MTAdoktori, Hársfalvi J.

Tézis

MTA doktori tézisek

Hemosztázis és trombózis

In vitro áramlási- és klinikai modellek

Hársfalvi Jolán

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum Klinikai Kutató Központ

Debrecen, 2011

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm az iránymutatást, az alkotásra serkentő feladatokat, a munkalehetőségét és a megvalósításhoz való hozzájárulást a vezetőimnek, a hazai és nemzetközi kollaborációs társaknak, a munkatársaknak, tanítványoknak.

Családomnak a segítő, szerető támogatása nélkül nem haladhattam volna azon az úton, amely e mű megírásához vezetett. Példamutató szüleim és megértő testvéreim nélkül pedig, el sem indulhattam volna rajta.

Vezetőim: Rák Kálmán[†] professzor, Muszbek László és Fésüs László akadémikusok.

Hazai és nemzetközi kollaborációs társak: Damjanovics Sándor akadémikus, Szőllősi János, Mátyus László, Vereb György professzorok, Prohászka Zoltán tudományos főmunkatárs, Jenei Attila docens; Hans Deckmyn professzor, Muriel Meiring tudományos igazgató, Nancy Cauwenberghs, Arnould Bonnefoy kutatók, Chantal Legrand professzor.

Munkatársak: Udvardy Miklós, Boda Zoltán, Kappelmayer János egyetemi professzorok, Tornai István, Pfliegler Győrgy, Altorjay István, Soltész Pál, Hevessy Zsuzsanna egyetemi docensek, Novák Levente tudományos munkatárs; Bézi Andrea, Haramura Gizella, Fábián Mária, Lisbeth vanHoutte, Bekéné Debreceni Ildikó, Szabó Zsuzsanna, Tömöri Éva, laboratóroumi technikusok és analitikusok.

Tanítványok: Papp Mária PhD, egyetemi adjunktus, belgyógyász és gasztroenterológus szakorvos; Szántó Tímea PhD és Udvardy Miklós László PhD, laboratóriumi szakorvosok; Tóth Judit, Szekeres-Csiki Katalin, Szarvas Mariann, Shlomit Mendelboum, Batta Zoltán PhD hallgatók; Szilágyi Gábor, Nagymihály Richárd, Uhrinyi Márk TDK hallgatók.

Külön köszönöm Paragh Györgynek, a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtumányi Centrum elnökének és Csernoch Lászlónak az Altalános Orvostudományi Kar dékánjának, hogy e mű megírására késztettek.

Tézis

Bevezetés és célkitűzés

A vér igen magas fokon differenciálódott, speciálisan fejlődött, folyékony kötőszövet, plazma faktorok oldata és celluláris elemek szuszpenziója. Különböző sebességgel, akadálytalanul áramlik a test ereiben. Oxigént és más, nélkülözhetetlen anyagot szállító rendszere ez a szervezetnek. Az érfal sérülésekor az életet védő hemosztatikus mechanizmus a sérülés korrekciójára törekszik, megakadályozza az elvérzést, de a trombusképződést is. A hemosztázis fő résztvevői az érrendszer, a trombociták, a plazma koagulációs és antitrombotikus és fibrinolitikus faktorai, illetve az áramlás során ható erők. A sérülést vazokonstrikció követi, majd a szabaddá vált szubendotéliális képletekhez a keringő trombociták kitapadnak, aktiválódnak és trombocita dugó képződik. A fibrint létrehozó koagulációs rendszer azonnali aktiválódása és a trombocita dugó illetve fibrinháló képződése, majd mindezek lebontását végző fibrinolitikus rendszer megfelelő működése, megakadályozzák a vérzést, és sebgyógyulást eredményeznek. Ez a fiziológiás véralvadási folyamat finoman szabályozott biokémiai reakciók sorozata.

A trombociták vagy a koagulációs faktorok hiánya, csökkent működése, esetleg a folyamat elégtelen szabályozottsága vérzéshez vezethet. Ugyanakkor a trombociták vagy a faktorok emelkedett mennyisége illetve a folyamat nem megfelelő helyen és időben történő aktiválódása érelzáródást okozhat, amelynek trombózis, szívinfarktus vagy sztrók lehet a következménye [1], [2] [3].

1995-től kaptam lehetőséget önálló munkacsoport alapításra, amely elsősorban azzal foglalkozik, hogy a trombociták részvételével zajló folyamatokat tanulmányozza. In vitro áramlási kamrák beállításával és alkalmazásával - az erek különböző áramlási körülményeit modellező kísérleti rendszerben - [4], [5], [6], fehérje és immunokémiai módszerekkel, mikroszkópos technikákkal, biotechnológiai és kombinatorikus kémiai eljárásokkal tanulmányoztuk a trombózis és hemosztázis mechanizmusait. Vizsgáltuk a vaszkuláris rendszert alkotó mátrixok [7], az izolált komponensek mint a kollagén- és a trombociták kitapadásában fontos szerepet játszó VW molekulák tulajdonságait [8]; a kollagén és a VWF egymással való kölcsönhatását, [9], [10], [11]. Bekapcsolódtunk a trombociták egymással való összekapcsolódásában szerepet játszó receptorának vizsgálatába [12]. Vizsgáltuk a kölcsönhatásokat befolyásoló / gátló / szabályozó anyagokat és hatásukat: a kollagént, a VWF-t - és az extracelluláris mátrix trombocita kölcsönhatás gátlásán keresztül ható anyagokat (peptidek, antitestek, aptamerek). Ennek eredményeként olyan gátlószereket ismertünk meg és írtunk le elsőként, amelyek az aterotrombózist megelőző gyógyszerek fejlesztésének alapjául szolgálhatnak [13, 14], [15], [16-18], [19], [20], [21]. A klinikai kutatás alanyát képező különböző betegcsoportoktól és egészséges egyénektől származó teljes vérből, plazmából végeztünk és jelenleg is végzünk vizsgálatokat, analizáljuk az eredményeket a betegségek patomechanizmusának jobb megértése érdekében [22], [23], [24-26], [27].

Jelen értekezés célja e tizenöt évnyi kutatómunka összefoglalása. Eredményeinket az "Irodalmi összefoglalóban" és az "Eredmények értékelése" részben próbálom az eddigi nemzetközi ismeretek alapjaira helyezni, azokkal összevetve, kiegészítve értékelni.

A "Módszerek" és az "Eredmények" részben a nemzetközi tudományos munkánkat reprezentáló közleményeink közül a saját vagy az általam vezetett kísérletes munkákat, illetve a többségében a Magyarországon készült munkákat ismertetem részletesen.

Először a trombózis és hemosztázis alapjainak megértésére irányuló vizsgálatainkat és eredményeinket, majd az általunk felismert, valamely részfolyamat gátlására alkalmas, antitrombotikus hatású anyagainkat - antitestek, peptidek, aptamer - és az azokkal történt vizsgálatainkat, végül pedig közvetlenül a klinikai tanulmányainkat ismertetem. Ezeken a fejezeteken belül, először a trombogén felszín, majd a trombogén felszín és a trombocita kölcsönhatásban résztvevő kofaktor (VWF), a VWF felszínnel és a trombocitával való kölcsönhatása, ezt követően a trombocita-trombocita összekapcsolódás, végül pedig a trombocita felszín által katalizált trombusképződés és lebomlás szabályozhatósága témakörökbe csoportosítva írom le az eredményeket és értékelésüket.

A tézisekben és az értekezésben a Magyar Tudományos Akadémia iránymutatásának megfelelően igyekeztem a magyar helyesírás szabályai szerint használni a szakmai nyelvet. Olyan esetekben, ahol nincs, vagy nem megfelelő a magyar változat, dőlt betűkkel az eredeti *terminus technicust* vagy idézőjelben használtam az angol kifejezést.

Tézis

Irodalmi összefoglalás / háttér

A hemosztázis az a folyamat, mely fenntartja egy zárt, nyomás alatt lévő keringési rendszer egységét érsérülés után is. Az érfalsérülés és a vér kilépése a keringésből gyorsan bekövetkező eseményeket indít el az érfalban és a vérben, melyek megakadályozzák a vérzést. A véráramlás sebességétől függően keringő trombociták gyűlnek a sérülés helyére, ahol azok a képződő trombus fő összetevőivé válnak az artériás oldalon; a szöveti faktor által beindított véralvadás is előrehalad, amelynek eredményeképpen trombin és a fibrin képződik. Ezek az események egy időben történnek. Normál körülmények között a szabályozó folyamatok időben és térben behatárolják a trombusképződést. Amikor a véralvadás, jól szabályozott folyamataiban kevés, sok vagy hibás faktor illetve trombocita vesz részt, akkor nehezen befolyásolható vérzés vagy trombózis alakulhat ki.

A hemosztázis fő folyamatai a (1) vazokonstrikció, (2) trombocita aktiváció és trombocita dugó képződés, (3) prokoaguláns és az antikoaguláns rendszer aktiválódása, fibrin alvadék képződése és fibrinolízis. A rendszer alkotóinak – mátrixok, trombociták, véralvadási faktorok, inhibitorok, ionok - egymásra ható és visszaható kölcsönhatásai következtében, egy nagyon pontosan szabályozott folyamatban, a sérült érfelszínen trombus képződik, amely az angiogenezis szintén nagyon pontosan szabályozott folyamatban lebomlik.

A trombózis és hemosztázis kutatás viszonylag új területe az áramlás során fellépő erők hatásának a vizsgálata [28]. A tanulmányok megértéséhez néhány alapfogalmat kell átismételni.

<u>Nyíróerő</u> vagy "*ang.: shear force*": az áramló folyadék rétegei, vagy laminái között fellépő, az áramlás irányával párhuzamos mechanikai erő, melyet a folyadékréteg a mellette lévő rétegre kifejt, *(jele* F, mértékegysége SI mértékrendszerben [N] (Newton), CGS mértékegységben [din]; [N] = [10⁵din]. Az erő iránya mindíg olyan, hogy a relatív megcsúszást akadályozni igyekszik.

A <u>nyírófeszültség</u> vagy *"ang.: shear stress"* (τ , SI dimenziója [N/m²]; CGS rendszerben [din/cm²]; 1 N/m² = 1 kg/(m*s); 1 N/m² = 10 din/cm²) az áramló folyadék rétegei, vagy laminái között fellépő, területegységre ható mechanikai erőt (nyomóerőt vagy nyíróerőt) jelenti, melyet a folyadékréteg a mellette lévő rétegre kifejt, ha a vért (folyadékot) egymáson elmozduló rétegekként képzeljük el és feltételezzük, hogy newtoni / összenyomhatatlan folyadékként viselkedik. A N/m² egységet Blaise Pascal emlékére 1971-ben elnevezték Pa (pascal)-nak. A nyírófeszültség egy henger alakú áramlási kamrában a rádiusszal (r) és az áramlás irányával (z) matematikailag kifejezhető, τ =- η (dvz/dr), ahol a dvz/dr a helyi sebességgradienst jelenti, az η pedig a dinamikai viszkozitást (belső súrlódási együttható). τ = n* γ [N/m² =10 dyne/cm²] normál vérre számolva a nyírófeszültség, τ = 0.04 γ , vagy τ = γ /25 (vagyis a nyírófeszültség= sebességgradiens / 25).

A dinamikus <u>viszkozitás</u> a folyadék anyagi minőségének és állapotának (hőmérséklet) jellemzője (jele a η , de gyakran használják a μ -t, SI mértékegysége [Pa*s] vagy [N/m² *s]; CGS mértékegysége a [P] (poise, Jean Louis Marie Poiseuille neve után); 1 P = 0,1 Pa*s A viszkozitás a normál vérre jó közelítéssel 0,0038 Pa*s, kerekítve ~ 4x10³ Pa*s. A <u>sebességgradiens</u> vagy *"ang.: shear rate"* (γ , dimenziója [1/s vagy s⁻¹]) az elmozdulás relatív sebessége (vagy sebességének változása), két egymás melletti folyadékréteg között. Tökéletes Newtoni folyadék esetén a sebességgradiens egyenesen arányos a nyíró feszültséggel és fordítottan arányos a folyadék viszkozitásával. $\gamma = dv/dr$, [s⁻¹= (m/s)/m].

A trombózis folyamata változó reológiai körülmények között, a trombus növekedésével érelzáródás felé halad. A trombózist elindító folyamatban az érfal közeli áramlási körülmények is meghatározzák azt, hogy a reaktív komponensek milyen gyorsan érnek el a sérült területre és milyen gyorsan távolodnak el a reakció termékei. Míg, jelen tudásunk szerint, az oldatban lévő alvadási faktorok szállítása a sérült érfalhoz klasszikus konvekciós-diffúziós mozgással történik, a sejtek és a vérlemezkék érfalhoz való mozgása növekszik az áramlás-függő sejt-sejt ütközésekkel, az áramlási sebességgel fokozódik a fallal való kölcsönhatásuk valószínűsége. Kísérleti úton igazolták, hogy a növekedett nyíróerők aktiválják a vérlemezkéket, megváltoztatják olyan proteinek, sejtek lokalizációját, mint a szőveti faktor (tissue faktor, TF) és a TF útvonal inhibítor, továbbá ezen faktorok gén expresszióját is szabályozzák. Nagy nyírási erők hiányában a vörösvértestek, a fehérvérsejtek és a trombociták stabil aggregátumokat hoznak létre egymással vagy az érfalat határoló sejtekkel, hatékonyan növelik a helyi vérviszkozítást. Tehát a hemodinamikai erők nemcsak specifikus anatómiai helyek trombózisképződésre hajlamosító sajátságát befolyásolják, de a trombusok biokémiai összetételét és a trombusképződési reakciók útvonalait is. [29]

Az áramlás körülményeitől függően regulálják a hemosztázist az erek belső falát borító endotélsejtek is [30].

Az erek belső falát borító endotél sejtek a vérkeringés során fellépő nyírófeszültség változásra igen sok válaszreakciót adnak [31]. A nyírófeszültség változását érzékelő rendszer vizsgálata igen nehéz, mert sem azok a struktúrák, amelyek érzékelik az erőt, sem a rájuk ható erők jellege nem határolható körül tisztán. Az egyértelműen bizonyított, hogy a transzmembrán molekulákra ható erő biológiailag fontos jelátvitelt, továbbá energiatermelő biológiai válaszreakciókat vált ki, melyeket két tényező befolyásol: (1) az erőátvivő ligand, és (2) az erő alkalmazásának útvonala/iránya. Az erőátvitel módjától függően a ligandok helyileg különböző nyírás-indukált válaszreakciókat hoznak létre az endotéliumban [32]

Az erek endotél sejtjeinek szabályozó szerepe döntő fontosságú a hemosztázis aktiválásának és gátlásának egyensúlyában. Az egészséges endotélium hozzájárul az akadálytalan véráramláshoz és meggátolja a hemosztázis aktiválódását kiváltó sejtek és proteinek kitapadását. Az antitrombotikus hatás azonban nagyon hamar aktivációs hatássá változik, amikor a sérülés hatására az erek endotélsejtjei alatti extracelluláris mátrix (ECM) szabaddá válik. Az ECM összetevőinak kvalitatív és kvantitatív és kvantitatív változásai határozzák meg az ECM

trombotikus (esetleg vérzékenységet okozó (Ehler-Danlos szindróma) tulajdonságát [33], [34]. Az endotél sejtek leválásakor az első réteg, amellyel az áramló vér találkozik az 50-100 nm vastag membrán, amely az endotél sejtek alapjául szolgál. Ez a réteg legnagyobb mennyiségben laminint, majd fibronektint, enaktint, proteoglikánokat és IV-es típusú kollagént tartalmaz. Ezek mindegyike

MTAdoktori, Hársfalvi J.

aktiválja a trombocitákat, a proteoglikánok kivételével. A membrán alatti ECM-ben nagy mennyiségben vannak jelen a kollagén fibrillumok, és a mikrofibrillumokkal asszociálódott elasztin. A ma ismert 21 különböző típusú kollagén valamelyike minden szövetben és szervben előfordul, biztosítva azok szerkezetét és szilárdságát. A szerkezetűk alapján csoportosítva a trombocita. és a VWF-kötési vizsgálatok szempontjából a fibrilláris I-es, II-es, III-as, a térhálót alkotó IV-es és a filament-képző VI-os típusú kollagéneket kell kiemelni. Maguk a kollagének jellegzetes aminosav összetétellel rendelkeznek, amely minden soksejtű élőlényben azonos. A kollagén mátix hemosztázis szempontjából alapvető tulajdonsága, hogy jól köti a VWF-t. A nagy nyíróerőknek ellenálló trombus képződésének az alapia a VWF rögzűlése.

A plazmában 2-4 g/L koncentrációban keringő fibrinogén molekula 340 kDa molekulatömegű glikoprotein. A hepatociták és a megakariociták szintetizálják [35]. A fibrinogén kutatásának nagy magyar tudósa volt a Szentgyörgyi iskolából Amerikába ment Mihályi Elemér - aki 2010-ben hunyt el - és Laki Kálmán, akinek a neve XIII-as faktorral, másnéven fibrin stabilizáló vagy Laki-Lóránd faktorral kapcsolódott össze,[36], [37], [38], [39], [40], [41]. Munkásságuk alapján vált ismertté, hogy trombin katalizált proteolitikus folyamatban a fibrinogén fibrinné alakul, a fibrinopeptid A és B lehasítása valamint a polimerizációs végek szabaddá válása közben. A polimerizációs végek szabaddá válása lehetővé teszi a fibrin molekulák egymáshoz kapcsolódását, háló képződését. A XIII-as faktor által katalizált reakcióban a folyamat tovább megy, a fibrinszálakból a fibrin molekulák $\epsilon(\gamma$ -glutamil)lízin kovalens kötésével stabil háló képződík. A hálóba fogott trombociták és / vagy vörös vértestek (áramlási sebességtől függően) a trombus fő tömegét képezik. A stabil fibrinháló képzzi a sejtek megtapadásának az alapját a sebgyógyulás és az angiogenezis folyamatához. A fibrinolítikus folyamatban ez a háló lebomlik. A trombusképződésben betöltőtt központi szerepe miatt, a trombin gátlása az antikoaguláns terápiák fő iránya. Éppen ezért a trombin szerkezete és funkciója közötti összefüggés megismerése a kutatások egyik fő iránya [42].

