

# A Mac-1 (CD11b/CD18) integrin szerepe a monocita-trombocita kapcsolatokban

Doktori tézisek

**Dr. Patkó Zsófia Panna**

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Acsády György egyetemi tanár  
Dr. Császár Albert egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Szollár Lajos egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Pécsvárady Zsolt egyetemi tanár  
Dr. Járai Zoltán főorvos

Budapest  
2012

## **Bevezetés**

A keringő fehérvérsejtek és vérlemezkék aktiváltsági állapotuktól függően aggregátumokat alkotnak. A kapcsolódás további aktivációhoz vezet, ennek eredményeképpen a leukocitákból és a trombocitákból felszabaduló citokinek fokozzák a gyulladásos folyamatot és a tromboziskészséget. A kapcsolódást számos tényező elősegítheti: ilyenek pl. a gyulladásos és protrombotikus mediátorok, hiperszenzitív reakciók, fertőzések, emelkedett vércukorszint, magas vérnyomás, obesitas, dohányzás és a nagy nyíróerők. A kölcsönhatások megismerése és az aggregátumok meghatározása új lehetőségeket jelent az atherotrombózis korai diagnosztikájában és terápiájában.

A monocita-trombocita komplexek két lépésben alakulnak ki. Az első, meghatározó lépés a P-selectin és ligandja közötti kapcsolat, ezt követően a komplex stabilizálódik a Mac-1 integrin segítségével. A P-selectin trombociták és endothelsejtek felszínén jelen levő adhéziós molekula, aktiváció hatására expressziója ugrásszerűen megnő. A P-selectinnek és ligandjának, a leukocita P-selectin glikoprotein ligandnak(PSGL-1, CD162) kötődése eddigi ismereteink

szerint alapvető fontosságú és sebességmeghatározó a leukocita-trombocita komplex kialakulása szempontjából. Második lépésként a komplex a monocitákon jelen levő CD18 integrin közreműködésével stabilizálódik, a kapcsolódás részleteit, és jelentőségét, illetve a folyamatban résztvevő molekulákat azonban eddig nem sikerült felderíteni. A CD18 integrin gátlása csökkent komplexképződéshez illetve a komplexek korai széteséséhez vezet.

## **Célkitűzés**

### ***1. A CD40 ligand és a Mac-1 kapcsolatának vizsgálata***

Az atheroszklerotikus plakk sejtes elemei, mint az endothel, a makrofágok és simaizomsejtek, mind a CD40-t mind a CD40 ligandot prezentálják. Ezeken a sejteken a CD40 ligand gyulladásszerű választ vált ki, megemelkedik a sejt felszíni adhéziós molekulák száma, a prokoaguláns és gyulladásszerű mediátorok, kötőszövetes matrixot bontó enzimek mennyisége. A CD40 ligand gátlása számottevően csökkenti az atheroszklerotikus plakk progresszióját. Freiburgi munkacsoportunk munkája során azonban a CD40L-nek egy a saját receptorától, a CD40-től független funkciójára derült

fény. Állatkísérletes modellünkben a CD40 knock out egerekben nem volt kisebb az érlelmeszesedés mértéke mint a kontrollcsoportban. A CD40 ligand gátlásával viszont sikerült visszaszorítani az érlelmeszesedés progresszióját, ami arra utal, hogy a CD40 ligand nem csak saját receptorán keresztül hat.

A CD40L szerkezeti hasonlóságot mutat a fibrinogénnel és kötődik annak trombocita receptorához, a GpIIb/IIIa-hoz. Az egyik lehetséges kapcsolódási partner ezért a fibrinogén leukocitákon található receptora, a Mac-1 (CD11b/CD18) integrin.

Vizsgálatunkban ezért a CD40 ligand és a Mac-1 integrin interakciójának vizsgálatát tűztük ki célul.

