

Az impedimetria alkalmazása
a kardiológiai kutatások területén –
– Thrombocyta-adhézió, kardiotoxicitás,
szív-szövetépítés

Doktori tézisek

Dr. Polgár Livia

Semmelweis Egyetem
Elméleti orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. med. habil. Kóhidai László, C.Sc., egyetemi docens
Dr. Soós Pál, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Szokodi István, D.Sc., egyetemi docens
Dr. Cervenak László, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Horkay Ferenc, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lakó-Futó Zoltán, Ph.D., szakorvos
Dr. Darvas Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2018

BEVEZETÉS

A kardiovaszkuláris megbetegedések a fejlett világ morbiditási és mortalitási statisztikái élén állnak, jelentős terhet róva ezzel az egyén mellett a társadalomra is. Mindezek okán a biomedicinális elméleti és klinikai kutatások jelentős része a kardiovaszkuláris területet célozza. Az impedimetriát alkalmazó sejtadhéziómérés az utóbbi évtizedben a kutatásban egyre elterjedtebben használt technika. Számos alkalmazási lehetőség nyílik az impedimetria számára a kardiovaszkuláris kutatások területén is. A kardiovaszkuláris sejt alkotóelemek adhéziójának vizsgálatán túl módot adhat a hemosztázis részletesebb karakterizálására, kardiovaszkuláris területet érintő gyógyszerészeti kísérletek végzésére vagy akár új sebészeti terápiák kifejlesztésére is.

A kardiovaszkuláris kutatások egyik legnagyobb területét képezik a thrombotikus megbetegedések. Ezek kialakulásában a thrombocyták és a felszínükön található adhéziós receptorok kiemelt szerepet játszanak. Számos gyógyszer hatásának célja a thrombocyt-funkció befolyásolása, melyek között a thrombocyt-adhéziós molekulákra hatóak is gyakoriak. A vérzéses és egyéb szövődmények elkerülése érdekében egyre nagyobb szerepet kap az antithrombotikus terápiák hatásának monitorozása és a thrombocyt-funkciós vizsgálatok kifejlesztése. A thrombocyt-adhézió a thrombusképződéshez vezető folyamat első lépése, melyet thrombocyt-aktiváció és végső soron thrombocyt-aggregáció követ. Bár a többivel szorosán összefonódó részfolyamatról van szó, a thrombocyt-adhézió külön receptorokkal, jelátviteli utakkal rendelkező részfolyamat. A thrombocyt-funkció vizsgálatára számos módszer létezik, azonban igen kevés eljárás ismert, mely a thrombocyt-adhéziót szelektíven képes mérni, és ezen technikák közös tulajdonsága, hogy ezek a módszerek végpont-esszék, azaz nincs lehetőség a thrombocyt-adhézió valós idejű követésére, illetve a folyamat dinamikáinak vizsgálatára. Továbbá, egyik módszer sem kellően standardizált, és használatuk nem terjedt el a laboratóriumi gyakorlatban.

A célzott gyógyszerbevitel (*targeted drug delivery*) módszer lényege, hogy a gyógyszerként funkcionáló hatóanyagot (általában citotoxikus hatóanyagot) egy másik molekulához (vivőmolekulához) kapcsolják, ezáltal a citotoxikus molekula a hatás helyén nagyobb koncentrációban van jelen, mint a szervezet többi részén – ezzel a gyógyszerhatékonyság növekszik és a mellékhatások kialakulása csökken. A gonadotropint felszabadító hormon (*gonadotropin-releasing hormon*, GnRH) emberben nem termelődő III. izoformája, illetve ennek analógjai kiváló vivőmolekulák daganatellenes gyógyszer-célbajuttatási rendszerek kialakításához, mivel a GnRH-receptorok többféle rosszindulatú daganatsejten is

kimutathatóak. A doxorubicin, daunorubicin és methotrexate citotoxikus gyógyszermolekulák, melyek mindhárman széles mellékhatásspektrummal rendelkeznek; a doxorubicin és a daunorubicin esetében a kardiovaszkuláris mellékhatások kiemelt jelentőségűek – főképp cardiomyopathia –, és végső soron szívelégtelenség kialakulásához vezethetnek, ez az alkalmazhatóságot is behatárolja. Ezen gyógyszer-célbajuttatási rendszerek fejlesztése során számos eredményt értek el; többek között hatóanyag-leadást fokozó beépített oligopeptid távtartó szekvenciák, multifunkcionális konjugátumok és dimer molekulák kerültek kifejlesztésre, ezek fokozott *in vitro* és *in vivo* tumorelles hatással illetve stabilitással és intracelluláris célbajuttatási potenciállal bírnak. Nem történt eddig olyan vizsgálat, amely ezeket a gyógyszermolekulákat kardiotoxicitás szempontjából vizsgálná – holott ezen tulajdonság az anthracyclin alapú terápiának az egyik limitáló tényezője.

A szívelégtelenség a thrombotikus kórképek mellett az egyik leggyakoribb kardiológiai megbetegedés. A végstádiumú szívelégtelenség kuratív terápiáját a szívtranszplantáció jelenti, azonban a donorszívek hiánya miatt a transzplantációs listák halálozása magas. Emiatt egyre elterjedtebb a mechanikus keringéstámogató eszközök használata, azonban ez – a szívtranszplantációhoz hasonlóan – számos szövődménnyel járhat. Az allogén szívtranszplantációt kiegészítő lehetséges új alternatívája lehet a szövetépítéssel (*tissue engineering*) előállított szívek beültetése. A szövetépítés során először egy biokompatibilis vázat (*scaffold*-ot) hoznak létre, majd következő lépésben a vázra a recipiens szervezetnek megfelelő sejt típusokat ültetik rá, létrehozva a kész, szövetépített szervet vagy szövetdarabot. A szövetépítés fontos előnye, hogy, mivel a donor szervezet sejtjei eltávolításra kerülnek, és nem kerülnek beültetésre, csökken az immunológiai kilökődési reakciók kialakulásának esélye. Mindez azt is jelenti, hogy a váz kialakításhoz szükséges donor szervek nem csupán humán donoroktól, hanem egyéb, hasonló morfológiával rendelkező fajokból is nyerhetőek (pl. sertés). Ezáltal egy eddig kiaknázatlan, hatalmas donor-pool nyílna meg transzplantációs célokra. A szövetépített egész szívek létrehozásának első lépése a biokompatibilis váz előállítása – ennek egyik lehetséges módszere az eredeti szövetről a sejtek eltávolítása decellularizációs eljárással. A második lépés a megfelelő sejt típusok (pl. cardiomyocita, endothel sejt) ráültetése a kész vázra – ehhez a váz és a sejtek mellett adhéziót szabályzó anyagokra is szükség van.

Az impedimetria 1984-ben Giaever és Keese által kifejlesztett, sejtadhézió mérésére alkalmas laboratóriumi technika. A mérés elvi alapja, hogy elektromos közegben az élő sejtek felszíni membránjuk intakt voltának köszönhetően szigetelő objektumként viselkednek. Az impedimetria során az adhéziós felületet egy arany elektróda vagy elektródahálózat képezi, melyen a műszer az alkalmazott frekvenciájú váltóáramnak megfelelő elektromos impedanciát

mér. Az elektródákhoz letapadó sejtek, mint szigetelőanyagok, fokozzák az elektródákon mért elektromos impedanciát. A regisztrált elektromos impedancia mértéke az elektródák lefedettségével – azaz a letapadt sejtek számával és a letapadás („kiterülés”) mértékével – arányos. Így az impedimetria segítségével a sejtadhézió kvalitatíve és kvantitatíve is jól mérhető. Mivel a regisztrált impedancia értéke a sejtekkel lefedett elektródafelülettel egyenesen arányos, a nem letapadó, csupán az elektródákra „hulló” sejtek esetében, azoknak az elektródákkal érintkező kisebb felülete miatt, alacsonyabb jelet észlel, így azt a valós adhéziótól jól el tudja különíteni a műszer. Hasonló a helyzet a thrombocyták vizsgálatakor az elektródákra eső összetapadt thrombocytákkal, illetve thrombocyta-aggregátumokkal. Mivel az aggregátum felülete kisebb, mint az azt képező thrombocyták összfelülete, a műszer alacsonyabb impedanciaértéket mér, és el tudja különíteni az adhéziót az aggregációtól. Az elektromos impedancia regisztrálására nagy frekvenciával, percenként több alkalommal van lehetőség – ennek következtében az impedimetria valós idejű, a sejtadhézió dinamikáját gyakorlatilag folyamatosan követő mérési módszernek tekinthető.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során céлом volt az impedimetria, illetve az impedimetriai adhéziómérés hasznosíthatóságának vizsgálata a kardiovaszkuláris kutatások területén. Ennek során az impedimetria alkalmazhatóságát vizsgáltam, mint potenciális diagnosztikai, gyógyszerfejlesztésben felhasználható vagy sebészi terápiák kifejlesztésében segítséget nyújtó eszközt. Munkám során az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