A VWF a vér fehérjéi közül a legnagyobb molekula, a trombociták adhéziójához és a trombus képződéséhez elengedhetetlen, multimer szerkezetű glikoprotein, mely a véráram azon helyein válik irányító szereplővé, ahol a vér áramlási sebessége, vagyis az érfalhoz viszonyított sebességgradiens nagy. A plazmában 10-20 mg/L a koncentrációja [43]. A VWF multimer diszulfid hidakkal különböző számban összekapcsolódó dimer alegységekből áll (2-100).

Denaturált formája 2-3 nm átmérőjű, 80-1300 nm hosszú szálnak vagy laza, 200-300 nm átmérőjű gombolyagnak látszik elektronmikroszkóppal.

Többen igazolták azt a feltételezést, hogy a VW molekula globuláris formában kering, és áramlás hatására "kitekeredik", egymáshoz kapcsolódik [44], fonalat képez [45]. Barg és munkatársai szilanizált csillámpalán nagy sebességgradienssel áramoltatva rögzítettek VWF-t, amelyből trombocitákat kötő, aktív, 300 µm hosszúságot is elérő szálakból álló filamentózus hálózat képződött. Mikroszkópos megfigyelésekkel (AFM és immunfluoreszcencia) igazolták, hogy a háló képződéséhez nagy VWF koncentráció, legalább 2,1 N/m² (21 dyn/cm²) nyírófeszültség és alacsony hidrofóbicitású kötő felszín szükséges. Amikor a globuláris VWF multimer kinyúlik, a vérlemezkék egymáshoz és a sérült érfalhoz való kapcsolódását közvetíti, ezáltal nő a molekula és

receptor kölcsönhatás valószínűsége, miközben nagy felszínen érhető el a VIII-as alvadási faktor is, amely a vérlemezke felszínén zajló koagulációs folyamatban főszereplő. A VW multimer mérete e konformációjától függő szerepét befolyásolja. Normál körülmények között a VWF-nak a keringésben nincs affinitása a trombocitákhoz. Azonban még ma sincs megmagyarázva az a megfigyelés, hogy a nagyon nagy VW multimerek konszumpciója a keringő trombociták számával arányosan fokozott esszeciális trombocitémiában (ET), [46]. A VWF az endotélsejtekben, kis mennyiségben a megakariocitákban képződik, az endotélsejtek Weibel-Palade testeiben raktározódik, a plazmában, a trombociták α-granulumaiban és az endotél alatti mátrixban van.

Tézis

A VWF génje a 12-es kromoszóma rövid karján található.. A szintézis során ~278 kDa molekulatömegű alegységek épülnek fel, melyek C terminális diszulfid hidakkal dimerizálódnak, majd N-terminális diszulfid hidakkal a dimérek összekapcsolódásával multimert alkotnak. A multimerben a szabályosan növekvő számú dimérből álló egységek, ~540-től 20 ezer kDa tartományban oszlanak el. A multimer szerkezete és mérete meghatározza a molekula aktivitását. Az alegységek FVIII, GPIb, GPIIb/IIIa, heparin és kollagén kötőhelyeit a multimer áramlásfüggő konformációváltozása befolyásolja. A multimerizáció foka a szintézis alatt is és a keringés folyamán is szabályozott, és a funkció szempontjából alapvető. A multidomén szerkezetű VWF protomer molekulatömege 309 kDa és hossza 120 nm. A pre-pro VW molekula egy 22 aminosavszámú szignál peptidet tartalmaz, egy 721 aminosavból álló propeptidet és 2050 aminosavszámú érett egységet. A szintézis folyamán az átírás utáni módosulás igen nagyfokú, amely 12 N-kötött glikozilációs oldalláncot eredményez minden érett monomer egységen. Négy potenciális N-kötött glikozilációs lehetőség van a propeptiden is. Összesen a molekulasúly 20%-a szénhidrát. Az N-kötött glikózilációs lehetőség van a propeptiden is. Josszesen [47].

Az érett VWF alegység, a monomer 2050 aminosavból áll, és mintegy 270 kDa molekulatömegű, mely csaknem teljes egészében négy különféle, ismétlődő doménből áll. Ezek a funkcionális domének az aminoterminális végtől a karboxi terminális vég felé a következő sorrendben kapcsolódnak: D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2. A VWF legtöbb funkciójáért az A1 és A3 hurok domének a felelősek. A VWF kollagénkötő funkcióját - az I-es, illetve a III-as típusú fibrilláris kollagén esetén- ez a két A típusú domén biztosítja. Az A1 domén a GPlb α glikoprotein kötőhelve, a VI-os típusú kollagén megkötésében is részt vesz, és kötőhelvek találhatók raita a heparin és a szulfatált glikolipidek számára is. Az Arg-Gly-Asp szekvenciájú, 1744-1746 pozícióban, a C1 doménben van a GPIIb/IIIa receptor vagy integrin αIIbβ3 kötőhelye. A D'-domén 1-272 aminosav szakaszán a VIII alvadási faktor kötőhelve valamint heparin kötőhelv található. A VWF alegységek doméniejnek konformációja és funkciója valószínűleg független a multimerizáció fokától. A multimerizáció a képződés helyén befejeződik, ahol azonban a VWF molekulák multimerizáltságának mértéke nagyobb, mint a vérben. A VWF féléletideje a keringésben 12,4+/-2,5 óra az antigén szint mérése alapján és 8,5+/-2,5 óra a kollagén kötő aktivitásának mérése alapján [48]. Érdekes ez az eredmény, és feltáratlan az aktivitásban és a mennyiségben mért féléletidők közötti különbség oka. A vérben a multimer egyensúly proteolitikus szabályozás alatt áll.

MTAdoktori, Hársfalvi J.

A normál multimerméret feltétele a normál hemosztázisnak. Genderen 1997-es közleményében az esszenciális trombocitémiás betegek VWF hemosztázisát vizsgálva azt is megállapította, hogy ET betegek esetén a VWF féléletideje antigén szint alapján nem különbőzik szignifikánsan a kontrollokétól, azonban a kollagénkötő akivitás alapján 30%-kal alacsonyabb. Utalt arra, hogy a VWF multimerizációját (aktivitását) befolyásoló másik faktor is szerepet játszhat ebben a folyamatban. Ez a másik a faktor az ADAMTS-13 enzim, amely felelős azért, hogy a szintetizált VWF multimerizációjának foka csökken a keringésben. Az ADAMTS-13 a metalloproteinázok családjába tartozó, nagyon jól szabályozott enzim. Az VWF A2 doménjében található Tyr842-Met843 aminosavak között hasítja a VW molekulát. (ADAMTS=a disintegrinlike domain, a metalloproteinase domain, and a trombospondin motif.) Az enzim hiánya vagy csökkent szintje esetén igen nagy multimerizáltsági fokú VW molekulák vannak a keringésben, amelyek a trombocitákhoz kötődnek és mikrotrombusok képződnek, trombotikus mikroangiopátiát okoznak

Tázis

[49], [50].A vér áramlása közben a trombociták az érfal közelében haladnak és rendszeresen érintkeznek az

érfalat bélelő endotélsejtekkel, miközben a sérülések javításával hozzájárulnak az endotélréteg folytonosságának biztosításához. Ezek a mikroszkópikusan diszkoid alakú, mag nélküli sejtek nyugvó állapotban vannak mindaddig, míg fiziológiás vagy patológiás hatás nem készteti öket aktivációra. Sérülés helyén kitapadnak az érfalhoz, a koaguláció és a sebgyógyulás folyamatának katalizálása közben szolgálják a normál hemosztázis fenntartását [51].

A trombocita a megakariocitákból képződik, az összes alkotórészével együtt (a kontraktilis, az alvadásaktív és a hormonhatású fehérjék, a lipidek és a membránok). A megakariocitákban alakulnak ki a granulumok, a citoszkeletáris rendszer, a nyitott csatornák, a receptor csoportok, majd a megakariociták széli részéről fűződik le az érett trombocita, amelyben további szintézis már nem zajlik. A nyugvó sejt a vérben kb. 3 µm átmérőjű és 1 µm vastag, amely aktiválódás hatására először gömb alakú lesz, majd zsugorodik, és állábakat ereszt képez, amelyekkel több sejt szorosan egymáshoz kapcsolódik. Sok fiziológiás aktivátora van, mint a trombin, a kollagén, az ADP, a PAF, (nagy áramlási sebességnél a VWF) és egyes farmakológiai anyagok, mint a Caionofor, a ciklikus endoperoxidok stb. Az aktivátorok specifikus receptorokon keresztűl hatnak.

A trombociták adhéziója a sérült érfalhoz a hemosztázis egyik legkorábbi lépése. Az endotélium károsodása után azonnal trombociták gyűlnek a felszínre kerülő szubendotéliális struktúrákra. A vénákban vagy nagyobb artériákban, ahol az áramlás során fellépő nyíróerők kicsik, a trombociták GPVI és GPIIb/IIIa receptoraik segítségével közvetlenül kötődnek a szubendotéliális kollagénhez. Nagy nyíróerők esetén azonban, különösen arteriolákban és beszűkült erekben, ezek a receptorok önmagukban nem tudják biztosítani a trombociták adhézióját. Feltételezhető volt, hogy ilyen körülmények között lelassulnak az áramló trombociták és ellenállva a nyíróerőknek, kialakítják stabil kötéseiket a sérült érfelülettel. Ezt a folyamatot valósidejű mikroszkópos rendszerek segítségével láthatóvá tették, és kimutatták, hogy a trombociták gördülnek a felszínre került szubendotéliumon, mielőtt megállnak. Demonstrálták, hogy ez a jelenség függ a von Willebrand faktor (VWF) és trombocita receptora (GPIb) jelenlététől. Ennek a kölcsönhatásnak a jelentőségét

igazolja, hogy a von Willebrand betegség (VWB) 3-as típusában (VWF teljes hiánya) és a Bernard-Soulier szindróma (GPlb hiánya) jellegzetes tünetei (pl.: nyálkahártya vérzések) olyan ereket érintenek, amelyekben a nyíróerők nagyok. Az áramlási sebességtől függő folyamatban a sérülés helyén kitapadó vérlemezkék először reverzibilisen kapcsolódnak az endotél mátrixhoz és az ott szabaddá váló trombogén anyagokon immobilizált adhezív fehérjékhez. E kapcsolódások miatt az áramlási sebességgel arányos mértékű sebességcsökkenés következik be, a sejt áramló mozgása a felszínen gördülő mozgássá változik. A gördülés alatt a VWF és receptorának (GPlb) kölcsönhatása elindítja a trombocita aktivációját, és a trombogén mátrixhoz közvetlenül kapcsolódó receptorain keresztül a trombocita stabilan rögzül a felszínen (adhézió). Az aktiválódó sejt felszíne képessé válik a K-vitamin függő alvadási faktorok lokalizálására, beindul az alvadási kaszkád, amelynek végeredménye a fibrinogén fibrinné alakulása, majd a stabil fibrinháló képződése (koaguláció). Eközben a sejt-sejt kölcsönhatást biztosító receptorok is aktiválódnak és a vérlemezkék a fibrinogén és a VWF által közvetítve egymáshoz kötődnek, mintegy dugót képeznek (trombocita aggregáció), hogy a sérült érfalat lezárják.

Tézis

A trombus létrejötte a trombocita receptorok, az adhezív felszín és a vérben keringő faktorok, kofaktorok összehangolt kölcsönhatását feltételezi.

A receptorok közül a trombociták felszínén legnagyobb számban az indirekt kölcsönhatásban résztvevő receptorok vannak, mint a GPIIb-IIIa, majd a GPIb-V-IX receptor komplex. Az indirekt kollagén – trombocita interakcióban számos adhezív fehérje játszik szerepet a megfelelő trombocita membrán receptorokkal kapcsolódva. A trombociták GPIb/V/IX receptora a VWF-on, a GPIIb/IIIa receptora (αIIbβ3) a VWF-on és a fibrinogénen, a GPIc/IIa receptor a fibronektinen, a CD47 (*integrin-associated protein*) a trombospondinon, az α5β1, valamint α6β1 minor integrinek a fibronektinen, illetve lamininen keresztül kapcsolódnak a kollagénhez [52].

Az áramlás körülményeitől függően különbség van trombocita integrin és a ligand működésében. A keringés vénás oldalán, azaz alacsony áramlási sebesség esetén a GPIIb/IIIa és a fibrinogén kapcsolata, míg a keringés artériás oldalán és a mikrocirkulációban, azaz magas áramlási sebességgel jellemezhető helyeken GPIb/V/IX és a VWF, valamint a GPIIb/IIIa és VWF közötti kölcsönhatás a döntő.

A direkt receptorok közül a GPIa-IIa (α2β1) receptor száma a legnagyobb, ez biztosítja a kollagénhez való direkt kapcsolódást, de a GPVI receptor és a CD36 (GPIV, GPIIIb) és p62 (P-szelektin) proteinek szerepe is jelentős ebben a folyamatban. A direkt receptorok működése aktivációt igényel. A GPIb nagy nyíró erők hatására és VWF kötés közben aktiválódik és elindítja a többi receptor aktiválódását.

Az érfal adhezívvé váló felszínéhez történő trombocita adhéziót követően három reakciósorozat zajlik egymással párhuzamosan: a szekréció, azaz a vérlemezke alfa-granulumai és a plazmamembrán fúziója, valamint a "flip-flop"-reakció, a trombocitamembrán átrendeződése, s a főleg trombin, ADP, tromboxán A2 hatására létrejövő trombocita-aggregáció (trombocita trombocita kölcsönhatás). Az aggregációhoz, amely a trombociták receptoraikon át történő egymáshoz kapcsolódása, a trombociták adhézió során bekövetkező aktivációja szükséges.

Tézis

Fiziológiás és patológiás trombocita agonisták képesek jelátviteli útvonalakon keresztül aktiválni a trombociták GPIIb/IIIa receptorait. A legtöbb aktivátor, lokális válaszként a sérült érfalból szabadul fel, vagy ott szintetizálódik. Ahhoz, hogy a stabil trombocita aggregáció kialakuljon, a fibrinogénen kívül több ligand kötődik az aktivált GPIIb/IIIa-hoz. Pozitív visszacsatoló mechanizmus eredményeképpen végül az érsérülés zárásához elegendő méretű és szilárdságú trombocita dugó keletkezik. A magas helyi koncentrációjú ADP, a *release*-reakció során felszabaduló enzimek, és a trombocita kontraktilis fehérjéi mind hozzájárulnak, hogy az érsérülés helyén az aggregálódott trombociták irreverzibilis fúziója jőjjön létre.

A VW funkciója különleges, mert áramlási sebességtől függően közvetíti a trombociták időszakos rögzülését az érfalon szabaddá váló struktúrákhoz. Ez a szerep a nagy áramlási sebességű helyeken – az artériákban és a kapillárisokban – döntő. A molekula hiánya vagy hibája különböző mértékű, néha az életet veszélyeztető vérzékenységhez vezet. (Az öröklött VW betegség a népesség 1%-át érinti). A nagy multimerek hiánya funkció vesztésével jár, vérzékenységet okoz, a nagyon nagy multimerek viszont nagyon trombogének, a trombusképződés mértékét növelik [53] [54]. Feltételezik, hogy a globuláris VWF multimer kinyúlik, amikor a molekula a vérlemezkék egymáshoz és a sérült érfalhoz való kapcsolódását közvetíti, ezáltal nő a molekula és receptor kölcsönhatás valószínűsége, miközben nagy felszínen érhető el a VIII-as alvadási faktor is, amely a vérlemezke felszínén zajló koagulációs folyamatban főszereplő. A VW multimer mérete e konformációjától függő szerepét befolyásolja.

A VWF azon kívül, hogy nagy nyíróerő ellenében biztosítja a trombociták kapcsolódását a szubendotéliális struktúrákhoz (adhézió), azáltal, hogy molekuláris hidat képez a trombocitákon lévő receptora (GPlb) és a szubendotélium (kollagén és proteoglikánok) között, közvetíti a trombociták egymáshoz való kapcsolódását is a GPlb és GPllb/IIIa receptorokhoz kötődve (aggregáció), részt vesz az endotélsejt bazális membrán kapcsolatban is (8. ábra). Továbbá a VWF molekula hordozza a VIII-as alvadási faktort is (nem kovalens kötéssel, komplexként együtt keringenek), ezzel stabilizálja a FVIII-t és megvédi az aktivált protein C vagy a FXa általi inaktivációtól a keringésben.

A VWF csökkent funkcióját okozó mennyiségi vagy minőségi eltérések mellett egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak az emelkedett szintje és aktivitása miatt kialakuló trombotikus rizikónak. Régóta ismert, hogy a nagy VW multimerek aktivitása nagyobb, mit a kisebbeké, sőt a VW molekula multimerizáltsági fokának egy bizonyos szint alá csökkenése vérzékenységet okoz. Igazolták azt, hogy a trombusképződés valószínűségét növelik a nagyon nagy multimerek [53]. Jelenleg a VWF szerepét Sadler foglalta össze a legáttekinthetőbb módon, amint ezt a közleményéből vett ábra mutatja [54]. A <20% VWF szint áltatálában 1-es típusú VWB-et jelent, a 20-50% közötti mérsékelt vérzési rizikót és a 200% fölötti a trombózis rizikójára figyelmeztethet. Méghozzá a vérzés és a trombózis rizikó, úgy tűnik, hogy folytonosan és fordítottan arányos a VWF szinttel (a vérzés rizikója fordítottan a trombózisé egyenesen), a normál tartományon belül is. A normál és az ellentétes hatású (vérzés és trombózis) patológiás állapotok között nincs éles határvonal. További alapkutatások tisztázzák majd, hogy a VWF szekréciója majd eltűnése,

multimerek felépülése és lebomlása hogyan függ össze a vérzéssel és a trombózissal. A klinikai kutatások, pedig folyamatosan keresik a betegek hasznára fordítható az új ismereteket.

Tézis

A raktárhelyéről kilépő VWF multimerek méreteloszlása a nagyon nagy multimerek (ultra-large VWF, ULVWF) felé eltolódott. A ULVWF, amely a trombocita dús trombus képződését sokkal jobban -akár immobilizáció nélkül is- katalizálja, mint a kis-, közepes- és nagy multimereket tartalmazó normál plazma VWF, gyorsan eltűnik a keringésből, a VWF multimer egyensúly normalizálódik. A multimer méretét az ADAMTS-13 enzim normalizálja, az A2 doménjében, a Tyr1605–Met1606 között hasítva a VWF-t. A hasítás nyíróerő függő [55]. A folyamat a pontos mechanizmusának feltárása jelen kutatások tárgya. A TTP és a HUS és a kis mikroereket érintő trombotikus megbetegedéseket közös néven trombotikus mikroangiopátiának nevezik (TMA) és azt feltételezik, hogy az ULVWF nagy mennyiségben való megjelenése és az elégtelen lebontása állhat a történések hátterében.