## ***2. A Mac-1 integrin szerepének vizsgálata a monocita - trombocita kapcsolatokban***

A keringésben a trombociták és leukociták kapcsolódásában a P-szelektin – PSGL-1 kapcsolatnak alapvető jelentősége van. Néhány vizsgálat azonban arra utal, hogy a szelektinek blokkolása nem gátolja meg teljes mértékben az aggregátumok képződését. Egyes mérési eredmények arra utalnak, hogy a Mac-1 (CD11b/CD18) integrin is részt vesz ebben a

kapcsolódásban: stabilizálja a leukocita-trombocita komplexeket, és ezért a funkcióért az integrin I doménje a felelős. Más környezetben, leukociták és az endothel imitáló, ICAM-ot prezentáló sejtek is alkothatnak heteroaggregátumokat, amelyek képződéséhez a szelektinek jelenléte nem feltétlenül szükséges.

Egyedi rendszerünkben, humán receptorok közül egyedül a Mac-1-et prezentáló CHO sejtekkel végzett vizsgálatunkban arra kerestük a választ, hogy a Mac-1 önállóan, szelektinek közvetítése nélkül is képes-e kapcsolatot létesíteni a trombocitákkal.

### ***3. A fibrinogén és a CD40 ligand szerepe a monocita-trombocita komplexek keletkezésében***

A monocita-trombocita komplexek képződésének vizsgálatakor felvetődött, hogy a fibrinogén, illetve esetleg más, nem azonosított molekulák jelenléte szerepet játszhat a kapcsolódásban, a folyamatban részt vevő receptorokat és a fibrinogénnek a komplex képződésben betöltött szerepét azonban nem sikerült tisztázni.

Vizsgálatunkban arra kerestük a választ, hogy a Mac-1 vizsgált ligandjai, a fibrinogén és a CD40 ligand részt vesznek-e a monocita-trombocita komplexek képződésében.

#### ***4. A Mac-1 integrin expressziójának és a monocita-trombocita aggregátumok szintjének vizsgálata 2 típusú diabéteszben***

Előrehaladott diabéteszben jelentősen megemelkedik a gyulladáshoz vezető mediátorok és a monocita-trombocita aggregátumok szintje. Vizsgálatunkban arra kerestük a választ, hogyan változik a gyulladást jelző paraméterek, a monocita-trombocita aggregátumok szintje és a Mac-1 expressziója korai, szövődésmenyes 2 típusú diabéteszben.

#### **Módszerek**

A Mac-1 (CD11b/CD18) integrin tanulmányozásához egyedi, a Mac-1-et prezentáló CHO (chinese hamster ovary) sejtvonalakat használtunk; egyik sejtvonalunk (CHO-Wt-Mac-1) az integrint konstitutívan inaktív formában, másik (CHO-del-Mac-1) az integrint konstitutívan aktivált formában prezentálták, kontrollként a kiindulási, az integrint nem tartalmazó CHO sejtvonalat alkalmaztuk.

Humán vizsgálatokhoz a vizsgált diabéteszes betegek illetve egészséges önkéntesek vérért citrátos csőbe gyűjtöttük, a trombocitadús plazmát centrifugálással, a trombocitákat gélfiltrációval nyertük, ADP-vel aktiváltuk. A monocitákat Ficoll-gradient centrifugálással izoláltuk, citometriás vizsgálatainkban CD14 pozitivitásuk alapján azonosítottuk, az aktivációt PMA-val végeztük.

A CD40 ligand illetve a trombociták sejtfelszínhez illetve monocitákhoz való kötődését áramlási citometriával, fluoreszcens jelölés (CD40L FITC, CD41 FITC) segítségével állapítottuk meg. A Mac-1 receptorhoz való kötődés specificitását anti-CD11b blokkoló antitesttel ellenőriztük. A fibrinogén és a CD40L szerepének tisztázására tisztított fibrinogént illetve rekombináns humán CD40 ligandot használtunk.

Adhéziós kísérleteinkben 96 lyukú ELISA lemezre vittük fel a Mac-1 ligandjait (fibrinogén, CD40L, ICAM-1), az aspecificus kötést agarózzal blokkoltuk. A CHO sejteket illetve monocitákat 37°C-on inkubálva hagytuk a felszínhez kötődni. A kötődés specificitásának megállapításához a sejteket

előzetesen gátló anti-CD11b antitesttel kezeltük. A kötődő sejtek mennyiségét permeabilizáló puffer hozzáadása után, 405 nm-en leolvasva számszerűsítettük.

