
A mikropartikulumok laboratóriumi diagnosztikája

PhD tézis

Dr. Tőkés-Füzesi Margit

Doktori Iskola vezető: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Prof. Dr. Mezősi Emese

Témavezetők: Prof. Dr. Kovács L. Gábor

Dr. Molnár Tihamér



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Laboratóriumi Medicina Intézet

Pécs, 2019

Rövidítésjegyzék

MB – microbead

MP – mikropartikulum

MV – mikrovezikulum

PS – foszfatidilszerin

PC - foszfatidil-kolin

SM – szfingomilein

PhE - foszfatidil-etanolamin

CD - cluster of differentiation

Cy5 – Cychrom5

FITC - fluoreszcein izothyocianát

FS – forward scatter (átmenő fény szórás)

LPS – lipopoliszaharid

PE – phycoerythrin

SC – side scatter (oldal irányú fény szórás)

DIC – disszeminált intravaszkuláris koaguláció

EDTA - etilén-diamin-tetraecetsav

FEV1 - az első mp.-ben mért térfogat erőltetett kilégzés közben

FVC - erőltetett kilégzési vitálkapacitás

Ig – immunglobulin

ISTH SSC – International Society of Thrombosis and Haemostasis Standardisation sub
Comitee

1. Bevezetés

A mikropartikulumokat először Chargaff írta le 1946-ban, precipitábilis faktorként mely a trombocita mentes plazmában gyorsítja a trombin képződést. 20 évvel később Wolf „trombocita pornak,, (platelet dust) nevezi el, mely a plazma ultracentrifugálása után képes trombin képzésre. A 90-es évektől a mérési módszerek fejlődésének köszönhetően tudásunk a „trombocita-porról,, kiszélesedett. Ezeket a részecskéket mikropartikulumoknak (MP) illetve mikrovezikulumoknak (MV) nevezték el. A későbbiekben kiderült, hogy in vivo a trombocitán kívül más sejtekből is eredhetnek és nemcsak a keringésben, hanem más testfolyadékokban így a vizeletben, gerincvelői- és ízületi folyadékokban, valamint a nyálban is kimutathatók.

1.1. A mikropartikulumok

A mikropartikulumok 0,1-1,0 μm nagyságú, sejteredetű vezikuláris strukturák, melyek tartalmazznak membrán szkeletont, de hiányzik belőlük a mag és nem rendelkeznek szintetikus kapacitással. Felszínükön sejteredetű és a minta előkészítés/leválás függvényében különböző mennyiségben expresszálnak foszfatidilszerint (PS) (International Society on Thrombosis and Haemostasis; Scientific and Standardization Committee Meeting; Sydney, 2005). Újabb irodalmi adatok szerint léteznek olyan MP-ok, melyek felszínükön nem expresszálnak PS-t. A MP-ok az extracelluláris mikrokörnyezetbe sejtaktiváció, magas nyírófeszültség hatására, valamint az apoptózis korai szakaszában válnak le a sejtmembránról akár fiziológias, akár patológias körülmények között. Kialakulásuk tehát aktív folyamat eredménye. Sejteredetű kimutatható, mivel az „anyasejt” felszínén található fehérjékből magukkal vihetnek. Származhatnak a keringésben található trombocitákból, neutrofilekből, monocitákból, limfocitákból és vörösvértestekből, valamint az endotél sejtekből. A MP-ok belsejükben hordozhatnak citoplazma és mag (pl. mitokondrium, enzimek, transzkripciós faktorok, mRNS és DNS) komponenseket.

1.2. A mikropartikulumok szerepe és kimutatásukra használt módszerek

A keringésben található MP-ok keletkezésüknek és sejteredetűségüknek megfelelően mind fiziológias, mind patofiziológias szempontból sokféle szerepet betölthetnek a szervezetben. A trombocita eredetű MP-ok (PMP) kifejezett prokoaguláns aktivitással rendelkeznek, ez felületegységre vonatkoztatva 50-100-szor nagyobb, mint az aktivált

trombociták esetében. Bizonyos MP-ok antikoaguláns fehérjéket is hordozhatnak a felszínükön pl. említésre méltó a TFPI (tissue factor pathway inhibitor), Protein C, Protein S, trombomodulin. A MP-ok számos immunológiailag aktív molekulát szállíthatnak, melyek a gyulladás mediátorainak tekinthetők és proinflammatorikus tulajdonsággal bírnak. In vitro kísérletek alapján a komplement kaskád aktiválásával elindíthatják a gyulladás folyamatát, valamint a leukociták kitapadását, gördülését és további MP-ok leválását különböző sejtekből. A trombocita eredetű MP-ok fokozhatják a már kitapadt neutrofil sejtekhez további neutrofilek kapcsolódását. Képesek arachidonsav szállítására és átadására, mely növeli a monociták endotél sejtekhez való kitapadását. A MP-ok gyulladás gátló tulajdonságokkal is rendelkeznek. A MP proinflammatorikus tulajdonságát támogató *in vivo* bizonyítékok elsősorban a gyulladásos folyamatokban mért emelkedett különböző sejteredetű MP számra korlátozódnak.

Kezdetben a mikropartikulumok kimutatására az ELISA, a szilárd fázishoz kötött (solide phase capture) technikák, az elektron mikroszkópia, valamint, az áramlási citometria állt rendelkezésre. Mivel a MP-ok jellemzése, élettani és kórélettani szerepének tisztázása egyre nagyobb érdeklődésre tart számot, ezen a területen is új mérési módszerek kerültek bevezetésre. Ilyenek az impedancián alapuló áramlási citometria (impedance based flow cytometry), atomi erő mikroszkópia AFM (atomic force microscopy), a transzmissziós elektron mikroszkópia TEM (transmission electron microscopy) és az NTA (nanoparticle tracking analysis).

2. Célkitűzések

Laboratóriumi célok:

- A rendelkezésre álló irodalmi adatokból kiindulva stabil módszer kidolgozása a mikropartikulumok izolálására és Beckman-Coulter FC500 áramlási citométeren való mérésére.
- Kontroll csoport kialakítása, a módszer tesztelése egészséges önkénteseken, referencia tartomány kialakítása céljából.

Klinikai célok:

- A mikropartikulumok klinikai jelentőségének vizsgálata szeptikus betegekben.
- A mikropartikulumok klinikai jelentősége COPD-s betegekben, különös tekintettel a stabil és a betegség exacerbációjában szenvedő betegekre.

3. Anyag és módszer

3.1. Mintakezelés

A jelenleg rendelkezésre álló irodalmi adatok figyelembevételével a mintavétel a kontroll és beteganyag esetében könyökhajlati vénából, rövid leszorítás után 21G-s tűvel 2,7 ml-es 3,8% (0,129 M) Na₃-citráttal alvadásgátolt (Becton Dickinson) zárt vérvételi rendszerű mintavételi csövekbe történt. Az első 3 ml vér nem került felhasználásra. A minták azonnal szállításra kerültek és egy órán belül feldolgoztuk őket.