1. Alkalmas technika-e az impedimetria a thrombocyta-adhézió és -spreading mérésére egészséges humán alanyoktól nyert thrombocyta-mintákon?

1/A. Milyen hatással vannak az ismert referencia agonisták a thrombocyták impedimetriával mért adhéziós, illetve spreading tevékenységére?

1/B. Van-e a különbség a referencia agonistáknak a thrombocyták adhéziós vagy spreading tevékenységére gyakorolt hatásában?

1/C. Vannak-e különbségek egy egészséges minta különböző klinikai faktorok által meghatározott alcsoportokban mért thrombocyta-adhézió/spreading mértéke között, illetve vannak-e kimutatható korrelációk a mért klinikai paraméterek és a thrombocyta-adhézió/spreading mértéke között?

2. Mely kemoterapeutikus hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumok lehetnek alkalmasak kevesebb kardiotoxikus mellékhatással bíró gyógyszermolekulák kifejlesztésére?

2/A. Milyen citotoxikus hatással bír a doxorubicin, daunorubicin, methotrexate, illetve a kemoterapeutikus hatóanyagot tartalmazó 16 GnRH-III konjugátum a szív élettani funkcióját alapvetően meghatározó két sejtípus, a HCM humán cardiomyocytá és HUVEC humán endothel sejtek esetében?

2/B. Kimutatható-e citotoxikus hatás doxorubicint tartalmazó konjugátumok esetében?

2/C. Kimutatható-e citotoxikus hatás daunorubicint (illetve daunorubicint és methotrexate-ot) tartalmazó GnRH-III konjugátumok esetében?

3. Lehetséges-e impedimetriai vizsgálómódszerrel, egy- és többsejtréteg összeállításban karakterizálni a decellularizált sertés szívvázat, illetve annak humán kardiovaszkuláris sejtekkel való adhéziónak a kapcsolatát?

3/A. Hogyan befolyásolja a homogenizált decellularizált sertés szívváz humán endothel sejtek és cardiomyocyták adhézióját?

3/B. Milyen hatással van az ismertén erős adhéziónak tulajdonsággal bíró fibronektin a homogenizált decellularizált szívváz viszonylatában a humán kardiovaszkuláris rendszer sejtjeinek adhéziójára?

MÓDSZEREK

1. Citotoxikus molekulákat tartalmazó GnRH-III hormon alapú peptid konjugátumok

Kísérleteinkben 16, citotoxikus hatóanyagot (doxorubicin, daunorubicin és methotrexate) tartalmazó GnRH-III peptid konjugátum kardiotoxikus hatását vizsgáltuk. Ezek előállítását az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport és a Konstanz Egyetem, Kémiai Tanszék, Analitikai Kémiai és Biopolimer Szerkezetanalitikai Laboratórium végezte.

2. Modellsejtek

A decellularizált sertésszív adhéziónak tulajdonságainak karakterizálásaként első lépésben egy ismertén jó adhéziónak tulajdonságokkal rendelkező sejt vonalat, a HT-1080 humán kötőszöveti eredetű fibrosarcoma sejt vonalat vizsgáltuk. Következő lépésben a decellularizált sertésszív adhéziónak tulajdonságait a kardiovaszkuláris rendszer egyik legfontosabb sejt típusán, endothelialis sejteken vizsgáltuk. Ehhez a HMEC-1 humán microvasculáris endothel sejt vonalat használtuk. Továbbiakban humán primer cardiomyocytá modellsejtként a HCM

(Human Cardiac Myocyte) sejteket vizsgáltunk. Cítotoxikus drogot tartalmazó peptidkonjugátumaink toxikus hatását cardiomyocyták mellett endothelialis sejteken is vizsgáltuk, ezen kísérletekhez a HUVEC humán umbilicalis véna eredetű endothelialis sejteket használtuk.

3. Thrombocyta-minták

A thrombocyta-adhézió impedimetriás méréseihez humán eredetű thrombocyta-mintát használtunk. A vérminták a Semmelweis Egyetem, Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika által folytatott *Budakalász Epidemiológiai Vizsgálat* keretein belül nyertük egészséges, gyógyszeres kezelés alatt nem álló, 20-40 év közötti önkéntesektől származtak. Mind a thrombocyta-adhézió, mind a thrombocyta-spreading mérések során 10-10 önkéntes thrombocta-mintáit vizsgáltuk. Méréseinkhez Platelet Rich Plasma (PRP)-t készítettünk.

4. Klinikai és laboratóriumi vizsgálatok

A vérvételi populáción standard laboratóriumi vizsgálatokat (vérkép, biokémiai vizsgálatok, enzimek, lipidek) és specializált vizsgálatokat – hemoglobin A1c (HbA1c), N-terminális agyi nátriuretikus peptid (PRO-BNP) – végeztünk. A vizsgálatban szereplő egyének klinikai állapotfelmérését – életkor, testtömeg, testmagasság, derék- és csípőkörfog, vérnyomás, jobb- és baloldali boka-kar index – is elvégeztük. Anamnesztikusan a dohányzást, alkoholfogyasztást, ismert allergiás megbetegedést, sporttevékenységet és fizikai aktivitást regisztráltuk.

5. Decellularizált sertésszív előállítás

A decellularizált sertésszívek előállítása perfúziós technikával történt Weymann és munkatársai által 2011-ben leírtak szerint. Az impedimetriás mérések elvégzéséhez a decellularizált sertésszívvázakat ultrahangos módszerrel homogenizáltuk.

6. Impedimetriai mérések

Az impedimetriai mérésekhez az xCELLigence SP készüléket (ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA, USA) használtuk. Ebben a műszerben az adhéziós felületet egy arany elektróda-array képezi, amelyet egy 96-lyukú E-plate welljeinek alján helyeztek el – ez durván a wellék aljának 80 százalékát borítja be. Az elektródákhoz letapadó élő sejtek szigetelő objektumként viselkednek, ezáltal emelik az elektródákon mért elektromos impedancia értékét. A mért impedancia értéke az elektródák sejtek által való lefedettségével – tehát a letapadt sejtek számával és a letapadás mértékével (a sejtek 'kiterültségével') – arányos. Az elektromos impedanciát a műszer három különböző frekvencián méri, ezek segítségével átlagot számol. A mért értéket ún. 'Sejtindex' (*Cell Index*, CI) formájában adja meg:

$$CI = \frac{Z_t - Z_b}{F}$$

A 'Sejtindex' egy dimenzió nélküli szám, mely függ: (1) az adott pillanatban mért elektromos impedanciától (Z_t), (2) a háttér impedanciától (Z_b) és (3) egy, a használt elektromos áram frekvenciájától függő beépített állandótól (F).

Az xCELLigence készülék segítségével dinamikus mérésre van lehetőség, a sejtek adhéziója valós időben követhető.

