

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A P-Szelektin Glikoprotein Ligand-1 szerepének
vizsgálata sejt-sejt interakcióban**

Dr. Miszti-Blasius Kornél

Témavezető:

Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2014

A P-Szelektin Glikoprotein Ligand-1 szerepének vizsgálata sejt-sejt interakcióban

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Klinikai Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Miszti-Blasius Kornél, általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Trombózis, Hemosztázis és Vaszkuláris betegségek programja) keretében

Témavezető: Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Dr. Nagy Kálmán, PhD
Dr. Reményi Gyula, PhD

A doktori szigorlat időpontja és helyszíne: 2014. március 12. 11:00 óra, DE ÁOK
Gyermecklinika könyvtára

Az értekezés bírálói:

Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktora
Dr. Rejtő László, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktora
Dr. Nagy Kálmán, PhD
Dr. Rejtő László, PhD
Dr. Reményi Gyula, PhD

Az értekezés védésének időpontja és helyszíne: 2014. március 12. 13:00 óra, DE ÁOK
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme.

BEVEZETÉS

A szelektin család

A lektinek több alcsoportra oszthatók a kapcsolódó partner kémiai tulajdonsága alapján, melyek az alábbiak: S-típusú (szabad tiol csoport), P-típusú (mannóz-foszfát), I-típusú (immunglobulin) és C-típusú (Calcium). A szelektinek a C-típusú lektinek alcsoportjába tartoznak és a vérlemezkék, illetve myeloid sejtek érfalhoz (és egymáshoz) történő kapcsolódását segítik. Minden szelektin tartalmaz egy lektin, egy epidermális növekedési faktor (EGF) domént, változó számú ismétlődő szakaszt, egy membránon átívelő - transzmembrán - szakaszt és egy citoplazmatikus részt.

A P-szelektin a szelektin család (P-, E-, L-szelektin) egyik tagja, melyet emberben és egerekben az 1-es kromoszómán található gén kódol. A P-szelektin biológiai funkciója sokáig nem volt tisztázott, de később felismerték, hogy az aktivált vérlemezkék és myeloid sejtek közti interakcióban, valamint az aktivált endothel sejtek és a neutrophyl granulocyták közti kapcsolódásban van jelentős szerepe. Az L-szelektin folyamatosan jelen van a fehérvérsejtek felszínén, bár a sejtfelszíni sűrűsége változhat agonisták és antagonisták hatására. Az E-szelektin csak az aktivált endothel sejtek felszínén jelenik meg. A P-szelektin pedig az aktivált vérlemezkék felszínén és endothel sejteken található. A szelektinek kölcsönhatásba léphetnek a ligandjukkal a nyirokerek, az endothel sejtek és fehérvérsejtek felszínén, így változatos sejt-sejt interakciókban játszanak központi szerepet

Mindhárom szelektin közös ligandja a P-szelektin glikoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162). Ezen a dimer szerkezetű molekulán a szénhidrátláncok megfelelő elrendeződése és szulfatációja elengedhetetlen a P- és L- szelektinhez történő kapcsolódáshoz.

A P-szelektin glikoprotein ligand-1 szerkezete és funkciója

A PSGL-1 molekula egy dimer mucin, mely folyamatosan jelen van a myeloid sejtek felszínén és a citoplazmatikus doménje a sejten belüli citoszkeletális hálózathoz kapcsolódik. A lektinek és receptoraik között gyorsan és reverzibilis módon alakulnak ki a kapcsolatok, ezzel megfelelő körülményeket teremtenek a fehérvérsejteknek az áramló vérben fellépő nyíróerők mellett a lelassuláshoz, gördüléshez („rolling”) és érpályából történő kilépéshez.

A sejtadhéziós molekulák szerepe különböző betegségekben

A thrombus képződés elengedhetetlen a sérüléseket követő vérzés elállításához, de a túlzott mértékű vérrög-képződés stroke-hoz, szívinfarktushoz, vagy érelmeszesedéshez vezethet, melyek a fejlett világban a vezető halálokok közé tartoznak. A vérlemezkék több útvonalon keresztül aktiválhatók állatkísérletekben egészen addig, amíg az ereket elzáró thrombus létrejön. A subendothelialis kollagénnel történő érintkezés játszik legtöbbször közre a thrombocyták aktiválásában és thrombotikus megbetegedésekben, olyan (fiziológiásan is jelenlévő) anyagokkal közreműködve, mint az adrenalin, ADP, vagy trombin. Az aktivált vérlemezkékben gyorsan mobilizálódik az alfa-granulumokból a P-szelektin, mellyel a neutrophyl granulocyták felszínén lévő PSGL-1 molekulához tudnak kapcsolódni és ezáltal „heterotipikus aggregátumok” alakulnak ki. A heterotipikus aggregátumok kialakulásában a PSGL-1 és a P-szelektin közti kölcsönhatás alapvető jelentőségű, mert a thrombocyták hozzákapcsolódnak az aktivált endothel sejtekhez, míg a fehérvérsejtek mozgása lelassul, így szintén hozzákapcsolódnak az aktivált vérlemezkékhez és endothel sejtekhez. A különböző betegségekben a sejtek közti interakciók megváltoznak.

Diabetes mellitusban szenvedő betegeknél magasabb a szolubilis P-szelektin mennyisége, mely utalhat a betegség súlyosságára. Tumoros megbetegedésekben a prognózis súlyossága és az áttét-képződés gyakorisága arányos a tumorsejtek által termelt mucin mennyiségével. A metasztázis képződést elősegíti a tumorsejt-vérlemezké-fehérvérsejt komplexből álló embólus kialakulása és ennek kölcsönhatása az endothel sejtekkel távoli szövetekben.

A hemopoietikus őssejtek mobilizációja

Fehérvérsejtek és hemopoietikus őssejtek (hematopoietic stem cell: HSC) csontvelőből történő mobilizációja manapság széles körben alkalmazott módszer mind az autológ, mind az allogén csontvelő transzplantáció esetén. A hemopoietikus őssejtek felszínén számos sejtadhéziós fehérje található: CXCR4 (chemokine C-X-C motif receptor 4), VLA-4 (Very Late Antigen-4), c-kit (tyrosine-protein kinase Kit, CD117), CD62L (L-szelektin) és CD44. A csontvelői stróma sejteken ezekkel komplementer receptorok találhatóak: SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), KL (kit ligand), PSGL-1, és HA (hyaluronsav). A granulocita kolóniastimuláló faktor (G-CSF) egy ismeretlen mechanizmuson keresztül a csontvelőben számos proteázt aktivál, melyek ezeket a receptor-ligand kötéseket (köztük az L-szelektin – PSGL-1 kapcsolatot) hasítják és ezáltal elősegítik, gyorsítják a hemopoietikus őssejtek bekerülését a perifériás vérbe.