3.2. A mikropartikulumok izolálása

A MP-ok izolálására jelenleg nincs egységes módszer, centrifugálási idők és erők tekintetében is számos módszer terjedt el. A MP-ok izolálására saját módszert dolgoztunk ki. A MP-ok izolálásához az első centrifugálás 800Xg-vel 20 perc szobahőmérsékleten történt, melynek eredményeként trombocita dús plazmát nyertünk. 1,5 ml felülúszót egy másik centrifugacsőbe vittünk át és 1500Xg-vel 20 percig újra centrifugáltuk. Az így nyert trombocita szegény plazmából 1,0 ml szupernatánst új teszt csőbe vittünk át és további 20 percet centrifugáltuk 1500Xg-vel. A sejtmentes plazma felülúszójának 500 µl-ét Eppendorf csőbe vittük át és a MP-at 18.000Xg-vel üleptítettük 10 percig. A szupernatánst óvatosan eltávolítottuk a pelletről úgy, hogy 25 µl plazmát az Eppendorf cső alján hagyunk. A MP-at 20 sec-ig történő vortexeléssel óvatosan reszuszpendáltuk, majd 1,0 ml CaCl₂-t nem tartalmazó Apo-binding pufferbe (10 mmol/l HEPES, 5 mmol/l KCl, 1 mmol/l MgCl₂, 136 mmol/l NaCl, pH=7,4) vettük fel. A HEPES-t a Sigma-Aldrich KFT-től (Budapest, Magyarország), míg a többi analitikai tisztaságú reagenst a Reanal KFT-től (Budapest, Magyarország) szereztük be.

3.3. A mikropartikulumok mérése

A MP-ok mérésére jelenleg nincs egységes és standardizált mérési módszer. A különböző mérési módszerekkel mért eredmények nehezen összehasonlíthatók. A leginkább elterjedt mérési módszer az áramlási citometria. Nagy előnye, hogy a MP szám megadása mellett egyszerre képes jellemezni a különböző eredetű MP-kat.

Intézetünkben a MP mérések beállítását egy Beckman Coulter FC500 készüléken végeztük. Két lézerefényforrással rendelkezik: kék argon-ion lézer (488 nm) és egy opcionális vörös szilárdtest lézer (633 nm). A fluoreszcens jeleket 5 fluoreszcens

csatornán detektálja: FL1=521nm/40, FL2=575nm/40, FL3=620nm/20, FL4=675nm/40, FL5=755nm/40. Az FS detektor gyűjtő szöge 2-16°, ami nem teszi lehetővé a 0,4 µm alatti részecskék pontos elkülönítését a fény és elektromos háttérzajtól.

Munkánk elkezdésekor a MP-ok áramlási citometriás mérésére nem állt rendelkezésre standardizált mérési módszer. A későbbiekben az ISTH (International Society of Thrombosis and Hemostasis) egy ajánlást fogadott el, amelyhez az általunk kidolgozott többlépcsős módszer nagymértékben hasonlít.

SAJÁT MÓDSZERÜNK ÖSSZEFOGLALÁSA

3.3.a. A CD markerek és fluoreszcens jelölések kiválasztása

A MP-ok kimutatására és sejteredetük meghatározására kiválasztott CD markereket, fluoreszcens jelölésüket és gyártójukat az 1. Táblázat mutatja be.

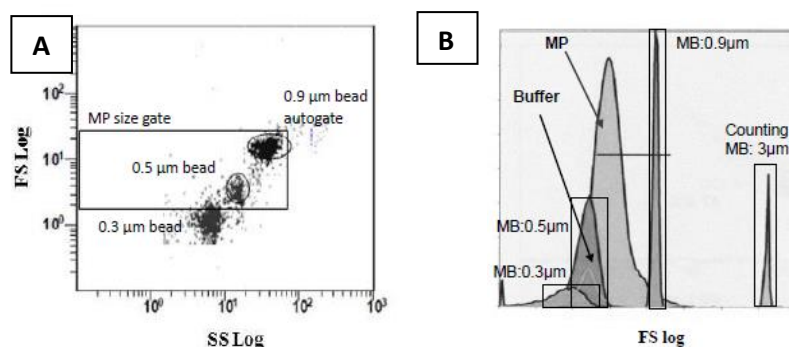
1. Táblázat: A kiválasztott CD markerek, sejteredetük, fluoreszcens jelölésük a gyártó megnevezésével.

CD marker	Sejteredet	Fluoreszcens jelölés	Gyártó
CD61 (GPIIb/IIIa)	Trombocita	FITC	Beckman-Coulter
CD41 (GPIIb/IIIa)		PE-Cy5	Becton-Dickinson
CD42a (GPIIb/V/IX)		FITC	Becton-Dickinson
PAC1 (GPIIb/IIIa)		FITC	Becton-Dickinson
CD31 (PECAM-1)	Endotél sejt	PE	Becton-Dickinson
CD62E (ELAM-1/E-szelektin)		PE	Becton-Dickinson
CD45	Pán leukocita	FITC	Beckman-Coulter
CD13 (Aminopeptidáz N)	Leukocita (neutrofil, eozinofil, bazofil, monocita)	PE	Beckman-Coulter
CD14 (LPS-R)	Monocita	PE	Beckman-Coulter
CD235 (Glycophorin A)	Vörösvértest	PE	Becton-Dickinson
CD56	NK, LGL sejt	PE-Cy5	Becton-Dickinson
Annexin V	Általános, PS-hez kötődik	FITC, Cy5	Becton-Dickinson
Egér IgG1	Izotípus kontroll	FITC, PE, PE/Cy5	Becton-Dickinson

Rövidítések: FITC: fluoreszcein izothyocianát; PE: phykoerythrin; Cy5: Cy-Chrome5 (PE-Cy5 konjugátum); Ig: immunglobulin; LPS-R: lipopoliszaharida receptor, NK: natural killer; LGL: large granular lymphocyte; NCAM: neural cell adhesion molecule; PECAM-1: platelet endothelial cell adhesion molecule.

3.3.b. A mikropartikulum méretkapu meghatározása

A MP méretkapu meghatározásához - melynek létrehozása a valódi események elkülönítéséhez szükséges az elektromos háttérzajtól és a háttértől - FITC-el jelölt 0,3-0,5-0,9 μm átmérőjű poliszitirén mikro gyöngyöket használtunk (a SoftFlow KFT, Pécs, Magyarország ajándéka). A FSC, SSC és fluoreszcens csatornákat logaritmusos skálára állítottuk. A MP-ok számának meghatározásához ismert koncentrációjú ($1 \times 10^5/\text{ml}$) $3\mu\text{m}$ átmérőjű számláló mikro gyöngyöket használtunk (Becton-Dickinson, Magyarország).

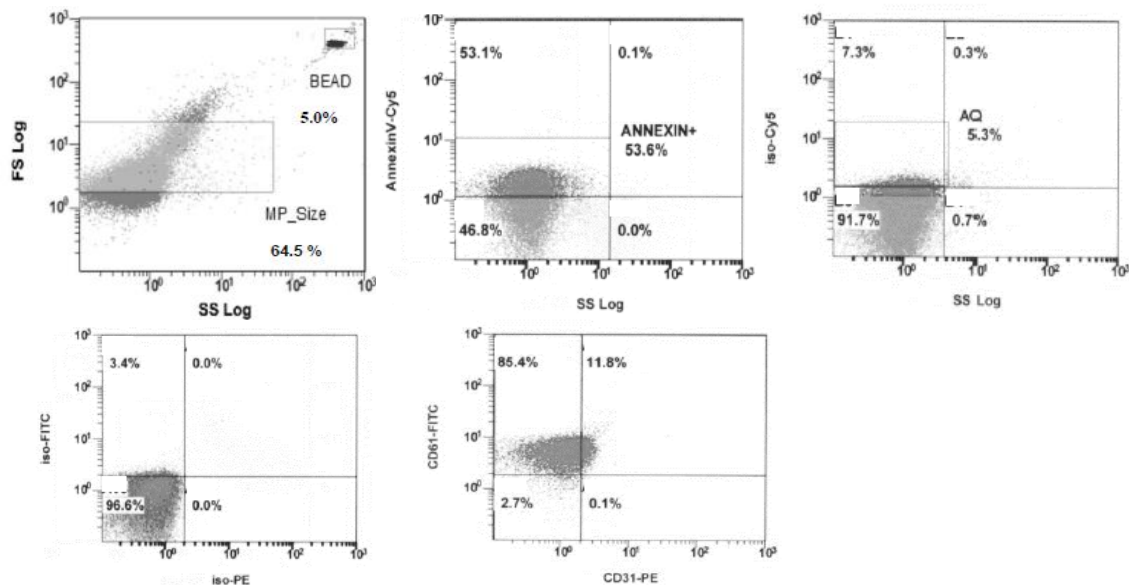


1. Ábra. MP méretkapu meghatározása mikrogyöngyök segítségével. Rövidítések: MB: microbead, MP: mikropartikulum, FS: forward scatter, SS: side scatter.