Thrombocytá-adhézió mérése: A thrombocytá-adhézió méréséhez a fent leírt módon előállított PRP-t használtuk. Első lépésként hígítatlan PRP minta és három különböző hígítású PRP minta (1:10, 1:100, 1:1000) adhézióját vizsgáltuk. A hígításhoz 0,9%-os nátrium-klorid oldatot használtunk. A további thrombocytá-adhézió mérésekhez 1:10 arányban 0,9%-os nátrium-kloriddal hígított PRP-mintát használtunk. A thrombocytá-szám függés után a thrombocyták adhézióját több standard, thrombocytá-adhézió, ill. -aggregáció mérése során használt agonista jelenlétében vizsgáltuk. Ehhez adrenalin – 5 μ M és 10 μ M koncentrációban –, adenzindifoszfátot (ADP) – 5 μ M és 10 μ M koncentrációban – és kollagén – 2 μ g/ml koncentrációban – használtunk. Minden minta esetén 3 párhuzamos mérést végeztünk. Ezen mérések során a thrombocytá-minta hozzáadása az agonisták hozzáadása után történt – a mérés leállítása nélkül.

Thrombocytá-spreading mérése: A thrombocytá-spreading méréséhez szintén 0,9%-os nátrium-kloriddal 1:10 arányban hígított PRP-vel előállított thrombocytá-mintát használtunk. Ezen mérések során az elektródákhoz már letapadt thrombocyták kiterülésének változását, spreading tevékenységét vizsgáltuk a thrombocytá-adhézió méréseknél alkalmazott standard agonisták (adrenalin, ADP és kollagén) hatására. Minden minta esetén 3 párhuzamos mérést végeztünk. Ezen mérések során először a thrombocytá-minták hozzáadása történt, majd az egyensúlyi állapot (plató fázis) elérés után következett az agonisták hozzáadása – a mérés leállítása nélkül.

Decellularizált sertésszív vizsgálata – egy sejtréteg elrendezés: A decellularizált sertésszívvel végzett vizsgálatok első lépéseként a wellék alján elhelyezkedő elektródákat különböző adhéziót befolyásoló anyagokkal fedtük. Kísérleteink során négy különböző fedést alkalmaztunk: (1) homogenizált sertésszív-váz (*heart scaffold*, HS), (2) fibronectin desztillált vízben 16 μ g/ml végkoncentrációra hígítva (FN), (3) homogenizált sertésszív-váz és fibronectin keveréke (fibronectin homogenizált sertésszív-vázban hígítva 16 μ g/ml végkoncentrációra) (FN + HS) és (4) desztillált víz (Kontroll). A kísérletek során minden vizsgált sejtvonal esetén három különböző sejtszámon végeztük a méréseket: 10 000/well, 15

000/well és 20 000/well sejtszámokon a HT-1080 fibrosarcoma sejtek és a HMEC-1 endothel sejtek esetén, és 5 000/well, 10 000/well és 15 000/well sejtszámokon a HCM cardiomyocyták esetén. Minden minta esetében 4 párhuzamos mérést végeztünk.

Decellularizált sertésszív vizsgálata – „szendvics” kísérlet: A „szendvics” kísérletek során két sejtréteg egymásra ültetését vizsgáltuk. Első lépésként HMEC-1 endothel sejtréteget (20-000/well) ültettünk a wellek alján tartó elektróda-hálózatra, melyekre, különböző fedőanyagokkal való kezelés után, HCM cardiomyocytá sejtet ültettünk. Miután az endothel sejtek egy konfluens egysejtvastagságú bevonatot, *monolayer*-t alakítottak ki (ezt az impedimetria görbe plató fázisa jelezte), az egy sejtvonalas méréseknél használt adhéziót befolyásoló fedő anyagokkal ((1) homogenizált szívváz, (2) fibronektin, (3) az előző kettő keveréke, illetve (4) kontrollként fentiek elhagyása – az előző szekcióban leírtak szerint) kezeltük. A méréseket három különböző HCM cardiomyocytá sejtdenzitással végeztük el: 5000/well, 10 000/well és 15 000/well. Minden minta esetén 4 párhuzamos mérést végeztünk.

Kardiotoxicitás mérése: A toxicitási vizsgálatok során HUVEC endothel sejteken és HCM cardiomyocytákon vizsgáltuk a 16 GnRH konjugátum toxikus hatását. Első lépésként a sejteket önmagukban adtuk az elektródákhoz, majd miután az adhézió elért egy egyensúlyi helyzetet (ezt jelezte az impedimetriás görbék plató fázisa), hozzáadtuk a vizsgált citotoxikus hatóanyagot. Minden minta esetén 4 párhuzamos mérést végeztünk.

7. Statisztikai kiértékelés

Az eredmények kiértékeléséhez az Origin Pro 8.0, SPSS, Microsoft Excel és RTCA 2.0 Software (xCELLigence SP készülék saját statisztikai szoftvere) statisztikai programokat használtuk.

Az adhézió, spreading és citotoxikus hatás kvantifikálására az RTCA Software beépített *Slope* paraméterét használtuk. Ennek segítségével a görbék lineáris szakaszára egy egyenest fektettünk, és annak a meredekségét számítottuk. A különböző eredmények összehasonlítását a *Delta Slope* (DS) paraméter segítségével végeztük, mely a vizsgált görbe és a kontroll görbe *Slope* értékének különbsége. Mivel az impedimetriás görbék a legtöbb esetben karakterisztikus bifázisos lefutást mutattak (kezdeti, rövid, általában felszálló szakasz, amelyet egy elnyújtottabb, általában leszálló szakasz követ), a *Slope* és DS értékeket mindkét szakaszra számítva külön értékeltük (rövidtávú és hosszútávú hatás).

A toxicitás és a decellularizált szívváz anyagaival történt méréseknél a statisztikai eltéréseket egyutas ANOVA teszt segítségével értékeltük. A thrombocytá-adhézió és –spreading

vizsgálatoknál páros *t*-próbát alkalmaztunk. A populációs klinikai és laboratóriumi paraméterek vizsgálatánál folyamatos változók esetén Pearson-féle korrelációs együtthatót (*r*-értéket) számítottunk, míg diszkrét változók esetén kétmintás *t*-próbát használtunk.

A statisztikai szignifikancia jelölésére az alábbi sémát használtuk:

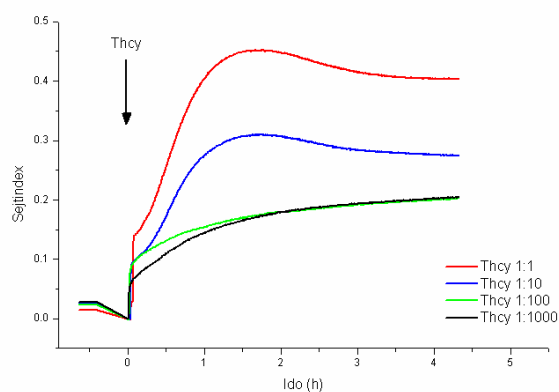
x: $p < 0,05$; y: $p < 0,01$; z: $p < 0,001$.