CÉLKITŰZÉSEK

A PSGL-1 szerepe a thrombosisban

Munkánk első részében célunk volt egy állatkísérletes modellben mesterségesen thrombosit kiváltani és figyelni a PSGL-1 hiányos egerek túlélését a kontroll populációval szemben.

Ezen vizsgálatok során két kérdésre kerestük a választ:

- a PSGL-1 hiányának van-e hatása az egerek túlélésére thrombotikus stimulus hatására
- a PSGL-1 hiányában a heterotipikus aggregátumok száma, illetve a thrombusokkal, embolusokkal elzáródott erek száma különbözik-e a kontroll állatoktól

A PSGL-1 szerepe a fehérvérsejt mobilizációban

Munkánk második felében a PSGL-1 molekulának a myeloid sejteknek a csontvelőből történő mobilizációjában és az érpályából történő kilépésében játszott szerepét vizsgáltuk egerekben:

- arra kerestük a választ, hogy PSGL-1 hiányában indukált citopénia hatására milyen gyorsan kerülnek ki a myeloid sejtek az érpályából (fehérvérsejt elimináció)
- megvizsgáltuk, hogy indukált citopénia után spontán módon, illetve exogén G-CSF adagolásával milyen kinetikával mobilizálódnak a fehérvérsejtek

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérleti állatok jellemzése

C57B6/126 PSGL-1 vad típusú (WT-Wild Type) és knockout (KO) egereket az anyjuktól 4 hetes korukban választottuk le. Az állatokat a számukra ideális 12 óra sötét – 12 óra világos napi ciklusban 21°C-os körülmények közt tartottuk. Standard rágcsáló eledelt (VRF1 Charles River, Németország) és vizet korlátlanul fogyaszthattak. A kísérletek során 12-16 hetes állatokat használtunk fel, a vonatkozó jogszabályokat végig betartva. A kísérleti engedélyünk száma az alábbi volt: 1/2006 DE MÁB, 8/2011 DE MÁB.

Thrombosis kiváltása egerekben

Altatás után az egerek farokvénájába 15 µg kollagént (Collagen reagent Horm, Nycomed München, Németország) 3 µg adrenalinnal (Tonogen, Richter, Budapest) együtt juttattunk be („teljes” dózisú kísérlet). A műveletet „fél” dózisú kollagén-adrenalin beadásával is megismételtük. A harmadik percben az állatok retro-orbitalis vénájából vért vettünk és a 30. percig figyeltük az egerek túlélését. Utána az állatokat cervicalis dislocatioval elpusztítottuk.

Vérvétel és sejtszám meghatározás

150 mg/kg dózisú intraperitonealis ketaminnal (Calypsol, Richter, Budapest) történő altatás után 200 µL vért vettünk 40 µL ACD-t (Acid Citrate Dextrose) tartalmazó csőbe. A vérvétel az egerek retro-orbitalis plexusából történt 30 mm hosszú K₂-ETDA-val bevont üvegapillárisal.

A mintákat Siemens Advia-120 (Deerfield, IL) hematológiai automatával a Multi Species program használatával mértük le.

Fibrinogén és fibrin

Kereskedelmi forgalomban kapható egér fibrinogént (Sigma, St Louis, MO) használtunk, míg a fibrint mi állítottuk elő: 0,25 mg/mL fibrinogént, 150 mM NaCl – 10 mM TRIS (pH: 7,4) oldatot és 2 U/mL humán plazmából származó thrombint inkubáltunk 37°C-on 15 percig. Centrifugálás (13 500g, 4°C, 35 perc) után a felülúszót eltávolítottuk és a cső alján maradt oldatot SDS PAGE pufferben (62,5 mM TRIS-HCl, 2% SDS, 10% Glycerin, 0,1% Brómfenol kék, 5% Merkaptoetanol, pH: 6,5) melegítettük 10 percig.

Fibrin meghatározás a tüdőben

A tüdőket az eltávolításuk után 4°C-os extrakciós pufferbe helyeztük, melynek összetétele: 150 mM NaCl, 10 mM EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav), 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (Sigma), 10 U/mL aprotinin (Richter, Budapest), 100 U/mL heparin (Merckle GmbH, Ulm, Germany), 0,1 M epszilon-aminokapronsav (Pannonpharma, Pécsvárad, Hungary) és 10 mM Tris/HCl, pH 7,4. A mintákat folyékony nitrogénnel gyorsan lefagyasztottuk, majd -20°C-on tároltuk kis tartályokban a felhasználásig. A feldolgozás során a szöveteket 5 percre 37°C-os vízfürdőbe helyeztük, majd a kiolvadt szövetet 10 percre extrakciós pufferbe tettük (0,5 mL puffer/100 mg szövet) és utána mechanikailag homogenizáltuk. Ezután 4 órára jégre helyeztük a mintákat. A következő lépésben 4°C-on 30 percen keresztül centrifugáltuk (16 000 g), kétszer mostuk és 200 µL pufferben „vettük fel”.

Ezután 18 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk a mintát, majd szobahőn 30 percen keresztül centrifugáltuk (16 000 g).

A felülúszóhoz (mely a kivont fibrint tartalmazta) 5% merkaptóetanolt, 0,1% brómfenol kéket adtunk és 7,5%-os SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) poliakrilamid gél elektroforézis segítségével elválasztottuk az összetevőket és átvittük Immobilon P Transfer membránra (Millipore, Bedford, MA) az immunoblot vizsgálatokhoz. A fibrin(ogén) kimutatása során nyúlban termelt anti-humán fibrinogént (DAKO, Glostrup, Denmark) alkalmaztunk (mely keresztreagál az egér fibrin(ogén)-nel) 1:2 000 hígításban, majd ezt követően torna-peroxidáz jelölt anti-nyúl (R and D Systems, Minneapolis) antitestet. A sávokat kemilumineszcens reakcióval tettük láthatóvá (Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare, Milwaukee). A fibrinogén és fibrin kvantitálásánál egyenlő tömegű tüdőszövet optikai denzitását vizsgáltuk úgy, hogy a denzitométer által detektált jel erősségét a különböző minták aktintartalmára normalizáltuk.

Szövetek feldolgozása hisztológiai és immunhisztokémiai vizsgálatokhoz

A fénymikroszkópos vizsgálatokhoz a szöveteket Sainte-Marie oldatban fixáltuk és paraffinba ágyasztuk. Immunhisztokémiai vizsgálatokhoz az 5 mikrométer vastagságú metszeteket deparaffináltuk, rehidráltuk és antigén feltárást végeztünk nagy nyomáson kuktában (120 °C, 3 perc) antigén feltáró oldattal (pH 6,0, DAKO, Glostrup, Denmark). Ezután következett szobahőn az endogén peroxidáz blokkolása 1%-os H₂O₂ -t tartalmazó metanol oldattal 30 percig. Három százalékos tejet tartalmazó háttérfestést csökkentő oldattal (background reducing solution, DAKO) történő kezelés után 1:40 hígítású mAB350 (American Diagnostica, Stamford, CT) fibrin-specifikus antitesttel inkubáltuk a szöveteket egy órán keresztül szobahőn. Foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS: Phosphate Buffered Saline) történő mosás után a reakció előhívása biotinmentes EnVision detection kit (DAKO) felhasználásával történt.