A diabéteszes betegcsoporton végzett vizsgálatokba 14, nemdohányzó, diétával vagy per os antidiabetikummal kezelt 2 típusú diabéteszes beteget és 14 egészséges kontroll személyt vontunk be. Kizárási kritériumnak tekintettük az inzulinnal való kezelést, az anamnézisben szereplő koronáriabetegséget, anginát, malignus betegséget, infekciót, vese- illetve májbetegséget. A vizsgálat előtti 14 napon belül egyik vizsgálati alany sem részesült gyulladáscsökkentő vagy trombocitagátló kezelésben.

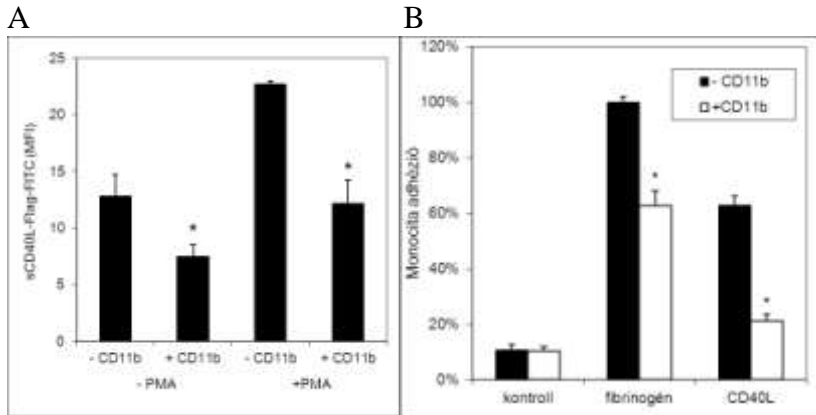
## **Eredmények**

### ***1. A CD40 ligand kapcsolódik a Mac-1 integrinhez.***

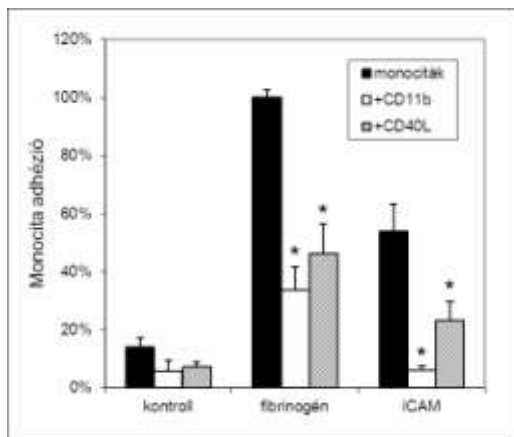
Áramlási citometriával és adhéziós vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a szolubilis CD40 ligand (sCD40L) kötődik a monocitákon és a CHO sejteken levő Mac-1 integrinhez. Előzetes CD40 liganddal történő inkubációt követően a fibrinogénre és az ICAM-1-re való kötődés is gyengébb volt,



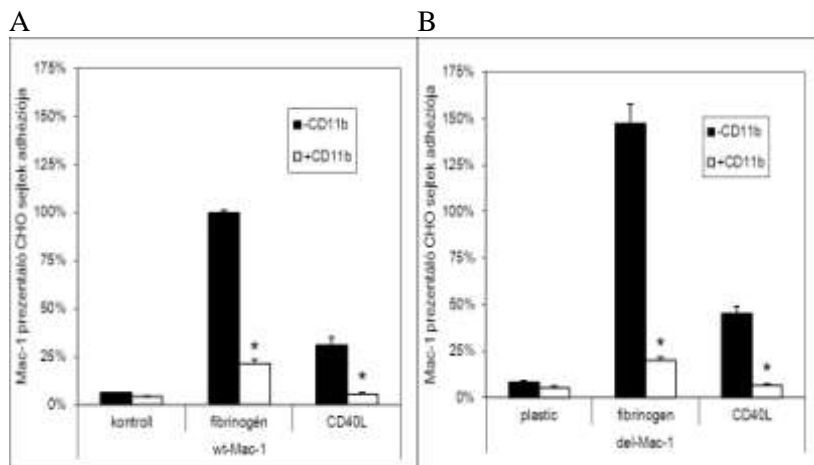
ami arra utal hogy a CD40 ligand az ismert ligandokkal azonos molekuláriszhez kapcsolódik és verseng azokkal a kötőhelyekért.