A trombusképződés megismerésére irányuló klinikai megfigyeléseket, és a klasszikus morfológiai és patológiai vizsgálatokat, az öröklött alvadási rendellenességeket okozó alvadási fehérjék megismerése követte. Később lehetővé vált a trombociták fiziológiájának vizsgálata, a turbidimetriás trombocita-trombocita kölcsönhatás vizsgálatok (aggregáció), a trombociták kitapadásának megfigyelése, mérése idegen felszínhez (üveglemez, üveggyöngy). 50-60 éve kezdődött az a technikai fejlődés, amely lehetővé tette és felgyorsította az *in vitro, ex vivo* és *in vivo* körülmények között történő kísérletes tanulmányokat [56].

Lehetővé vált a trombus alkotóinak biokémiai vizsgálata is, a proteinek izolálása, aminosav szekvenciák, domén szerkezetek és funkciók meghatározása, a molekuláris és genetikai háttér megismerése. Vizsgálható a szubendotéliális mátrix vagy a képződő trombus és izolált komponenseinek is az összetétele, a trombogenitást szabályozó alkotói.

Több mint 30 éve írták le az áramló vérben kialakuló nyíróerők hatását a trombocita adhézióra. Azóta a vér reológiáját is figyelembe veszik a trombózis és hemosztázis kutatások. A vér reológiai viszonyainak a modellezésére számos áramlási kamrát készítettek. Működésük szerint lehetnek *in vivo, ex vivo* és *in vitro* áramlási modellek/kamrák. Alakjuk szerint öt csoportba sorolhatóak: gyűrűs-; cső alakú-; és párhuzamos lemezű áramlási kamrák; kúp és sík áramlási eszközök; és a pangási vagy álló pontos áramlási kamrák.

Humorális oldalról a trombus növekedésének, stabilizációjának főszereplője a trombin, amely a sérülés helyén tapadt trombociták felszínén protrombinból igen gyorsan képződik. Azokban a folyamatokban, amelyekben a trombociták sérült érfalhoz való lokalizációját nem a kollagén iniciálja, a trombin képződésének igen nagy szerepe lehet [20].

A mai farmakológiai kutatás egyik vezető iránya a kígyómérgekből, vérszívó rovarokból, állatokból izolálni a hatóanyagokat és azok hatásmechanizmusának vizsgálni. A munkák célja, a különböző biotechnológiai technikákkal specifikus trombusképződést gátló anyagok/inhibitorok megismerése. Az általánosan használt antitestek mellett az *in vitro* peptid és fehérje vagy a nukleinsav alapú specifikus felismerő molekulákat alkalmazó nagyteljesítményű technológiák egyre gyorsabban

Tézis

fejlődnek. Pl. nagyon nagy affinitású humán antitesteket lehet fágtechnológiával izolálni, hatékonyan, egyszerűen és olcsón [57], [58] [59].

A peptid/fehérje alapú specifikus felismerő molekulák fág technológiával (angol irodalomban "phage display" technológia) állíthatók elő [60]. Ennek a technikának az a lényege, hogy a fágokba -célszerűen valamelyik külső glükoproteinjébe vagy a köpenyfehérjéjébe idegen peptid vagy antitest szekvenciát lehet építeni. A peptidek hossza tervezett. A peptidek lehetnek lineárisak vagy ciklikusak. Az adott peptidszekvencián belüli lehetséges variációkat tartalmazó fágok sokasága a fágkönyvtár. Minél hosszabb a peptid, annál nagyobb számú a variáció lehetősége. A peptid hosszát a stabilitás limitálja. Általában max. 30 aminosavból álló peptidkönyvtár létezik.

Egy gyakran használt másik típusú eljárással aptamereket lehet kiválasztani. Az aptamerek egyszálú nukleinsavak, amelyek jól meghatározott háromdimenziós szerkezete lehetővé teszi, hogy az antitestekhez hasonló módon kapcsolódjanak célmolekulához [61].

Az aptamerek kis (peptid) molekulák és antitestek tulajdonságaival egyaránt rendelkeznek: nagy specificitás, kémiai és biológiai stabilitás, alacsony toxicitás és antigenitás, kölcsönhatások felismerési képessége (protein-protein). Azonban az antitestekkel ellentétben, kémiai-, biokémia módszerekkel szintetizálhatóak, amely költséghatékony előállítási lehetőséget biztosít.

SELEX-Systematic Evolution of Ligands by Exponential- dúsítási eljárás elterjedése azonban olyan oligonukleotid szekvenciák izolálását tette lehetővé, amelyek sok fajta, nagy számú célmolekula specifikus felismerésére és nagy affinitású kötésére képesek. Ezek az oligonukleotid szekvenciák, más néven aptamer molekulák, az antitestek versenytársai a terápiás és a diagnosztikai alkalmazásban egyaránt. Az aptamerek alapvetően különböznek az antitestektől és azokhoz képest a technológia és az alkalmazás még nagyon kezdeti fázisban van, azonban igen gyorsan fejlődik [62].

A trombin aptamerek nanomolár koncentrációban gátolják a trombinnak az alvadást aktiváló hatását, a trombin exosite-1 régiójához való kötődésén keresztül. [63]. A Bock és munkatársai által közölt konszenzus trombin aptamer, C-15-mer (ahol a C jelentése: consensus), egy 15 nukleotidból [d(GGTTGGGTGGGTTGG)] álló egyszálú DNS, melyet oligonukleotidok kombinációiból álló hatalmas könyvtárból, trombinkötő képességük alapján azonosítottak.

Az oligonukleotidok módosításával még jobb apamereket lehet találni. Aradi J munkacsoportja 4tiodeoxiuridiláttal (s4dU) módosított oligonukleotidokat szintetizált és leírták, hogy a beépített molekulacsoport redukáló és hidrofil karaktere miatt az új szintetikus aptamereknek nagy affinitása van számos fehérjéhez [64]. Az eredmények részben bemutatom, hogy módosított aptamerek hatását vizsgáltuk és azt találtuk, hogy egyikük a trombin 1-es anionkötő helyéhez kötődve hatékonyabb gátlószernek bizonyult, mint a C-15-mer [20].

Anyagok, klinikai minták és módszerek

Humán VWF (Haemate P, Aventis Behring, GmbH, Marburg, Németország) Sephadex CL-4B (Pharmacia AB, Uppsala, Svédország); New England Biolabs (Beverly, MA, USA) "random heptamer phage display" könyvtár;

Humán trombin, hirudin, hirudin fragmentumok 54-65 (a továbbiakban hir54-65), tisztított fibrinogén, tripszin, fibrin polimerizációt gátló peptid: Gly-Pro-Arg-Pro (GPRP), PAR-1 trombin receptort aktiváló peptid (SFLLRNP, rövid nevén TRAP-1); risztocetin, diaminobenzidin (DAB), humán I-as és III-as típusú kollagén placentából (Sigma katalógus szerint I-es és X-es típusú) a Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA); Horm kollagén (ló ínból, I-es és III-as típusú kollagén keveréke) a Nycomed Pharma (München, Németország) forrásból származtak. Rekombináns teljes hosszúságú VWF, ΔA1- (Δ478-716), ΔA2- (Δ729-910), A3his- (920-1111), RGGS- (1744-1746), ΔD4B- (Δ1113-1639) és ΔC-VWF (Δ1640-1899) Peter Lenting (University Hospital, Utrecht, Hollandia) ajándéka volt. A B8-fágból korábbi, publikált munkából volt a laboratóriumunkban. Aspecifikus fágnak laktoferrinen szelektált fágokat használtunk. A GPIb N-terminálisára specifikus 24B3 monoklonális antitest (moAb), és a VWF A3 doménjére specifikus 82D6A3 moAb, a 6B4 FmoAb fragment készítését korábbi publikációk tartalmazzák.

Kromogén trombin szubsztrát S-2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-PNA) a Chromogenix (Milano, Olaszország). Reptiláz idő reagens (batroboxin) a Diagnostica Stagotól (Asnieres, Franciaország), Chrono-Lume kit a Chrono-log Company (Havertown, USA), ioncserélő kromatográfiával tisztított aptamer 5'--GGTTGGTGGTGGGTGGG-3' (C15-mer) a VBC Biotech Services (Bécs, Ausztria), BCATM fehérje meghatározó kit a Pierce (Rockford, USA).

A vérmintákat egészséges önkéntesektől vettük, akik legalább két héttel a vérvétel előtt nem szedtek trombocita ellenes gyógyszereket. 9 rész vért 1 egység 105 mM-os nátrium-citráttal antikoaguláltuk az alvadási idő és a trombocita aggregációs vizsgálatokhoz vagy 10 U /mL alacsony molekulatömegű heparinnal (LMWH) a trombocita adhézió tanulmányhoz (Fraxiparine, Glaxo Wellcome Production S.A.S. Franciaország). A vizsgálatok, a különböző plazmák és a trombociták szeparálása egy óránál nem régebben vett vérből történtek.

A trombocitadús plazmát (PRP) 150 g-n (15 perc, szobahőmérséklet) és a trombocita szegény plazmát (PPP) 2.000 g-n (10 perc) centrifugálással különítettük el. A PRP trombocitaszámát PPPvel hígítva állítottuk 200 G/L-re. (Ha a PRP trombocitaszáma kevesebb volt, akkor az adott trombocitaszámú és mennyiségű PRP-ből a trombocitákat 2.000 g-n 10 percig centrifugálva kiülepítettük, és a trombocitákhoz az óvatosan levett PPP-ból annyit adtunk, hogy szuszpendálva 200 G/L legyen a trombocitaszám. A plazmákat a feldolgozásig -70 C°-on tároltuk (nem több mint 6 hónap).

A mosott trombocita szuszpenziót 0,18 μM prosztaglandin E1 tartalmú citrátos vérből készítettük. A PRP-ből centrifugált trombocitákat háromszor mostuk "A" mosó pufferben (140mM NaCl, 2,5mM KCl, 0,1mM MgCl₂, 10mM NaHCO₃, 0.5mM NaH₂PO₄, 1mg/mL glükóz, 10mM HEPES, pH7,4), az

eredeti vérnek megfelelő térfogatban szuszpendálva. Az utolsó szuszpenzióból trombocita számot határoztunk meg és centrifugálás után a pontosan számolt mennyiségű "B" pufferben vettük fel a trombocitákat. A "B" puffer az "A" puffertől abban különbözött, hogy 2mM CaCl₂ –t tartalmazott. Általában 200 G/L-es trombocitaszámú szuszpenzióval dolgoztunk vagy az adott kísérlethez tervezett számú szuszpenzióval.

VWF:Ag mérése ELISA módszerrel történt jelöletlen, jelzett poliklonális anti human VWF ellenes antitestekkel [65]. A kollagén kötő aktivitás mérése (CBA) azonos módon történt, csak a fedő antitest helyett kollagént használtunk. Risztocetin kofaktor aktivitást (VWF:RCo) kereskedelmi forgalomból beszerzett kittel mértük (Helena, Beaumont, TX, USA). A VWF multimer szerkezete SDS agaróz elektroforézis, immunoblott denzitometriával történt, az eredmények részben leírt módosított módszerrel. A VWF hasító enzimének (ADAMTS-13) az aktivitását fluoreszcencia rezonancia energia transzfert kiváltó szubsztrátreakció és antigén szintjét ELISA módszerrel mértük, a Technoclone-tól beszerzett kittel (TECHNOZYM® ADAMTS-13, Technoclone GmbH, Bécs, Ausztria).

A kollagénhez kötődő VWF morfológiai különbségeinek AFM vizsgálatához alacsony (0,07 N/m² = 0,7 din/cm²) és magas (4,55 N/m² = 45,5 din/cm²) nyírófeszültséget párhuzamos lemezű áramlási kamrában biztosítottunk. 1 µg/mL-es VWF oldatból 5 vagy 15 perces perfúzió után a kollagén felszínhez tapadt molekulákat parafomaldehid oldattal fixáltuk.

A trombocita adhéziós kísérletekhez két fajta áramlási kamrát használtunk. Amikor párhuzamos lemezek között áramoltattuk a vért, akkor párhuzamos lemezű kamrát (angol irodalomból származó rövidített néven PPC, paralell plate chamer) és amikor egy síklemez fölött forgatott kúppal áramoltattuk a vért, síkon forgó kúp kamrát (CPC, cone and plate chambers) használtunk. A vért kísérleti tervenként különböző, 2,5-, 5-, esetenként 15 percig áramoltattuk, vénás és artériás körülményeket modellező sebességgradiens beállítással, amely általában <650/s és >1000/s (gyakran 2600/s vagy még nagyobb) volt.

A trombocita adhézióra kollagén felszínen, párhuzamos lemezű áramlási kamrában 650/s, 1300/s és 2600/s sebességgrandies beállítással vizsgáltuk. I-es típusú humán kollagénből 1 mg/mL-es oldatot 50 mmol/L-es ecetsav oldattal készítettünk, PBS ellenében dializáltuk, majd Thermanox műanyag fedőlemezre porlasztottuk. Az előző nap előkészített és fedett lemezt másnap reggelig szobahőmérsékleten, sötét helyen hagytuk. Az áramlási kísérlethez 12 mL, LMWH-val antikoagulált vért, 6B4 Fab-val 37°C-on 5 percig inkubáltuk. 5 perces áramoltatás és alapos mosás után a kollagénnel fedett lemezeken összegyűlt trombocitákat (a trombust) metanollal dehidráltuk/fixáltuk, majd May-Grünwald/Giemsa-val festettük. Trombocita adhéziót fénymikroszkóppal, a csatolt kamerával és képanalizáló programmal mértük. A trombocitákkal fedett felszínt a teljes felszínhez viszonyított százalékban adtuk meg. Átlagosan 30 látómezőt/fedőlemezt vizsgáltunk. A trombocita adhézió csökkenését a gátlóanyag nélküli vérből képződő maximális trombocita adhézióhoz viszonyítva, százalékos értékében fejeztük ki.

A fágok trombusképződésre gyakorolt hatásának vizsgálatára síkon forgó kúp rendszerű áramlási kamrát használtunk 4000/s áramlási sebességgel, ami 15,2 N/m² (152 dyne/cm²)

MTAdoktori, Hársfalvi J.

dc 72 10

Tézis

nyírófeszültségnek felel meg. Az áramlási kamrát 5%-os tejpor oldattal blokkoltuk 30 percig, majd Hepes pufferrel mostuk (0,01 mol/L Hepes, 0,145 mol/L NaCl, pH: 7,35). A kísérletekben 250 μL vért 10, vagy 30 percig, pufferrel előinkubáltunk, aspecifikus vagy L7-fágokkal, majd 5 percig áramoltattuk kollagénnel fedett fedőlemezen. A lemezről, véletlenszerűen, 30 területet választottunk az analízishez (IMAN 2.0, Anyagtani Kutató Intézet, Budapest, Magyarország). A trombocita számot a kísérlet előtt és után is Sysmex K4500 hematológiai automatával (Toa Medical Electronics Co., Ltd., Kobe, Japán) határoztattuk meg.

Amikor az adhéziót a belga laboratóriumban lévő mini párhuzamos lemezű kamrával is elvegeztük, Az aptamerek trombusképződésre gyakorolt hatását 650/s sebességgradiensen Impact-R (DiaMed AG, Cressier sur Morat, Svájc) síkon forgó kúp kamrában vizsgáltuk. III-as típusú humán kollagén, vagy HMEC-1 extracelluláris mátrixsza volt a trombogén felszín.

A trombocita aggregációt Lumi aggregométerrel mértük (Chrono-log, PA, USA), 290 G/L tombocitaszámú PRP-vel vagy mosott trombocita szuszpenzióval. A trombin aggregációt (0,5 U/mL) 1,25mM GPRP (fibrin polimerizációt gátló peptid) jelenlétében végeztük. A Horm kollagén 5µg/mL-es koncentrációban használtunk az aggregáció kiváltására. A trombin inhibitorokat (vizsgálandó aptamereket és az összehasonlításhoz használt más gátló anyagokat) 1 percig előinkubáltuk PRP-vel a trombin hozzáadása előtt. Az inhibitorokat trombinnal való előinkubálás után együtt adva a PRP-hez is alkalmaztuk. A kísérleteket hasonló képen végeztük a mosott trombocita szuszpenzióval (WPS-sel) is. A trombocita aggregáció mértékét az aggregációs görbe meredekségének meghatározásával adtuk meg számszerűen.

A trombocita szekréciót az aggregációval egyidejűleg az ATP felszabadulást luciferin-luciferáz reakcióval mérve követtük. A legmagasabb lumineszcens jel elérése után a mintához 4µM ATP standardot adtunk, a jelmagasság növekedéséből számoltuk az ATP felszabadulás vagy szekréció (relase) mértékét.

Áramlási citometriás analízis során az 1C1E7 és a 82D1E1 antitesteket szukcinimidilfluoreszceinnel jelöltük (XSF; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Hogy a trombocita GPIIb/IIIa receptorát gátoljuk, a citrátos vért 20 μ g mL⁻¹ 16 N7C2 antitesttel inkubáltuk, majd 50 μ g mL⁻¹ jelzett anti-VWF-ral és 20 μ g mL⁻¹15E7 moAt-tel vagy hiányában, 30 percig 20 C°-on. Az így kezelt trombocita dús plazmát (PRP) a készülék pufferével (Facsflow, Becton Dickinson, Le Pont-de Claix, France) tovább hígítva szívattuk fel az áramlási citométerrel (FACStar, Becton Dickinson). A fluoreszces jel meghatárázásához10000 sejtet gyűjtött össze a készülék, minden mintából. Kontrollként vagy XSF-jelzett MEM31 vagy nem jelzett trombociták autofluoreszcenciája szolgált. A trombociták fluoreszcencia intenzitásának növekedését (az autoflureszcenciára vonatkoztatva) az trombocitákhoz kötődő VWF antitesteket kötő képességének tekintettük. XSF-jelzett 82D1E1 volt a kontroll VWF ellenes antitest.