A trombin lerakódását a tüdőszövetben úgy kvantitáltuk, hogy minden csoportban 4 egénnél, 40-szeres nagyítású objektívvel 12 véletlenszerűen kiválasztott látótérben megszámoltuk az elzáródott erek számát.

A Masson-festés során deparaffináltuk a metszeteket, majd végeztünk egy magfestést hematoxilinnal. Ezután savas fuxinnal (A-oldat) megfestettük a citoplazmát, majd a ferri-kloridból (B-oldat) és foszfomolibdénsavból (C-oldat) álló festékekkel a kollagént és a fibrin(ogén)t.

Thrombocyta-fehérvérsejt aggregátumok detektálása

Áramlási citometriai mérések során 50 µL ACD-vel antikoagulált vért jelöltünk patkányból származó anti-egér CD14 PE (fikoeritrin) és CD41 FITC (fluoreszcein-izotiocianát) antitesttel (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA). A CD41 a vérlemezkék, míg a CD14 elsősorban a monocyták azonosítására szolgált.

A fehérvérsejt populációkat az SSC-FL2 fényszórás alapján különítettük el és a heterotipikus aggregátumokat a CD41 fluoreszcens jel alapján azonsítottuk. A heterotipikus aggregátumok kialakulását 15 perces, 37°C-os 10 µmol/L koncentrációjú TRAP (thrombin receptor activating peptide) kezeléssel serkentettük. Az aggregátum-képződés gátlását vizsgáló kísérletben 2 µg/mL patkányban termelt egér PSGL-1 ellenes antitest hozzáadásával blokkoltuk fehérvérsejtek és vérlemezkék közti kapcsolódást.

Indukált citopeniát követő sejtmobilizáció G-CSF kezelés hatására

Vad típusú és PSGL hiányos hím, 12-16 hetes egereket Halothannal (Sigma-Aldrich, St Louis) elaltattunk és 250 mg/kg cyclophosphamidot (Endoxan, Baxter, Illinois) adtuk be intraperitonealisan, hogy elérjük a cytopeniát.

Ezután naponta kétszer subcutan 7,8 µg/kg dózisú G-CSF (Neupogen, Amgen, Thousand Oaks, CA) kezelést indítottunk négy napon keresztül.

Az őssejtek áramlási citometriai vizsgálata

A mobilizált őssejtek perifériás vérben történő megjelenését patkányban termelt egér CD34/CD162/CD45 és CD34/CD117/CD45 ellenes antitestekkel detektáltuk. A CD162 és CD117 ellenes antitest R-fikoeritrinnel (R-PE), a CD34 fluoreszcein isotiocianáttal (FITC), a CD45 peridinin-klorofill fehérje (PerCP) fluorofórral volt jelölve és a BD Pharmingen-től (Becton Dickinson, Franklin Lakes) származott. A méréseket BD FACSCalibur áramlási citométerrel végeztük és az adatokat CELLQuest 3.2 (Becton Dickinson, Franklin Lakes) programmal elemeztük.

Immunhisztokémiai vizsgálatok femur metszeteken

A kísérleti állatokból eltávolítottuk a femurt az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz. A combcsontokat 1 napos Sainte-Marie oldattal történő fixálás után 10%-os EDTA (pH 7,2) (Solon, Ohio) oldatban tároltuk két hétig. A dekalcifikált és dehidratált szöveteket 54 °C-os paraffinba ágyasztuk és 5-6 µm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket zselatinnal bevont tárgylemezre helyeztünk és egy éjszakán át 37 °C -on hagytunk.

A CD34+ sejtek azonosításához a metszeteket deparaffináltuk xilollal és hidráltuk leszálló alkoholsorban. A metszetek rehidrációját követően mintáinkat 0,5% H₂O₂ –t tartalmazó abszolút metanollal kezeltük az endogén peroxidáz aktivitás blokkolása végett. PBS-sel történő mosás után a metszeteket 2%-os BSA-t tartalmazó PBS oldatban inkubáltuk 37 °C-on 30 percig nedveskamrában, hogy minimalizáljuk a nonspecifikus festődést.

Ezután következett az 1:75 hígítású nyúlban termelt egér CD34 ellenes antitesttel (Chemicon, Temecula, CA) történő jelölés egy órán keresztül 37 °C-on. PBS-sel történő rövid mosás után a mintákat egy órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten az 1:200 hígítású (0,1% BSA-t tartalmazó PBS-sel) biotinkonjugált nyúl ellenes szekunder antitesttel (Vectastain Elite ABC Kit, Vector, Burlingame, CA). Ezután a metszeteket 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk streptavidin-biotin peroxidáz komplex-szel (Vectastain Elite ABC Kit, Vector). PBS-sel történő mosás után a reakciót a Vector Peroxidase Substrat Kit-tel tettük láthatóvá. PBS-sel történő mosás után a metszeteket desztillált vízzel leöblítettük és lefedtük.

Granulocyta-macrophag kolónia esszé

Exterminációt követően az egerek combcsontját aseptikus körülmények között eltávolítottuk, majd a csontvelőt steril injekciós tű és fecskendő segítségével 1mL McCoy's 5A médiummal egy kémcsőbe kimostuk, majd Ficoll gradiens segítségével szeparáltuk a mononukleáris sejteket.

A perifériás vérben a granulocyták és macrophagok közös előalakjai morfológiai vizsgálatokkal nem azonosíthatók, így kimutatásukra funkcionális kolónia esszé módszert alkalmazunk. Az egerek retro-orbitális plexusából nyert vérét 50 IU heparint tartalmazó Eppendorf-csőbe gyűjtöttük, majd PBS-sel kétszeresére hígítottuk. Ezt követően azonos térfogatú Ficoll-ra rétegeztük és 15 percig 400 g-n centrifugáltuk.

A sűrűség gradiens alapján elkülönülő mononukleáris sejteket tartalmazó gyűrűt leszívtuk, a sejteket PBS-sel átmostuk (10 perc centrifugálás 400g-n). A felülúszót eltávolítottuk, és a sejteket 1 ml McCoy's 5A médiumba (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) felvettük. Perifériás vérből szeparált sejtek esetén 6×10^5 /ml sejtet, csontvelőből származó sejtek esetén 1×10^5 /ml sejtet szélesztettünk egy-egy Petri-csészébe.