EREDMÉNYEK

1. Thrombocyta-funkció vizsgálata impedimetriával

1.1. Thrombocytaszám-függés vizsgálata

Az xCELLigence rendszer az adhézió valós idejű mérésére alkalmas sejtbioológiai vizsgálo technika. Számos eredmény mutatja alkalmasságát az adhézió sejtszintű vizsgálatára, azonban thrombocyta-adhézió vizsgálatára mindeztáig nem írtak le impedimetriás méréseken alapuló eredményeket. A thrombocyták nem valódi



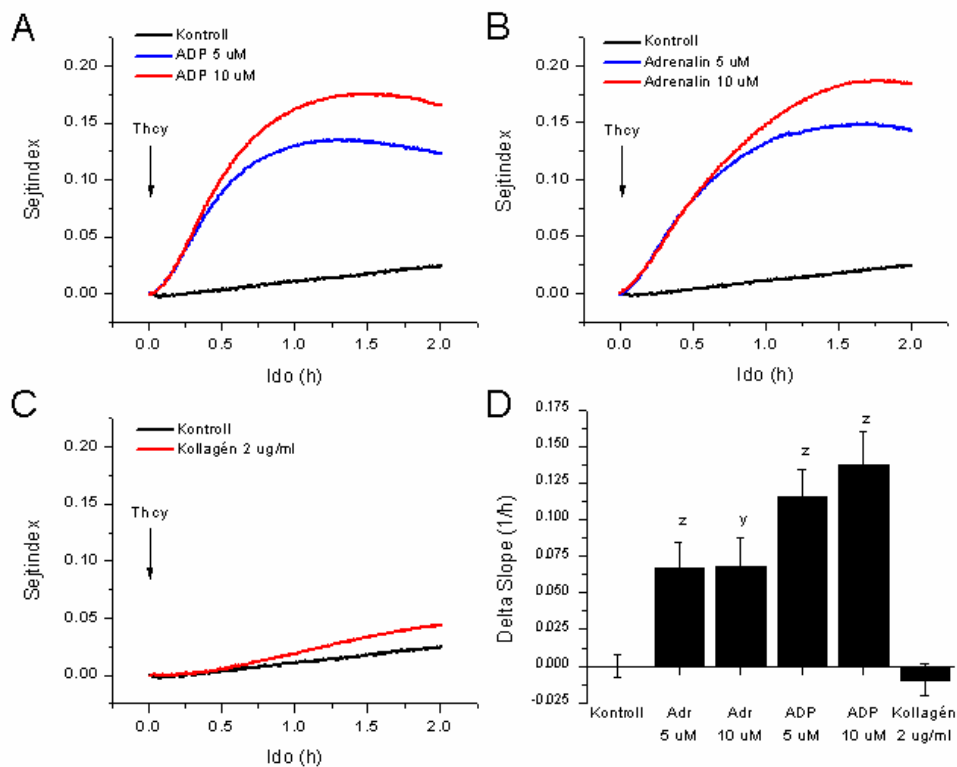
1. ábra– A különböző thrombocyta-számok hatása a thrombocyta-adhézióra

sejtek, hanem sejtfragmentumok, sejtekhez képest hiányos sejtalkotókkal, valamint nagyságrendekkel kisebb mérettel is rendelkeznek. Ezek miatt a thrombocyták adhéziójának vizsgálatára egy nagy érzékenységű vizsgálo módszerre van szükség. Az xCELLigence rendszer impedancia alapú adhéziómérése ezeknek a követelményeknek megfelelt. A letapadó thrombocyták által generált impedanciajel, bár a sejtekéhez képest arányosan kisebb mértékben, de jól detektálható és mérhető volt a készülék által, sőt, a műszer segítségével a különböző thrombocyta-számú minták is jól elkülöníthetőek voltak egymástól.

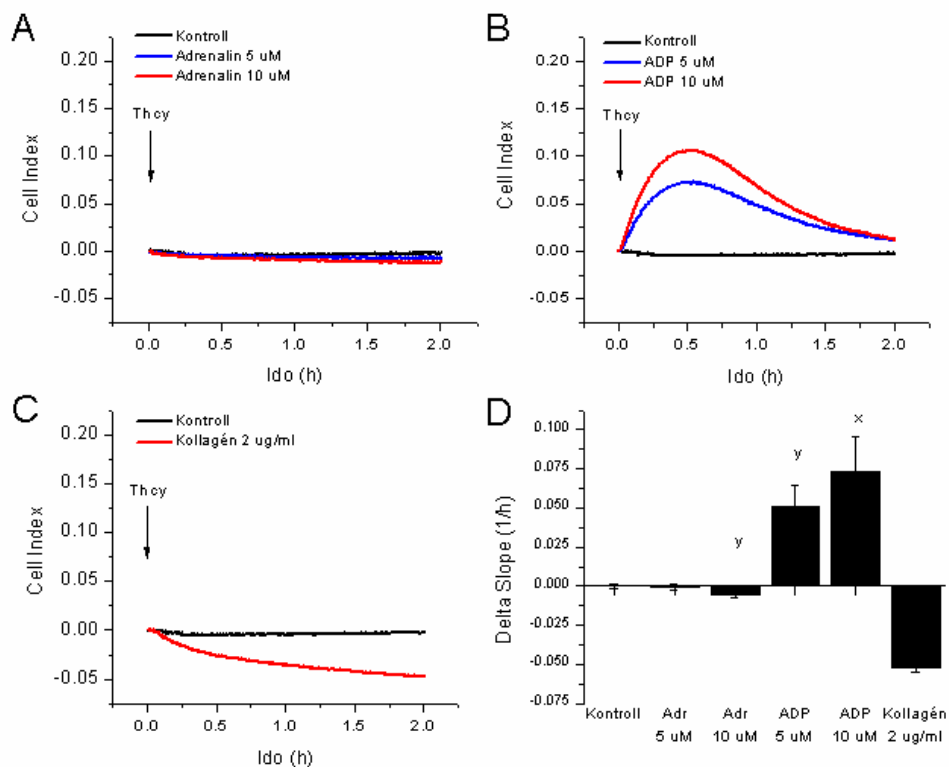
1.2. Thrombocyta-adhézió és -spreading – impedimetriai mérések

Az adrenalin és az ADP is gyenge thrombocyta agonista. Impedimetriai mérés során mindkét agonista hatása kimutatható volt: egészséges egyénektől származó thrombocyta-mintákon koncentrációfüggő módon fokozták a mért thrombocyta-adhéziót. Az ADP hasonló koncentrációfüggő módon fokozta a thrombocyták spreading tevékenységét, azonban az adrenalin nem befolyásolta az elektródákhoz már kitapadt thrombocyták kiterülését.

Elmondható tehát, hogy az impedimetria segítségével a thrombocyta-adhézió és -spreading, ez két, egymással szorosan összefüggő folyamat, elkülöníthető volt egymástól.



2. ábra – Agonisták hatása a thrombocyta-adhézióra. Reprezentatív impedimetriai görbék: adrenalin (A), ADP (B), kollagén (C) és statisztikai kiértékelés (D)



3. ábra – Agonisták hatása a thrombocyta-spreadingre. Reprezentatív impedimetriai görbék: adrenalin (A), ADP (B), kollagén (C) és statisztikai kiértékelés (D)

A kollagén egy erős thrombocytá-agonistának számít. Érdekes módon, az impedimetriai mérések során a kollagént használva a thrombocytá-adhézió esetében jobbra negatív hatást mértünk. Erre az ellentmondásosnak tűnő eredményre két különböző magyarázat is lehetséges. Egyrésztől nem kirázható, hogy a hígítás során a minta von Willebrand-faktor tartalma lecsökkent, így nem volt elegendő a kollagén hatásának kialakulásához. Másik lehetséges magyarázat, hogy – mivel a thrombocytákon direkt kollagénreceptorok is megtalálhatóak – az erős agonista kollagén hatására aggregáció történt. Az aggregátumok összességében sokkal kisebb, mint az egyes letapadó thrombocyták összeadott felülete – ez pedig magyarázattal szolgál az alacsonyabb mért 'Sejtindex'-re.

Ezen eredmények alapján úgy gondoljuk, hogy a gyenge thrombocytá-agonisták (pl. adrenalin, ADP) a megfelelő trigger anyagok a thrombocytá-adhézió vizsgálatára, mivel itt gyengébb stimulusokra van szükség, mint a thrombocytá-aggregáció vizsgálata esetén.