A MP méretkapu alsó határát a 0,5 μm -es gyöngy felső részénél határoztuk meg (küszöb), mivel az FS/SS hisztogramon az ez alatti mérettartományban a 0,3 és 0,5 μm nagyságú mikrogyöngyök már átfedést mutatnak, vagyis ebben a mérettartományban a citométer nem tudná egyenként elkülöníteni a MP-kat. A méretkapu felső határát a 0,9 μm -es mikro gyöngy felső és külső részénél határoztuk meg (1. Ábra). Ebben a MP méretkapuban a puffer és a MP-ot tartalmazó minta elválik a háttértől és az elektromos háttérzajtól.

3.3.c. A mikropartikulum méretkapun belül az AnnexinV pozitív MP-ok meghatározása

A MP méretkapun belül MP-ként határoztuk meg azokat az eseményeket, melyek a fluoreszcensen jelölt AnnexinV-vel pozitívak és fluoreszcencia intenzitásuk az izotípus kontroll és a mintát nem tartalmazó puffer felett van (2. Ábra).



2. Ábra: AnnexinV⁺ események meghatározása a MP méretkapun belül az izotípus kontroll levonása után. AnnexinV, trombocita (CD61) és endotél (CD31) marker⁺ MP-ok.

3.3.d. A fluoreszcensen jelölt CD markerek optimális jelölési koncentrációjának meghatározása és a MP-ok jelölése

A fluoreszcens jelölésű CD markerek optimális jelölési koncentrációjának meghatározásához az ismert koncentrációjú antitestekből hígítási sort készítettünk, mellyel megjelöltük a MP-ot nem tartalmazó Apo-puffert és a MP mintát. Optimálisnak tekintettük azt az antitest jelölési koncentrációt, ahol a MP-t tartalmazó minta eseményszáma tisztán elkülöníthető volt a puffertól és az izotípus kontroll háttértől. Az eddigiek alapján tehát MP-nak tekintettünk minden olyan eseményt, mely az általunk meghatározott MP kapuba esett, AnnexinV-el jelölődött és fluoreszcencia intenzitása meghaladta az izotípus kontrollét. A MP-ok sejteredetének meghatározásához a megfelelő fluoreszcensen jelölt optimalizált jelölő koncentrációjú CD markert használtuk. A MP jelöléshez az izolált Apo-binding pufferben felvett mintából 10 μ l-t jelöltünk 100 μ l 2,5mmol/l CaCl₂-al kiegészített Apo-binding pufferben, az előzőleg optimális jelölőkoncentrációra hígított 10 μ l végtérfogatban felvett antitesttel. A minták jelölése 30 percig sötétszobában, szobahőmérsékleten történt. Az eredményeket CXP software segítségével értékeltük ki.

3.4. Pozitív és negatív kontroll mérése

Pozitív kontrollként egészséges önként jelentkezőktől gyűjtött trombocita dús plazma kalcium ionophore-al A23186 (Sigma Aldrich, 25 μ mol/ml) való stimulálása után

izolált MP-at használtunk. Negatív kontrollnak AnnexinV-el jelöltük a MP-at 2,5 mmol/l EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) jelenlétében.

3.5. Reprodukálhatóság és a mintavételtől eltelt idő befolyása a mért MP mennyiségekre

A módszer reprodukálhatóságának tesztelése érdekében két önkéntes egészséges egyéntől két különböző időpontban vettünk le három-három mintát. A minták izolálását, CD markerekkel való jelölését és mérését egymás után végeztük el. A két kontroll esetében a számított variációs koefficiensek alapján (<20%) mindegyik mért CD marker esetében a módszer a mintavétel, izolálás, jelölés, mérés tekintetében reprodukálhatónak tekinthető. Vizsgáltuk, hogy a mintavétel ideje után az izolálás időpontja mennyiben befolyásolja az össz és a különböző CD markerekkel jelölt MP-ok mennyiségét. A mintavétel után azonnal izolált és az 1 órás időbeli eltolódással nyert MP-ok számában nem találtunk szignifikáns különbséget.

4. A módszer alkalmazása beteganyagban

4.1. Kontroll csoport kialakítása, referencia tartomány számítás, a módszer tesztelése

A kontroll csoportot 20 egészséges, önkéntes egyénből alakítottuk ki. Nem szerinti megoszlásuk: 10 férfi és 10 nő. Átlag életkoruk 57 év (49-63). Életkor tekintetében beválasztási szempontként a később vizsgálni kívánt betegcsoportjaink életkorát vettük figyelembe, ahhoz alakítottunk ki hasonló életkorú kontroll csoportot. Kizáró kritériumnak tekintettük - akár csak későbbiekben a betegcsoportok esetében - az anamnézisben előforduló ismert hematológiai betegséget, citosztatikus kezelést az elmúlt 3 hónapban, nagy dózisé, hosszan tartó szteroid kezelést, a trombociták funkcióját befolyásoló gyógyszerek (pl. acetyl-salicilsav) szedését, vértranszfúzió vagy disszeminált intravaszkuláris koaguláció (DIC>5 score-al) előfordulását az előző néhány hónapban, valamint diagnosztizált antifoszfolipid szindrómát (APS).

A kontroll csoportban mért MP mennyiségek referens értékeit a teljes kontroll csoportban és nemek szerint a 2. Táblázat mutatja be.

2. Táblázat: Referencia tartomány (medián, 25 és 75 percentilis) a kontroll csoportban (n=20) valamint a kontroll csoport bontása után a nők (n=10) és a férfiak (n=10) között. Az értékek MPx10⁵/ml-ben megadva

CD marker	Kontroll csoport		Nők		Férfiak	
	Medián MPx10 ⁵ /ml	25 - 75 percentilis	Medián MPx10 ⁵ /ml	25 - 75 percentilis	Medián MPx10 ⁵ /ml	25 - 75 percentilis
Össz MP	2,20	(1,14 - 5,98)	2,03	(1,24 - 3,70)	2,67	(1,14 - 4,85)
CD61	2,11	(1,08 - 5,87)	1,94	(1,19 - 3,65)	2,57	(1,08 - 4,70)
CD41	1,51	(0,69 - 5,39)	1,44	(0,83 - 2,46)	1,84	(0,69 - 3,35)
CD42a	0,21	(0,05 - 1,06)	0,16	(0,05 - 0,32)	0,29	(0,07 - 0,79)
PAC1	0,17	(0,07 - 0,94)	0,13	(0,07 - 0,20)	0,25	(0,06 - 0,94)
CD31	0,83	(0,34 - 3,42)	0,76	(0,34 - 1,63)	0,98	(0,35 - 1,96)
CD62E	1,77	(0,90 - 5,62)	1,68	(0,93 - 3,17)	2,12	(0,90 - 4,11)
GlyA	0,29	(0,13 - 2,71)	0,23	(0,15 - 0,65)	0,53	(0,13 - 1,69)
CD45	1,90	(0,96 - 5,68)	1,78	(1,06 - 2,94)	2,24	(0,96 - 3,82)
CD13	1,64	(0,84 - 5,54)	1,57	(0,89 - 3,19)	2,12	(0,84 - 3,79)
CD14	0,07	(0,03 - 0,16)	0,07	(0,05 - 0,11)	0,09	(0,03 - 0,21)
CD56	1,05	(0,52 - 5,08)	0,93	(0,52 - 1,88)	1,23	(0,52 - 3,06)

Az egyes CD markerek vonatkozásában a férfiak és a nők között szignifikáns különbség nem mutatható ki.