*1.A ábra: sCD40L kötődése monocitákhoz áramlási citometriával, PMA-val aktivált illetve nem aktivált monocitákon. \* $p < 0,05$  a CD11b-vel nem kezelt (-CD11b) monocitákhoz viszonyítva. 1.B: monociták kötődése immobilizált fibrinogénen és sCD40 ligandon, adhéziós vizsgálat. A kötődés specificitását mindkét vizsgálatban a Mac-1 gátló anti-CD11b antitesttel ellenőriztük. \* $p < 0,01$  a CD11b-vel nem kezelt monocitákhoz viszonyítva.*



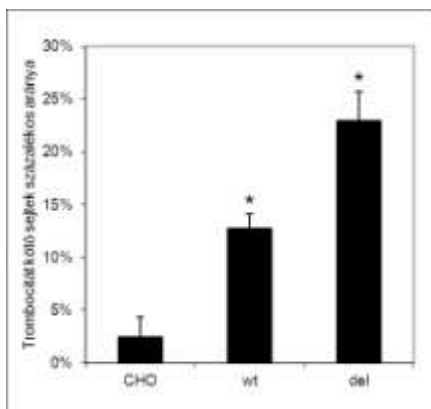
2. ábra: A CD40 ligand verseng a kötőhelyekért a fibrinogénnel és az ICAM-1-el. Kontrollként gátló anti-CD11b antitestet alkalmaztunk. \* $p < 0,05$  a kezeltlen monocitákhoz viszonyítva.



3.A ábra: aktiválatlan (wt) és 3B: aktivált (del) Mac-1-et prezentáló CHO sejtek adhéziója immobilizált sCD40 ligandon. Pozitív kontrollként fibrinogént, negatív kontrollként agarózzal bevont műanyag felületet használtunk. \* $p < 0,01$  a CD11b-vel nem kezelt sejtekhez viszonyítva.

## ***2. A Mac-1 integrin szelektinek közvetítése nélkül is képes kapcsolatot létesíteni a trombocitákkal.***

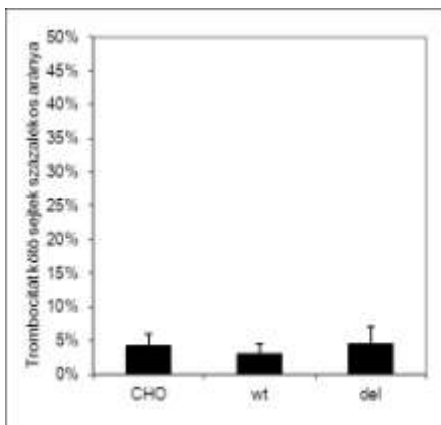
Igazoltuk, hogy a Mac-1 integrint prezentáló CHO sejteken trombocitadús plazma (PRP) hozzáadásakor jelentős mértékű trombocita kötődés tapasztalható. A kötődés az aktivált Mac-1-et prezentáló sejteken szignifikánsan nagyobb mértékű volt, mint az aktiválatlan integrin esetében. Mivel CHO sejtvonalkban a sejtek a humán sejtfelszíni molekulák közül egyedül a Mac-1-et prezentálják, a Mac-1-el nem rendelkező CHO sejtek (negatív kontroll) pedig nem kötöttek trombocitát, ezért rendszerünkben az integrin szerepe az aggregátumképződésben egyértelműen igazolható volt.