1.3. Klinikai faktorok hatása thrombocytá-adhéziós és spreading tevékenységére

Vizsgálatunk során különböző *in vivo* paramétereket regisztráltunk és vetettünk össze a thrombocytá-adhézió változásával, hogy az impedimetriai alapú thrombocytá-adhézió mérést tovább karakterizáljuk. A thrombocytá-adhézió szignifikánsan fokozott volt olyan egyének esetében, akiknek az anamnézisében allergiás megbetegedés szerepelt. Ezzel ellentétben szérum vércukorszint negatív korrelációt mutatott a thrombocytá-adhézió mértékével. Szintén negatívan korrelált a thrombocytá-adhézió az életkorral alacsony koncentrációjú adrenalin használatakor – ez ellentétes azzal a ténnyel, hogy a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásának rizikója a kor előrehaladtával növekszik. Azonban jelen vizsgálatban az alanyok mind fiatal, 20 és 40 év közötti egyének voltak, amely populációban kardiovaszkuláris megbetegedések előfordulásának rizikója alacsony.

Mindezek alapján elmondható, hogy az impedimetriai alapú thrombocytá-adhézió mérés kellően differenciált egy egészséges populáció alcsoportjai között, és érzékenyen tudta kimutatni az apró különbségeket is. Ez kiemeli ennek a technikának a jelentőségét prognosztikai faktorok detektálására egy tünetmentes populáció esetén.

1.4. Laboratóriumi paraméterek és impedimetriai mérések közötti korrelációk

Az impedimetriai thrombocytá-adhézió mérés klinikai hasznosíthatóságának további vizsgálata céljából a standard laboratóriumi paraméterek és az impedimetriával mért thrombocytá-adhézió, illetve -spreading közti összefüggéseket elemeztük. Kiemelendő, hogy az adrenalin és az ADP által kiváltott thrombocytá-adhézió negatív korrelációt mutatott a szérum nátrium és

kalcium szintekkel. A spreading jelenség során tapasztalt változások az elektródafelszínhez tapadó thrombocyták esetében jóval gyengébb reakciók, mint amelyeket az adhézió vizsgálata esetén tapasztaltunk, ezért kevesebb szignifikáns korrelációt találtunk. Mivel a spreading tevékenység egy kisebb nagyságrendű, finomabb folyamat az adhézióhoz képest, feltételezhető, hogy egy egészséges populációban, ahol a variabilitás kicsi, nehezebb különbségeket kimutatni. Mindez azt mutatja, hogy ezen a téren további vizsgálatok szükségesek, célzott betegcsoportok bevonásával, a spreading mérés standardizálásához. Az azonban, hogy egy egészséges mintán is ki lehet mutatni eltéréseket, azt sugallja, hogy patológiás állapotokban, ahol ezek a különbségek hatványozottan vannak jelen, jó eséllyel vizsgálhatók a thrombocytá-spredding tevékenységbeli különbségek impedimetriával.

2. Citotoxicitás vizsgálata impedimetriával

A két kemoterápiában használt gyógyszermolekula, doxorubicin és daunorubicin kardiovaszkuláris mellékhatásait régóta dokumentálták már, míg a methotrexate esetében igen ritka, incidentális kardiovaszkuláris mellékhatások ismertek. Kísérleteink hasonló *in vitro* eredményeket mutattak: a doxorubicin és a daunorubicin esetében citotoxikus hatást mértünk cardiomyocytákon és endothel sejteken is, míg a methotrexate esetében cardiomyocytákon semmilyen toxikus hatást nem tudtunk kimutatni, és az endothel sejtek esetében is csak rövidtávú hatásokat figyeltünk meg, hosszútávon ezek a hatások eltűntek.

Az An-152 egy doxorubicin tartalmazó GnRH-I konjugátum, amelynek erős tumorellenes hatását számos humán rosszindulatú daganat esetén leírták, többek között humán prosztatata carcinoma esetében fázis I és fázis II vizsgálatok is folyamatban vannak. Saját méréseink során az An-152 a doxorubicinhez hasonlóan citotoxikus hatással bírt a cardiomyocytákra, azonban a doxorubicinhez képest csökkent mértékben, csak a két legmagasabb (10^{-6} mol/L és 10^{-7} mol/L) vizsgált koncentráción. Endothel sejteken az An-152 hasonló toxikus hatást mutatott. Ezek alapján, jó tumorellenes hatása ellenére, a mellékhatások tekintetében nem az An-152 javasolható, mint ideális molekula.

A GnRH-III(Dox-ester) az An-152 GnRH-III-at tartalmazó analógja, mely fokozottabb tumorellenes hatással rendelkezik. Mérések során a doxorubicinéhez hasonló citotoxikus hatást mutatott endothel sejteken a két magasabb koncentráción (10^{-7} és 10^{-6} mol/L), és még erősebb mértékben, minden vizsgált koncentráción (10^{-8} , 10^{-7} és 10^{-6} mol/L) a cardiomyocytákon, melyek feltételezhetően limitálnák későbbi felhasználását, mint gyógyszerhatóanyag.

A vizsgált monomer konjugátumok közül a GnRH-III(Dau) – a citotoxikus hatású daunorubicinnel ellentétben – nem mutatott toxikus hatást se a cardiomyocyta, se az endothel sejteken. A két, általunk vizsgált bifunkcionális konjugátum, (Lys)⁴GnRH-III(Dau⁴-Dau⁸) és GnRH-III(Dau⁸-Dau⁸) is hasonló viselkedést mutatott: nem volt toxikus hatással egyik vizsgált sejttípusra sem. Ezen adatok alapján a bemutatott három konjugátum kardiotoxikus mellékhatás nélküli kemoterapeutikumok fejlesztésének jövőbeli célpontjai lehetnek.

A beépített speciális tetrapeptid távtartó („*spacer*”) szekvenciák (GFLG vagy YRRL) korábbi vizsgálatokban a tumorsejtekben a konjugátum lizoszomális hasíthatóságát fokozták, amivel a daganatellenes potenciált fokozták. Saját vizsgálatainkban kettő doxorubicin tartalmú, távtartó szekvenciát tartalmazó konjugátumot vizsgáltunk: GnRH-III(Dox-amid-GFLG) és GnRH-III(Dox-oxim-GFLG). Mindkét molekula megtartotta a doxorubicinra jellemző toxikus hatását cardiomyocytákon és endothel sejteken is, bár cardiomyocyták esetében ez a hatás csökkent mértékű volt, csak a legmagasabb koncentrációban volt kimutatható. Ettől eltérően, az egyik daunorubicin tartalmú, távtartó szekvenciával bíró konjugátum, a GnRH-III(Dau-GFLG) egyik vizsgált koncentrációban sem mutatott toxikus hatást cardiomyocyta sejteken, és az endothel sejtek esetében is csupán a legmagasabb vizsgált koncentrációban. A másik daunorubicin tartalmú, YRRL spacer szekvenciát tartalmazó konjugátum és dimer formája, GnRH-III(Dau-YRRL) és [GnRH-III(DauYRRLC)]₂, viszont a daunorubicinéhoz hasonló mértékben citotoxikus hatásúak voltak endothel sejteken, míg gyakorlatilag egy nagyságrenddel gyengébben, csupán a legmagasabb vizsgált koncentráción mutattak toxikus hatást cardiomyocyta sejteken.

Kettő módosított GnRH-III konjugátumot [(Lys(Ac))⁴GnRH-III(Dau) és (N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau)] vizsgáltunk. Endothel sejtekben egyik hatóanyagánál sem tudtunk toxikus hatást kimutatni. Cardiomyocytákon az (N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau) nem mutatott toxikus hatást, de a (Lys(Ac))⁴GnRH-III(Dau) esetében a legmagasabb vizsgált koncentrációban (10⁻⁶ mol/L) toxikus hatást mértünk – ellentétben a daunorubicinnal, mely ezt a toxikus hatást a két alacsonyabb vizsgált koncentráción is mutatta –, továbbá, ez a hatás gyakorlatilag egy nagyságrenddel gyengébb volt a daunorubicinénál. Ezek alapján a ⁴Ser módosítása feltételezhetően nem csak fokozott stabilitású daganatellenes hatást eredményez, mint ahogy azt korábbi vizsgálatokban leírták, hanem a kardiális mellékhatások is csökkenhetnek általa.

