

## 2005.

A kísérletek során a FXIII-A expresszióját vizsgáltuk meg acut myeloid leukémiában és thrombocyta aktiváció során. Az előbbi vizsgálatok során azt találtuk, hogy az M4, M5 és M7 típusú AML-ekben a FXIII-A szenzitívebb marker mint a CD14 de chronikus myelomonocytás leukémiában a két marker szenzitivitása megegyező (Kappelmayer J et al. *Thromb Haemost*, 2005: 94: 454-9). A FXIII-A nem aktivált thrombocytákban kizárólag intracellulárisan detektálható, de thrombin vagy TRAP aktiváció hatására a thrombocyta felszínén is megjelenik FXIII-A. Ez az expresszió azonban csak hígított teljes vérben észlelhető, míg mosott thrombocytákon nem, így feltételezhető, hogy a plazma FXIII-A kötődéséről és nem az intracelluláris FXIII-A expressziójáról van szó. A FXIII-A a gátlási vizsgálatok alapján 50-60%-ban a GPIIb/IIIa komplex-hez kötődik (Nagy B Jr et al, előkészületben) illetve bemutatva poster formájában (ISTH meeting, 2005 Sydney megjelent absztrakt formában a *Journal of Thrombosis and Haemostasis*-ban).

Az ex vivo minták analízise során beállításra került a P-selectin Thr715Pro polimorfizmus melynek prevalenciáját és a szolubilis P-szelektinnel valamint a thrombocyta P-szelektinnel való asszociációját vizsgáljuk I-es és II-es típusú diabeteses populációban. Az eddig elvégzett mérések alapján úgy tűnik, hogy egészséges egyéneknél a korábbi irodalmi adatokhoz hasonlóan szignifikánsan alacsonyabb a szolubilis P-szelektin szintje, ezen polimorfizmus heterozigóta formájában, mint a vad típusban, míg a diabeteses populációban a mind a thrombocyta mind a szolubilis P-szelektin szint szignifikánsan emelkedett, függetlenül a genotípustól.

Az ex vivo vizsgálatok másik csoportjában coronaria stent beültetést követően vizsgáltuk 2-féle thrombocyta gátló kezelés hatását a thrombocyta aktivációra. Azt találtuk, hogy a P-szelektin expresszió szignifikánsan csökkent clopidogrel előkezelés esetén de mind az előkezelt mind az ad hoc csoportban normalizálódik 4 órán belül (Szik T et al, submitted to *Platelets*). Az állatkísérletes vizsgálatok megkezdődtek melyben a P-szelektin ligand (PSGL-1) knockout egerek thromboticus stimulussal kapcsolatos rezisztenciáját vizsgáltuk és immunhisztokémia illetve Westen-blot módszerekkel azt találtuk, hogy a fibrindepozíció kevésbé emelkedik knockout egerekben mind vad típusúakban (Miszti-Blasius et al Sydney poster, megjelent absztrakt formában a *Journal of Thrombosis and Haemostasis*-ban).

## 2006.

1. Különböző klinikai mintákon (coronaria stent beültetés utáni állapot és II-es típusú diabetes mellitus) vizsgáltuk a thrombocyta aktiváció mértékét és ennek összefüggését a klinikai képpel. A kardiológiai betegekben azt találtuk, hogy a stent beültetést követően igen jelentős vérlemezke aktiváció jön létre, melyet modulál az antitrombocyta kezelés. Ezen eredmények a tavalyi év során a *Platelets* című folyóiratban közlésre kerültek. A II. típusú diabetes esetén azt találtuk, hogy a 2005-ben beállított Thr 715 Pro polimorfizmus megléte igen jelentősen befolyásolja a solubilis P-selectin szintjét egészségesekben, méghozzá szoros korellációban a BMI-vel, de obezitásban és különösen II. típusú diabetesben a solubilis P-selectin szintje rendkívül magas lesz, melyre Thr 715 Pro megléte nincs hatással. Fenti eredményekből írt in extenso közleményt a *Thrombosis and Haemostasis* folyóiratba beküldtük, amelynek átdolgozását kérték és ezt jelenleg végezzük.

2. A XIII-as faktor (FXIII), mint a thrombocyták egyik fontos markerének vizsgálatát két területen folytattuk. Az egyik a különböző leukémiákban aberránsan megjelenő thrombocyta marker vizsgálata, melynek során azt találtuk, hogy acut lymphoid leukémiák (ALL) egy részében áramlási citometriai módszerekkel FXIII expresszió mutatható ki, melynek jelenlétét

konfokális lézes scanning mikroszkópiával, ELISA-val és Western-blottinggal is igazoltuk. Az erről szóló közlemény 2006 augusztusában jelent meg a *Thrombosis and Haemostasis*-ban. A FXIII expresszió megjelenését thrombocytá aktiváció során tovább vizsgáltuk különböző aktivációs reagensek (TRAP és thrombin) hatására. Az utóbbi hónapokban kollaborációs kísérletekben a FXIII thrombocytá kötődését vizsgáljuk különböző fibrinogének jelenlétében.

3. Állatkísérletes kutatásokban a 2005-ben megkezdett munkát folytatjuk és jelenleg folyik a P-selectin glykoprotein ligand 1 (PSGL-1) knock out és vad típusú egerek thrombus képződésnek kvantitálása különböző thrombocytá aktivációs stimulusok során.

Az OTKA pályázat során elnyert összeg egy kisebb részéből olyan kísérletekhez vásároltunk reagenst, melyek egy korábbi kutatási téma (akut myeloid leukémiák prognosztikai markerei) komplettálásához volt szükséges. Az erről szóló közlemény 2006. novemberében került elfogadásra a *Current Medical Chemistry*-ben.