A granulocyta-macrophag progenitorok (GM-CFU: colony forming unit-granulocyte–macrophage) túlélését és proliferációját in vitro a G-CSF, GM-CSF és interleukin-3 citokineket nagy mennyiségben tartalmazó WEHI-3B kondicionált médium hozzáadásával érték el. A lágy gél közeget az 1,2%-os metilcellulóz biztosította.

A sejt kultúrák duplikátumban 7 napon keresztül CO₂ termosztátban 37 °C-on, 100%-os páratartalom mellett 5% szén-dioxidot tartalmazó légkörben növekedtek.

Kolóniának tekintettünk minden olyan sejtcsoportot, mely sztereomikroszkóp alatt vizsgálva (Olympus, Hamburg, Germany) legalább 50 sejtből állt.

Statisztikai elemzések

Az egerek thrombotikus stimulus hatására bekövetkező elhullásánál Chi-négyzet tesztet, az elzáródott erek számánál egyszempontos ANOVA elemzést, a sejtszám meghatározásnál Student-féle t-tesztet használtunk.

A sejtmobilizációs kísérleteknél a Gaussi-eloszlást mutató adatoknál a Student-féle t-tesztet, a nem parametrikus eloszlás esetén a Mann Whitney-tesztet alkalmaztuk a GraphPad Prism 4.0 program (La Jolla, CA) segítségével.

EREDMÉNYEK

A PSGL-1 hiány protektív hatása a thrombosit kiváltó stimulusokkal szemben

Összesen 87 egéرنél vizsgáltuk a 30 perces túlélést a thrombosit kiváltó stimulus hatására. Teljes dózisú kollagén (15 μg) és adrenalin (3 μg) beadásakor 13 vad típusú egérből 8 (62%), illetve a KO törzsből 15 egérből 7 (47%) pusztult el 30 perc alatt ($p=0,476$). Felére csökkentett dózisú kollagén (7,5 μg) és adrenalin (1,5 μg) hatására sokkal markánsabb különbség jelentkezett a túlélésben: a vad típusú állatoknál 30 egérből 15 pusztult el (50%), míg a KO törzs esetén 29-ből csupán 3 (10%) ($p=0,002$).

Sejtszámok a túlélő állatokban

A kollagén és adrenalin együttes beadása dóziszfüggő citopéniát okozott. Teljes dózis alkalmazásakor mindkét egértörzsben szignifikáns thrombocytaszám csökkenést lehetett megfigyelni ($p<0,0001$) és a két csoport között nem volt különbség ($p=0,261$).

Ezzel ellentétben „fél-dózisú” thrombotikus stimulus alkalmazásakor a PSGL-/- törzsben a vérlemezkeshszám csökkenés szignifikánsan kisebb volt ($p=0,0325$) a kiindulási értékhez képest. A fehérvérsejtszám csökkenés hasonló mértékű volt a két törzsnél és függetlennek bizonyult az alkalmazott kollagén és adrenalin dózisától. Mivel a perifériás vérben a PSGL-1 hiányában az abszolút neutrophyl szám emelkedett, megvizsgáltuk 6 vad típusú és 9 KO egéرنél a jelenséget thrombotikus stimulus hatására. Kezelés előtt a KO egereknél háromszor magasabb volt az abszolút neutrophyl granulocyta szám, de a csökkenés mértékében nem volt különbség.

Trombin képződés és fibrin lerakódás a tüdőben

Szisztémás thrombosis során a tüdőben fibrin rakódik le, melyet Western-blot analízissel vizsgáltunk. Ehhez az egér fibrin(ogén)nel keresztreakciót adó poliklonális anti-humán antitestet használtunk, mely a fibrinogént és a fibrint is kimutatja. Kimutattuk, hogy thrombotikus stimulus hatására több fibrin rakódik le a vad típusú egértörzs egyedeiben, mint a KO egerekben.

A thrombusok morfológiai elemzése

Immunhisztokémiai (IHC) vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a tüdő érhalózatában számos thrombus keletkezett, illetve akadt el a thrombotikus stimulus után. Masson-trichrom festéssel vizsgálva a vad típusú egértörzsben sokkal több elzáródott eret találtunk, valamint a thrombusok mérete is nagyobb volt. A PSGL-1^{-/-} egereknél kevesebb és az ereket kevésbé kitöltő thrombust találtunk. Immunhisztokémiai vizsgálatokkal az érrögökben fibrint mutattunk ki az mAb350 jelű antitesttel, mely csak a (keresztkötött) fibrint mutatja ki és a fibrinogént nem. Ezzel a vizsgálattal is nagyobb volt az elzáródott erek aránya a PSGL-1^{+/+} törzsben.

Heterotipikus aggregátumok keletkezése

A vad típusú egerek neutrophyl granulocytái magas CD41 (Platelet Glycoprotein IIb) fluoreszcencia intenzitást mutattak TRAP stimuláció hatására, mert a vérlemezkék (vagy vérlemezke eredetű mikropartikulák) hozzájuk tapadtak. Ezt a hatást teljes mértékben gátolni lehetett anti-PSGL-1 blokkoló antitest használatával (ekkor a TRAP hatására nem emelkedett meg a neutrophyl granulocyták CD41 fluoreszcencia intenzitása).

A monocytáknál hasonló jelenséget lehetett tapasztalni, míg a lymphocytáknál semmiféle változás nem következett be TRAP hatására. A KO egértörzsben egyetlen fehérvérsejt populáció CD41 fluoreszcencia intenzitása sem változott meg TRAP hatására.

Fehérvérsejtek eliminációja a keringésből indukált citopénia során

Ciklofoszfamid kezelés hatására mindkét egértörzs fehérvérsejtszáma lecsökkent 80-90%-kal, de különböző kinetikával. A vad típusú egerekben minden fehérvérsejt populáció abszolút száma lecsökkent, míg a KO állatoknál az abszolút neutrophyl és monocyta szám az első nap emelkedett és csak a második napon kezdett el csökkenni. Mindkét egértörzs egyedeiben a harmadik napra csökkent le leginkább a fehérvérsejtszám. A sejtszámok a hatodik napon érték el a maximumot, de a KO egereknél az értékek szignifikánsan magasabbak voltak (a kiindulási sejtszám háromszorosa).

Spontán fehérvérsejt mobilizáció

A spontán fehérvérsejt mobilizáció során (az állatok nem kaptak G-CSF kezelést) az egyszeri dózisú ciklofoszfamid injekció beadása után hét nappal mindkét egértörzsben a kiindulási értéknél szignifikánsan magasabb neutrophyl és monocyta számot mértünk (n=7). A vad típusú egereknél az abszolút neutrophyl granulocyta szám a 7. napon 3,0 G/L volt, míg a KO egértörzsben sokkal magasabb (12,5 G/L). A monocyták esetén a legmagasabb sejtszámot a vad típusú egereknél a 7. napon, míg a KO egereknél a 11. napon lehetett megfigyelni. A korábban elhanyagolható mennyiségben jelenlévő atípusos neutrophyl granulocyták (prekurzor sejtek) száma szintén megemelkedett a 7. és 11. napon.