Jelen munka során végzett kísérleteinkben a [GnRH-III(Dau-C)]₂ dimer konjugátum nem volt citotoxikus hatással se az endothel, se a cardiomyocyta sejtekre – hasonlóan a monomer GnRH-III(Dau) konjugátumhoz. Ezzel ellentétben, a (N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau) monomer konjugátum – mely nem mutatott toxikus hatást – dimer párja, a [(N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau-

C)]₂ cardiomyocytá sejtéken toxikus hatással bírt a két magasabb vizsgált koncentráción (10⁻⁶ és 10⁻⁷ mol/L), azonban ez a hatás a daunorubicinénál gyengébb volt. Hasonlóképpen, a dimerizáció fokozta a [GnRH-III(Dau-YRRLC)]₂ dimer konjugátum citotoxikus hatását endothel sejtéken, és megtartotta azt cardiomyocytákon is.

A multifunkcionális konjugátumok két különböző hatóanyagmolekulát (daunorubicin és methotrexate) tartalmaznak, ezzel fokozva a daganatellenes potenciált. Saját méréseinkben a kettő vizsgált multifunkcionális konjugátum közül se a GnRH-III(Mtx⁸-Dau⁸), se a (Lys)⁴GnRH-III(Mtx⁴-Dau⁸) nem volt citotoxikus hatással cardiomyocytá sejtékre. Bár a GnRH-III(Mtx⁸-Dau⁸) esetében az impedancia csekély emelkedését mértük a legmagasabb (10⁻⁶ mol/L) koncentráción rövidtávon endothel sejtéken, a hosszútávú mérés során szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni. A (Lys)⁴GnRH-III(Mtx⁴-Dau⁸) nem mutatott citotoxikus hatást endothel sejtéken sem rövid-, sem hosszútávon. Ezek alapján fokozott tumorellenes és metasztázisellenes hatásaik mellett a multifunkcionális konjugátumok jó eséllyel kevesebb kardiiovaszkuláris mellékhatással is rendelkezhetnek a daunorubicinnál.

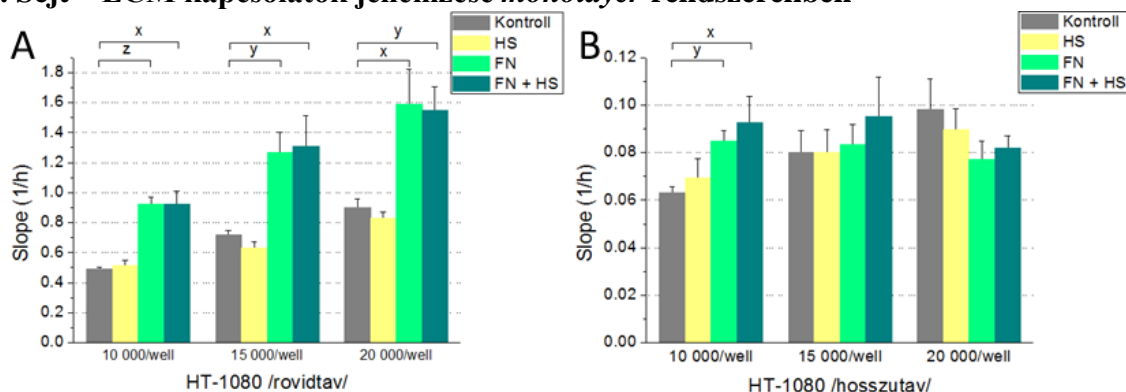
A kardiotoxicitás mérések során 7 olyan konjugátumot azonosítottunk, melyek nem mutattak citotoxikus hatást sem az endothel, sem a cardiomyocytá sejtéken.

Hatóanyag	Vivómolekula	Monomer	Dimer
Doxorubicin	<i>GnRH-I</i>	An-152	-
	<i>GnRH-III</i>	GnRH-III(Dox-észter)	-
	<i>GnRH-III + spacer</i>	GnRH-III(Dox-oxim-GFLG) GnRH-III(Dox-amid-GFLG)	- -
Daunorubicin	<i>GnRH-III</i>	GnRH-III(Dau)	[GnRH-III(Dau)]₂
	<i>GnRH-III + spacer</i>	GnRH-III(Dau-GFLG) GnRH-III(Dau-YRRL)	- [GnRH-III(Dau-YRRL)] ₂
	<i>Módosított GnRH-III</i>	(N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau) (Lys(Ac) ⁴ GnRH-III(Dau))	[(N-MeSer) ⁴ GnRH-III(Dau)] ₂ -
Daunorubicin + Daunorubicin	<i>GnRH-III</i>	(Lys)⁴GnRH-III(Dau⁴-Dau⁸)	-
		GnRH-III(Dau⁸-Dau⁸)	-
Daunorubicin + Methotrexate	<i>GnRH-III</i>	(Lys)⁴GnRH-III(Mtx⁴-Dau⁸)	-
		GnRH-III(Mtx⁸-Dau⁸)	-

1. táblázat – A vizsgált GnRH konjugátumok és a citotoxikus hatást nem mutató konjugátumok (pirossal kiemelve)

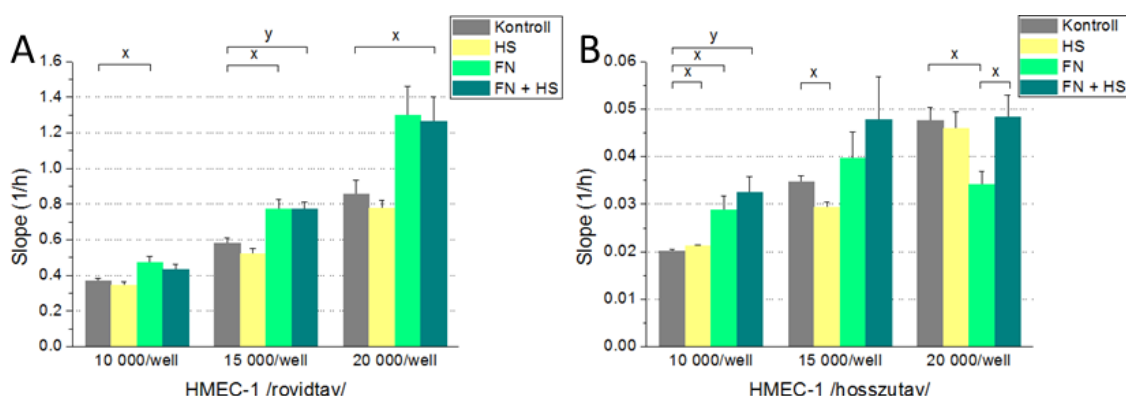
3. Decellularizált sertésszív homogenizátum adhéziós tulajdonságainak vizsgálata impedimetriával

3.1. Sejt – ECM kapcsolatok jellemzése *monolayer* rendszerekben



4. ábra – Decellularizált szív-váz-homogenizátum és fibronektin elektródafedések hatása HT-1080 humán fibrosarcoma sejtek adhéziójára rövid- (A) és hosszútávon (B)