4.2. A módszer tesztelése beteganyagon

4.2.1. Szeptikus betegcsoport

Vizsgálatainkat a Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatásetikai Bizottságának engedélyével végeztük (2406/2005). A betegektől írásos beleegyező nyilatkozatot kértünk, miután a vizsgálatokról és a vérvételről részletes tájékoztatást kaptak. Vizsgálatainkba 24 órán belül diagnosztizált két vagy több szervelégtelenséggel rendelkező súlyos szeptikus beteget (n=27) vontunk be az Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet Intenzív terápiás részlegéről. A betegek szepszis besorolási kritériumai az alábbiak voltak (2016 előtti ajánlás): láz ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) vagy hipotermia ($\leq 36^{\circ}\text{C}$), tachikardia ($\geq 90/\text{perc}$), tachipnoe, megváltozott tudatállapot, hiperglikémia, leukocita szám ≥ 12.000 sejt/ μl vagy ≤ 4.000 sejt/ μl , emelkedett C-reaktív protein (CRP $\geq 10\text{mg/l}$) és szérum procalcitonin (PCT $\geq 5\text{ng/ml}$) szint. Kizárási kritériumként a kontroll

csoportnál felsoroltakat alkalmaztuk. A vizsgálat végpontjai: a beleegyezés visszavonása, ill. exitus a vizsgálat ideje alatt. A klinikai státus követésére naponta történt a MODS (Multiple Organ Dysfunction Score) és SOFA (Sequential Organ-Failure Assessment) érték számítás. Valamennyi betegről az intenzív osztályra való felvételkor (első napon), valamint a 3. és 5. napon történt mintavétel és MP vizsgálat.

4.2.1.a Eredmények

Mindhárom mérési időpontban (1., 3. és 5. napon) szignifikánsan magasabb össz mikropartikulum számot mértünk a szeptikus betegek körében a kontroll csoporthoz viszonyítva (valamennyi $p < 0,01$). A CD61⁺ és CD41⁺ MP-ok száma a vizsgálat ideje alatt valamennyi időpontban szignifikáns emelkedést mutatott a szeptikus betegcsoportban a kontrollhoz viszonyítva (mindkettő esetében $p < 0,01$). Mindkét trombocita marker és az össz MP szám esetében is megfigyelhető az enyhe MP szám csökkenés az 5.-ik vizsgálati nap végére. A szintén trombocita eredetű CD42a⁺ MP szám is emelkedést mutatott az 1. 3. és 5.-ik napon a szeptikus betegek esetében ($p < 0,05$). Az aktivációs PAC1 trombocita markert hordozó MP-ok száma viszont szignifikáns csökkenést mutatott az 1. és az 5.-ik vizsgálati napon. ($p < 0,05$). A három különböző vizsgálati napon mért CD62E⁺ endotél eredetű MP szám nem mutatott szignifikáns eltérést a szeptikus és kontroll csoport összehasonlításakor. A 20 túlélő és a 7 nem túlélő szeptikus beteg MP eredményeinek statisztikai elemzése során nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között egyik vizsgálati időpontban sem. A szervelégtelenségek száma és az össz MP szám közötti összefüggés statisztikai vizsgálata során szignifikáns különbséget lehet kimutatni a 2 szervet és az 5 szervet érintő szervelégtelenség esetén. Két szervelégtelenség esetén az össz MP szám szignifikánsan megemelkedett az öt szervelégtelenségben szenvedőkhöz képest ($p < 0,05$).

4.2.2 A krónikus obstruktív tüdőbeteg (COPD-s) csoport

4.2.2.1. Prospektív vizsgálat COPD-s betegek

A vizsgálatba összesen 50 COPD-ben szenvedő beteget vontunk be a 2008-2010 közti időszakban. Beválasztásuk a tüdőgyógyászati szakrendelésen és a Megyei Tüdőgondozóban kontroll vizsgálatra jelentkeztek köréből, illetve az I.sz. Belgyógyászati Klinika Pulmonológia osztályán korábban kezelt betegek behívásával

történt. Vizsgálatainkat a Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatásetikai Bizottságának engedélyével végeztük (3429/2009). A betegek miután a vizsgálatokról és a vérvételről tájékoztatást kaptak, aláírásukkal hivatalos beleegyezésüket adták a vizsgálathoz. A betegeket két csoportba soroltuk be: 1. stabil COPD-s betegek (34 beteg) és 2. COPD-s betegek akut exacerbációban – AECOPD (16 beteg). A betegeket a GOLD stádium besorolás (hörgőtágító inhalációja után mért FEV1-érték- az első másodpercben mért térfogat erőltetett kilégzés közben) alapján osztottuk súlyossági csoportokba (Magyar Tüdőgyógyász Társasági ajánlása, GOLD stádiumok, 2006):

- | | | |
|---|---|----------------------------|
| I. enyhe: $FEV1 \geq 80$ referencia% (ref%) | } | tünetmentes, vagy panaszos |
| II. közepsúlyos: $50 \text{ ref}\% \leq FEV1 < 80 \text{ ref}\%$ | | |
| III. súlyos: $30 \text{ ref}\% \leq FEV1 < 50 \text{ ref}\%$ | | |
| IV. nagyon súlyos: $FEV1 < 30 \text{ ref}\%$ vagy $FEV1 < 50 \text{ ref}\%$ + krónikus légzési elégtelenség ($PaO_2 < 60 \text{ Hgmm}$ +/- $PaCO_2 > 50 \text{ Hgmm}$) vagy cor pulmonale tünetei | | |

Mind a négy stádiumban igazolható légúti obstrukció: FEV1/FVC (erőltetett kilégzési vitálkapacitás) $< 70\%$. Exacerbáltak tekintettük azokat a betegeket, akik kórházi beutalásra szorultak, és akiknél sürgős intravénás kortikoszteroid kezelést kellett indítani a súlyosbodó tüneteik miatt pl. a köpetmennyiség növekedése, köhögés vagy respiratorikus distressz jelei. Stabil COPD-s csoportba soroltuk be a rendszeres éves ellenőrzésre jelentkező betegeket, akiknek nem voltak új tüneteik.

4.2.2.1.a Eredmények

A betegek demográfiai, klinikai, gyógyszereszedési, légzésfunkciós és rutin laboratóriumi adatait a 3. Táblázatban tüntettük fel. A kontroll csoport ebben az esetben is a korban illeszkedő önkéntes, társbetegségtől mentes egyénekből (n=19) állt. A kontroll egyének átlag életkora 57 év (49-63), nő:férfi megoszlás 10:9 volt, dohányzók aránya 42%.

3. Táblázat: Demográfiai, klinikai, gyógyszereszedési és légzésfunkciós adatok a stabil és exacerbációs (AECOPD) betegekben.