Az eosinophyl sejtek számának változása egy másfajta mintázatot mutatott: a 7. napon szinte detektálhatatlanul alacsony volt a mennyiségük, de egy kis késleltetéssel a 11. napra (különösen a KO egértörzsben) megemelkedett a számuk. A 7. napra morfológiailag atípusos neutrophyl granulocyták (prekurzor sejtek) jelentek meg, melyek az indukált citopénia előtt detektálhatatlanul alacsony mennyiségben voltak jelen.

G-CSF indukált fehérvérsejt mobilizáció

Az exogén G-CSF hatásának vizsgálatokor az egerek (n=15) a citopenia kiváltása után négy napon keresztül, naponta két alkalommal 7,8 µg/kg dózisban kaptak Neupogent (G-CSF). Négy órával az utolsó dózis után (a 7. napon) a neutrophyl granulocyták száma 28,3 G/L-re (vad típusú), illetve 47,7 G/L-re (KO) emelkedett, míg a monocyták száma 2,0 G/L (vad típusú), illetve 4,1 G/L (KO) értéket ért el. A neutrophylek, monocyták és eosinophyl sejtek abszolút száma a KO törzsben szignifikánsan emelkedett ($p < 0,05$ – $p < 0,0001$) a vad típusú egerekhez képest. A korábbi kísérletekkel összehasonlítva, exogén G-CSF kezelés hatására a neutrophylek és monocyták abszolút száma lényegesen magasabbra emelkedett, míg az eosinophylek számában nem lehetett megfigyelni ezt a különbséget. A spontán fehérvérsejt mobilizációhoz hasonlóan az eosinophyl sejtek számának emelkedése kis késleltetéssel, a 11. napon alakult ki.

CFU-GM vizsgálat a perifériás vérben és a csontvelőben

Kolónia-képző egységek vizsgálata során folyamatosan magasabb CFU-GM számot találtunk a KO egerek perifériás vérében. Átlagosan négyszer több CFU-GM fordult elő a KO egerek perifériás vérében, mint a vad típusú egerek mintájában.

Az ötödik napon kifejezett csökkenést lehetett megfigyelni a CFU-GM számban a KO egerek esetében, de még így is szignifikánsan magasabb volt a számuk, mint a vad típusú törzsben ($p < 0,01$).

A csontvelői cellularitást az összes mononukleáris sejt száma alapján határoztuk meg, ami a cyclophosphamide kezelés utáni első napokban csökkent, mivel a proliferáló progenitor sejtek károsodtak, illetve elpusztultak. A csontvelői sejtsűrűség tükrözi a csontvelő hemopoetikus aktivitását, habár a csontvelő regenerációjában a CFU-GM sejtek vesznek részt. A csontvelőben a 10^5 mononukleáris sejtre jutó CFU-GM kolóniák száma párhuzamosan csökkent mindkét egértörzsben az indukált citopénia hatására, de a számuk szignifikánsan magasabbra emelkedett a PSGL-1^{-/-} egerekben a harmadik napon ($p < 0,05$).

A CFU-GM kolóniák számának emelkedésével a combcsontra (femur) vonatkoztatott CFU-GM populáció száma szignifikánsan magasabbra emelkedett a 4. és 5. napon a PSGL-1^{-/-} egerekben.

Őssejtek vizsgálata perifériás vérben és csontvelőben

A kolónia képző egységek vizsgálatának eredményei egyezést mutattak a perifériás vérben keringő CD34⁺/CD117⁺ őssejtek számával, mivel utóbbiak mennyisége szignifikánsan magasabb volt az 5. napon a KO egértörzsben két színnel történő jelöléssel áramlási citometriai vizsgálatok során.

Áramlási citometriai vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a 7. napon a vad típusú egerekben az őssejtek száma a perifériás vérben jelentősen megemelkedett és ez összhangban volt a csontvelő immunhisztokémiai vizsgálatának eredményeivel.

MEGBESZÉLÉS

A PSGL-1 hiány védő hatása thrombotikus stimulusokkal szemben

A fehérvérsejtek, vérlemezkék és endothel sejtek közti interakciók fontos szerepet játszanak a thrombosis kialakulásában. A thrombocyták működését sejtadhéziós molekulák befolyásolják, melyek további thrombocytákkal, fehérvérsejtekkel, endothel sejtekkel, vagy az extracelluláris mátrixszal történő kapcsolódást segítik elő. Részletes vizsgálatok bizonyították, hogy P-szelektin hiányában csökken a fehérvérsejtek érfalhoz történő kitapadási képessége és a különböző stimulusokra bekövetkező thrombus képződés mértéke. A PSGL-1 hiányában a thrombotikus stimulusokra adott választ korábban nem vizsgálták részletesen, ezért módosítottunk egy korábbi thrombosis modellt, melyben kollagén+adrenalin stimulust használtak.

A korábbi tanulmányokban alkalmazott dózisban bejuttatva a kollagént és adrenalint nem találtunk számottevő különbséget vad típusú és PSGL-1 hiányos egerek válaszreakciójában. Amikor felére csökkentettük a thrombost kiváltó anyagok mennyiségét („fél” dózis), látványos különbséget tapasztaltunk a két egértörzs túlélésében. Teljes dózis alkalmazásakor a vad típusú egerek 62%-a pusztult el, míg a PSGL^{-/-} törzs egyedeinek a 47%-a. A felére csökkentett dózis alkalmazásával azt találtuk, hogy a vad típusú egerek 50%-a pusztult el, míg a KO egereknek csupán a 10%-a. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a nagyobb dózis elfedi a PSGL-1 hiányának védőhatását a thrombotikus stimulusokkal szemben.

A thrombocytaszám csökkenésében nem találtunk különbséget a két egértörzs között amikor teljes dózisú kollagént+adrenalint alkalmaztunk, de „fél dózis” beadásakor a vad típusú egerek vérlemezke számának csökkenése szignifikánsan nagyobb volt.

Ez felveti a lehetőségét, hogy a PSGL-1 molekulának fontos szerepe van a thrombus képződésben és a fehérvérsejt-vérlemezké interakcióban. A neutrophyl granulocyták száma a stimulus hatására mindkét törzsben szignifikánsan csökkent. Igazoltuk a korábbi megfigyeléseket, mely szerint a PSGL^{-/-} törzs egyedeinek perifériás vérében magasabb a neutrophyl granulocyták aránya.