0,1 mL fibrinogén oldatot (2mg/mL) vagy gyűjtött normál humán plazmát 0,1 mL Owren-féle puferrel, amely különböző koncentrációban tartalmazta az aptamereket, 1 percig inkubáltunk 37°Con. Az alvadási reakciót 0,1mL (0,6NIHU/mL végkoncentrációjú) trombin hozzáadással indítottuk. Alternatívaként, az aptamereket először trombinnal inkubáltuk 1 percig és a reakciót fibrinogén,

MTAdoktori, Hársfalvi J.

vagy plazma hozzáadásával indítottuk. Az alvadási idő mérésére KC-1 koagulométert (Amelung, Lemgo, Németország) használtunk. Hogy teszteljük az aptamerek trombin specifitását, egyes kísérletekben a trombint 5- batroxobin unit (BU)/mL Reptilase-zal helyettesítettük.

Tézis

A trombin S-2238 kromogén szubsztrátjának a hidrolízisét 405 nm-en, 37 C°-on mértük. A reakcióelegy különböző koncentrációban tartalmazta az aptamereket 0.1mL pufferben (20mM Tris-HCI. 50mM NaCl. pH8.3), amelyhez 0.1mL trombint (0.2U /mL) adtunk. A reakciót 0.1mL szubsztrát (2mM) hozzáadásával indítottuk. A felszabadult p-nitro-anilin fényelnyését (OD-t) egy mikrolemez olvasón követtük. Egyes kísérletekben az aptamerek hatását 2,5 nM hirudin ielenlétében is mértük.

Fibrinopeptid A (FpA) mérése folyadékkromatográfia – tömegspektrometria (LC-MS) alkalmazásával. Növekvő koncentrációjú aptamerekkel előinkubált plazmához az időmérő inításával egyidőben trombint adtunk és egy szintetikus peptidet, a mennyiségi meghatározásra szolgáló belső standardként. Egyes kísérletekben a trombint inkubáltuk elő az aptamerekkel és a reakció a plazma hozzáadásával kezdődött. Minden reakciót leállítottunk 3 egység 96%-os etanol hozzáadásával akkor, amikor az aptamer nélküli plazma megalvadt (30 másodperc), A precipitátumot centrifugáltuk (13.600g, 4°C, 15 perc), és 90 µL felülúszót SpeedVac bepárlóbanban beszárítottunk. A száraz anyagot 90 µL 10%-os acetonitrilt és 0,1% hangyasavat tartalmazó oldatban oldottuk fel. FpA-t LC-MS alkalmazásával (API 2000, Appied Biosystems) mértünk. 10µL mintát fecskendeztünk egy 2,1x50mm-es C18-as fordított fázisú oszlopra és 15-41%-os acetonitrilt és 0,1% hangyasavat tartalmazó vízzel eluáltunk. Az FpA elúcióját (retenciós idő: 3,8 perc) és a belső standardot (retenciós idő: 4,7 perc) dupla-protonált tömegük alapján detektáltuk (m/z=769,3 és m/z=870). Az FpA/belső standard csúcsérték arányát hasonlítottuk a kalibrációs görbéhez. HUVEC sejteket Jaffe szerint izoláltuk humán köldökzsinórból, a szülés után nem több mint két órán belül. A sejteket Medium 199 tápoldatban tenyésztettük, amelyet kiegészítettünk 20% magzati borjúszérummal (FCS), 15 mM NaHCO3-mal, 2mM glutaminnal, 5mg/L fungizonnal, 100 kU/L penicillinnel és 100 mg/L streptomicinnel (mind Gibco BRL, Life Technologies, Franciaország). HMEC-1 seiteket együttműködési szerződés keretében Ades E.W. és Lawley T.J. kutatóktól kaptuk (Centers and Emory University School of Medicine, Atlanta, GA), és MCDB 131 tápoldatban tenyésztettük (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) amelyet kiegészítettünk 10% FCS-sel, 100 kU/L penicillinnel, 100 mg/L streptomicinnel, 2 mM glutaminnal, 0,01 mg/L epitéliális növekedési faktorral és 1 mg/L hidrokortizollal. A sejteket a teljesen benőtt felszínről tripszin-EDTA (0,125% tripszin, 0.01% EDTA, vegyes %-ok, desztillált vízben) emésztéssel vettük fel és passzáltuk. A HUVEC mátrixot az 1-3 passzálás után a HMEC mátrixot a 35-45 passzálás után használtuk. (Ez utóbbit 34 passzálás után kaptuk.) 96 lvukú lemezbe 5x10⁴ /0.1mL seitszuszpenziót adtunk. Szérummentes tápoldatokat használtunk a tenyésztéshez, amelyeket 0,1% albuminnal (marha vérből izolált) egészítettük ki. A sejtekkel egyenletesen és teljesen befedett felszínt foszfát puferrel (PBS) mostuk kétszer, majd 0.1 % Triton X-100 és 0.1 M NH₄OH tartalmú oldattal lizáltuk 20 perciq, szobahőmérsékleten. A lizáló oldat inhibitrokat is tartalmazott (5mM NEM és 1 mM PMSF). A mátrixokat vagy direkt használtuk az immunokémiai reakciókhoz, vagy az elektroforetikus

szeparáláshoz a mintapuffeben oldottuk. (Mintapuffer: 80 mM Tris, pH 6,8; 2 % SDS, 5 % MEA és 0,001 % brómfenolkék.) A mátrix felszínén levő vagy a tápfolyadékba szekretált anyagokat in situ antitest próbákkal vagy ELISA módszerekkel határoztuk meg.

Tézis

Az extracelluláris mátrix relatív prokoaguláns aktivitását a felszínekre mért 37 Co-os citrátos plazma (0,14 mL) rekalcinálási (25 mM-os 0,07 mL CaCl₂) idejéből határoztuk meg.

A VWF detektálására kidolgoztunk egy arany gyöngyökket jelzett antitestet (Protein A) alkalmazó módszert, amely atomerő mikroszkóppal (atomic force microscopy, AFM) lehetővé teszi az egyes VWF molekulák helyzetének a meghatározását és a kollagénhez való kötődésük morfológiai analízisét. Párhuzamos lemezű áramlási kamrába l-es típusú kollagénnel fedett üveglemezeket tettünk, amelyek felett gélszűréssel tisztított VWF áramoltattunk. A kollagénen kötődött VWF-ről AFM-mel alkottunk képet. A VWF kötésének morfológiai különbségeit alacsony (0.07 N/m² = 0.7 din/cm²) és magas (4.55 N/m² = 45.5 din/cm²) nvírófeszültséget alkalmazva hasonlítottuk össze. Debreceni Egyetem Biofizikai és Seitbiológiai Intézete az AFM-et részenként vásárolta meg a Twente Egyetemtől (Enschelde, Hollandia). "Contact-mode" -ban, 512x512 pixel-es képek készültek 0,7-1,5 sor/másodperces olvasási sebességgel, egyszerre mérve a csúcsokat és a zajt. A VWF-kötő fágok szelekcióját a lineáris heptamer peptid (L-7) könvytár útmutatója alapján végeztük el. A szelekcióhoz 20 µg/mL-es tisztított VWF-t tartalmazó PBS oldattal fedtük a felszínt egy éjszakán át, majd 30 percig 3%-os kazein oldattal blokkoltuk és PBS-T oldattal mostuk, ezután pedig a fágkönyvtárat adtuk rá az első körben. A második szelekciós körben az első körből szelektált majd amplifikált fágokat vittük a felszínre, majd a harmadik körben a második körben szelektált és amplifikált fágokat. Az elúciót mindegyik körben 0,1 M-os glicin oldattal végeztük. A kísérlet részletei a közlemény "support" anyagának Anyagok és Módszerek részében szerepelnek. A fágok kötőkapacitásának tesztelésére tisztított VWF-ral fedtünk (10 µg/mL VWF PBS-ben, 4°Con, egy éjszakán át) 96 lyukú mikrotiter lemezt. 30 perc blokkolás után az L7-fág klónokat 0,4% kazeint tartalmazó TBS-ben sorozat hígításban vittük fel és 2 órán keresztül hagytuk szobahőn. Mosás után a kötődött fágokat torma peroxidázzal jelzett M13 fág ellenes poliklonális antitesttel (anti-M13-HRP, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Svédország) inkubáltuk, orto-feniléndiamin (OPD, Sigma) és H₂O₂ (Acros Organics) hozzáadásával kvantitáltuk. Minden inkubáció után TBS-T-vel 5-ször mostuk a lyukakat. Epitóp térképezéshez a 96 lyukú lemezt, PBS-ben oldott, 10 μq/mL koncentrációjú vad típusú-, ΔΑ1-, ΔΑ2-, A3his-, RGGS-, ΔD4B-, vagy ΔC-VWF-ral fedtünk, majd 3%-os tejpor oldattal blokkoltuk. A lyukakat 2 órán keresztül, 37°C-on inkubáltuk L7-, vagy aspecifikus fágok sorozat hígításával (0.3% teiport tartalmazó TBS-ben oldva). Kontrollként fedetlen lemezen is inkubáltunk fágokat. A kötődött fágokat anti-M13-HRP antitesttel, a korábban leírtak szerint detektáltuk.

Az eredmények rendszerezése, az adatok statisztikai elemzése Microsoft Excel és SPSS.15 statisztikai szoftverekkel történt. Az IC50 értékek számolásához GraFit (Erithacus Software Limited, Horley, UK) szoftvereket használtunk.

Elválasztástechnika (vékonyréteg-kromatográfia, és ioncserélő kromatográfia. gélgázkromatográfia, HPLC, FPLC, elektroforézis), minőségi és mennyiségi kémiai, biokémiai,

Tézis

biofizikai és immunkémiai módszerek, véralvadási vizsgálatok, áramlási citometriás vizsgálatok és további vizsgálatok leírása meghaladja a dolgozat terjedelmét. Ezek ismertetése az idézett közleményekben található.

Eredmények

MTAdoktori, Hársfalvi J.

A kutatómunkában a megfelelő téma megválasztása mellett jelentős szerepet tölt be a kutatáshoz alkalmazandó anyagok eszközök, rendelkezésre álló műszerek, módszerek, de nem utolsó sorban az a szellemi munka, esetenként innováció, amelyek ezek megismerését, alkalmazását lehetővé teszik. Ezért először azokat az eredményeinket ismertetem, amelyek a kutatásainkban alkalmazott eszközök, módszerek megismerése közben új, nemzetközi szinten elfogadott eredményre is vezetettek.

A továbbiakban az eredményeket a nagy nyíróerő hatása alatt végbemenő véralvadási, trombusképződési folyamat jelenleg elfogadott sorrendje szerint igyekszem ismertetni: trombogén felszín, trombogén felszínhez kapcsolódó molekulák, kofaktorok, ezek közreműködésével kapcsolódó trombocita, majd trombocita-trombocita kölcsönhatások, végül a trombus képződése. A kutató munkák együttműködésben folytak, különböző munkacsoportokkal, különböző pályázati támogatásokkal. A saját vagy munkacsoportomban dolgozó kutatók meghatározó hozzájárulásával végzett munkák eredményét írom le, amelyek további részleteit az idézett közlemények tartalmazzák.

A vénás és artériás körülményeket modellező, teljes vért alkalmazó áramlási kamráknak több típusa ismert. A párhuzamos lemezű (PPC) és a viszkoziméterekből kidolgozott síkon forgó kúp (CPC) rendszerű kamrák a leggyakrabban alkalmazottak. Az előbbiek a vérigénye, attól függően, hogy milyen méretű a kamra, nagyon különböző lehet. A vér mennyisége és az adhezív/trombogén felszín méretének aránya is igen eltérő a kamrákban. Legkisebb vérigénye a síkon forgó rendszerű kamráknak van, azonban ezekben a felszín aránya a vér térfogatához képest igen nagy. A két különböző rendszerű kamrát alkalmazva, megvizsgáltuk, hogy azonos nyírófeszültség esetén az adhéziós eredmények értelmezhetőségét hogyan befolyásolja az eltérő geometria és a trombogén felszínre vonatkoztatott különböző vértérfogat [4]. A teljes felszínfedettség és az egyes trombusok (mivel eqyedi trombociták nem vagy alig vannak a kollagénen a trombocita halmazokat trombusoknak nevezzük a továbbiakban) területe/adhéziós terület közötti összefüggés vizsgáltuk. A PPC és a CPC felszínein azonos a trombusok / adhéziós területek mintázata. A trombus területet ábrázolva a felszínfedettség függvényében, legjobban egy exponenciális görbe illeszthető a PPC és CPC összes adatokra, y= 7,018e^{0,0648x}; R² = 0,9183. Megfigyelhető, hogy 25% felszínfedettség alatt alig van különbség a két kamra között, azonban 25%-nál nagyobb felszínfedettség a CPC-ben nem érhető el. A trombus magassága 2 és 18 µm között változott. PPC esetén a többség 4 és 6 μm között, a CPC esetén 6 és 8 μm között volt. Az eloszlásfüggvény Gaus görbét követ. Az átlag trombus magasság PPC esetén 6,6 ± 0,3 μ m (n=8), míg CPC esetén 7,5 ± 0,2 μ m (n=5) (p=0,0144). Fluoreszcensen jelzett VWF eloszlása is mutatja ezt a különbséget. A két mérés technikailag különbözött. Az ábrán az is látszik, hogy a VWF maximum a trombus közepe táján van, a magassággal arányosan. A keringő vérből eltűnő, egyedül álló trombociták számának az

Tézis

MTAdoktori, Hársfalvi J.

aránya a keringetés előtti trombocitaszámra vonatkoztatva (single platelet disappearance, SPD) és a felszínfedettség közötti összefüggés CPC esetén jelentős, lineáris regressziós analízissel (y = 0,8562x + 9,413; R=0.4897; p=0,0021), azonban PPC esetén nincs értékelhető összefüggés (y = -0,009x + 8,8787; R= -0,01233; p>0.05.

Mivel a VWF aktivitása arányos a multimer méretével, azaz a multimerizáltságának mértékével, a VWB diagnosztikájában a VWF funkciójának meghatározásához nélkülözhetetlen a multimerek méret szerinti eloszlásának meghatározása. A nátrium lauril szulfáttal (SDS) denaturált VWF multimerieire bontható SDS-agaróz gélelektroforézissel. Az értékelés a vizsgálandó és a kontroll minta multimer sávjai számának összehasonlításával -rutinszerűen csak szemmel- történik. Gyakorlott analitikus a vérzési rendellenességgel járó multimer hiányt így is meg tudja határozni. Denzitometriával a sávok intenzitása és lokalizációja számszerűsíthető, grafikusan denzitometriás görbe szerkeszthető. A denzitometriás meghatározás nehézsége a görbe ill, az adatok értékelése. Munkacsoportunk doktorandus hallgatója készített egy programot, amely a denzitometriás görbe megfelelő értékelését és teszi lehetővé [8]. A denzitometriás értékelés elsősorban azt a célt szolgálja, hogy a nagy multimerek mennyiségi növekedését tudjuk értékelni. Ennek a célnak az elérése érdekében az elektroforetikus szétválasztást kellett először optimalizálni, hogy a nagy és a kis multimerek is jól értékelhető, különálló sávokat adjanak. Ezt két fontosabb változtatással lehetett érni: (1) a VWF elektroforézishez általánosan alkalmazott Tris-glicin pufferben a glicin helyett az agaróz forgalmazója által ajánlott borát alkalmazásával, (2) az elektroforetikusan elválasztott VWF multimerek gélen történő merkaptolizálásával, amellyel a gélből a membránra történő fehérje transzfert egyenletessé (multimer mérettől függetlenné) lehetett tenni. A multimerek méretének jellemzéséhez első lépés a görbe alatti terület felső 25 százalékához tartozó sávok vándorlási távolságának meghatározása. Ehhez a felső 25%-t elválasztó vándorlási távolsághoz tartozó molekulaméretet (M_{MW25}) - amelyet a mintában található multimer csúcsok, és a hozzájuk tartozó molekulatömeg összefüggése alapján lehet kiszámítani -, tekintettük a minta legnagyobb multimereit jellemző értéknek. A módszer segítségével von Willebrand betegek mintáit, egészséges egyének plazma illetve trombocita lizátum mintáit vizsgáltuk. Összevetettük a multimer analízis eredményét a VWF funkcionális tesztekkel (VWF kollagén kötő kapacitás, VWF risztocetin kofaktor aktivitás) és igazoltuk a multimer méret és a funkcionális teszt eredmények közötti összefüggést (r²=0,42 ill. 0,43). A VWF molekula multimerizációjának fokától függő aktivitása a kollagénhez való kötődését is befolvásolia. A VWF kollagén kötő képességének (VWF:CB) a vizsgálatára a VWF kollagén kötő módszer (VWF:CBA) alkalmas. A módszerek (többnyire saját laboratóriumi, de kapható a kereskedelmi forgalomban is) különböző kollagéneket, különböző módon alkalmaznak. A módszervalidálási folvamat során irodalmi felmérést készítettünk [66] és a VWF:CB mérésére módszert állítottunk be, amellyel a fenti méréseket is végeztük.