	Stabil COPD (n=34)	AECOPD (n=16)	p-érték
Kor*	63 (54-70)	63 (56-67)	0,755
Férfi [#]	20 (59)	9 (56)	0,863
Krónikus társbetegség			
DM [#]	2 (6)	5 (31)	0,03
CVD [#]	20 (58)	9 (56)	0,863
Dohányzás [#]	20 (59)	10 (62)	0,804
Gyógyszereszedés			
Ca ⁺⁺ -csatorna blokkoló [#]	8 (23)	10 (62)	0,009
β-blokkoló [#]	17 (50)	7 (44)	0,680
ACEI [#]	13 (38)	6 (37)	0,898
Statin [#]	2 (6)	3 (19)	0,320
ICS [#]	25 (74)	14 (87)	0,464
LABA [#]	26 (77)	14 (87)	0,698
LAMA [#]	32 (94)	14 (87)	0,245
Légzésfunkció			
FEV1/FVC*	0,56 (0,41-0,63)	0,49 (0,37-0,55)	0,179
FEV1 ref%*	0,52 (0,36-0,67)	0,56 (0,45-0,67)	0,925
GOLD stádium			
GOLD I-II [#]	21 (62)	10 (62)	0,96
GOLD III-IV [#]	13 (32)	6 (37)	0,96
Rutin laboratóriumi paraméterek			
Koleszterin* (mmol/L)	5,50 (5,00-6,80)	4,95 (4,10-6,10)	0,151
VVT szám* (T/L)	4,89 (4,43-5,22)	4,99 (4,49-5,29)	0,677
TCT szám* (G/L)	232 (172-276)	267 (195-328)	0,112
FVS szám* (G/L)	7,55 (5,76-9,76)	13,53 (8,99-15,85)	<0,001
hs-CRP* (mg/L)	5,65 (3,50-8,30)	9,67 (2,93-23,61)	0,114

Az adatok, mint medián (IQR)* és n (%)[#] vannak megadva. A változók összehasonlítására Mann-Whitney U és Chi-square tesztet használtunk. DM: diabétesz mellitusz; CVD: kardiovaszkuláris betegség; ACEI: angiotenzin konvertáló enzim inhibitor; ICS: belélegzett kortikoszteroid; LABA: hosszan ható β-agonista; LAMA: hosszan ható muscarin antagonist; GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; FEV1: erőltetett kilégzési térfogat az 1. másodpercben; FVC: erőltetett vitál kapacitás; VVT: vörösvértest; TCT: trombocita; FVS: fehérvérsejt; hs-CRP: magas szenzitivitású C-reaktív protein.

A COPD-ben szenvedő betegekben, exacerbációtól függetlenül szignifikánsan magasabb MP számok mérhetők a kontroll csoporthoz képest. CD62E⁺, CD41⁺, CD42a⁺, CD14⁺ mikropartikulumok szignifikánsan emelkedett értéket mutatnak az akut exacerbációban szenvedőkben, a stabil betegekhez képest (4. Táblázat).

4. Táblázat: Mikropartikulumok száma a kontroll csoportban, valamint stabil és exacerbációban szenvedő COPD-s betegekben.

CD marker (X10 ⁵ /mL)	Kontroll (n=19)	Stabil COPD (n=34)	AECOPD (n=16)	p-érték Kontroll vs stabil/AECOPD	p-érték Stabil vs. AECOPD
Annexin V+	2,18 (1,33-3,70)	53,74 (35,08-76,38)	61,15 (44,26-73,39)	<0,001	0,747
CD31+	0,79 (0,48-1,40)	10,35 (7,78-17,04)	15,59 (11,82-21,95)	<0,001	0,164
CD62E+	1,72 (0,97-3,17)	29,87 (26,85-40,58)	44,09 (33,43-59,21)	<0,001	0,011
CD61+	2,10 (1,22-3,65)	48,36 (32,02-73,68)	54,99 (38,18-65,73)	<0,001	0,992
CD41+	1,51 (0,90-2,46)	37,99 (32,69-52,59)	61,15 (44,25-73,39)	<0,001	0,018
CD42a+	0,17 (0,12-0,30)	1,32 (0,92-1,51)	3,19 (1,49-5,69)	<0,001	0,002
PAC1+	0,15 (0,09-0,23)	0,57 (0,28-3,05)	0,52 (0,15-0,76)	<0,001	0,182
GlyA+	0,28 (0,16-0,59)	8,21 (6,76-11,59)	11,93 (5,03-18,98)	<0,001	0,133
CD45+	1,88 (1,10-2,94)	37,67 (26,34-59,24)	43,21 (20,29-60,07)	<0,001	0,670
CD13+	1,62 (0,99-3,19)	30,37 (21,32-55,00)	41,44 (26,91-46,07)	<0,001	0,904
CD14+	0,07 (0,06-0,11)	0,29 (0,08-0,48)	0,624 (0,44-0,98)	<0,001	0,008
CD56+	1,02 (0,63-1,88)	43,99 (32,81-54,94)	61,15 (42,02-73,40)	<0,001	0,240

Az adatokat, mint medián és (IQR) ábrázoltuk. Kruskal-Wallis teszt.

GOLD stádium alapján egy mikropartikulum esetében mutattunk ki különbséget. A PAC1⁺ MP-ok száma szignifikánsan magasabb volt a súlyosabb COPD-ben (GOLD III-IV) szenvedőkben, mint GOLD I-II stádium esetén. Többváltozós analízissel fordított korrelációt találtunk a CD62E⁺, CD42a⁺ és a CD14⁺ MP mennyiségek, valamint a FEV1/FVC hányados (-0,406, -0,473, -0,440, p<0,001) között.

4.2.2.2. Retrospektív vizsgálat a COPD-s betegcsoportban

2018-ban elvégeztük a 2010-ben vizsgált COPD-s betegcsoportunk retrospektív vizsgálatát. A különböző sejteredetű MP-k és a 7 éves kimenetel közötti összefüggésekre voltunk kíváncsiak. A vizsgálatunkba 2010-ben bevont 50 betegből (34 stabil, 16 exacerbált), mind az 50 beteg elektronikus adatbázisban (eMedSol) rögzített adatait sikerült követnünk. A mintavételt követő 7 évben visszamenőleg

valamennyi betegnél regisztráltuk a súlyos, kórházi felvételt igénylő exacerbációk számát, az SBO megjelenéseket, valamint a halálozás dátumát.

4.2.2.2.a Eredmények

Teljes COPD populáció halálozás 7 éve alatt

Megvizsgáltuk a 7 évvel ezelőtt mért MP mennyiségek és a túlélés közötti összefüggést a teljes COPD-s betegcsoportban. Azt találtuk, hogy az elhalálozottakban (n=20), a szisztémás keringésben 7 évvel ezelőtt mért össz MP szám, a trombocita eredetű CD61⁺ és a leukocita eredetű CD13⁺ mikropartikulum szám szignifikánsan magasabb volt a túlélőkhöz képest. A fent leírt MP számok mellett a vörösvértest eredetű GlyA⁺ és a trombocita eredetű PAC1⁺ (aktivációs marker) MP szám is szignifikánsan magasabb volt a nem túlélőkben a túlélőkhöz viszonyítva a teljes COPD-s betegcsoportban. Érdekes módon 2010-ben, amikor GOLD stádium alapján vizsgáltuk a mikropartikulum mennyiségeket, egy mikropartikulum esetében mutattunk ki különbséget. A PAC1⁺ MP-ok száma szignifikánsan magasabb volt a súlyosabb COPD-ben (GOLD III-IV) szenvedőkben, mint GOLD I-II stádium esetén (p=0,031).