A vérlemezkéket közvetlenül aktiváltuk az egerek farokvénájába fecskendezett kollagén+adrenalin injekcióval és ezzel kiváltottuk a szisztémás thrombosit. Az előzetes kísérleteink során megállapítottuk, hogy a mikrothrombusok leginkább a tüdőszövetben akadnak el, illetve rakódnak le (mivel a tüdőnek jó a vérellátása, kisebbek az erek és egy kicsit lassabb a keringés). Immunoblot vizsgálatokkal több fibrin találtunk a vad típusú törzsben és később ezt alátámasztottuk mikroszkópos vizsgálatokkal. Hematoxin-eozin, Masson festést, valamint fibrinre specifikus monoklonális antitestet (mAb350) alkalmazva is azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú egereknél több thrombus keletkezik és ezek teljesen, vagy nagy részben (70-80%) elzárják az ereket. A PSGL-1 hiányos állatokban az erek nem, vagy csak részlegesen záródtak el és szignifikánsan kevesebb volt a thrombotizált erek száma. Ez azt a hipotézist támasztja alá, mely szerint a PSGL^{-/-} állatokban a kisebb fibrin lerakódás a kevesebb thrombus képződésének a következménye.

A heterotipikus aggregátumok képződésének módja eltért a két állattörzsben. Annak igazolására, hogy ennek a háttérben valóban a PSGL-1 molekula áll, egy antitesttel leblokkoltuk a vad típusú egerek PSGL-1 receptorát és in vitro aktiváltuk a vérlemezkéket.

A blokkoló antitest hatására ugyanazt a mintázatot kaptuk, mint a KO egereknél és ezzel igazoltuk, hogy a thrombocytá-fehérvérsejt aggregátumok azért különböztek a két törzsben, mert a KO egerek nem rendelkeztek a PSGL-1 molekulával.

Annak ellenére, hogy az egereknek magasabb a thrombocyta száma, különböznek bizonyos szignalizációs útvonalak, mások a vér áramlási viszonyai, az általunk módosított thrombosis modell hasznos adatokat szolgáltatathat a humán thrombus képződés folyamatainak megértéséhez és egy olyan potenciális gyógyszer kifejlesztéséhez, mely blokkolná a P-szelektin és PSGL-1 közti kapcsolódást. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a PSGL-1 hiánya védőhatást biztosít a mesterségesen kiváltott thrombosis szemben. A hatás ennek a mucinnak a széleskörű jelenlétével és a sejtek közti interakciókban betöltött komplex funkciójával van összefüggésben. Szívinfarktuson átesett betegek reperfüziós károsodását csökkentette a P-szelektin, E-szelektin, illetve a PSGL-1 ellen termelt antitest alkalmazása, mert a fehérvérsejtek kevésbé tudtak az érfal mentén lelassulni és kilépni a károsodott szövetekhez. A vérlemezke-fehérvérsejt interakció és a következményes endothelsejt aktiváció fontos szerepet tölt be a thrombus képződésében. Ezek a klinikai adatok egyeznek a megfigyeléseinkkel, mely szerint a PSGL-1 blokkolásának védőhatása lehet az atherothrombotikus betegségekben.

A PSGL-1 hiány jelentősége a csontvelői őssejt mobilizációban

A csontvelőben az érett myeloid sejtek, illetve prekursor sejtek „horgonyzása”, majd perifériás vérbe kerülése receptor-ligand kölcsönhatások bonyolult együtthatasának a következménye.

Mindig a szervezet igényének megfelelően kerülnek ki az érett fehérvérsejtek, vagy az éretlenebb előalakok a perifériás vérbe. Az egyensúlyban lévő csontvelőből mindig annyi fehérvérsejt jut a keringésbe, amennyi elpusztul.

Egy fertőzés, vagy citosztatikus kezelés hatására a stimulált csontvelőből sokkal éretlenebb leukocyta előalakok is kikerülnek.

A receptor-ligand interakciókat részletesen vizsgálták, de még nem teljesen tisztázott, hogy ezek a kapcsolódások mennyire „túlbiztosítottak”, illetve minden kapcsolódás fontos-e ahhoz, hogy időben kerüljön ki a fehérvérsejt a csontvelőből a keringésbe. A P-szelektin hiányának jelentőségét korábban már leírták, ezért a kísérleteink során mi a ligandjának (PSGL-1) jelentőségét vizsgáltuk.

A PSGL-1 hiány kétféleképpen is befolyásolhatja a sejt-sejt interakciókat. Egyrészt megtalálható a csontvelőben az extracellularis mátrixban és ezáltal segíti a hemopoetikus őssejtek és progenitor sejtek horgonyzását (a felszínükön található L-szelektin segítségével).

Másrészt ez a dimer mucin segíti a myeloid sejtek kilépését az érpályából a szövetekbe. Az aktivált endothel sejtek P-szelektint és E-szelektint expresszálnak, melyek döntően meghatározzák a gördülő fehérvérsejtek és az érfal közti kapcsolódást. A fehérvérsejtek felszínén folyamatosan jelenlévő PSGL-1 molekula biztosítja a kapcsolatot a receptor és ligandja között.

Kísérleteink során bebizonyítottuk, hogy a PSGL-1 molekula hiányában a neutrophyl granulocyták és monocyták érpályából történő kilépése lassabb és emiatt tovább maradtak a keringésben amikor cyclophosphamiddal citopéniát váltottunk ki. Amikor egy egyszeri dózisú citosztatikummal blokkoltuk az új fehérvérsejtek képződését, akkor a KO törzs egyedeiben lassabban csökkent a fehérvérsejtszám, mint a vad típusú állatokban.

A különböző myeloid sejtek csontvelőből történő kikerülése változatos volt. A neutrophyl granulocyták és monocyták száma nagyon hasonló módon változott, akár történt exogén G-CSF adagolás, akár nem. A myeloid sejtek emelkedésének aránya mindkét kísérletsorozatban hasonló volt a két egértörzsben, de a myeloid sejtek abszolút száma magasabb volt a PSGL-1^{-/-} egerek esetén.

Az egyetlen különbség a két kísérletsorozat között az volt, hogy exogén G-CSF adagolása nélkül a monocyták a 11. napon érték el a maximális számukat, míg exogén G-CSF hatására már a 7. napon (hasonlóan a neutrophyl granulocytákhoz). Ennek hátterében az állhat, hogy a monocyták lassabban kerültek ki a csontvelőből, vagy még inkább az a jelenség, hogy hosszabb ideig maradtak a keringésben a PSGL-1 hiányában.