Az artériás és a kapilláris keringésben a trombózis és hemosztázis első folyamata a sérült érfelszínen szabaddá váló endotélsejt alatti mátrixra a trombociták egy rétegben kitapadnak. Trombocita "egyréteg" kialakulása vagy adhézió ez a folyamat. Erre receptorokon és ligandjaikon át kapcsolódik a többi trombocita, aggregátum képződik, miközben létrejön a fibrinháló, összességében a trombus. A folyamatot izolált kollagénen, humán mikrovaszkuláris endotélseitek (HMEC-1) és köldökvéna endotélsejtek (HUVEC) által termelt extracelluláris mátrixon (ECM) vizsgáltuk, francia kollaborációs munkánkban [7]. A francia munkacsoport in situ ELISA-val kimutatta, hogy az HMEC-1 ECM-ben volt IV. típusú kollagén, fibronektin, laminin és trombospondin, I-es, III-as és VI-os típusú kollagén valamint VWF nem volt kimutatható mennyiségben. A HUVEC ECM-ben viszont mindegyik jól mérhető mennyiségben volt jelen. Indirekt immunfluoreszcenciával is igazoltuk a VWF hiánvát. A magyar munkacsoportban készült a HMEC-1 ECM prokoaguláns aktivitásának és trombusképző tulajdonságának a meghatározása. A prokoaguláns aktivitást a sejtmátrixokra mért citrátos plazma rekalcinálással indított fibrinkiválási ideiéből határoztuk meg. amely 36±5 sec volt az HMEC-1 ECM-en, míg a HUVEC ECM-en 95±6 sec. A trombusképző tulajdonság meghatározása érdekében LMWH-val antikoagulált vért 5 percig áramoltattunk párhuzamos falú áramlási kamrában, vénás és artériás sebességgradienst alkalmazva (650/s és 2600/s). A HUVEC ECM-en a vénás áramlási körülménvek között egyenként. az artériáson csoportosan tapadtak ki a trombociták, és mindkét esetben egy réteget képeztek. A felszínen kitapadt trombociták vagy trombocita csoportok átlagos mérete 16 ill. 50µm² a két sebességgradiensnek megfelelően. Az HMEC-1 ECM-en azonban nagykiterjedésű és rétegyastagságú trombocita aggregátumok/trombusok keletkeztek a vénás és az artériás áramlási körülmények között egyaránt. Átlagos területük 600-1200um² volt. Megfigvelhető, hogy az alacsonyabb sebességgradiens esetén valamivel nagyobb kiterjedésűek a trombusok. A kollagénen a jellemző, vénás áramláskor kis-, artériás áramláskor nagykiterjedésű trombusok képződtek. A plazma VWF szerepét olvan VWF ellenes monoklonális antitest jelenlétében vizsgáltuk, amely a VWF kollagénnel való kölcsönhatását gátolta. Az antitest egyáltalán nem befolyásolta a trombusképződést a HMEC-1 ECM-en, míg teljesen gátolta a HUVEC-ECM-en artériás áramlási körülmények között. VWF ellenes monoklonális antitest gátolta az adhéziót a HUVEC ECM-en, de nem befolyásolta az adhéziót és a trombusképződés az HMEC ECM-en. A trombin inhibitor hirudin jelenlétében az adhézió mértéke nem változott, azonban a trombusképződés elmaradt az HCEM-1 ECM-en de nem változott a kollagén mátrixon. A kontrollhoz hasonló, nagyméretű trombusok képződtek akkor is, amikor artériás áramlási körülmények között súlyos, 3-as típusú VW beteg vérét áramoltattuk a HMEC-1 ECM-en. Ennek a betegnek a vére nem tartalmazott sem plazma-, sem trombocita eredetű VWF-t. Az adhézió és a trombusképződés a VWF hiányára jellemző volt HUVEC ECM-en és a kollagén mátroxon egyaránt. Ez utóbbin alig vagy egyáltalán nem volt kitapadt trombocita artériás áramlási körülmények között. A HMEC-1 VWF nélküli mátrixa erős trombogén tulajdonságot mutatott, annak ellenére, hogy az Ies, III-as és VI-os típusú kollagének is hiányoztak a mátrixból. Hirudinnal ez a trombogén hatás nagymértékben gátolható volt. A trombociták adhéziója változatlan maradt, azonban a trombociták aggregációia elmaradt.

Tázis

dc_72_10

MTAdoktori, Hársfalvi J.

Tézis

Atomerő mikroszkóp alkalmazásával (atomic force microscopy, AFM) lehetővé vált a nagy nyírőerő hatására kitekeredett VWF vizsgálata [67], azt gondoltuk, hogy hasonló módon meggyőződhetünk arról, hogy az immobilizált kollagénhez, különböző áramlási körülmények között kötődő VWF faktor kitekeredik-e [9]. A hálós kollagén szálakon kötött, natív állapotában minden dimenzióban jóval kisebb VWF molekulák detektálására kidolgoztunk egy arany gyöngyökkel jelzett antitestet (Protein A) alkalmazó módszert, amely lehetővé teszi az egyes VWF molekulák kötődés utáni helyzetének a morfológiai analízisét. Gélszűréssel tisztított VWF-t, párhuzamos lemezű áramlási kamrában, Ies típusú kollagénnel fedett mikroszkóp fedőlemezeken, áramoltattunk. A kollagénen kötődött VWF-ről AFM-mel alkottunk képet. A VWF kötésének morfológiai különbségeit alacsony (0.07 N/m² $= 0.7 \text{ din/cm}^2$) és magas (4,55 N/m² = 45.5 din/cm²) nyírófeszültséget alkalmazva hasonlítottuk össze. A 1/10 hígításban alkalmazott arannyal jelzett "protein A" hatásosan jelölte a VWF-t, az egyedülálló VWF – anti-VWF komplex molekulák teljesen fedve voltak aranvgömbökkel. A nem specifikusan kötött arany partikulumok maidnem kizárólag egyesével fordultak elő, nagyon alacsony arányban megfigyelhetőek voltak a kettesével elhelyezkedően, nagyobb aggregátumok viszont egyáltalán nem voltak. Az első kísérletek alkalmával kettős jelölést (30- és 15 nm-es aranygömbökkel konjugált antitesteket) használtunk, annak kiderítése érdekében, hogy az arany markerek láthatóak-e a kollagénnel fedett felszínen. Az áramlási kamrába helyezett, kollagénnel fedett üveglemezek felett gélfiltrációval tisztított VWF-t áramoltattunk. Az áramlást követő fixálás után levegőn, AFM-mel képalkotás történt. A kollagénhez kötött VWF morfológiájában nem volt szignifikáns különbség alacsony és magas nyírófeszültség esetén. Nem mutatkozott egyértelmű jel a VWF kitekeredésére egyik esetben sem. Az elrendeződés nagyfokú véletlenszerűséget mutatott. 1 μg/mL VWF-t tartalmazó oldatot 5 percig, nagy sebességgel áramoltatva, a kollagénhez kötődött VWF mennyisége majd kétszerese a kis áramlási sebességgel áramoltatott oldatból kikötődötthöz képest, valamint megjelentek szokatlan formájú VWF molekulák is. Ez a különbség 15 perces perfúzió esetében - valószínűleg diffúzió következtében - eltűnt. Mosott és fixált trombocita (68 x 10⁹/L) jelenléte nem okozott semmilyen látható változást a VWF morfológiájában a különböző nvíróerők hatása alatt.

Belga ösztöndíjasként, fél napot töltöttem Sixma professzor laboratóriumában, Hollandiában (Uttrecht University), ahol Martin Ijseldijk analitikus megmutatta a párhuzamos lemezű áramlási kamra működését, a trombocita adhéziós vizsgálatokat, teljest vért alkalmazva. Ezt a módszert és egy tőlük vásárolt kamrát alkalmaztam sok éven keresztül a trombocita adhézió és a trombusképződés mechanizmusának és gátlásának tanulmányozására.

Előszőr a *Hirudo Medicinalis*-ból származó Calin hatásának mechanizmusát vizsgáltam. A belga munkacsoport ekkor mutatta ki, hogy a Calin gátolta a trombocita adhéziót és a trombocita dús trombus képződését hörcsögben [68]. *In vitro* kísérleteim eredményei szerint a Calin koncentrációfüggően gátolta a von Willebrand faktor-kollagén kölcsönhatást, a trombocita aktivációt és adhéziót mind statikus, mind dinamikus körülmények között [14]. Statikus körülmények között a Calin a plazma és a tisztított VWF kötödését I-es tipusú borjúbőr kollagénhez

3,6 és 3,0 µg/mL IC50-nel jellemezhető koncentrációban gátolta. A gátló hatás már 10 perc inkubálás után maximális volt. Ha azonban először a kollagén felszín volt inkubálva Calinnel, majd Calin kimosás után volt a plazma ill. a tisztított VWF oldat a felszínre mérve, 3,9 és 19,5 volt az IC₅₀. a Calin kollagénhez való kötődését valósidejű, felszíni plazmon rezonancia módszerrel mérve. A Calin koncentrációfüggően kötődött a kollagénhez, a lemoshatóságának az analízise monofázisos disszociációt mutat, amely $(8.8 \pm 0.3) \times 10^{-4}$ /s konstanssal jellemezhető. Dinamikus körülmények között, sebességgradienstől függően gátolta a Calin a VWF kötödését a kollagénhez, 300 /s sebességgradiensnél IC₅₀:16-19 μ g/mL, 1300 /s-nél IC₅₀:75-83 μ g/mL volt. Annak tisztázása érdekében, hogy vajon a Calin trombusképződést gátló hatása a trombocita-kollagén vagy VWF-kollagén kölcsönhatáson át érvényesül-e, különböző adhezív felszínt és sebességgradienst alkalmazva vizsgáltuk a trombocita adhéziót és a trombusképződést citráttal alvadásgátolt telies vérből. A Calin 300 /s és 1300 /s sebességgradiensnél egyaránt gátolta a trombocita adhéziót különböző kollagénekhez. Részleges gátlást fejtett ki humán endotélsejt extracelluláris mátrixához való adhézióra 300 /s -nél, 1300 /s -nél nem/vagy minimális volt a gátló hatás VWF-ral vagy a fibringgénnel fedett felszínekhez mindkét sebességnél. A vizsgált maximális Calin koncentrációnál (28 µg/mL), 1300/s sebességgradiensnél, a kontroll 28±17%-ára (x±SE) csökkent a trombocita adhézió ló ínból származó (Horm) kollagénhez képest. A Calin majdnem teljesen gátolta a trombociták kitapadását humán kollagén I-es és III-as típusához 1300/s és 300/s sebességgradienseknél egyaránt (megfelel IC₅₀: 4,1±2.8, 5,1±1,6 és 5,1±2,1, 3,0±1,5 μ g/mL. Hasonló kísérleti körülmények között, a Calin sebességgradienstől függően, de csak részlegesen gátolta az adhéziót humán köldökvénából preparált endotélsejtek extracelluláris mátrixán. IC50 12,1±4,2 µg/mL 300/s-nél, ahol az adhézió inkább kollagén függ. 1300/s-nél 18 µg/mL Calin 32±24% gátlást okozott. Ennél a sebességgradiensnél az adhézió gátlása VWF-ral fedett felszínhez 32±18% volt, 12µg/ml Calin koncentrációnál. Nem volt értékelhető adhézió-gátlás alacsony sebességgradiensnél VWF-ral- és egyik sebességnél sem fibrinogénnel fedett felszínekhez. Nem befolyásolta az eredményeket az, hogy alvadásgátlóként citrátot vagy LMWH-t alkalmaztunk, kivéve az I-es tipusú humán kollagén esetét, amelyhez citrátos vérből a trombociták nem tapadtak ki.

A kollagén, a VWF és a GPIb/IX/V receptorkomplex kapcsolat fontos szerepet játszik a trombusképződésben, ezért antitrombotikus kezelés célpontja lehet. Több munkánkban alkalmaztunk fágtechnológiát azért, hogy olyan rövid peptideket szelektáljunk, majd azonosítsunk, amelyek a kollagén-VWF kölcsönhatást befolyásolják [21]. Ezekre a peptidekre alapozva, orálisan adható antitrombotikum fejleszthető ki. 2*10⁹ különböző fágklónt tartalmazó lineáris heptamer peptid könyvtárat alkalmaztunk, hogy tisztított humán VWF-hoz specifikusan kapcsolódó fágokat találjunk. Három VWF-ral fedett felszínen történő "panning" után 94 egyedi peptidszekvenciát tartalmazó klónt tartalmazó baktériumkultúrát szaporítottunk. Ezek felülúszóit teszteltük VWF-ral fedett ELISA lemezbe mérve. A VWF-hoz kötődött fágokat peroxidázzal jelzett M13 ellenes antitesttel majd a peroxidáz szubsztrátjával detektáltuk. A legmagasabb affinitással kötődő

Tézis

peptideket hordozó fágklónok közül hetet választottunk. (Egy nem specifikus fágot tartalmazó baktériumtenyészetet is csináltunk.) Ezeket a fágokat tartalmazó baktériumokat nagy mennyiségben szaporítottuk, majd a fágokat további vizsgálatokra és szekvencia analízisre izoláltuk. Mindegyik izolált fág kötődött VWF-hoz, továbbiakban L7-fágok, a fágszám növekedésével telítési görbével jellemezhető módon. A kötődés specifikus volt, mivel a nvolcadik, az aspecifikus fág nem kötődött a VWF felszínhez és egyik fág sem kötődött humán I-es és III-as típusú kollagénnel fedett felszínhez. A fágok nem kötődtek glikokalicinhez sem, a GPIb receptor plazmában szabadon is található extracelluláris részéhez. A plazma glikokallicint egy olyan monoklonális antitesttel (Ab24B3) rögzítettük a felszínhez, amely biztosította az GPIb aktív konformációjának megfelelő formát. Az egyedi klónok szekvencia analízise azt mutatta, hogy minden klón a YDPWTPS szekvenciájú peptidet tartalmazta. Ezeket a fágokat tovább teszteltük, hogy képesek-e gátolni a VWF kölcsönhatását a ligandiaival, kollagénnel és GPIbg-val, Érdekes módon, az L7-fácok gátolták a VWF kötődését I-es és III-as típusú kollagénhez statikus körülmények között, megközelítőleg 2 és 1*10⁹ fág/mL-es IC₅₀-nel, amíg az aspecifikus fágoknak nem volt hatása. A fágok nem befolyásolták a VWF-GPIba kölcsönhatást, mivel sem a VWF risztocetin hatására történő kötődését glikokalicinhez, sem a risztocetin indukált trombocita aggregációt nem gátolták. Az L7-fágok nem voltak hatással a kollagén által indukált vérlemezke aggregációra sem. Azt vizsgáltuk a következőkben, hogy az L7-fágok mennyire képesek gátolni a VWF kötődését kollagénhez síkon forgó kúp rendszerű áramlási kamrában, közel fiziológiás körülmények közöt. A vért 4000/s sebesség grádienssel áramoltattuk, humán I-es vagy III-as tíusú kollagénnel fedett fedőlemezen. Ezen körülmények között az L7-fágok részlegesen gátolták a trombociták kitapadását mindkét felszín esetében, ha 1*10¹⁰ fág/mL mennyiségben alkalmaztuk őket és maximum gátlást értünk el 1*10¹¹ /mL fágszám esetén. Puffer, vagy aspecifikus fág esetén nem tapasztaltunk gátlást. A fágok epitópjának/jainak keresése érdekében az L7 fágok kötődését vizsgáltuk különböző VWF deléciós mutánsokkal fedett felszínhez. A fágok (1-10)*10⁸/mL tartományban kötődtek a vad típusú, RGSS-, ΔA2- és ΔD4B- VWF-hoz. A kötődés az 1-es ábrához hasonló telítési görbékkel volt jellemezhető. Meglepő, hogy a VWF-kollagén kölcsönhatást gátló L7-fágok nem az A3 doménhez kötődtek, amely az elsődleges kötőhely I-es és III-as típusú fibrilláris kollagén számára, továbbá normál módon kötődtek ΔA1-VWF-hoz, bár ez a domén is tartalmaz másodlagos kötőhelyet kollagén számára. Mivel az L7-fágok nem kötődtek a ΔC-VWFhoz, arra következtettünk, hogy a VWF C doménjéhez kötődtek. Egy korábbi, ettől független munkában szintén VWF-kötő fágokat (B8 fágok) szelektáltunk pentadekamer fágkönyvtárból [17]. Ebben a munkában szintén a C doménhez kötődve gátolta a VWF-kollagén kölcsönhatást a szelektált B8 fág. Az L-7 és a B8 fágok hatását összevetve azt találtuk, hogy a biotinált B8-fágok vetélkedtek az L7-fágokkal a VWF-hoz történő kötődésért IC50-nél a fágszám 5*10⁹ /mL volt. Hogy a fágok hatását kizárólag az a peptid okozza amely az L-7-es fágkönyvtárt alkotó, a III-as köpenyfehérjén megjelenített peptidek sorrendje szerint különböző- fágok közül kiválasztódott, szegedi kollaborációs társunk által szintetizált peptiddel vizsgáltuk. Ellentétben az L7-fággal, a szintetikus YDPWTPS L7-peptid nem gátolja a VWF-függő trombocita kitapadást, amikor a

23

MTAdoktori, Hársfalvi J.

peptiddel előinkubált vért kollagénnel fedett felszínen áramoltattuk. Ennek az a lehetséges oka, hogy a monomer peptid aviditása kicsi a fág gazdasejthez kötődő részén lévő lévő 5 darab gp3-as

Tézis

köpenyfehérjén megjenelenített 5 peptid együttes hatásához viszonyitva. A következő lépésben az alábbi négyágú peptidet szintetizált a kollaborátor. Neve MAP lett, amely a "multi antigen peptides" angol kifejezés rővidítése. MAP: (H-Tyr-Asp-Pro-Trp-Thr-Pro-Ser)4-Lys2-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Mrg-NH2, molekulatömege (g/mol): 4724.28. A négyágú, multiantigén peptidben van 6 arginin maradékból és egy (Lys)₃ magból álló rész, a megfelelő sztérikus elrendeződés érdekében. A peptidek kémiailag a szabad aminócsoportokhoz és a C-terminális két Lys csoportjához vannak a kapcsolva. A kevert MAP-hoz viszonyítva, a YDPWTPS szekvenciasort tartalmazó MAP 148 nmol/L-es koncentrációnál majdnem teljes mértékben gátolta a vérlemezkék kitapadását kollagén felszínhez. Hasonlóan a 33 nmol/L koncentrációban alkalmazott, VWF-A3 doménen gátló 82D6A3 monoklonális antitest hatásához. Ez az eredmény arra utal, hogy a négyágú MAP a vérlemezke adhézió potenciális inhibitora. Az eredményeket a fenti táblázat foglalja össze.