Többszörös regressziós analízist végeztünk, melybe az életkor, nem, FEV1/FVC, a CRP, LABA, LAMA, vörösvértest szám, az össz MP szám valamint a CD61⁺, CD13⁺, PAC1⁺ és a GlyA⁺ MP szám kerültek bevonásra. Ennek alapján a vörösvértest szám (OR: 5,3, 95%CI: 1,009-28,324, p<0,05) és a vörösvértest eredetű GlyA⁺ mikropartikulum szám (OR: 1,2, 95%CI:1,001-1,527, p<0,05) a 7 éves mortalitás független prediktorának bizonyult.

Korrelációs analízissel vizsgáltuk, hogy a perifériás vérben lévő alakos elemek száma befolyásolja-e a MP-ok számát. A PAC1⁺ MP mennyiség és a vörösvértest szám között az elhunytak körében pozitív korrelációt (0,317, p=0,03), míg a trombocita szám és a CD31⁺ MP-ok száma között fordított korrelációt találtunk (-0,485, p<0,05).

Retrospektíven vizsgáltuk, hogy a túlélő és az elhalálozott betegcsoport között volt-e különbség a COPD-s betegek GOLD stádium szerinti súlyosságában 7 évvel ezelőtt, illetve az azóta eltelt időben kialakult exacerbációk számában. Eredményeink szerint az elhalálozottakban szignifikánsan magasabb volt az exacerbációk száma 7 év alatt, viszont a 7 évvel ezelőtti FEV1 besoroláson alapuló GOLD stádiumban még nem volt különbség a két csoport között.

Stabil COPD populáció exacerbációjának markerei

Ezt követően olyan mikropartikulumokat kerestünk, melyek a stabil COPD-s betegekben (n=34) előre jelezhetik a gyakori exacerbációt (>3/év). Eredményeink szerint a gyakori exacerbációt mutató betegeknél az össz MP és a pán leukocita eredetű CD45⁺ MP szám szignifikánsan magasabb volt, mint a ritka (<3/év) exacerbációt mutató betegeknél (p<0,05). ROC analízis alapján a gyakori exacerbációkat, a pán leukocita eredetű CD45⁺ MP szám (Area: 0,708, 95%CI: 0,532-0,888, p=0,047), a vörörsvértest szám (Area:0,744, 95%CI: 0,566-0,922, p=0,020) és a trombocita szám (Area: 0,759, 95%CI: 0,574-0,941, p=0,014) jelezte leginkább előre. Többszörös regressziós analízissel független prediktort azonban nem találtunk.

Gyakori exacerbáció és a túlélés

Ezt követően olyan mikropartikulumokat kerestünk, melyek a gyakori exacerbációt (exac numb> 3/év) mutató betegekben a 7 éves megfigyelési időszakban a túlélés független prediktorai voltak. ROC analízis alapján, a CD45⁺ mikropartikulumok $\leq 8,5 \times 10^5$ /mL értéknél a túlélést 73%-os szenzitivitással és 86%-os specificitással jelezte előre (Area: 0,81, 95%CI: 0,63-0,99, p=0,02). Többszörös regressziós analízissel, melybe az életkor, nem, FEV1/FVC, CRP és CD45⁺ MP kerültek bevonásra, csak a CD45⁺ mikropartikulum szám mutatkozott a túlélés független prediktorának (OR: 0,75, 95%CI: 0,55-1,00, p<0,05).

5. Új megállapítások

Laboratóriumi megállapítások:

1. A rendelkezésre álló irodalmi adatokból kiindulva stabil módszert dolgoztunk ki a mikropartikulumok izolálására és Beckman-Coulter FC500 áramlási citométeren való mérésére.
2. Kimutattuk, hogy az általunk kidolgozott módszer a VK%-ok alapján (<20%) mindegyik CD markerrel jelölt MP szám tekintetében reprodukálható.
3. Igazoltuk, hogy a mintavételtől eltelt idő (1 órával mintavétel után) a mért MP mennyiségeket egyetlen CD marker esetében sem befolyásolja.

4. Referencia tartományt hoztunk létre egészséges egyénekből az 57 év (49-63) korosztályban a különböző sejt eredetű MP mennyiségekre, mely a későbbiekben összehasonlítási alapot képzett/képezhet a korban illő betegcsoportokhoz.

Klinikai megállapítások:

MP-ok klinikai jelentősége a szeptikus betegekben:

1. Kimutattuk, hogy súlyos szeptikus betegek esetén az össz mikropartikulum szám, a besorolás utáni 1., 3. és 5-ik napon szignifikánsan magasabb, mint a kontroll csoportban.

2. Súlyos szeptikus betegek esetében a besorolás utáni 1., 3. és 5.-ik napon a trombocita eredetű CD41⁺, CD61⁺ és CD42a⁺ MP szám szignifikáns emelkedését mutattuk ki a kontroll csoporthoz viszonyítva.

3. Az aktivációs PAC1 trombocita markert hordozó MP-ok számában viszont szignifikáns csökkenést mutattunk ki az 1. és az 5.-ik vizsgálati napon.

4. A különböző sejteredetű MP mennyiségek tekintetében egyik vizsgálati időpontban sem mutatható ki szignifikáns különbség a túlélő és a nem túlélő szeptikus beteg csoportok között.

5. Kimutattuk, hogy súlyos szeptikus betegekben az össz MP szám szignifikánsan magasabb a 2 szervet érintő szervelégtelenség esetén, mint az 5 szervelégtelenségben szenvedőknél.

MP-ok klinikai jelentősége COPD-s betegekben:

1. Először igazoltuk, hogy a stabil és akut exacerbációban lévő COPD-s betegek keringésében szignifikánsan magasabb az **Annexin V⁺ össz MP** szám, a **trombocita eredetű CD61⁺, CD41⁺, CD42a⁺, PAC1⁺**, a **vörösvértest eredetű GlyA⁺**, a **leukocita eredetű CD45⁺, CD13⁺**, a **monocita eredetű CD14⁺** és a **limfocita eredetű CD56⁺** mikropartikulum szám az egészséges kontrollokhöz viszonyítva. Az irodalomban korábban csak **endotél eredetű CD31⁺** és **CD62E⁺** mikropartikulumokat vizsgálták, melyeknél szintén a fenti összefüggést találtuk.

2. Először írtuk le, hogy az akut exacerbációban lévő COPD-s betegek perifériás vérében a CD62E⁺ endotél eredetű MP szám mellett a **trombocita eredetű CD41⁺**,

CD42a⁺ valamint a **monocita eredetű CD14⁺ MP** szám is szignifikánsan magasabb, mint a stabil COPD-s betegekben.

3. Kimutattuk, hogy a **trombocita eredetű PAC1⁺** aktivációs markert hordozó MP-ok száma szignifikánsan magasabb a súlyosabb COPD-ben (GOLD III-IV) szenvedőkben, mint a kevésbé súlyos (GOLD I-II) COPD-s betegek esetén.

4. A teljes COPD populációban a **vörösvértest szám és GlyA⁺** mikropartikulum szám a 7 éves mortalitás független prediktorának bizonyult.

5. A stabil COPD-s betegekben a pán **leukocita eredetű CD45⁺ MP** szám előre jelezte a 7 év alatti gyakori exacerbációt és a gyakori exacerbáció csoportban a mortalitás független prediktorának bizonyult.

