

Normál monocyták és monocytás leukémia sejtvonalak prokoaguláns aktivitása, az FLT3-ITD mutáció szerepe

Hudák Renáta, Bekéné Debreceni Ildikó, Gálné Szabó Gabriella, Antal-Szalmás Péter, Kappelmayer János

Debreceni Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet

Bevezetés: A kedvezőtlen prognózisú FLT3 (fms-szerű tirozinkináz receptor-3) ITD mutáció a felnőttkori akut myeloid leukémiák 20-30%-ában fordul elő, leggyakrabban a monocytá sejtvonalat érinti. Kísérleteinkben az FLT3-ITD mutációra vad típusú THP-1, heterozigóta MOLM-13 és homozigóta MV4-11 akut monocytás leukémia sejtvonalak prokoaguláns hatását vizsgáltuk. Hipotézisünk az volt, hogy az FLT3-ITD mutáció megléte - a normál humán monocytákhoz képest - fokozott prokoaguláns aktivitással járhat.

Anyag és módszer: A sejtvonalak tenyésztése 15%-os FBS-t tartalmazó RPMI-1640 tápoldatban történt. Humán monocytákat mágneses monocytá szeparáló kit segítségével szeparáltunk. A sejtek életképességét tripánkék festéssel és propidium jodid jelöléssel határoztuk meg. A prokoaguláns hatást egy lépéses prokoaguláns aktivitás assay-vel (PCA, KC-1 koagulométer), és thrombin generációs teszttel (TGT, Fluoroskan Ascent fluoriméter, Thrombinoscope szoftver) vizsgáltuk. Felszíni szöveti faktor (TF) antigén és foszfatidil-szerin expresszió vizsgálata Beckman Coulter FC500 áramlási citométerrel történt.

Eredmények: A foszfatidil-szerin expresszió mindhárom sejtvonala esetében 3-4% volt. A TF expresszió mértéke az alábbiak szerint alakult: THP-1: 87%, MOLM-13: 4,7%, MV4-11: 75%. A PCA teszt eredményei: THP-1 sejtvonala esetében $123 \text{ mU}/5 \times 10^6$ sejt, MOLM-13 sejtvonala $65 \text{ mU}/5 \times 10^6$ sejt, MV4-11 sejtvonala $35 \text{ mU}/5 \times 10^6$ sejt. Mindhárom monocytás leukémia sejtvonala szignifikánsan gyorsabb thrombin generációt mutatott (lagtime: 3,9-4,7 min) normál humán monocytákhoz képest (lagtime: 14,9 min, SEM: 2,5). VII-es faktor hiányplazma és anti-TF antitesttel történt előkezelés teljesen blokkolta a sejtek prokoaguláns aktivitását, a MOLM-13 sejtvonala XII-es faktor hiányplazmában reziduális thrombin generációt mutatott. A sejtvonalakból szeparált mikropartikulák thrombin generációja az intakt sejtekével megegyező tendenciát mutatott.

Következtetés: Áramlási citometriai módszerrel igazoltuk, hogy a sejtek TF-t expresszálnak felszínükön, melynek a PCA és TGT által bizonyítottan szerepe van prokoaguláns hatásukban, amelyet a mikropartikulák jelenléte tovább erősíthet, de az FLT3-ITD mutáció önmagában nem jár fokozott prokoaguláns hatással.