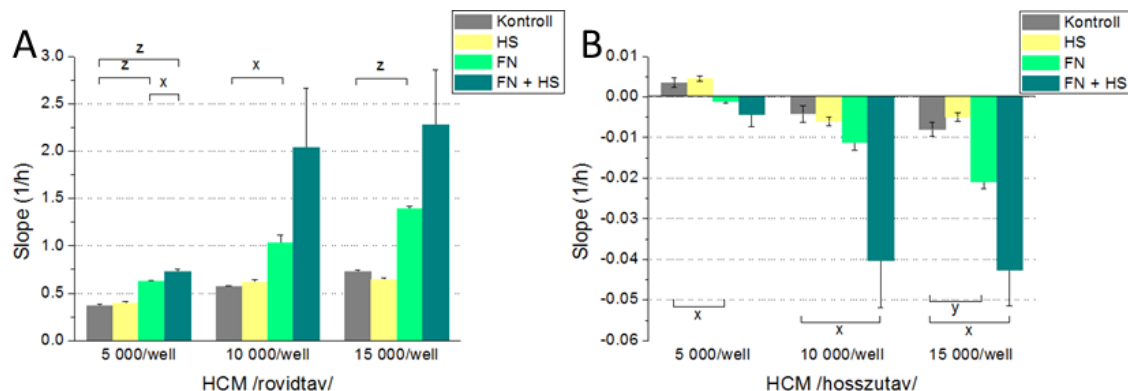
A decellularizált szívek adhéziós tulajdonságainak sejt szintű karakterizációja, illetve humán sejtekkel való kapcsolatuk jellemzése a jövőbeni recellularizációs fejlesztések számára hasznosítható információval szolgálhat. A HT-1080 humán fibrosarcoma sejtvonal egy tumoros sejtvonal, melyet, erős adhéziós tulajdonságai miatt, többek között, adhéziós kutatások modellsejtjeként használnak. Kísérleteink során a HT-1080 sejtek jellegzetes, sejtszámfüggő, erős adhéziós tevékenységét mértük, melyet az elektródák fibronektinnel való előzetes fedése tovább fokozott. A sertésszív-homogenizátumból nyert fedés esetén a HT-1080 sejtek hasonlóan erős adhéziós tevékenységét tapasztaltuk, amely mellett szintén megfigyelhető volt a fibronektin pozitív hatása. *Ezen eredmények szerint a decellularizált szív-váz önmagában nem rendelkezik adhéziót gátló hatással.*



5. ábra – Decellularizált szív-váz-homogenizátum és fibronektin elektródafedések hatása HMEC-1 humán endothel sejtek adhéziójára rövid- (A) és hosszútávon (B)

Az endothel sejtek kizárólag a kardiovaszkuláris rendszerben megtalálható sejtek, melyek, az erek mellett, az endocardium luminalis, vascularis részét bélelik. Mint ilyenek, a recellularizáció potenciális alanyai, ezért kísérleteink során a decellularizált sertésszív váz endothel sejtek adhéziójára gyakorolt hatását vizsgáltuk. A kísérleteinkhez használt HMEC-1

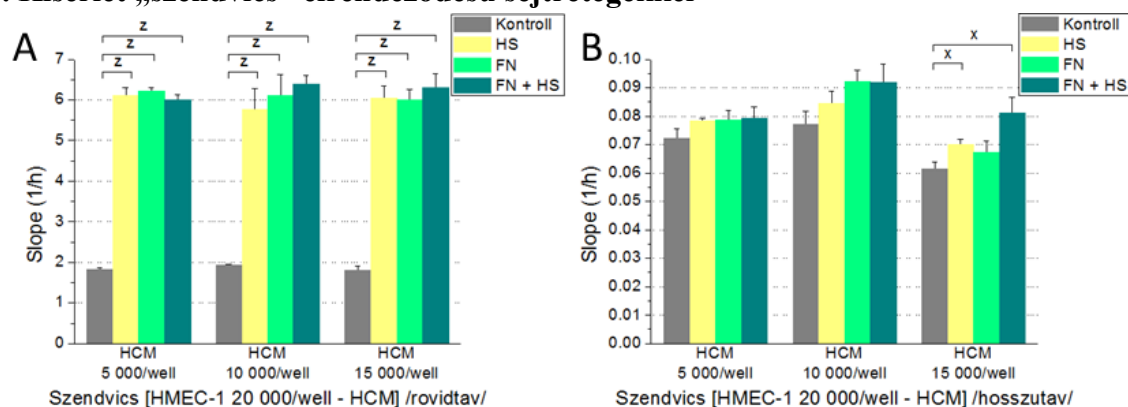
endothel sejtek adhéziós aktivitása megtartott volt az elektródák decellularizált szívíváz-homogenizátummal való fedése után, úgy fibronectin hozzáadásával, mint anélkül. Az endothel sejteken kívül a recellularizációhoz szükséges sejtek másik fő célcsoportja a cardiomyocytá sejtek, így ezek kapcsolatát is vizsgáltuk a homogenizált szívívázal.



6. ábra – Decellularizált szívíváz-homogenizátum és fibronectin elektródafedések hatása HCM humán cardiomyocytá sejtek adhéziójára rövid- (A) és hosszútávon (B)

A HCM cardiomyocyták adhézióját szintén nem csökkentette a decellularizált szívíváz-homogenizátum fedőréteg. Amennyiben ezt fibronectinnel kombináltuk, az adhézió fokozódása volt megfigyelhető, különösen alacsony (5000/well) sejtszámon. Bár hosszútávon ez a fokozódás valamelyest csökkent, a kezdeti szint alá nem jutott el az adhézió erőssége. Magas sejtszámokon (10 000/well és 15 000/well) ez a csökkenés kifejezettebb volt. Ennek háttérben technikai tényezők valószínűsíthetőek. Nem kizárt ugyanis, hogy a sejtek egy része pusztulni kezdett, ugyanis a kísérletünkben a közeg állandó volt, médiumcserével nem szakítottuk meg a mérést, ez pedig befolyásolhatta a sejtek megmaradását hosszútávon.

3.2. Kísérlet „szendvics” elrendeződésű sejtrétegekkel



7. ábra – „Szendvics” kísérlet: Decellularizált szívíváz-homogenizátum és fibronectin fedő kezelések hatása HCM humán cardiomyocytá sejtek HMEC-1 humán endothel sejt monolayer-hez való adhéziójára rövid- (A) és hosszútávon (B)

A „szendvics” kísérletben a homogenizált szívíváz kezelés jelentősen fokozta a cardiomyocyták adhézióját az elektródákra korábban (24 óra) kiültetett konfluens (ezt jelezte az impedimetria görbék plató fázisa) endothel sejtrétegen. Hasonló erős adhézió-fokozó hatást figyeltünk meg a

fibronektinnel való kezelés esetén is, önmagában, valamint szívíváz-homogenizátummal együtt is. Ez az erős pozitív hatás megmaradt a kísérlet során végig (72 óra). Ezek az eredmények decellularizált sertésszív-íváz humán kardiovaszkuláris sejtek celluláris szintű adhéziójára gyakorolt neutrális, illetve pozitív hatását mutatják. Mindezek alapján az általunk vizsgálat HMEC-1 humán microvascularis endothel sejtek és a HCM cardiomyocyták ígéretes sejtípusok lehetnek a jövőben szívívázak recellularizációs kísérleteihez.

3.3. A fibronektin hatása

A decellularizált szívíváz és kardiovaszkuláris sejtek kapcsolatára utaló kedvező eredményektől függetlenül a recellularizációs folyamathoz további regulátor anyagok biztosítása elengedhetetlen. Méréseink során a fibronektin kezelés pozitív hatást gyakorolt a HT-1080 fibrosarcoma, HMEC-1 endothel és HCM cardiomyocyta sejtek adhéziójára, valamint az endothel és cardiomyocyta sejtek közti sejt-sejt adhézióra. A decellularizált szívíváz kivonattal és fibronektinnel való kevert fedés fokozta az endothel sejtek adhézióját, sőt a cardiomyocytákét is. *Mindezek alapján eredményeink megerősítik a korábbi feltevést, miszerint a fibronektin a jövőben sikerrel alkalmazható lehet adhéziót fokozó és regulátor molekulaként is az egész szívívázak recellularizációjához.*

KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az impedimetria alkalmas metodika a thrombocytá-adhézió és -spreading kvalitatív és kvantitatív mérésére. Az impedimetria a jövőben hasznos módszer lehet a thrombocytá-funkció vizsgálatára a kutatói és a klinikai gyakorlatban is, diagnosztikus vizsgálatok és antithrombotikus terápiák hatásának követése során egyaránt.