6. Közlemények jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemény

Tőkés-Füzesi M, Ruzsics I, Rideg O, Kustán P, Kovács GL, Molnár T. Role of microparticles derived from monocytes, endothelial cells and platelets in the exacerbation of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2018 Nov 15;13:3749-3757. doi: 10.2147/COPD.S175607. eCollection 2018. **IF: 2,917**

Az értekezéssel kapcsolatos közlemények

Tőkés-Füzesi M*, Woth G*, Ernyey B, Vermes I, Mühl D, Bogár L, Kovács GL. Microparticles and acute renal dysfunction in septic patients *J Crit Care*. 2013 apr. Vol: 28(2): 141-147. * jel egyenlő hozzájárulást jelent a két szerző részéről
IF: 2,191; IF az egyenlő (50%-os) hozzájárulás alapján 1,095

Woth G*, **Tőkés-Füzesi M***, Magyarlaki T, Kovács GL, Vermes I, Mühl D. Activated platelet-derived microparticle numbers are elevated in patients with severe fungal (*Candida albicans*) sepsis *Ann Clin Biochem*. 2012 Vol.:49(6): 554-560. * jel egyenlő hozzájárulást jelent a két szerző részéről

IF: 1,922; IF az egyenlő (50%-os) hozzájárulás alapján 0,961

Összesített IF: 4,113; IF az 50%-os hozzájárulás alapján 2,056

A témához kapcsolódó idézhető absztraktok

Tőkés-Füzesi M, Magyarlaki T, Vermes I, Kovács LG. Introduction of a flow cytometric method for microparticle measurements *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Vol.: 49, suppl.: 1, p. S358-S358, may 2011. **IF: 2,15**

Woth G, **Tőkés-Füzesi M**, Magyarlaki T, Vermes I, Kovács LG, Mühl D. Platelet and endothelial receptor density changes in severe septic patients *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Vol.: 49, suppl.: 1, p. S357-S357, may 2011. **IF: 2,15**

Ruzsics I, Singoszki Sz, Illés MB, Sárosi V, Balikó T, **Tőkés-Füzesi M**, Kőszegi T, Woth G, Vermes I, Kovács LG. Microparticles in stable and exacerbated COPD patients *European Respiratory Journal*, 2013; Vol: 42, P777 (Suppl. 57). **IF: 7,125**

Ruzsics I, Tőkés-Füzesi M, Matancic M, Sárosi V, Woth G, Molnár T. Predictive value of CD14 and CD31 microparticles for the survival of COPD during 7 years. *European Respiratory Journal*, 2018; 52: Suppl. 62, PA3852; DOI: 10.1183/13993003.**IF: 12,242**

Tőkés-Füzesi M, Ruzsics I, Kustán P, Molnár T, Kovács GL. Microparticles as potential biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chem Lab Med*, 2018; 56(9):eA155.P26; DOI 10.1515/cclm-2018-0718. **IF: 3,556**

Összesített IF: 27,223

Más témában megjelent közlemények

Tókécs F. A, **Füzesi M**, Ember I: A metasztázis képződés molekuláris aspektusai (review) Orvosképzés, 1995, 6:362-370.

Tókécs F. A, **Füzesi M**, Ember I: A retinoidok onkogenetikai hatásai (review) *Lege Artis Medicinæ*, 1996, 6(9-10): 508-515.

Selypes A, **Tókécs-Füzesi M**, Serényi P, Ember I: Investigation of the total RNA expression of the genes c-myc and p53 in the testis of mice treated with cadmium. *Central European Journal of Occupational and Env. Medicine*, 1998, 4(1): 36-44.

Miseta A, Kellermayer M, Liszt F, Ludány A, Magyarlaki T, Sipos K, Berkó Gy, **Tókécs-Füzesi M**: A vérplazma elektrolitjai myeloma multiplexben. *Orvosi Hetilap*, 2001. 142(17): 1449-53.

Tókécs-Füzesi M, Bedwell DM, Repa I, Sipos K, Sümegi B, Rab A, Miseta A: Hexose Phosphorylation and the Putative Calcium Channel Component Mid1-p are Required for the Hexose-Induced Transient Elevation of Cytosolic Calcium Response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 2002. 44: 1299-1308. **IF: 5,832**

Miseta A, **Tókécs-Füzesi M**, Aiello DP, Bedwell DM A *Saccharomyces cerevisiae* mutant unable to convert glucose to glucose-6-phosphate accumulates excessive glucose in the endoplasmic reticulum due to core oligosaccharide trimming. *Eukaryotic Cell* 2(3):534-41. July 2003. **IF: 3,399**

Szendrei T, Magyarlaki T, Rideg O, **Tókécs-Füzesi M**, Kovács G, Nagy Á, Szomor Á, Molnár L, Dávid M, Póto L, Pajor L és Losonczy H: Multidrog rezisztencia vizsgálatok chronicus lymphoid leukaemiában. *Orvosi Hetilap*, 149 évf. 4 szám, 161-167, 2008.

Aradi D, **Tókécs-Füzesi M**, Paska T, Komócsi A: Monitoring the efficacy of antiplatelet therapy: all methods are equal, but some methods are more equal than others? *American Heart Journal*, 155(4): 2008. **IF: 4,285**

Papp E, Sinkovitz A, Paraicz G, **Tókécs-Füzesi M**, Magyarlaki T, Sárosi V, Balikó Z. A vasháztartás állapota krónikus légzési elégtelenségben szenvedő COPD-s betegeknél. *Medicina Thoracalis* LXII.1. febr.: 27-35, 2009.

Gyarmati J, **Tókécs-Füzesi M**, Kovács GL, Gaál V, Vida G, Ertl T. Fructosamine levels and hyperglycaemia in preterm neonates. *Neonatology*, 95(4): 267-270, 2009. **IF: 1,984**

Aradi D, Komocsi A, Vorobcsuk A, Rideg O, **Tókécs-Füzesi M**, Magyarlaki T, Horváth G I, Serebruany LV. Prognostic significance of high on-clopidogrel platelet reactivity after percutaneous coronary intervention: Systematic review and meta-analysis. *Am Heart J*. 2010 Sep;160(3):543-51. Review. **IF: 5,052**

Aradi D, Magyarlaki T, **Tőkés-Füzesi M**, Rideg O, Vorobcsuk A, Sayour A, Horváth IG, Komócsi A. Comparison of conventional aggregometry with VASP for monitoring P2Y12-specific platelet inhibition. *Platelets*. 2010;21(7):563-70. **IF: 2,117**

Rideg O, Magyarlaki T, **Tőkés-Füzesi M**, Miseta A, Kovács G L, Horváth I G, Komócsi A, Aradi D. Impact of genetic variants on post-Clopidogrel platelet reactivity in patients after elective percutaneous coronary intervention. *Pharmacogenomics*. 2011 Sep;12(9):1269-80. **IF: 3,974**

Frank D, Cseh G, Kocsis B, Nagy T, Borsiczky B, **Tőkés-Füzesi M**, Miseta A. Polymethyl-methacrylate-sorbitol based capsules as local drug delivery vehicles: in vitro antibiotic elution study. *Cell Biol Int*. 2011 Feb 8;35(3):267-272. **IF: 1,482**

Kupó P, Aradi D, Tornoyos A, **Tőkés-Füzesi M**, Komócsi A. Assessment of platelet function in patients receiving tirofiban early after primary coronary intervention. *Interv Med Appl Sci*. 2016 Dec;8(4):135-140. **IF: 1,24**

Faludi R, NagyG, **Tőkés-Füzesi M**, Kovács K, Czirják L, Komócsi A. Galectin-3 is an independent predictor of survival in systemic sclerosis. *Int J Cardiol*. 2017 Apr 15;233:118-124. **IF: 4,638**

Összesített IF: 41,128

Könyvfejezetek

Könyvfejezet (magyar):

Klinikai Biokémia (Egyetemi jegyzet, 284 oldal) 2001.