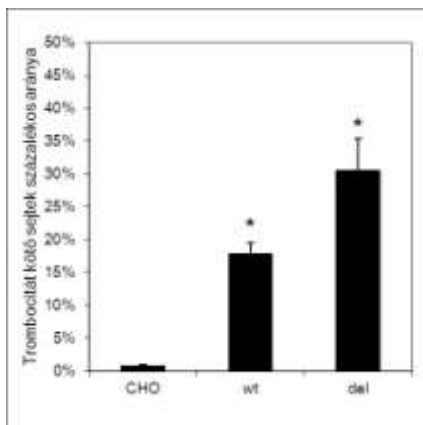
*4. ábra: trombociták kötődése PRP-ben Mac-1 prezentáló CHO sejtekhez. Áramlási citometriás mérés, a trombocitát kötő sejtek számát az összes sejt százalékában fejeztük ki, 5000 sejtet számoltunk. \* $p < 0,05$  a Mac-1-et nem prezentáló sejtekhez viszonyítva.*

***3. A trombociták Mac-1-hez való kötődéséhez közvetítő molekulára van szükség, ezt a szerepet a fibrinogén és a CD40 ligand is betöltheti.***

Vizsgálatainkban a tisztított trombociták nem kötődtek a sejtekhez, vérplazma jelenlétekor, vagy a trombociták aktivációjakor viszont jelentős mértékű komplexképződés volt tapasztalható, ezért feltételeztük, hogy a kötődéshez szükséges egy a vérplazmában jelen levőmolekula, melyet az aktivált vérlemezke képes előállítani. Vizsgálatunk során igazoltuk, hogy a Mac-1 ligandjai, a fibrinogén és az általunk Mac-1 ligandjaként azonosított CD40 ligand hozzáadása kis mértékben, de szignifikánsan fokozza a komplexképződést.

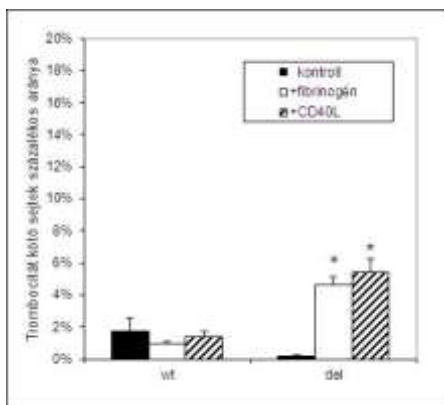


**A**



**B**

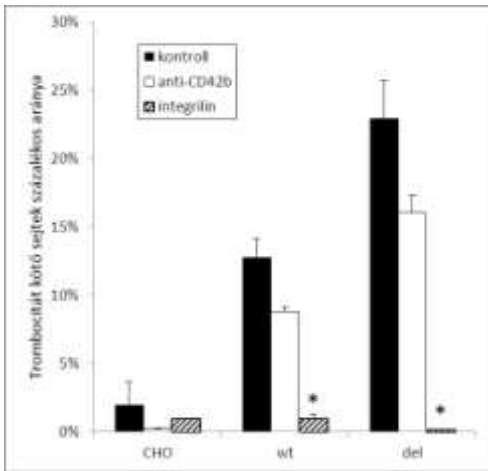
5.A ábra: tisztított trombociták kötődése Mac-1 prezentáló CHO sejtekhez,  $p > 0,1$ . 5.B: aktivált trombociták kötődése Mac-1 prezentáló CHO sejtekhez.  $*p < 0,05$  a CHO sejtekhez viszonyítva. Flow citometriás vizsgálat.



6. ábra: Fibrinogén és CD40 ligand hozzáadása elősegíti a trombociták kötődését a Mac-1 prezentáló CHO sejtekhez.  $*p < 0,05$  a megfelelő kontrollhoz viszonyítva. Flow citometriás vizsgálat.