Trombin gátlását értük el szelektált fágokkal és módosított aptamerrel. Mind a kettő jelentősen befolyásolta a trombusképződést teljes vért alkalmazva HMEC mátrixon a különböző áramlási körülményeket modellező kísérleti rendszerünkben. Ciklikus heptapeptid fágkönyvtárból válogatott, humán α trombinhoz kötődő fágok a PPACK-kel versengő trombin gátlást mutattak. Az fágpeptid aminosav szekvenciája: Cys-Asn-Arg-Pro-Phe-Ile-Pro-Thr-Cys. Ez a szintetikusan is előállított peptid (trombin inhibitor peptid, TIP), Ki=0,49 mM inhibitor állandóval jellemezhető módon gátolta/nyújtotta a trombin alvadási időt. Koncentráció függően gátolta a trombocita aggregációt és a granulumok kiürülési reakcióját. Vénás és artériás áramlási körülmények között is gátolta a trombocita dús trombus képződését HMEC mátrixon, a teljes vérből [18]

Egy másik munkában a vaszkuláris történéseket jelentősen befolyásoló inhibitor, egy módosított aptamer (UC15-mer) hatásának a vizsgálatát írjuk le [20]. A konszenzus trombin aptamer, rövid néven C-15-mer, egy 15 nukleotidból álló egyszálú DNS, [d(GGTTGGTGGTGGTTGG)], amelyet kombinatorikus oligonukleotidokból álló, hatalmas könyvtárból a trombinkötő kapacitása alapján választották ki, majd sokszorozták. A C-15-mer nanomolekuláris koncentrációban gátolja a trombint hatását, a trombin exosite-1-hez, más néven az 1-es anionkötő helvhez kötődve. A trombinon az exosite 1 a fő fibrinogén felismerő hely. Hogy meghatározzuk, hogy a módosított aptamerek gátolják-e ezt a régiót és versenyeznek-e ennek a természetes szubsztrátjával, trombin alvadási időt mértünk tisztított fibrinogénnel és humán plazmával, az aptamerek jelenlétében. A kísérletek első sorozataiban az aptamereket preinkubáltuk fibrinogén oldattal, vagy plazmával és aztán trombint adtunk hozzá. A C15-mer és UC15-mer trombinnal együtt adva, gátolta a tisztított fibrinogén és plazma alvadását. Fibrinogén oldat esetén az IC50 az UC15-mer esetén háromszor alacsonyabb volt, mint C15-mer esetén, plazma esetében a különbség 2,2-szeres volt. Amikor trombin hatására felszabaduló FpA gátlását mértük, az aptamerek hatásossága gyakorlatilag azonos volt azzal, amit az alvadási idő kísérletekben tapasztaltunk. Mindkét aptamer körülbelül kétszer hatékonyabb volt fibrinogén oldatban, mint plazmában. Ugyanezt a különbséget

MTAdoktori, Hársfalvi J.

figyelhettük meg akkor, amikor aptamerekkel preinkubált trombinnal indítottuk a plazma alvadását (29.B ábra) vagy FpA felszabadulását. Ezeket a próbákat reptilázzal is megismételtük. A reptiláz egy kígyóméreg enzim, amely FpA-t lehasítva a fibrinogén Aα-láncáról fibrinkiválást okoz. Az aptamerek egyikének sem volt hatása ezen reakcióra, amely megerősíti az aptamerek trombinspecifikus hatását. A trombin amidolitikus hatását a kromogén szubsztráttal mérve - S-2238-, nem befolvásolták a reakciót az aptamerek, bizonvítva, hogy az aptamerek nem hatnak a katalitikus központra. Trombin gátlása hirudinnal az exosite-1-hez való kötődésen át valósul meg, az UC15-mernek - ha a hirudinnal azonos helyre kötődik - fel kellene tartania a hirudin gátló hatását. Ahogy azt a kromogén szubsztrát hidrolízisével mértük. Az UC15-mer koncentráció növelésével, a trombin a hirudin gátló hatásából felszabadult, sugallva azt, hogy az UC15-mer versenyez a hirudinnal a trombin exosite 1-ért. Vizsgáltuk az aptamerek hatását a trombin indukált trombocita aktivációra is. PRP-t vagy WPS-t 1 percig inkubáltunk aptamerekkel, növekvő koncentrációban, a trombocita aktiválódást trombinnal indítottuk. A PRP-ben a C15-mer és UC15mer dózis-függő módon gátolta az aggregációt és az ATP szekréciót. Mind a két esetben az IC₅₀ értéke UC15-merhez csak a fele volt a C15-merhez képest. Sem az IC50 értékek, sem a relatív hánvados nem változott, amikor először a trombint inkubáltuk aptamerekkel, maid hozzáadtuk a PRP-hez. WSP-ben az IC₅₀ értékek drasztikusan csökkentek mindkét aptamerre és az UC15-mer tizenkétszer hatékonyabb volt, mint a C15-mer. Megjegyzendő, hogy a trombociták alakváltozására nem volt hatással az aptamer, az aggregációban maximum hatásos koncentrációnál négyszer magasabb koncentrációja sem. Az aptamer hatás hiánya a TRAP-1 és a kollagén indukált aggregációra, trombin specifikusságot mutat. Az aptamerek hatását a trombusképződésre fiziológiás áramlási körülmények között vizsgáltuk, teljes vérből, különböző trombogén felszíneken kúp és sík kamrában. Aptamerek és hir54-65 nélküli vérből a HMEC-1mátrixot és trombinkezelt fibrinogén felszínt egyformán nagy trombusok borították. Amikor az aptamerek jelen voltak, mind a HMEC-1 extracelluláris mátrixot, mind a trombinkezelt fibrinogén felszínt nagy számú, de kisebb területű és vékonyabb trombusok valamint sok egyedi trombocita fedte. Az aptamerek hatása a hir54-65 hatásához volt hasonlítható. Kollagén felszínen nem volt változás a trombusképződésben az aptamerek jelenlétében.

Megfelelő minőségkontrollal, VWF mennyiségi, minőségi és speciális funkcionális vizsgálatokat rutinszerűen végzünk, ezáltal kiegészítjük az alaprutin vizsgálatokat, és hozzájárulunk a klinikusok kutató munkájához.

Egyik ilyen tanulmányban négy VWB esetét és fenotipizálását írjuk le, amelyek genotipizálását a belga kollaborációs partner laboratóriumában végezte el a munkacsoportunk doktrandusz hallgatója [11]. A négy magyar beteg mellé három azonos feno- és genotípusú belga beteg esetét lehetett csatolni, így közösen történt a publikálás, amely szerint az R1306W VWF mutáció okozta a 2B VWB-et.

Egy esettanulmányban igazoltuk a trombociták fokozott kötődését VWF felszínhez. Tanulmányunk, amelyben egy policitémia veraval (PV) diagnosztizált férfi esetét ismertettük, igazolta a beteg

trombocitáinak VWF felszínhez való fokozott kötődését. Más publikációkkal ellentétben, normális trombocitaszám mellett, egyedi volt a trombocita receptorok eloszlása. A nyugvó trombociták felszínén található GPIb receptorok száma a várhatótól eltérően, kétszer-háromszor nagyobb volt aktiválás után, egészséges kontrollokhoz és más PV-ás betegekhez képest. A betegnél súlyos, multiplex, cerebrális isémiás léziókat faláltunk. *In vitro* trombusképződési modellben, amelyben teljes vért áramoltattunk vénás és artériás körülmények között, a tisztított VWF-ral fedett felszíneken trombocita aggregáció és trombusképződés a volt jellemző, míg az egeszséges és a PV kontrollok esetén a trombociták egyrétegben történő kitapadása volt a jellemző. Hasonló, patológiás eredményeket még nem publikáltak PV-val kapcsolatban. A tanulmány alátámasztja, hogy a normál trombocitaszámmal rendelkező PV betegeknek is szükséges antitrombocita terápia [27].

Tézis

Nagy tanulmányok igazolták, hogy az emelkedett VWF:Ag szint, a VWF növekedett aktivitása, fokozott trombózis rizikót jelent, trombotikus mikroangiopátia megjelenéséhez vezethet. Különböző, mikroangiopátia veszélyét magával hordozó betegségekben vizsgáltuk a VWF multimer és szekréciója utáni hasító enzimének, a metalloproteinázok családjába tartozó ADAMTS-13-nak a szerepét.

Emelkedett VWF mennyiség és funkció, normál ADAMTS-13 aktivitás és antigén volt kimutatható májcirrhosisos betegek plazmájából [23]. Különböző eredetű cirrhosisosos betegek (n=151; férfi/nő:78/73; Child A/B/C: 32/33/35%) és egészséges önkéntesek (n=64) trombocita szegény plazmáit (PPP) használtuk a vizsgálatokhoz. A kontrol csoporthoz hasonlítva a VWF:Ag (301±122, kontroll 120±32 %), VWF:RCo (198±94, 114±42%) és VWF:CB szintek (243±107, 119±33 %) voltak. A VWF:RCo/VWF:Ag és a VWF:CB/VWF:Ag aránnyal kifejezett funkcionális aktivitás emelkedésének mértéke azonban elmaradt a mennyiséghez képest, amely 0,65 és 0,81 volt a kontroll 0,95 és 0,99-hoz képest. A két funkcionális aktivitás aránya (VWF:CB/ VWF:RCo nem különbözött a kontroll csoport aktivitás eredményekből számolt aránytól. A multimerizáció mértéke, analizálva a kis-, közepes-, nagy- és ultra nagy multimer tartományban lévő sávok denzitásábak eloszlását, a kis molekulatömegű frakciók mennyiségének növekedése felé tolódott. AZ ADAMTS-13 antigén és aktivitás értékek igen nagy szórást mutattak, emelkedett és a csökkent értékek is voltak. Aktivitás átlag 135±71%, antigén 140±83, ezek az értékek a kontroll csoportra 126±45 és 124±44 % volt.

Emelkedett VWF mennyiség és funkció, normál ADAMTS-13 aktivitás volt kimutatható preeklampszia esetén [26], azonban az ADAMTS-13 csökken krónikus szív elégtelenség esetén [25].

Tézis

MTAdoktori, Hársfalvi J.

Tézis

nemcsak a multimer hiányát, de mennyiségének a relatív csökkenését és növekedését is kiszámolja. Ez az eljárás lehetővé teszi a 2A, 2B és a trombocita típusú VWB-ség differenciál diagnosztikáját akkor is, amikor a nagy multimerek mennyisége szemmel alig láthatóan csökken. Azonban nagyobb a várható értéke annak a lehetőségnek, hogy az endotél aktiváció mértékét jelezheti a raktárhelyéről nagyobb mennyiségben kiszabaduló, még nagymértékben multimerizált VWF kvantitaív jellemzése. Erre példa egy most futó klinikai munkánk, amelyben jól jellemzi a multimer méret és mennyiség a sebészeti eljárás során érintett erekből felszabaduló VWF trombogén állapotát. Jelentős eredmény, hogy a VWF multimerizáció mértékének számszerű megadására kidolgozott szoftver alkalmazható bármilyen szakaszolt növekményt (multimerizáció vagy polimerizáció) leíró csúcsgörbe halmaz értékelésére.

Kimutattuk, hogy humán mikrovaszkuláris endotélsejt alatti mátrix (HMEC-1, sejtvonal szubendotéliuma) VWF és I., III. és IV. típusú kollagén hiánya esetén is iniciálja és fenntartja a trombusképződést, artériás és vénás áramlási körülmények között egyaránt. Eredményeink arra utalnak, hogy magas áramlási sebességen a szubendothéliumon adhézió és aggregátum képződés bekövetkezhet I-es III-es és IV-es típusú kollagén, valamint VWF közreműködése nélkül is. Trombin inhibitorokkal gátolható a trombus képződése. Ez az eredmény arra utal, hogy jelentős mértékű trombinképződés lehet a nagyméretű trombusok képződése hátterében. A HMEC-1 sejtvonal hasznos lehet olyan tanulmányokban, amelyekben, a mikrovaszkuláris szubendotélium trombogén tulajdonságait vizsgálják. Mivel fibrilláris kollagén és VWF hiányában is igen trombogén a mátrix a trombin aktivitás függő trombózis modellekben javasoljuk a használatát.

A von Willebrand betegség patomechanizmusában nemcsak a plazma VWF molekula hiánya vagy csökkent mennyisége, hanem a megfelelő mennyiségű, de a nagy multimerek hiánya vagy a molekula kollagén kötő helyének funkció képtelen mutációja is vérzékenységet okoz. Alapkutatási és klinikai kutatási eredmények igazolták, hogy a trombocita adhézióhoz VWF nagy molekulatömegű része elengedhetetlen. Az is igazolódott, hogy a multimer molekula szerepe az, hogy ideiglenes megkösse, ezáltal áramlásában lelassítsa a trombocitákat, amelyek a sérülés helyén szabaddá váló trombogén struktúrához kötődnek. Az, hogy ehhez a folyamathoz a sérült felszínen kitekeredő, és elterülő VWF, mint egy tépőzár tapadó része szolgáltat segítséget, vagy egy pontián rögzül, és horgonykötélként funkcionál, még tisztázandó kérdés. Többen igazolták azt a feltételezés, hogy a molekula globuláris formában kering, és áramlás hatására "kitekeredik", egymáshoz kapcsolódik [44], fonalat képez [45]. Barg és munkatársai szilanizált csillámpalán nagy sebességgradienssel áramoltatva rögzítettek VWF-t. Trombocitákat kötő, aktív, 300 um hosszúságot is elérő szálakból álló filamentózus hálózat képződött. AFM-es és immunflureszcenciás mikroszkópos megfigyeléssel igazolták, hogy a háló képződéséhez nagy VWF koncentráció, legalább 21 dyn/cm² nyírófeszültség és alacsony hidrofobicitású kötőfelszín szükséges. Ugyan a VWF molekuláris háló létrejöttéhez a nagy nyírófeszültség szükséges, a VWF

Eredmények értékelése

Módszerfejlesztési tanulmányunkban a trombocita kitapadást hasonlítottunk össze, kollagénnel fedett felszínen, magas sebességgradiens mellett CPC és PPC adhéziós modelleket használva [4]. Olvan geometriai és reológiai különbségek vannak PPC és CPC között, hogy szükségesnek tartottuk a trombogén felszín és vértérfogat közötti hatásokot vizsgálni, a trombusképződés szempontjából. Felszínnek a kollagént választottuk, mivel ez a szubendotéliális mátrix igen trombogén komponense artériás sebességgradiensnél (1000/s), ahol a VWF a kulcsszereplő. A teljes vér áramoltatási ideje 150 másodperc volt, ez a legrövidebb időintervallum, ami reprodukálható eredményekhez vezet. Vizsgálatunk a trombogén felszínre kitapadó trombocitákra irányult. Nem találtunk eltérést a trombusok morfológiáiában, habár felszínfedettség és trombus terület között van eltérés. A vizsgált felszínfedettség és átlag trombus terület PPC felszíneken megegyezik más közleményben használt hasonló felszínekével, a módszerbeli eltérésektől függetlenül. Az, hogy CPC felszínfedettség görbéje hamarabb véget ér a PPC-hez képest, jelzi, hogy elfogy a keringő trombocita, amely a felszínhez tapadhatna. Pedig elméleti számolás alapján, ha csak a felszínhez tapadnak trombociták, bőven lehetne. Ezért arra lehet gondolni, hogy az aggregáció jelentős CPC-ben keringő vérben. Erre utal a PPC-hez képest nagyobb trombus átlagmagasság is a CPC-ben. A fluoreszcensen jelzett VWF homogén eloszlása a trombusban azt mutatja, hogy a VWF a trombociták felszínhez tapadása mellett a trombus növekedésben is nagy számban vesz részt. Matsui és munkatársai közlésével ellentétes ez az eredmény. Ők nem látták a VW molekulának az egyenletes háromdimenziós eloszlását a trobusban, azonban ez az eredményük valószínű az elégtelen immunokémiai festésükkel volt magyarázható, mint ezt egy későbbi közleményükben meg is jegyezték [69, 70]. Az egyedi trombociták számának jelentős csökkenése a CPA-ban az adhézó mellett jelentős mértékű aggregációra utal. A síkon forgó kúp rendszer kevés vérigénye miatt alkalmas klinikai kutató és rutin laboratóriumi körülmények között is a vaszkuláris hematológiai betegségek patomechanizmusának vizsgálatára. Azonban a feszínen képződött adhéziót az áramló közegben zajló aggregációval együtt kell értékelni. (Valószínű ennek az értékelésnek a hiánya miatt, jelenleg is csak néhány munkacsoport, elsősorban a kamra kereskedelmi forgalmazását elindító munkacsoport használja a kamrát.)

A VWF molekulák változó számú dimer alegységekből állnak össze nagy VWF multimer molekulává. Méretűket azonban a keringésbe kerülve specifikus proteolízis csökkenti. A keringésben megtalálható VWF molekulák így változó méretűek és jellegzetes méretbeli (multimer) eloszlást mutatnak. A molekula méret – az aviditás változása miatt – alapvetően befolyásolja a VWF-trombocita kölcsönhatást. Csak a nagy multimerek képesek hatékonyan közvetíteni a trombocita adhéziót, ugyanakkor a szokásosnál nagyobb multimerek a trombusképződés valószínűségét növelik. A nemzetközi gyakorlatban eddig nem ismert, új eljárást dolgoztunk ki a VWF multimer eloszlásának pontosabb leírás**á**ra. Az értékelés és a program jelentősége, hogy

Tézis

MTAdoktori, Hársfalvi J.