Véralvadás, Szív és harántcsíkolt izom betegségek laboratóriumi diagnosztikája fejezet

A fehérjekutatás modern módszertana,

szerző: Ludány Andrea, E-book, (ISBN, <http://tamop.etk.pte.hu/TF/>), Medicina Kiadó 2012, TÁMOP-4.1.2.-08/1/A-209-0054

Könyvfejezet: A vérszérum és vérplazma fehérje vizsgálatai; A hemosztázis vizsgálatok fehérje módszertana; A thromboembóliás kórképek fehérje diagnosztikája.

Könyvfejezet (angol):

My first book on bioanalytical methods, Editors: Mihaela Badea, Monica Florescu; Transilvania University Press 2010 (ISBN 978-973-598-743-5)

Chapter: **M. Tőkés-Füzesi**, O. Rideg, T. Szendrei, T. Magyarlaki: Analysis of multidrug resistance (MDR) mechanism – flow cytometric and molecular biological techniques p. 177-182.

Bioanalytical methods for life sciences. Immunochemical methods. Applied bioanalytical methods in medicine, food control and environmental protection; E-book, Editors: Mihaela Badea, Monica Florescu, Gheorghe Coman; Editura Universitatii Transilvania din Brasov 2010 (ISBN 978-973-598-724-4)
Chapter: **M. Tóké-Füzesi**, O. Rideg, T. Szendrei, T. Magyarlaci: Analysis of multidrug resistance (MDR) mechanism – flow cytometric and molecular biological technics p.156-163.

Diagnostic methods in human pathology, Edited by: Antonella Chesca; Editura Transilvania University Press Brasov 2012 (ISBN 978-606-19-0059-6)
Chapter: **M. Tóké-Füzesi**: Application of protein electrophoresis in routine laboratory practice p. 121-126.

Modern diagnostic methods for human diseases, Edited by: Antonella Chesca; Editura Transilvania University Press Brasov 2013 (ISBN 978-606-19-0213-2)
Chapter: **M. Tóké-Füzesi**, G.L.Kovács: Microparticles in health and disease p. 99-107.

A témához nem kapcsolódó idézhető absztraktok

Tóké-Füzesi M, Rideg K, Vermes É, Ember I: Effects of β -carotene on gene expressions in Cyclophosphamide treated mice. Int. J. Oncol, Vol. 7.(suppl), p. 1007, 1995.

IF: 1,110

Vermes É, Rideg K, **Tóké-Füzesi M**, Perjési P, Szabó T, Ember I, Tóth Gy: Effect of β -carotene on the genotoxic changes induced by Cyclophosphamide. Int. J. Oncol., Vol. 7. (suppl): 1000, 1995.

IF: 1,110

Tóké A, **Tóké-Füzesi M**, Ember I: Oncogene expressions in different metastatic and non metastatic tumors. Int. J. Oncol., Vol. 7. (suppl), p. 1007, 1995.

IF: 1,110

Rideg O, Teibert A, Magyarlaci T, **Tóké-Füzesi M**, Miseta A, Schmelczer M, Kovács LG: Appearance of multidrug resistance (MDR) as an early predictor of relapse in imatinib treated chronic myeloid leukaemia patients. Clinica Chimica Acta. 355: S285-S285 Suppl. S MAY 2005.

IF: 2,149

Szendrei T, Magyarlaci T, **Tóké-Füzesi M**, Rideg O, Kovács G, Poto L, Nagy A, Szomor A, Molnár L, Dávid M, Losonczy H: Multidrug-resistance in chronic lymphocytic leukemia Blood Reviews Vol 21, Suppl 1, S-140, 2007.

IF: 5,92

Gyarmati J, **Tóké-Füzesi M**, Kovács LG, Gaal V, Vida G, Ertl T: Fructosamine levels and hyperglycemia in preterm neonates. Acta Paediatrica 96,24-25, 2007.

IF: 1,411

Márky-Zay J, Tauber K Jakab, **Tóké-Füzesi M**, Magyarlaci T, Baráth S, Kappelmayer J. Laboratory validation of the Multidrugquant™(MDQ) assay kit. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Vol.: 49, suppl.: 1, p. S474-S474, may 2011.

IF: 2,15

Gergics R, Ács O, Hantosi M, **Tőkés-Füzesi M**, Rábai Tóthné I, Kovács GL. Comparison of two reagents measuring Heparin (UFH, LMWH). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Vol.: 49, suppl.: 1, p. S499-S499, may 2011. **IF: 2,15**

Kiss G, **Tőkés-Füzesi M**, Hussain A, Márton Zs, Hágendorn R. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: case study of an uncommon syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54(10): eA157–eA211. YF3. **IF: 3,017**

Tőkés-Füzesi M, Kiss G, Dobos Á, Gerdei Zs, Miseta A. The presence of a rare haemoglobin variant in a family. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54(10): eA157–eA211. P6. **IF: 3,017**

Kiss G, **Tőkés-Füzesi M**, Ács O, Miseta A. First experiences using a newly installed fully automated hematology analyser system: the Sysmex-XN-series. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(9): eA165.P51; DOI 10.1515/cclm-2018-0718. **IF: 3,556**

Összesített IF: 26,7

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek Prof. Dr. Kovács L. Gábornak, hogy biztosította számomra a kutatáshoz szükséges feltételeket, a sok értékes tanácsát, szakmai támogatását és töretlen bizalmát, valamint társ-témavezetőmnek, Dr. Molnár Tihamérnak a sok hasznos gyakorlati tanácsot és segítségét a klinikai adatok elemzésében és kiértékelésében.

Köszönettel tartozom Dr. Magyarlaci Tamásnak, hogy megismertette és megszerettette velem az áramlási citometriát, a sok előrevívő szakmai és baráti beszélgetésért, a támogatásáért és bizalmáért. Köszönöm Prof. Dr. Vermes Istvánnak, aki lehetővé tette, hogy találkozhatnék Prof. Dr. Auguste Sturkkel és Dr. Rienk Nieuwlanddal a mikropartikulumok elismert kutatóival és néhány nap erejéig betekintést nyerjek amszterdami laboratóriumuk munkájába. Sajnos e dolgozat elkészültét egyikőjük sem érthette meg.

Köszönöm Prof. Dr. Miseta Attilának, hogy megismertette velem a kutatói munkát, később pedig szigorával és hajthatatlanságával nagyban hozzájárult dolgozatom létrejöttéhez.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Kellermayer Miklósnak, hogy annak idején ismeretlenül is bízott bennem és lehetővé tette pályakezdésemet a laboratóriumi szakma területén, később pedig a sok biztatást.

Köszönöm Dr. Mühl Diánának és Dr. Ruzsics Istvánnak a szeptikus. ill. a COPD-s betegek besorolásában, klinikai adatainak gyűjtésében és a pontos mintatovábbításában nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Woth Gábornak és Dr. Kustán Péternek a szeptikus - ill. a COPD-s betegadatok statisztikai elemzésében nyújtott segítségét.

Szeretném megköszönni kollégáimnak és egyben barátaimnak Dr. Lakatos Ágnesnek, Prof. Dr. Ludány Andreának, Dr. Liszt Ferencnek, Prof. Dr. Kőszegi Tamásnak és Dr. Kiss Gabriellának a sok buzdítást és lelki támogatást.

És végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Szüleimnek és Nagytatámnak, hogy verejtékes, fáradtságos és néha erejüket meghaladó munkájukkal lehetővé tették számomra, hogy orvos lehessenek.

Hálával tartozom lányomnak, Teklának és páromnak, Karcsinak azért a sok-sok szeretetért és törődésért, amivel körülvettek, szikla szilárd hátteret biztosítva munkámhoz.