## 2007.

1. Az ex vivo mintákon végzett analízisek közül a korábbi években megkezdett II. típusú diabetes mellitus-os betegekben származó minták esetén analizáltuk a thrombocytá és vörösvértest eredetű mikropartikulák abszolút számát és annak összefüggését a betegség lefolyásával és egyéb laboratóriumi és klinikai jellemzőkkel. A mikropartikulák vizsgálata terén elindítottunk egy pilot study-t, mely az aszpirin kezelés hatását vizsgálja a mikropartikulák számára és összetételére. Az aszpirin hatékonyságát PFA-100 analizátorral teszteltük. Az eredmények feldolgozása mindkét tanulmányból jelenleg folyamatban van.

A thrombocytá glikoprotein analízis terén korábbi években szerzett tapasztalatok alapján megvizsgáltuk a thrombocytá IIb és IIIa glikoproteinek mennyiségét Glanzmann thrombastheniás betegekben (Losonczy G. és munkatársai, *Haematologica*, 2007).

Az előző OTKA jelentésben leírtuk a P-selectin polimorfizmus és a szolubilis P-selectin vizsgálatával kapott eredményeket. E szerint a Thr715 Pro polimorfizmus megléte az alacsony BMI-vel rendelkező egészségesekben szignifikánsan modulálja a szolubilis P-selectin szintet, de emelkedett BMI esetén és II típusú diabetesben nem. Ezen eredményeket a *Thrombosis and Haemostasis* folyóiratban közöltük (Nagy B Jr. és munkatársai, *Thrombosis and Haemostasis*, 2007).

2. A XIII-as faktorról kapcsolatos kísérleteket két területen folytattuk. A korábbi beszámolóban leírtuk, hogy a FXIII-t aberráns fenotípusként azonosítottuk akut lymphoblastos leukémiákban. Ezen kívül az AML-ek utánvizsgálata során azt találtuk, hogy az AML M7 típusú (megakariocytás) leukémiában a valós megakarioblast arányt FXIII jelölődés és nem a GPIb vagy GPIIb jelölődéssel kapjuk. Ezen eredményekről szóló közlemény már online elérhető (Kiss F. és munkatársai, *Cytometry A*, 2007).

A FXIII-mal kapcsolatos további vizsgálatok során megállapítottuk, hogy aktivált thrombocytákon XIII-as faktor expresszió kizárólag plazmából való adszorpció révén jöhet létre és nem az intracelluláris FXIII-A sejt felszínén való megjelenése miatt. Jelenleg FXIII-at kötő és nem kötő fibrinogén variánsok felhasználásával kívánjuk tisztázni a thrombocytá FXIII expresszió további részletét.

3. A foszfataz és kináz gátlók szerepének vizsgálata során megállapítottuk, hogy a protein-foszfataz 1 és 2A (PP1 és PP2A) inhibitorainak (okadánsav, tautomycetin és calyculin) alkalmazásával a PP1 és PP2A egyidejű blokkolása hatékonyan gátolja a thrombocytá P-

selectin expressziót TRAP indukálta thrombocyták aktiváció során. Fenti eredményeket mind teljes vér, mind PRP közegben igazolni tudtuk.

4. A PSGL1 deficiens egértörzsben a korábbi években leírt thrombotikus stimulus (kollagén-adrenalin) hatását vizsgálva igazoltuk a hisztológiailag és Western blot-ban is igazoltuk a PSGL1 hiány protektív hatását. Az erről szóló kézirat jelenleg van összeállítás alatt.

Ugyanezen egértörzsen egy másik kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, hogy a PSGL1 hiánya milyen mértékben befolyásolja a G-CSF (Neupogen) általi myeloid sejt és thrombocyták mobilizációt.

A 2007-es évre előirányzott költség felhasználása a tervezettnél megfelelően történt, a november 22-i állás szerint 271.000 Ft maradvány mutatható ki. 2007. évben hat nemzetközi publikáció jelent meg, ebből három az OTKA témájában.

## **2008.**

Ex vivo mintákon végzett analízisek közül elvégeztük 30 db stent beültetett beteg esetében perifériás vérminták analízisét az alábbi thrombocyták aktivációs markerekre: thrombocyták P-selectin, solubilis P-selectin, CD63 expresszió, heterotipikus aggregátumok aránya, mikropartikula mennyiség. Fenti eredményeket korreláltattuk a betegek előzetes kezelési protokolljával (csak ASA, vagy ASA+clopidogrel).

A XIII-as faktorról (F XIII) kapcsolatos vizsgálatok során megállapítást nyert, hogy thrombocyták TRAP aktiválása, az FXIII expresszió fokozódásával jár. Azonban kimutattuk, hogy ez a plazmában lévő FXIII kötődése és nem az intracelluláris FXIII felszíni megjelenése miatt jön létre. Specifikus fibrinogén felhasználásával tisztáztuk az FXIII kötődés biokémiai jellemzőit.

Erről szóló kéziratunkat 2009. január 22-én a Thrombosis and Haemostasis folyóiratba megküldtük, melyben a bírálók minimális változtatást kértek.

A thrombocyták foszfatáz inhibitorokkal végzett kísérletek során PRP-ben bizonyítottuk, hogy az 1 és 2A típusú foszfatázoknak csak együttes gátlása hozza létre a thrombocyták aktiválás során észlelhető hatást. TRAP aktivált mintákon bizonyítottuk, hogy mind az aggregáció, mind a P-selectin expresszió dóziszfüggő módon gátlódik calyculin (CLA) hatására. Ugyanakkor nem aktivált mintákon azt találtuk, hogy a CLA dóziszfüggő módon alakváltozást hoz létre a thrombocytákban, mely aggregometriával, valamint áramlási citometriai fényszórás és antigén expressziós vizsgálatokkal bizonyítható volt.