trombocita kötő képességének az indukálásához elégséges a molekula adszorpciója egy megfelelően trombogén felszínhez. Hogy ezekhez a kutatásokhoz hozzájáruljunk, kifejlesztettünk egy aranyjelzett Protein A-t alkalmazó módszer, amely lehetővé tette az atomerő mikroszkópia (atomic force microscopy, AFM) alkalmazását az egyes VWF molekulák helyzetének meghatározására és a kollagénhez való kötődésük morfológiai analízisére [9]. E munkánk célja, hogy magyarázatot találiunk a VWF áramlásfüggő kötési kapacitásának növekedésére. Párhuzamos lemezű áramlási kamrában kollagénnel fedett üveglemezeken gél filtrációval tisztított VWF-t áramoltattunk alacsony (0.07 N/m²) és magas (4.55 N/m²) nyírófeszültséget biztosító körülmények között. AFM képalkotással hasonlítottuk össze a kollagénhez kötött VWF morfológiai különbségeit. Szignifikáns különbség nem volt felfedezhető a VWF morfológiájában, az elrendeződés nagyfokú véletlenszerűséget mutatott. A felszínhez kötött VWF mennyisége majd kétszeres volt magas nvírófeszültség esetén, valamint megielentek szokatlan formáiú VWF molekulák is. Ez a különbség 15 perces perfúzió esetében eltűnt. Ezen felül mosott és fixált trombocita jelenléte nem okozott semmilyen látható változást a VWF morfológiájában a különböző nyíróerők hatása alatt. Mindezekből arra következtetünk, hogy a nyíróerő nem befolyásolja szignifikánsan a VWF molekula alakiát, amikor az a kollagénnel fedett felszínhez kötődik. Bár kis nyíróerő esetén később telítődik a kollagén felszín a VW molekulákkal. Ezt az eredményünket támasztja alá egy 2010-es közlemény, amelyben a VWF multimer analízisét mutatják be. Nem a mennyiségét mérik, de világosan látszik az ábrán, hogy a humán III-as típusú kollagénnel fedett felszínhez nagyobb mennyiségben kötődött a VWF az első és második perces mintákban, amikor 400-, 1700-, 4000/s sebességgradiens jellemezte a VWF és mosott vörösvértest szuszpenzió áramlását [71]. Ez a cikk azt is bemutatja, hogy a sebességgradiens növelésével a felszínhez kötött VWF nagy multimerjeinek a mennyisége nő. Egy 2002-es közlemény, amelyben felszíni plazmon rezonancia módszerrel mérik a készülék csippjéhez konjugált kollagén VWF kötő képességét, arról ír, hogy a multimerek jobban kötődnek a kollagén felszínhez [72]. A mi eredményeinket a citáló közlemények elfogadják, használják saját munkájuk bevezetéséhez vagy magyarázatához, de magához az alapkérdéshez nem tesznek semmit [73] [74], [75-86]. Ellentétben mások munkájával, azt igazoltunk, hogy a VWF molekulák, az in vivo körülményeket megközelítő áramlási feltételeket biztosítva, nem mutatnak áramlási irányba rendeződő fibrilláris struktúrát a kollagén felszínen, az áramlás során a kollagén felszínhez tapadt VWF nem terül ki, feltehetően sokkal kisebb molekulaszerkezeti változások történnek. A multimerizáció nem befolvásolia a VWF monomer funkcionális egységeit. "domain"-ieit, azonban egyre több adat bizonyítja, hogy a funkció szempontjából fontos domének hozzáférhetősége nagy nyírófeszültségű helyeken, a multimer molekula konformációjával változik. Vitatott, hogy a konformáció változása milyen mértékű és mennyire függ más molekulákkal-, mint a kollagénnel vagy a GPIb receptorral való kölcsönhatástól. A legtöbb tanulmány azonban azt állítja, hogy a VWF multimer molekula szerkezete az álló trombogén mátrix és a viszonylag nagy sebességgel mozgó trombocita közti kölcsönhatás közvetítésére azért nagyon alkalmas, mert a globuláris molekula kitekeredik a nagy nyíróerő hatására és képes a trombocitát mintegy kipányvázni, miközben a VWF számos kölcsönhatási helye hozzáférhetővé válik; a meghosszabbodott VWF polimer kötési potenciálja megnő [87, 88]. A VWF A1 doménjének a trombocita GPIb receptorhoz való kötődése a fő adhezív kölcsönhatás. A VWF kollagénhez való kötődése során válik az A1 domén konformációja alkalmassá erre a szerepre [89]. Az így létrejött kapcsolat reverzibilis. Arra is vannak adatok, hogy nem egy VWF molekula tölti be a híd szerepét az érfal sérülésekor felszínre kerülő kollagén (és egyéb szubendotéliális molekulák) és a trombociták között, hanem a plazmában lévő VWF molekulák gyorsan hozzákötődnek a felszínhez rögzült társaikhoz (auto-asszociáció). Saját kísérleti eredményeink szerint azonban nem változik a konformáció atomerő mikroszkóppal megfigyelhető mértékben [10].

Tézis

Hirudo Medicinalis-ból származó Calin gátolta a trombocita dús trombus képződést hörcsögben a von Willebrand faktor-kollagén kölcsönhatást a kollagén indukálta trombocita aktivációt és adhéziót dinamikus körülmények között [68], [14]. Ez a hatás specifikus, mert a Calin nem vagy alig befolyásolta az ADP, A23187, arachidonsav vagy U46069 aggregációt. Statikus körülmények között koncentráció függően, de nem teljes mértékben gátolta a VWF kötődését a kollagénhez. Miyel a VWF-nak legalább két kollagénkötő helye van, a részleges gátlásnak az lehet az oka, hogy a Calin csak az egyik kötőhelyet foglalja le. Az is bizonyítja, hogy a Calin kapcsolódik a kollagénhez, hogy a Calinnel előinkubált kollagén nem volt képes VWF kötő kapacitását megtartani már 10 perc inkubálás után sem. A VWF kollagénhez való kötődése sebességgradiens függésének mérésére, amit korábban senki sem mért, kidolgoztam egy módszert. Ennek az eredménye, hogy a Calin nyírási feszültségtől függően befolyásolja a VWF-kollagén kölcsönhatást. Az IC50 statikus körülmények között és kis sebességgradiensnél hasonló, de 5-ször nagyobb, mint nagy sebességgradiensnél. Ez arra enged következtetni, hogy a VWF áramlásfüggő konformáció változása is szerepet játszhat a VWF kollagénhez való kötődésében. A sebességgradiens változásának hatása jelentős a trombocita-kollagén kapcsolódás mechanizmusában: nagy sebességgradiensnél a trombocita először kollagénhez kötött VWF-on át a GPIb receptoron, majd GPIa-IIa receptoron közvetlenül kapcsolódik a kollagénhez, míg kis sebességgradiensnél a trombociták kollagén receptorainak van elsődleges szerepe. Mivel a Calin a kollagénez kötődik, feltételezhető, hogy mind a két mechanizmuson keresztül hat. Érdekes volt a Calin különböző trombogén felszínekhez történő adhézióra való hatását is megvizsgálni, kis és nagy sebességgradienseknél. A Calin koncentráció függően gátolta a trombocita adhéziót különböző típusú kollagénekhez. Nagy sebességgradiensnél a Calin alacsonyabb koncentrációban gátolta a trombocita adhéziót, mint a VWF kötődését I-es típusú kollagénhez. Bár a kísérleti körülmények nem voltak teljes mértékben azonosak, az a következtetés levonható, hogy a Calin-gátlás nem csak a VWF-kollagén kölcsönhatás gátlásán keresztül érvényesül. Alátámasztva ezzel azt a nézetet, hogy nagy sebességgradiensnél a trombocita GPIa/IIa abszolút szükséges a trombocita adhézióhoz. Humán eredetű I-es és III-as típusú kollagénekhez ötször kevesebb Calin mutatott hasonló trombocita adhézió gátlást, mint a Horm kollagénhez. Ez azt jelentheti, hogy a Calin nem egyformán kötődik a különböző kollagénekhez, vagy a Horm kollagén olyan aktivátort/okat

Tézis

tartalmaz, amely/ek jelentős mértékű, nem kollagén függő aktiválódást is kiválthat/nak. (A Horm kollagén egy durva kollagén preparátum, különböző, de főleg I-es és III-as tipusú kollagének keveréke. Az adhézió során sokkal nagyobbak az adhéziós területetek, mint bármely más kollagénen és azokon igen intenzív az aggregátumok képződése.) Haementeria officinalis-ból izolált leech antiplatelet protein (LAPP), és a rekombináns technikával előállított formála (rLAPP). szintén gátolta a kollagén-adhéziót, statikus körülmények között vizsgálva, I-es tipusú kollagénen, Dinamikus körülmények között gátolta az adhéziót az I-es, III-as IV-es, részlegesen a VI-os típusú kollagénekhez, és befolyásolta az adhéziót fibronektinhez vagy VWF-hoz, a Calinhez hasonlóan. A telies gátláshoz 3µM rLAPP koncentráció volt szükséges nagy sebességgradiensnél, míg 10-szer nagyobb koncentrációban mutatott hasonló gátlást kis sebességnél. Gátolta a trombocita adhéziót ateroszklerotikus koronária artéria darabkához is. A Calin csak mérsékelten gátolta a trombocita adhéziót az endotélseitek extracelluláris mátrixához (ECM). Kis sebességgradiensnél a kollagén adhézióhoz hasonló, koncentráció függő gátlás volt, de nagy sebességgradjensnél, ahol a VWF döntő szerepet játszik, nem volt szignifikáns gátlás, annak ellenére, hogy a Calin gátolta a VWF kötődését a kollagénhez. A magyarázat az lehet, hogy az ECM maga tartalmaz már VWF-t, így nem szükséges azt a vérből felvennie. Másik magyarázat, hogy hasonlóan a LAPP-hoz, a Calin kevésbé aktív a VI-os tipusú kollagénnel szemben, amely az ECM-ben az elsődleges VWF kötőhely. Mindezek ellenére a Calin hatásos állatkísérletes trombózis modellen. Ebben a modellben egy standardizált metszést ejtenek a hörcsög femorális vénáján, amelyen trombocitadús trombus képződik. Mivel a vénás rendszerben a kis sebességgradiens a jellemző, valószínű, hogy itt a trombocita-kollagén kölcsönhatás gátlása érvényesült. Összefoglalva, a Calin amellett, hogy gátolja a direkt trombocita-kollagén kölcsönhatást, a kollagén VWF kötődést is befolyásolja, ezért kis és nagy sebességgradiensnél egyaránt mutatkozik az adhézió gátló hatása. Cikkünk megjelenése óta több összehasonlítás jelent meg a Calin-ről és más trombózis gátlószerről [90] [91], a különböző trombózis modellekben hasznos a trombocita-kollagén kölcsönhatás tanulmánvozására.

Alapkutatás szintjén még ma sincs elég adat arra, hogy a VWF valamilyen felszínhez való rögzülése okoz-e olyan konformáció változást a multimer molekulában, hogy az befolyásolja a kollagén-VWF-GPIb kölcsönhatást. Alkalmazott kutatás szintjén az állatkísérletes tanulmányok bizonyították, hogy azok a GPIb-, vagy VWF ellenes monoklonális antitestek és GPIb-, vagy VWF-fragmentumok, amelyek gátolják a kollagén-VWF-GPIb kötés valamelyikét, hatásos antitrombotikus ágensek in vivo körülmények között is. Sőt, a többi antitrombotikus ágenssel összevetve, szélesebb a terápiás spektrumuk, mint a ma használt antitrombotikus vegyületeké, mivel a kellő antitrombotikus hatás eléréshez szükséges dózis alkalmazása nem jár együtt a vérzési idő jelentős mértékű megnyúlásával. Ezen tanulmányok szerint ezek az antitestek és protein fragmentumok csak intravénásan alkalmazandók. Fágtechnológiát alkalmazva olyan peptidek keresése volt a célunk, amelyek antitrombotikus hatással rendelkeznek A peptidek az orális antitrombotikus gyógyszerek jó kiindulási alapanyagai lehetnek. Lineáris heptamer fág könyvtárat vizsgálva

Tézis

azonosítottunk egy YDPWTPS peptid szekvenciát hordozó fág klónt, amely gátolja a VWF-kollagén kölcsönhatást statikus és áramlási körülmények közt egyaránt, ami bizonyítja, hogy hatással van az adhézióra és a trombusképződésre. Érdekes módon a négy YDPWTPS szekvenciát hordozó négyágú MAP megtartotta az eredeti peptidet hordozó fág klón antitrombotikus képességét, szemben a szimpla peptiddel. A MAP hatékonvan gátolia a vérlemezkék kitapadását kollagénnel fedett felszínre. Artériás áramlási körülmények között, maidnem teljes gátlást mutat 150 nmol/L koncentrációnál, ami valóban jó kiindulási anyaggá teszi azt. Nem volt meglepő, hogy a szimpla peptid nem mutat gátló hatást, mivel a fág technológiával válogatott szimpla peptidek általában alacsony affinitással rendelkeznek a célmolekula iránt. A fágok 3-5 példányban fejezik ki a peptidet a felszínükön, ezáltal a megjelenített peptid hatását inkább az aviditás határozza meg, mintsem az egyedülálló peptid affinitása. Jelen tanulmányban az aviditás szerepe a MAP használatával jazolódott, hatékony inhibitor volt. Bár GPIb-VWF kölcsönhatást gátló peptid antagonistákat már azonosítottak, tudomásunk szerint ez az első beszámoló egy olvan peptidről, amely adhéziót és aggregációt gátló hatását a VWF-kollagén kölcsönhatás gátlásával fejti ki. Váratlanul, de azt figyeltük meg, hogy a peptid epitópia a VWF C doménjében helyezkedik el. Hosszú ideje bizonyos, hogy az A3 domén tartalmazza a fibrilláris I-es és III-as típusú kollagén számára az elsődleges kötőhelyet, ahogy ezt az A1- és A3-deléciós mutánsokkal folytatott tanulmányok bizonyították. Másrészt, úgy tűnik, hogy az A1 domén is szerepet játszik az I-es és III-as típusú kollagénhez való kötődésben, amely akkor válik nyilvánvalóvá, amikor a D'D3 domén takarása artériás áramlási körülmények hatására megszűnik. Továbbá áramlási körülmények között, az A1 doménben található a kötőhely IV-es típusú kollagén számára. Mostanáig nem derült ki, hogy a C doménnek van-e szerepe az I-es és III-as típusú kollagénhez történő kötődésben. Érdekes módon, egy korábbi tanulmányunkban, amely során pentadekamer könyvtárat és eltérő szelekciós módszert alkalmaztunk, két fág klónt azonosítottunk RVVCEYVFGRGAVCS és GCCFLVGGLCYSTCA szekvenciákkal, amelyek epitópja a C doménben van és szintén gátolják a VWF-kollagén kölcsönhatást. A régebben szelektált és az utóbbi fágok egymással vetélkednek a VWF kötésért, ami megerősíti a tényt, hogy ugyan ahhoz a doménhez kötődnek és arra utalnak, hogy a C domén valóban szerepet játszhat a VWF-kollagén kölcsönhatásban. Az hogy a C domén hogyan befolyásolja a kollagén kötést egyelőre tisztázatlan. Nem valószínű, hogy a C domén közvetlen szerepet játszana a kollagén kötésben, mivel ilyesfajta kölcsönhatás meglétére még nincs bizonyíték. Lehet, hogy a C doménhez történő kötődéssel a peptid konformációváltozást idéz elő a VWF-on, pontosabban az A3 doménben, így akadályozya a VWF-kollagén kötés kialakulását. Konklúzióként elmondhatjuk, hogy elsőként találtuk az olyan peptidet, amely artériás áramlási körülmények között gátolja a VWF-kollagén kölcsönhatást, valamint a trombocita adhéziót és aggregációt is. Egy ilyen peptid jó kiindulási pont lehet egy orálisan adható antitrombotikus gyógyszer kifejlesztéséhez.

A trombusképződést jelentősen befolyásolta az áramlási körülményeket modellező kísérleti rendszerünkben a trombin aktivtás gátlása, mind kollagén, mind HMEC mátrixon. Ebben a

MTAdoktori, Hársfalvi J.

munkában a vaszkuláris történéseket hatékonyan befolyásoló inhibitor, egy 4-tio-deoxiuridiláttal módosított aptamer (UC15-mer) hatásnak a vizsgálatát írjuk le [20]. Az irodalomban közölt adatok szerint a C15-mer gátló hatása (IC50) a trombin indukált fibrinogén alvadásra 25-200nM között változott. Ezeket az adatokat a kísérletekben használt különböző trombin koncentrációk miatt nehéz összehasonlítani, de a mi eredményünk (52.9nM) beleillik ebbe a sorba. Az UC15-mer esetén az IC₅₀ 2.8-szor alacsonyabb volt a fibrinogén alvadási tesztben, a C15-mer-hez viszonyítva, tehát az új, módosított aptamer gátló hatása erősebb volt, mint a C15-meré. Az UC15mernek 2,2-szer nagyobb gátló hatását igazoltuk plazmával is. Hasonló eredményeket kaptunk, amikor a trombin aktivitást EpA felszabadítással mértük. Az IC₅₀ mindkét aptamerre magasabb volt plazmában, mint fibrinogén oldatban. Az aptamerek protrombinhoz való specifikus kötődése és a plazmaproteinek kevésbé specifikus mátrix hatása lehet felelős ezért az eltérésért. A kromogén szubsztráttal mért trombin aktivitást az UC15-mer, hasonlóan a C15-merhez, amely az irodalomból is jól ismert, nem gátolta. Ez azt jelenti, hogy aptamer a hatását nem a trombin katalitikus oldalán keresztül fejtette ki. Hogy bebizonyítsuk, hogy az UC15-mer a trombin exosite-1-hez kötődve vett részt a trombin alvadási aktivitásának gátlásában, az UC15-mer és a hirudin együtt adva a reakcióelegybe vizsgáltuk a hatásukat. A hirudinról ismert, hogy a C terminális véggel kapcsolatba lép a trombin exosite-1-gyel, az N-terminális vége pedig a trombin aktív centrumához kapcsolódik, így blokkolja mind az alvadási, mind az amidolitikus aktivitást. Ha az UC15-mer lekötné az exosite 1-et, fel kellene függesztenie a hirudin okozta amidolitikus aktivitás gátlást. Valóban, kromogén szubsztráttal mérhető volt, hogy az UC15-mer jelenléte felfüggesztette a hirudin gátló hatását.