Az eosinophyl granulocyták a neutrophyl granulocytákhoz és monocytákhoz képest késleltetetten érték el a maximális számukat mindkét kísérletsorozatban és ezt az értéket nem befolyásolta a G-CSF adása. Az eosinophyl granulocyták főleg az emésztőrendszerben találhatóak, és a perifériás vérben a teljes fehérvérsejtszám 1-4%-át teszik ki, a számuk csökkenésének, vagy emelkedésének a kinetikája sokkal összetettebb mint a neutrophyl granulocytáké és számos egyéb faktor közrejátszhat ebben az eltérő kinetikában. A G-CSF nem hat közvetlenül az eosinophyl granulocytákra, de egyéb citokinek (IL-2, IL-3, IL-5 és IL-7) gyorsítják a kijutásukat a perifériás vérbe és ezáltal egy indirekt, késleltetett stimuláló hatást fejtenek ki. Korábbi kísérletek során megfigyelték, hogy P-szelektint, vagy E-szelektint tartalmazó felületen kevesebb eosinophyl szaporodik fel mint neutrophyl. Ezen kívül az eosinophylek kevesebb fehérvérsejt-fehérvérsejt interakcióban vesznek részt. Ahhoz, hogy ezeket az eredményeket megfelelően értelmezzük, ki kell emelni, hogy a korábbi kísérletekhez hasonlóan mi is alátámasztottuk, hogy in vitro körülmények között a G-CSF csökkenti a PSGL-1 sejtfelszíni expresszióját és adhézióját a P-szelektinhez. Emiatt elképzelhető, hogy abban a kísérletsorozatban, amelyikben exogén G-CSF adagolása történt a vad típusú egereknél (melyeknél jelen van a PSGL-1 molekula) nemcsak több sejtet mobilizáltunk a csontvelőből, hanem a sejtek tovább maradtak a keringésben, mivel elvesztették a sejtfelszíni PSGL-1 mennyiségük egy részét és kevésbé tudtak kötődni az érfalhoz.

Nemcsak az egereknél, hanem emberi mintákban is tapasztaltuk a PSGL-1 expresszió csökkenését exogén G-CSF hatására. A vad típusú egértörzs myeloid sejtjeinek felszínén csökkent a CD162 (PSGL-1) expresszió G-CSF hatására, de a lymphocyták esetén nem változott a CD162 mennyisége. Kis mértékben mindkét egértörzsnél csökkenhetett a fehérvérsejtek érpályából történő kikerülésének képessége, mert a G-CSF hatására csökkent a fontos sejtadhéziós molekulának, az L-szelektinnek is a sűrűsége a fehérvérsejtek felszínén.

A G-CSF másik hatása az volt, hogy az osteoblastok felszínén csökkentette az SDF-1 mennyiségét és ezáltal a szelektinek és ligandjaik kölcsönhatása megváltozott.

Az atípusos neutrophyl granulocytá prekurzorok száma szignifikánsan magasabb volt a KO egértörzsben, mint a vad típusú törzsben. Ezen sejtek számában nem volt különbség exogén G-CSF hatására. A G-CSF hatására megjelenő prekurzor sejtek vizsgálata alapvető fontosságú, ezért a kolóniaképző egységeket részletesen elemeztük a csontvelőben és a perifériás vérben. Ezzel párhuzamosan áramlási citometriai vizsgálatokat és immunhisztokémiai vizsgálatokat is végeztünk. A kolóniaképző egységek jelentős része elkötelezett - „lineage-restricted” - kolóniából állt.

Vizsgálataink során a perifériás vérben sokkal több CFU-GM kolóniát találtunk mint a csontvelőben az indukált citopéniás periódus alatt. Ebben az időszakban a csontvelőben a kolóniák száma mindkét törzsben emelkedett, de másfajta kinetikával. A PSGL-1^{-/-} állatokban több CFU-GM kolóniát találtunk a femurban. Noha a kolóniaképző esszék jól mutatják a progenitor sejtek mennyiségének a változását, a kolóniaképző sejtek nem azonosak a hemopoetikus őssejtekkel, viszont a csontvelő CFU-GM sejtjeinek mennyisége arányos a CD34/CD117 dupla pozitív sejtek mennyiségével. Az emberi őssejteket a CD45/CD34 dupla pozitivitásuk alapján azonosítják, amivel ki lehet zárni a keringő endothel sejteket.

Ez a megközelítés egerekben kevésbé használható, mert a vizsgálatok során a CD34 sejtfelszíni jelölődése változhat, ezért ilyenkor inkább a CD117/CD34 dupla pozitív események jelzik az őssejteket.

Korábbi tanulmányokhoz hasonlóan azt tapasztaltuk, hogy a sejt mobilizáció csúcspontján szignifikánsan több CD34/117 dupla pozitív progenitor sejtet találtunk a perifériás vérben, mint a kezelésben nem részesülő állatoknál („egyensúlyi állapot”), de ez csak a vad típusú egértörzsben volt megfigyelhető. Ezek az adatok összhangban álltak az immunhisztokémiai megfigyeléseinkkel, ahol a csontvelőben több CD34+ sejtet találtunk a vad típusú állatokban akár történt sejt mobilizáció, akár nem.

Ismeretes, hogy a PSGL-1 nemcsak közreműködik az érett fehérvérsejtek P-szelektinhez történő kötődésében, de ez az egyetlen ligandja a P-szelektinnek az éretlen CD34+ hemopoetikus progenitor sejteken. Ezeknek a nagyon éretlen sejteknek a felszínén lényegesen alacsonyabb az egyéb adhezív receptoroknak (CD44, CD49d) a sűrűsége és emiatt talán könnyebben kerülnek a keringésbe a PSGL-1 hiányában.

A blast- és őssejtek viszont lényegesen több adhezív receptort hordoznak a felszínükön, ami a PSGL-1 – szelektin horgonyzás hiányában egészen másfajta sejt mobilizációs kinetikát eredményez.

A kísérleteinkben alkalmazott G-CSF dózisa alacsonyabb volt, mint a más munkacsoportok által egerekben alkalmazott mennyiség. Az embereknél ajánlott dózis leggyakrabban 5-10 µg/kg között változik és a vizsgálataink során mi is ezt alkalmaztuk. A KO egereknél a neutrophyl granulocyták és monocyták számának emelkedése lényegesen kifejezettebb volt, mint a vad típusú állatoknál akár alkalmaztunk G-CSF kezelést, akár nem. A G-CSF kezelés PSGL-1 hiányában sokkal nagyobb mértékű myeloid sejt mobilizációt eredményezett.

Ennek a jövőben akár a humán terápiában is lehetne szerepe: ha sikerülne átmenetileg blokkolni a PSGL-1 és P-szelektin közti kötődést, akkor talán a nehezen mobilizáló betegeknél is sikeresebb lehetne az őssejt-gyűjtés, vagy kisebb dózisu G-CSF kezeléssel is hatékonyan lehetne mobilizálni a myeloid sejteket citosztatikus kezelés után és ezáltal csökkenteni lehetne a mellékhatásokat és a kezelés költségeit.