#### ***4. A trombocita GpIIb/IIIa integrin részt vesz a Mac-1-el való kapcsolódásban***

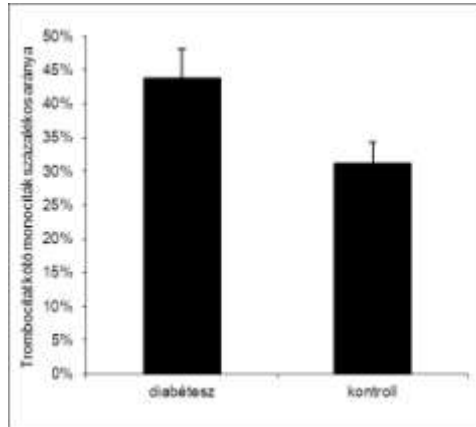
A GpIIb/IIIa-t gátló integrilin (eptifibatid) segítségével igazoltuk, hogy a komplexképződésben a trombocitaGpIIb/IIIa molekula szerepet játszik a trombociták Mac-1-hez való kapcsolódásában. A vizsgált másik antitest, az anti-CD42b csak enyhe és nem szignifikáns mértékben csökkentette a kialakuló aggregátumok mennyiségét.



*7. ábra: A GpIIb/IIIa-t gátló integrilin jelentős mértékben csökkentette a sejt-trombocita kapcsolódás mértékét. \* $p < 0,05$  a megfelelő kontrollhoz viszonyítva.*

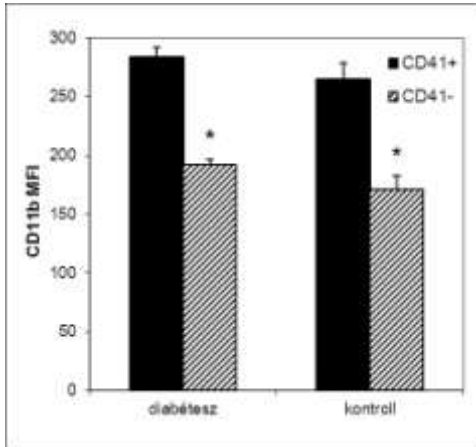
**5. 2 típusú diabéteszben a kontrollcsoportéval megegyező gyulladási paraméterek mellett emelkedett monocita-trombocita aggregátumszintek mérhetők.**

Igazoltuk, hogy 2 típusú diabéteszes betegekben a kontrollcsoportéhoz képest jelentősen emelkedett monocita-trombocita aggregátum szint mérhető. A gyulladási paraméterek elemzésekor ugyanakkor nem találtunk különbséget a két csoport között. A monocita-trombocita aggregátumok szintje nem mutatott összefüggést a gyulladási paraméterekkel, sem a CD40L plazmaszintjével.



8. ábra: A diabéteszes csoportban szignifikánsan nagyobb monocita-trombocita aggregátum szint mérhető.  $p=0,027$

**6. A trombocitákkal aggregátumot alkotó monocitákon szignifikánsan nagyobb Mac-1 expresszió mérhető.**



*9. ábra: a Mac-1 szintje nem különbözik a diabéteszes és a kontroll csoport között, a trombocitát kötő monocitákon azonban szignifikánsan magasabb Mac-1 expresszió mérhető. \* $p=0,005$  a komplexet alkotó monocitákhoz viszonyítva.*

Vizsgálatunk során igazoltuk, hogy a trombocitát kötő monocitákon szignifikánsan magasabb Mac-1 expresszió mérhető. Ez a különbség mind a diabéteszes, mind az egészséges egyéneknél megfigyelhető volt, ugyanolyan mértékben.



## Következtetések

1. **A CD40 ligand kapcsolódik a leukocita Mac-1 receptorhozés verseng a fibrinogénnel a kötőhelyekért.** Ez a megfigyelés új kapcsolódási pontot jelent a gyulladás és érlemeszesedés folyamatában, és a CD40 ligand egy új funkciójára hívja fel a figyelmet.

2. **A Mac-1 integrin (CD11b/CD18) részt vesz a trombociták sejtfelszínhez való kötődésében, amely interakcióhoz a P-selectin jelenléte nem feltétlenül szükséges.** Sejtkultúrák kísérleteinkben a Mac-1-et prezentáló CHO sejtek képesek voltak a trombocitákkal komplexet képezni. Eszerint a leukocita-trombocita kölcsönhatásban szereplő Mac-1 a P-szelektin előzetes ligandkötése nélkül is képes megkötni a trombocitákat, ami megerősíti és új megvilágításba helyezi a Mac-1 kötődés jelentőségét a leukocita-trombocita kapcsolatokban.