1/A. Referencia agonisták hatása a thrombocytá-adhézióra és -spreadingre egészséges egyénektől származó thrombocytá-mintákon impedimetria felhasználásával kimutatható és mérhető. A további vizsgálatok során az adrenalin és az ADP javasolható, mint impedimetriában alkalmazott thrombocytá-agonista.

1/B. Az impedimetria segítségével a thrombocyták adhéziós és spreading tevékenysége elkülöníthető egymástól. Az adrenalin csak az adhézióra gyakorol pozitív hatást, míg az ADP az adhézióra és a spreadingre is.

1/C. Az impedimetriai thrombocytá-adhézió mérés segítségével az egészséges egyének közötti különbségek és különböző klinikai faktorokkal asszociált különbségek is kimutathatók. Ezek a különbségek kifejezettebbek az adhézió, mint a spreading vizsgálata esetén. A jövőben

betegcsoportokon további vizsgálatok szükségesek a thrombocyta-adhézió egyes kórállapotokban létrejövő változásának vizsgálatára.

2. Impedimetriai mérésel hét, cardiomyocytákon és endothel sejteken toxikus hatást nem mutató GnRH-III konjugátumot azonosítottunk, melyek a jövőben kevesebb kardiotoxikus mellékhatással bíró kemoterapeutikus gyógyszermolekulák fejlesztésének célpontjai lehetnek.

2/A. A doxorubicin, daunorubicin, methotrexate, illetve a kemoterapeutikus hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumok hatása HCM humán cardiomyocytákon és HUVEC humán endothel sejteken kimutatható és mérhető volt.

2/B. A vizsgált doxorubicint tartalmazó konjugátumok között mindegyik molekula mutatott citotoxikus hatást.

2/C. A vizsgált daunorubicint (illetve daunorubicint és methotrexate-ot) tartalmazó GnRH-III konjugátumok között citotoxikus hatást nem mutatott:

- monomer konjugátum: GnRH-III(Dau)
- daunorubicin tartalmú multifunkcionális konjugátum: (Lys)₄GnRH-III(Dau₄-Dau₈), GnRH-III(Dau₈-Dau₈)
- modifikált GnRH-III-at tartalmazó konjugátum: (N-MeSer)₄GnRH-III(Dau)
- dimer konjugátum: [GnRH-III(Dau-C)]₂
- daunorubicint és methotrexate-ot tartalmazó, multifunkcionális konjugátum: GnRH-III(Mtx₈-Dau₈) and (Lys)₄GnRH-III(Mtx₄-Dau₈).

3. A használt impedimetriai mérési összeállítás a szívíváz de/recellularizációs folyamatának jól alkalmazható modellje. A homogenizált decellularizált szívíváz, valamint az impedimetria a jövőben az egész szív szövetépítés kutatások során a recellularizációs kísérletek hasznos eszköze lehet.

3/A. A decellularizált szívíváz-homogenizátum semleges vagy pozitív hatással van az endothel sejtek és cardiomyocyták adhéziójára – gátló hatást nem tudtunk kimutatni. A decellularizált szívíváz cardiomyocyták számára kedvező környezet lehet a recellularizáció során.

3/B. Impedimetriai úton is kimutatható volt, hogy a fibronektin, mint erős adhéziót fokozó tulajdonsággal bíró molekula, a jövőben fontos szabályozó vagy serkentő szerepet tölthet be a recellularizáció során.

SAJÁT PUBLIKCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

1. **Polgár L**, Lajkó E, Soós P, Láng O, Mező G, Hudecz F, Merkely B, Kőhidai L. (2018) Drug targeting to decrease cardiotoxicity - determination of the cytotoxic effect of GnRH-based conjugates containing doxorubicin, daunorubicin and methotrexate on human cardiomyocytes and endothelial cells. *Beilstein J Org Chem.* 14:1583-1594.
IF 2,330
2. **Polgár L**, Soós P, Lajkó E, Láng O, Merkely B, Kőhidai L. Platelet impedance adhesionometry: A novel technique for the measurement of platelet adhesion and spreading. (2018) *Int J Lab Hematol.* 40(3): 372-381.
IF 1,919
3. Bäcker H*, **Polgár L***, Soós P, Lajkó E, Láng O, Merkely B, Szabó G, Dohmen PM, Weymann A, Kőhidai L. (2017) Impedimetric Analysis of the Effect of Decellularized Porcine Heart Scaffold on Human Fibrosarcoma, Endothelial, and Cardiomyocyte Cell Lines. *Med Sci Monit.* 23: 2232-2240
IF 1,894 – *Megosztott elsőszerzőség
4. Soós P, Schmack B, Istók R, **Polgár L**, Bagyura Zs, Veres G, Merkely B, Szabó G, Weymann A. (2011) Szövetépítés egész szíven. *Cardiologia Hungarica.* 41(5): 373-378.

Egyéb közlemények:

1. Bagyura Z, Kiss L, Lux Á, Csobay-Novák C, Jermendy ÁL, **Polgár L**, Szelid Z, Soós P, Merkely B. (2020) Association between coronary atherosclerosis and visceral adiposity index. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 30(5):796-803.
IF 3,700
2. Kiss LZ, Bagyura Z, Csobay-Novák C, Lux Á, **Polgár L**, Jermendy Á, Soós P, Szelid Z, Maurovich-Horvat P, Becker D, Merkely B. (2019) Serum Uric Acid Is Independently Associated with Coronary Calcification in an Asymptomatic Population. *J Cardiovasc Transl Res.* 12(3):204-210.
IF 2,480
3. Varjú I, Farkas VJ, Kőhidai L, Szabó L, Farkas ÁZ, **Polgár L**, Chinopoulos C, Kolev K. (2018) Functional cyclophilin D moderates platelet adhesion, but enhances the lytic resistance of fibrin. *Sci Rep.* 8(1): 5366.
IF 4,122

4. Kiss LZ, Bagyura Z, Vadas R, **Polgár L**, Lux Á, Édes E, Szenczi O, Soós P, Szelid Z, Becker D, Jermendy G, Merkely B. (2017) Signs of subclinical atherosclerosis in asymptomatic patients at increased risk of type 2 diabetes mellitus. 31(8): 1293-1298.
IF 2,792
5. Bagyura Z, Kiss L, Édes E, Lux A, **Polgár L**, Soós P, Szenczi O, Szelid Z, Vadas R, Józán P, Bagdy G, Merkely B. (2014) Cardiovascularis szűrőprogram a közép-magyarországi régióban – Budakalász Vizsgálat. Orv Hetil, 155(34): 1344-1352.
6. Kosztin A, Soós P, **Polgár L**, Kuttyifa V, Becker D, Kovács A, Merkely B. (2014) EORP szívelégtelenség regiszter a Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinikán. Cardiologia Hungarica. 44(4): 218-223.
7. Kőhidai L, Lajkó E, Szabó I, **Polgár L**, Manea M, Mező G. GnRH-based drug targeting: Cell adhesion and migration modulator effects of GnRH derivatives in tumor cells. In: Sills ES (szerk.), Gonadotropin-releasing hormone (GnRH): Production, structure and functions. Ed. Sills ES; Nova Publ. 2013: 251-272.

Könyvfejezet

8. Bagyura Zs, Szelid Zs, Soós P, Szenczi O, Maurovich-Horvát P, Édes E, Lux Á, **Polgár L**, Andrási Z, Tátrai A, Józán P, Merkely B. (2012) Magyarországi primer prevenció populációs felmérés: Budakalász Epidemiológiai Vizsgálat előzetes eredmények. Orvosképzés. 87(2): 102-108.
9. Lajkó E*, **Polgár L***, Lengyel J, Láng O, Kőhidai L, Magyar K. (2012) Basic cell physiological activities (cell adhesion, chemotaxis, proliferation) induced by selegiline and its derivatives in Mono Mac 6 human monocytes. J. Neural Transm. 119(5): 545-556.

IF 3,052 – *Megosztott elsőszereplőség