ÖSSZEFOGLALÁS

A gyulladás és érlemezés hátterében a vérlemezék, fehérvérsejtek és endothel sejtek közti interakció áll. A vérlemezék a különböző sejt felszíni receptoraikon keresztül, illetve szolubilis mediátorok által lehet aktiválni, melyek ezután központi szerepet játszanak a gyulladás kezdeti szakaszában és az endothel sejtek károsodásában. Ez a folyamat atherosclerotikus plakk kialakulásához vezethet, melynek következménye érelzáródás is lehet.

A szívinfarktus, ischaemiás stroke és thrombosis a vezető halálokok közé tartoznak a fejlett világban. Ezekben a betegségekben közös, hogy az aktivált thrombocyták felszínén megjelenik a P-szelektin, mely kölcsönhatásba léphet a fehérvérsejtekkel a PSGL-1 molekulán keresztül, így heterotipikus aggregátumok keletkeznek. Ugyanezen ligand által kapcsolódnak a leukocyták az endothel sejtekhez.

Kollagén és adrenalin együttes beadásával thrombotikus stimulust idéztünk elő állatkísérletes modellben és igazolni tudtuk, hogy a PSGL-1 hiányában az egerek túlélési esélyei jobbak.

Két különböző mikroszkópos módszerrel kimutattuk, hogy a kialakult thrombusok száma kevesebb és ezek a thrombusok kevésbé zárják el az ereket a PSGL-1^{-/-} egerekben. Ez a hatás a P-szelektin és PSGL-1 közti interakcióra vezethető vissza, mert ha blokkoltuk ezt a kapcsolódást, akkor kevesebb heterotipikus aggregátum keletkezett.

A P-szelektin és PSGL-1 közti kapcsolatnak a myeloid sejtek csontvelőből történő mobilizációjában, illetve az érpályából történő kilépésében is jelentősége van. Napjainkban a hemopoetikus őssejtek mobilizációja elképzelhetetlen lenne a különböző mobilizáló ágensek (G-CSF, GM-CSF, AMD-3100) nélkül. Munkánk során bizonyítottuk, hogy PSGL-1 hiányában a myeloid progenitor sejtek gyorsabban kerülnek ki a csontvelőből a perifériára. Cyclophosphamide kezelés után a granulocytá-macrophag kolóniaképző egységek (CFU-GM) száma is emelkedett a PSGL-1^{-/-} állatok combcsontjában és ezzel párhuzamosan a perifériás vérben is emelkedett a CD34+/CD117+ őssejtek száma. Az eredményeink arra utalnak, hogy PSGL-1 hiányában a G-CSF hatékonyabban emeli meg a myeloid sejtek abszolút számát a perifériás vérben a csontvelőből történő gyorsabb mobilizáció, a keringő őssejtek érésének serkentése és az érpályából történő lassabb kilépés által.

TÁMOGATÁSOK

Jedlik Ányos Doktorjelölti Ösztöndíj a konvergencia régiókban. A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



SZÉCHENYI TERV



Iktatószám: DEENKÉTK/27/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Miszti-Blasius Kornél

Neptun kód: AJ4XM4

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

Mtmt azonosító: 10034630

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Miszti-Blasius, K.**, Felszeghy, S., Kiss, C., Benkő, I., Géresi, K., Megyeri, A., Hevessy, Z., Kappelmayer, J.: P-selectin glycoprotein ligand-1 deficiency augments G-CSF induced myeloid cell mobilization.
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 387 (2), 109-118, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-013-0913-9>
IF:2.147 (2012)
2. Nagy, B., **Miszti-Blasius, K.**, Kerényi, A., Clemetson, K.J., Kappelmayer, J.: Potential therapeutic targeting of platelet-mediated cellular interactions in atherosclerosis and inflammation.
Curr. Med. Chem. 19 (4), 518-531, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/092986712798918770>
IF:4.07
3. **Miszti-Blasius, K.**, Beke Debreceni, I., Felszeghy, S., Dezső, B., Kappelmayer, J.: Lack of P-selectin glycoprotein ligand-1 protects mice from thrombosis after collagen/epinephrine challenge.
Thromb. Res. 127 (3), 228-234, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2010.11.022>
IF:2.44



További Közlemények

4. Kappelmayer J., **Miszi-Blasius K.**: Laboratóriumi vizsgálatok.
In: Urológia 2. átdolg. kiad. Szerk.: Tóth Csaba, Medicina, Budapest, 86-97, 2014.
5. Horváth K., **Miszi-Blasius K.**, Gyurina K., Szegedi I., Kiss C.: Herediter sphaerocytosis - A széles spektrumú betegség.
Gyermekgyógyászat. 64 (5), 217-220, 2013.
6. **Miszi-Blasius K.**, Esze R., Szegedi I., Kiss C., Kappelmayer J.: Diagnosztikai lehetőségek örökletes hemolitikus anémiákban.
Gyermekgyógyászat. 64 (5), 213-214, 2013.
7. Palicz, Z., Jenes, Á., Gáll, T., **Miszi-Blasius, K.**, Kollár, S., Kovács, I., Emri, M., Márián, T., Leiter, É., Pócsi, I., Csósz, É., Kalló, G., Hegedűs, C., Virág, L., Csernoch, L., Szentesi, P.: In vivo application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF).
Toxicol. Appl. Pharmacol. 269 (1), 8-16, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.02.014>
IF:3.975 (2012)
8. Kotán, R., Németh, N., Kiss, F., Pócsán, J., **Miszi-Blasius, K.**, Tóth, L., Furka, I., Mikó, I., Sápy, P., Szentkereszty, Z.: Micro-rheological changes during experimental acute pancreatitis in the rat.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 51 (4), 255-264, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2012-1531>
9. Németh, N., Kiss, F., Magyar, Z., **Miszi-Blasius, K.**, Furka, I.: Following-up hemorheological consequences of gonadectomy in male and female rats.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 50 (4), 231-243, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2011-1430>
10. **Miszi-Blasius K.**, Veszprémi A., Kissné S.V., Kappelmayer J.: A liquor fehérvérsejtszám és sejtösszetétel vizsgálatának algoritmus =Algorithm for the investigation of the white blood cell count and cell differentiation in cerebrospinal fluid.
Klin. Kísér. Lab. Med. 33 (2), 11-16, 2008.
11. Kappelmayer, J., Nagy, B., **Miszi-Blasius, K.**, Hevessy, Z., Setiadi, H.: The emerging value of P-selectin as a disease marker.
Clin. Chem. Lab. Med. 42 (5), 475-486, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2004.082>
IF:1.685

12. Nagy B., Veszprémi A., Kiss F., **Miszi-Blasius K.**, Kappelmayer J.: Thrombocyták aktiváltsági állapotának vizsgálata áramlási citometriai módszerekkel =Detection platelet activation status by flow cytometric methods.
Klin. Kísér. Lab. Med. 30, 46-53, 2003.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14.317

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 8.657

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.02.07