3. **A Mac-1 integrin a trombocitán jelen levő GpIIb/IIIa receptoron keresztül létesít kapcsolatot a trombocitákkal.** Vizsgálatunk során a trombocita GpIIb/IIIa receptort mint a Mac-1-el való kapcsolódásban résztvevő trombocita receptort azonosítottuk. Ez az eredmény ugyanakkor felhívja a figyelmet a

GpIIb/IIIa receptor blokkolók egy lehetséges új hatásmechanizmusára, ami megmagyarázza a korábban klinikai vizsgálatokban, GpIIb/IIIa gátló kezelés alkalmazásakor talált alacsonyabb leukocita-trombocita komplexszinteket, egyben új terápiás jelentőséget tulajdonít az említett gyógyszercsoportnak.

**4. A fibrinogén és a CD40 ligand mint hídmolekulák szerepet játszanak monocita Mac-1 és trombocita GpIIb/IIIa integrinek kapcsolódásában.** Igazoltuk, hogy a Mac-1-GpIIb/IIIa integrinek kapcsolódásához elengedhetetlen egy hídmolekula, pl. fibrinogén vagy CD40 ligand jelenléte, amely a Mac-1-nek és a GpIIb/IIIa-nak is ligandja. Ez a megfigyelés a sejtfelszíni Mac-1 és GpIIb/IIIa integrinek közti kapcsolódás mechanizmusát írja le, felhívja a figyelmet a leukocita és trombocita aktiváció illetve a keringésben levő szolubilis mediátorok jelentőségére a sejtközi kapcsolatokban.

**5. A monocita-trombocita aggregátumok mennyiségének emelkedése megelőzi a gyulladásos paraméterek megjelenését 2 típusú diabéteszben.** Igazoltuk, hogy szövődménymentes 2 típusú diabéteszes betegekben szignifikánsan megemelkedik a monocita-trombocita aggregátumok szintje, a gyulladást jelző

laborértékek ugyanakkor nem jeleznek elváltozást. Eszerint a megfigyelés szerint a monocita-trombocita aggregátumok szintjének emelkedése érzékenyebben jelzi a diabéteszben zajló metabolikus változásokat, mint a gyulladásos paraméterek, pl. a CRP vagy az IL-6.

#### **6. A trombocitát kötő monocitákon fokozott Mac-1 expresszió észlelhető, ami független a 2 típusú diabétesz jelenlététől.**

Igazoltuk, hogy azokon a monocitákon, amelyek a trombocitákkal aggregátumot alkotnak, fokozódik a Mac-1 adhéziós integrin expressziója. Ez az emelkedés a diabéteszes és az egészséges populációban egyaránt megtalálható, mértéke a két vizsgált csoportban azonos, és független a cukorbetegség jelenlététől.

#### **Saját publikációk jegyzéke**

1. **PatkoZ,** Csaszar A. (2005) A monocita-trombocita kölcsönhatások szerepe az érlelés folyamatában, MOTESZ Magazin 3: 69-75.

2. Zirlik A, Maier C, Gerdes N, MacFarlane L, Soosairajah J, Bavendiek U, Ahrens I, Ernst S, Bassler N, Missiou A, **Patko Z**, Aikawa M, Schönbeck U, Bode C, Libby P, Peter K. (2007) CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation*, 115(12): 1571-1580.

**IF: 12,755**

3. **Patko Z**, Csaszar A, Acsady G, Peter K, Schwarz M. (2012) Roles of Mac-1 and glycoprotein IIb/IIIa integrins in leukocyte-platelet aggregate formation: stabilization by Mac-1 and inhibition by GpIIb/IIIa blockers. *Platelets*, 23(5): 368-375.

**IF: 1,847**

4. **Patko Z**, Csaszar A, Acsady G, Öry I, Takacs E, Furesz J. (2012) Elevation of monocyte-platelet aggregates is an early marker of type 2 diabetes. *Intervent Med Appl Sci*, 4(4): 181-185.