diath Haemorrh*, 1973. 29(3):679-83.
115. Mitchell, J.L. and Mutch, N.J., Novel aspects of platelet factor XIII function. *Thromb Res*, 2016. 141 Suppl 2:S17-21.
116. Kotova, Y.N., et al., Binding of Coagulation Factor XIII Zymogen to Activated Platelet Subpopulations: Roles of Integrin α IIb β 3 and Fibrinogen. *Thromb Haemost*, 2019. 119(6):906-915.
117. Nagy, B., Jr., et al., Binding of plasma factor XIII to thrombin-receptor activated human platelets. *Thromb Haemost*, 2009. 102(1):83-9.
118. Holme, P.A., Brosstad, F. and Solum, N.O., The difference between platelet and plasma FXIII used to study the mechanism of platelet microvesicle formation. *Thromb Haemost*, 1993. 70(4):681-6.
119. Dale, G.L., et al., Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature*, 2002. 415(6868):175-9.
120. da Silva, R.F., et al., Conversion of human M-CSF macrophages into foam cells reduces their proinflammatory responses to classical M1-polarizing activation. *Atherosclerosis*, 2016. 248:170-8.
121. Nagenborg, J., et al., Heterogeneity of atherosclerotic plaque macrophage origin, phenotype and functions: Implications for treatment. *Eur J Pharmacol*, 2017. 816:14-24.
122. Lee-Rueckert, M., et al., Lipid-Laden Macrophages and Inflammation in Atherosclerosis and Cancer: An Integrative View. *Front Cardiovasc Med*, 2022. 9:777822.
123. Romanic, A.M., et al., Factor XIIIa cross-links lipoprotein(a) with fibrinogen and is present in human atherosclerotic lesions. *Circ Res*, 1998. 83(3):264-9.

124. Kapusta, P., et al., Factor XIII expression within aortic valves and its plasma activity in patients with aortic stenosis: association with severity of disease. *Thromb Haemost*, 2012. 108(6):1172-9.
125. Gomez, D. and Owens, G.K., Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 2012. 95(2):156-64.
126. Tang, J., et al., Arterial Sca1(+) Vascular Stem Cells Generate De Novo Smooth Muscle for Artery Repair and Regeneration. *Cell Stem Cell*, 2020. 26(1):81-96 e4.
127. Allahverdian, S., et al., Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation*, 2014. 129(15):1551-9.
128. Bonetti, J., et al., Phenotypic Modulation of Macrophages and Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis-Nitro-Redox Interconnections. *Antioxidants (Basel)*, 2021. 10(4).
129. Torocsik, D., et al., Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. *Cell Mol Life Sci*, 2005. 62(18):2132-9.
130. Torocsik, D., et al., Factor XIII-A is involved in the regulation of gene expression in alternatively activated human macrophages. *Thromb Haemost*, 2010. 104(4):709-17.
131. Rios, F.J., et al., Oxidized LDL induces alternative macrophage phenotype through activation of CD36 and PAFR. *Mediators Inflamm*, 2013. 2013:198193.

TÁRGYSZAVAK

áramlási citometria

ateroszklerotikus plakk

habos sejtek

immun-elektronmikroszkópia

immunfluoreszcens mikroszkópia

makrofág

mikropartikula

oxidált LDL

transzglutamináz

trombocita aktiváció

XIII-as faktor

KEYWORDS

flow cytometry

atherosclerotic plaque

foam cells

immune-electron microscopy

immunofluorescent microscopy

macrophage

microparticle

oxidized LDL

transglutaminase

platelet activation

factor XIII

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek Prof. Dr. Muszbek László akadémikus úrnak, az alapképzés első éveitől kezdve nyújtott támogatásért, ösztönzésért és bizalomért. Hálásan köszönöm azt a szakmai tudást, amit átadott nekem és a rengeteg segítséget a kísérletes munkában, konferenciákra való felkészülésben, a publikációk és a disszertációm elkészítésében.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Bereczky Zsuzsannának, aki lehetőséget biztosított számomra, hogy a kutatómunkámat a Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszéken végezhessem.

Köszönet illeti Haramura Gizella és Bana Ágnes analitikusokat a módszerek elsajátításában nyújtott segítségért és a szakmai tanácsokért.

Köszönöm Dr. Szász István tudományos segédmunkatársnak a sejtes munkában való közreműködést.

Köszönöm a Laboratóriumi Medicina Intézet és a Klinikai Laboratóriumi Tanszék valamennyi munkatársának a támogatást és a segítséget.

Köszönetemet fejezem ki a Társszerzőknek a gondos munkáért, melynek eredményeképpen elkészültek a disszertációm alapját képező publikációk. Az áramlások citometriás kísérletekhez Prof. Dr. Kappelmayer János, Prof. Dr. Panyi György, Bekéné Dr. Debreceni Ildikó és Marco Cozzolino nyújtottak értékes segítséget. Az immun-elektronmikroszkópos vizsgálatok Prof. Dr. Antal Miklós és Kis Gréta segítségével történtek, a sejtek immunfluoreszcens analízisében Dr. Bárdos Helga szakértelmére számíthattam, míg a szöveti metszetek vizsgálatában Dr. Horváth Emőke nyújtott felbecsülhetetlen segítséget. Hálás vagyok Dr. Katona Évának és Dr. Baráth Barbarának az ELISA kísérletekben, valamint Dr. Balla Józsefnek és Pethő Dávidnak a simaizom sejteknek a tenyésztésében történő közreműködéséért. Köszönöm Prof. Dr. Nicola J. Mutchnak a szakmai konzultációt.

Végezetül köszönettel tartozom szüleimnek, testvéreimnek és a családom többi tagjának, hogy mindig bíztattak és a tanulmányaim során kitartottak mellettem. Az ő támogatásuk nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg.

A kutatómunka és a megjelent közlemények az alábbi pályázatok támogatásával készültek: OTKA K 109543, OTKA K 129287, GINOP 2.3.2-15-2016-00050, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009.

FÜGGELÉK

A függelék a hivatalos publikációs listát és a disszertáció alapjául szolgáló közlemények különlenyomatát tartalmazza.



Nyilvántartási szám: DEENK/83/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Somodi Laura
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Somodi, L.**, Horváth, E., Bárdos, H., Baráth, B., Pethő, D., Katona, É., Balla, J., Mutch, N. J., Muszbek, L.: Cellular FXIII in Human Macrophage-Derived Foam Cells.
Int. J. Mol. Sci. 24 (5), 1-12, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24054802>
IF: 6.208 (2021)
2. **Somodi, L.**, Bekéné Debreceni, I., Kis, G., Cozzolino, M., Kappelmayer, J., Antal, M., Panyi, G., Bárdos, H., Mutch, N. J., Muszbek, L.: Activation mechanism dependent surface exposure of cellular factor XIII on activated platelets and platelet microparticles.
J. Thromb. Haemost. 20 (5), 1223-1235, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jth.15668>
IF: 16.036 (2021)

További közlemények

3. Mezei, Z. A., Katona, É., Kállai, J., Bereczky, Z., **Somodi, L.**, Molnár, É., Kovács, B., Miklós, T., Ajzner, É., Muszbek, L.: Factor XIII levels and factor XIII B subunit polymorphisms in patients with venous thromboembolism.
Thromb. Res. 158, 93-97, 2017.
IF: 2.779

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 25,023

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 22,244

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

Debrecen, 2023.03.16.