A C15-mernek a 4-tio-deoxiuridiláttal való módosítása kétszer erősebb trombin indukálta trombocita aggregáció és szekréció gátlást eredményezett PRP-ben. Esetünkben a C15-merre az IC₅₀ a PRP-ben 3-4-szer nagyobb volt, mint Li munkacsoport által közölt érték. A különbség talán, ha csak részben is, az értékelés különböző módszere miatt lehetséges; ők az aggregációs vonal alatti terület mérésével jellemezték az aggregáció mértékét, míg a mi tanulmányunkban az IC50 kalkulálása az aggregációs görbék meredekségén alapult. A kollagén indukált aggregáció és szekréció trombintól független, egyik aptamer sem befolyásolta ezeket; hasonlóan C-15-merhez. A TRAP-1, egy szintetikus peptid, ami utánozza a trombin receptor (PAR-1) ligandját, tehát a TRAP-1 a trombintól függetlenül aktiválja a trombocitán a receptort. TRAP-1-et használva igazoltuk, hogy az UC15-mer a trombinra hat és nem annak a receptorára. Még a legmagasabb aptamerkoncentráció sem volt hatással a TRAP-1-indukált trombocita aggregációra, beigazolva, hogy az aptamerek trombinhoz való kötődése blokkolia a trombinnak azt a képességét, hogy PAR-1-et hasítsa. Mindkét aptamer gátló hatását teszteltük mosott trombociták szuszpenziójával (WPS) is. WPS-ben az aptamerek sokkal hatékonyabbak voltak, mint PRP-ben. Az IC₅₀ értékek különbségének mértéke nagyobb volt, mint a plazma és a fibrinogén alvadás gátlását jellemző IC₅₀ értékek közötti különbségek. Ennek egyik oka az lehet, hogy a mérőrendszerekben a plazma proteinek aránya, köztük a protrombin is, igen eltérő volt. A WSP-ben nem volt fibrinogén, amely szintén egy ok lehetett. Végül a szabad Ca ionok koncentrációja kb. 20-szor magasabb volt a WSP-ben, mit a citrátos plazmában. A C15-mer és az UC15-mernek a gátló hatása közötti

különbség sokkal nagyobb volt WPS-ben, mint PRP-ben. A WPS-ben az IC50 UC15-merre egy nagyságrenddel alacsonyabb volt, mint a C15-merre. Szemben az aggregációval és szekrécióval, a trombin indukált trombocita alakváltozás (shape change) érintetlen volt 4µM aptamer koncentrációig. Két tanulmányban az alakváltozást nem értékelték, de a publikált ábrák alapján az változatlan volt az aptamer jelenlétében. Egy harmadik tanulmányban nem volt alakváltozás alacsonvabb C15-mer koncentrációknál, de teljes gátlás történt 1.45µM-nál, Fontos, megjegyezni, hogy a trombin indukálta trombocita aggregáció útjának (PAR-1 és GPIb) gátlása a trombin indukálta trombocita alakváltozást érintetlenül hagyta. D-Phe-Pro-Arg klorometil-keton szintén gátolta a trombin indukált aggregációt anélkül, hogy hatással lett volna az alakváltozására. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy vagy elegendő mennyiségben marad szabad trombin exosite-1, hogy alakváltozást gerjesszen, vagy az alakváltozás exosite-2 által vezérelt; esetleg mindkettőtől független folvamat. Az aptamerek hatását a trombusképződésre is vizsgáltuk. Amikor az endotéliális seitréteg sérül, a trombociták gyorsan hozzátapadnak a szabaddá váló szubendotélium "ragadós" összetevőihez és aktiválódnak. A trombocita aktivációt felerősíti a helyben képződő trombin és fibrin, melyek az éppen zailó trombusképződés során alakulnak át aktív molekulává. Hogy értékeljük, hogy az aptamerek hogyan hatnak a trombusképződésre, közel fiziológiás állapotban, HMEC-1 mátrixot, trombinkezelt fibrinogén és kollagént felszíneket használtunk, egy áramlási rendszerben. (A trombinkezelt fibrinogen tulajdonképpen fibrin, azonban a trombin egy része a felszínhez kötve marad, ezért nevezzük így ezt a felszínt.). Korábbi munkánkban kimutattuk, hogy a HMEC-1 extracelluláris mátrixa egy nagyon trombogén felszín, amely nem tartalmazza a reaktív kollagének főbb típusait (I, III és VI típus), de a trombinképződést igen nagymértékben aktiválja. Mások pedig azt mutatták ki, hogy a trombin, vagy trombinkezelt fibrinogén által borított felszínen trombin receptor függő adhézió valósul meg. Kísérleteinkben a nagy trombusok képződését mindkét aptamer gátolta a HMEC-1 mátrixán és trombinkezelt fibrinogénen is, de maga a trombocita adhézió nem változott. Hasonló eredményeket kaptunk a trombint gátló peptiddel, a hirudinnal is. Mások heparinizált humán vérben, amelyet balon angioplasztika során sérült nyúl aortán perfundáltak, FpA képződés és trombocita depozíció redukcióját írták le, trombin aptamer hatására, hasonlóan a mi eredményeihez. Azt is kimutatták, hogy az aptamer gátolta a trombin-fibrin interakcióban a már kötött trombint is. Mint más trombinspecifikus gátlóanyagok, az aptamerek sem befolyásolták a kollagén indukálta trombocita adhéziót. Az eredmények arra utalnak, hogy a trombin exosite-1 részt vesz a trombociták HMEC-1 és trombin-kezelt fibrinogén felszíneken történő trombusképző folvamatában.

Tézis

A trombusba zárt fehérjék mérése -amely trombocitákból és plazmából származó proteineket tartalmazza, elsősorban fibrint- egy komplex összképet ad az aptamerek hatásáról a trombusképződés során. Ebben az összetett rendszerben az IC₅₀ értékek mindkét aptamerre némiképp magasabbak voltak, mint plazmában, vagy PRP-ben, de az UC15-mer jobb hatásfoka itt is megfigyelhető volt. Összefoglalásképp, a 3-as, 7-es, 9-es és a 13-as pozíciókban a konszenzus aptamer timidilátjainak 4-tio-deoxiuridiláttal való kicserélése sokkal erősebben gátolta a trombin indukált fibrin alvadékképződést és trombocita aktivációt, habár a hatékonysága 2-12-szereres

között változott a különböző kísérleti rendszerekben, mint a konszenzus aptamer. Az új aptamer sokkal hatékonyabban csökkentette a trombus depozíciót trombinkezelt fibrinogén felszínen is. A molekulacsoportok cseréje két fő változást okozott a molekula fizikai-kémiai tulajdonságaiban. 1/ A módosított nukleotid tautomerizációja miatt (enol formába alakulása) reaktív – SH csoportot vagy csoportokat hordozhat és ez a csoport a megfelelő pozícióban reakcióba léphet a fehérjék szulfhidril csoportjaival. Mivel nincs szabad -SH a trombinon, ez a változás nem magyarázza az UC15-mer megnőtt gátló kapacitását. 2/ A tiono csoport a 4-es pozíciónál a bázist hibrofóbbá alakítja át, amely erősebb aptamer-protein kölcsönhatást eredményezhet. Korábbi publikáció szerint a 4-tiodeoxiuridilátból álló homo-oligonukleotid taralmaz, módosítatlan társainál sokkal stabilabbnak kellene lennie a biológiai környezetben. Ez a tulajdonság jelentős előnnyé válhat *in vivo* alkalmazás esetén. Az aptamereket tartalmazó 4-tiodeoxiuridilát további optimalizációja lehetőséget jelent hatékonyabb trombingátló aptamerek létrehozására, amelyek új, potenciális antitrombotikus gyógyszerek. Eredményünket az aptamerek molekulamodellezési és szerkezetmósítási munkákban használják [92], [93].

Prospektív epidemiológiai tanulmányok alapján a VWF-t atherotrombotikus rizikófaktorként tartják számon. Trombotikus megbetegedések; érgyulladások, diabetesz, elhízás, magas vérnyomás, máj- és malignus megbetegedések kísérő jelensége a plazma VWF szintjének emelkedése. Emelkedett szintjét az endotélt ért stimulus illetve sérülés bizonyítékaként figyelték meg perifériás artériás megbetegedésekben; valamint mind akut, mind ischemiás stroke-ot vagy tranziens ischemiás történést követően; kiemelten nagy-artériás aterotrombózis okozta isémiás sztrókban; valamint rádiófrekvenciás szívkatéterezésen átesett betegek esetén [94].

A szerzett hemosztázis rendellenességek leggyakrabban májcirrhosisban fordulnak elő. Ezek a rendellenességek csökkent vagy növekedett hemosztázis kapacitást jelenthetnek, de a kompenzatórikus mechanizmust is eredményezhetnek. Saját és mások közléseiből ismert, hogy az endotél aktiváció markerének tartott VWF-nak a szintje igen magas ezen betegek plazmájában [95], [96], Különböző eredetű és súlyosságú májcirrhosis beteg esetében a VWF különböző módszerekkel mért aktivitását a mennyiségi változása függvényében vizsgáltuk és az eredményeket összevettük a VWF multimerizáció fokát befolyásoló ADAMTS-13 enzim aktivitásával és mennyiségével. A csökkent VWF aktivitás / antigén eredmények a molekula funkciójának csökkenésére utalnak. Megállapítottuk, hogy az ADAMT-13 mennyisége és aktivitása a betegség legsúlyosabb fázisában csökkenést mutat. A multimerek eloszlása is a közepes méretűek többségét mutatta. Ez azt jelentheti, hogy a nagy multimerek vagy nem képződtek elegendő mennyiségben, vagy hamar lebomlottak, esetleg kürültek. Az esetk többségében azonban a lebontó enzim mennyisége és aktivitása nem mutatott változást a kontroll csoporthoz képest, bár igen nagy eltérések voltak a beteg csoportban. A VWF:CB is csökkent a betegség a fokozott endotél perturbáció következménye lehet. A VWF:CB is csökkent a betegség

legsúlyosabb fázisában, ami utalhat a szintetizálódott VWF multimerizációjának hibájára. Valószínű a kompenzatórikusan fokozott endotél funkció okozza ezeket a változásokat [23] [24].

Tézis

Összefoglalás

MTAdoktori, Hársfalvi J.

A VWF nyíróerő függő struktúrájának és funkciójának megértésére irányuló kutatásainknak a célja: hozzájárulni a trombociták és az endotélsejtek valamint az extracelluláris mátrix közötti összehangolt folyamat molekuláris szintű elemzéséhez, a normál hemosztázis és a patológiás vérzés vagy trombózis a vaszkuláris hematológiai betegségek mechanizmusának megismeréséhez, amely közelebb vihet a gyógyításukhoz.

Munkám során igazoltuk, hogy kapilláris, artériás és vénás áramlási körülmények között egyaránt, jelentős a trombocitadús trombus képződése.

Humán mikrovaszkuláris endotélsejtek mátrixán és trombinnal kezelt fibrinogénen trombin útvonalon, nyíróerőtől és VWF-tól függetlenül képződik a trombus. Köldökvéna endotélsejt- és kollagén mátrixon nyíróerő és VWF függő a folyamat. A trombin 1-es anionkötőhelyét foglaló, ismert inhibitorok és azoktól hatékonyabb, általunk módosított DNS (aptamer) a trombint és a trombusképződést is gátolja, de a trombocita egyréteg kialakulását (adhéziót) nem.

A VWF multimerizáltságának mértéke szerint közvetíti a trombociták és a fibrilláris kollagén közötti, nyírőerő függő kapcsolatot. Kollagén mátrixon a VW molekula nagy nyíróerő hatása alatt sem változtatja a morfológiáját, nem nyúlik ki. A különböző antitestek és fágtechnológiával kiválasztott peptidek hatása szerint azonban, konformációja változik, megnő az A1 domén és a trombocita glikoprotein lb α (GPlb) lánca közötti összekapcsolódás valószínűsége. A fágszelekció a VWF új kollagékőtő helyének a felismerésére is vezetett. A kombinatórikus kémián alapuló aptamer és fágpeptid szelekciós eljárásokkal nyert molekuláink a trombusképződést befolyásoló gyógyszerek alapmolekulái lehetnek

A trombusképződés, a trombogén felszín és a sebességgradiens függvényében, trombin vagy von Willebrand faktor (VWF) inhibitorokkal gátolható.

Különböző geometriájú, fiziológiás és patológiás áramlást modellező rendszereket hasonlítottuk össze. A párhuzamos lemezű kamrákhoz viszonyítva, a kis vérigényű, síkon forgó kúp kamrában a trombocita adhézió mellett az aggregáció folyamata is jelentős, amelyet a kísérletek tervezésénél és értékelésénél nem szabad elhanyagolni.

A különböző méretű VWF multimereket statisztikai analízisre alkalmas számmal jellemezzűk, amelynek az a jelentősége, hogy a VW multimerek szerepét a vérzékenységtől a trombotikus állapot rizikójáig vizsgálhatjuk. A VWF multimer szerkezetének az értékelésére teljesen új módszert kidolgozása, amely a VW betegség pontosabb tipizálása mellett a fokozott endotél aktivációra utaló nagy multimerek mennyiségi növekedésének kvantitálására alkalmas. A módszernek nagy jelentősége lehet a klinikai kutatásban.

2B típusú VW betegség ritka mutációját igazoltuk.

Policitémia vera-s beteg trombocitáin a Gplb receptor többletet mutattunk ki, amely fokozott trombusképzéssel járt és a fatális trombotikus történés oka lehetett.

Tézis

Nagy mennyiségű és aktivitású VWF van a plazmában májcihossisban, gyulladásos folyamatokban, műtét utáni állapotban, ami felhívja a figyelmet a trombotikus mikroangiopátia kialakulásának a lehetőségére.

Hívatkozások

- 1. Boda, Z., Thrombosis és Vérzékenység. 2006, Budapest: Medicina Könyvkiadó Rt.
- 2. Pfliegler, G., Vénás tromboembolia. 2002, Budapest: B+V MEDICAL+TECNICAL LAP-ÉS Könyvkiadó.
- Brass, L., In the shadow of the thrombus. Nat Med, 2009. 15(6): p. 607-8.
- Szarvas, M., P. Oparaugo, M.L. Udvardy, J. Toth, T. Szanto, L. Daroczi, G. Vereb, and J. Harsfalvi, Differential platelet deposition onto collagen in cone-and-plate and parallel plate flow chambers. Platelets, 2006. 17(3): p. 185-90.
- Harsfalvi, J., Measurement of thrombus formation: Comparison of two methods. Clinica Chimica Acta, 2005. 355: p. S206-S206.
- Udvardy ML, K.J., Hársfalvi J, Glycocalicin coated beads for studying platelet GPIb function. Platelets, 2007. 18(1 supp 1): p. 1 - 23.
- Bonnefoy, A., J. Harsfalvi, G. Pfliegler, F. Fauvel-Lafeve, and C. Legrand, The subendothelium of the HMEC-1 cell line supports thrombus formation in the absence of von Willebrand factor and collagen types I, III and VI. Thromb Haemost. 2001. 85(3): p. 552-9.
- Udvardy, M.L., K. Szekeres-Csiki, and J. Harstalvi, Novel evaluation method for densitometric curves of von Willebrand factor multimers and a new parameter (M(MW)) to describe the degree of multimersation. Thromb Haemost, 2009, 102(2): p. 412-7.
- Novak, L., H. Deckmyn, S. Damjanovich, and J. Harsfalvi, Shear-dependent morphology of von Willebrand factor bound to immobilized collagen. Blood, 2002. 99(6): p. 2070-6.
- Hársfalvi J., S.M., A von Willebrand factor és a vascularis haematologia. Mikrocirkuláció, 2005. Suppl./1: p. 39-44.
- Szanto, T., A. Schlammadinger, S. Staelens, S.F. De Meyer, K. Freson, I. Pareyn, S. Vauterin, J. Harsfalvi, H. Deckmyn, and K. Vanhoorelbeke, The A/T1381 polymorphism in the A1-domain of von Willebrand factor influences the affinity of von Willebrand factor for platelet glycoprotein Ibalpha. Thromb Haemost, 2007. 98(1): p. 178-85.
- Matyus, L., L. Bene, M.V. Alvarez, I. Zavodszky, J. Harstalvi, J. GonzalezRodriguez, and S. Damjanovich, *Lateral organization of Ilb/Illa heterodimer on platelets*. Progress in Biophysics & Molecular Biology, 1996. 65: p. PMI23-PMI23.
- Hársfalvi J, S.J.M., Van Houtte E., Sayer R.T., Vermylen J., Deckmyn H., Hirudo Medicinalisból származó calin gátolja a von willebrand faktor-collagen kölcsönhatást statikus és dinamikus körülmények között. Belorvosi Archivum, 1994. XU/II: 2. 468-473.
- Harsfalvi, J., J.M. Stassen, M.F. Hoylaerts, E. Van Houtte, R.T. Sawyer, J. Vermylen, and H. Deckmyn, Calin from Hirudo medicinalis, an inhibitor of von Willebrand factor binding to collagen under static and flow conditions. Blood, 1995. 85(3): p. 705-11.
- Cauwenberghs, N., M. Meiring, S. Vauterin, V. van Wyk, S. Lamprecht, J.P. Roodt, L. Novak, J. Harsfalvi, H. Deckmyn, and H.F. Kotze, Antithrombotic effect of platelet glycoprotein lb-blocking monoclonal antibody Fab fragments in nonhuman primates. Arterioscief Thromb Vacs Biol, 2000. 20(5): p. 1347-53.
- Cauwenberghs, N., K. Vanhoorelbeke, S. Vauterin, D.F. Westra, G. Romo, E.G. Huizinga, J.A. Lopez, M.C. Berndt, J. Harsfalvi, and H. Deckmyn, Epitope mapping of inhibitory antibodies against platelet glycoprotein Ibalpha reveals interaction between the leucine-rich repeat N-terminal and C-terminal flanking domains of glycoprotein Ibalpha. Blood, 2001. 98(3): p. 652-60.
- Ulrichts, H., H. Depraetere, J. Harsfalvi, and H. Deckmyn, Selection of phages that inhibit vWF interaction with collagen under both static and flow conditions. Thromb Haemost, 2001. 86(2): p. 630-5.
- Meining, M.S., D. Litthauer, J. Harsfalvi, V. van Wyk, P.N. Badenhorst, and H.F. Kotze, In vitro effect of a thrombin inhibition peptide selected by phage display technology. Thromb Res, 2002. 107(6): p. 365-71.
- Ulrichts, H., J. Harsfalvi, L. Bene, J. Matko, J. Vermylen, N. Ajzenberg, D. Baruch, H. Deckmyn, and I. Tornai, A monoclonal antibody directed against human von Willebrand factor induces type 2B-like alterations. J Thromb Haemost, 2004. 2(9): p. 1622-8.
- Mendelbourn Raviv, S., A. Horvath, J. Aradi, Z. Bagoly, F. Fazakas, Z. Batta, L. Muszbek, and J. Harsfalvi, 4thio-deoxyuridylate-modified thrombin aptamer and its inhibitory effect on fibrin clot formation, platelet aggregation and thrombus growth on subendothelial matrix. J Thromb Haemost, 2008. 6(10): p. 1764-71.
- Szanto, T., K. Vanhoorelbeke, G. Toth, A. Vandenbulcke, J. Toth, W. Noppe, H. Deckmyn, and J. Harsfalvi, Identification of a VWF peptide antagonist that blocks platelet adhesion under high shear conditions by selectively inhibiting the VWF-collagen interaction. J Thromb Haemost, 2009. 7(10): p. 1680-7.

MTAdoktori, Hársfalvi J.

Tézis

- Tornai, I., Z. Boda, A. Schlammadinger, A. Juhasz, N. Cauwenberghs, H. Deckmyn, and J. Harsfalvi, Acquired Bernard-Soulier syndrome: a case with necrotizing vasculitis and thrombosis. Haemostasis, 1999. 29(4): p. 229-36
- Tornai, I., P. Maria, M. Udvardy, and J. Harsfalvi, VWF functions, ADAMTS-13 activity and antigen levels in patients with liver cirrhosis. Hepatology, 2007. 46(4): p. 808.
- Tornai, I., M. Papp, M.L. Udvardy, P. Orosz, and J. Harsfalvi, The alterations of von Willebrand factor and its cleaving protease, ADAMTS-13 show an opposite change of direction in patients with liver cirrhosis. Journal of Hepatology, 2008, 48: p. 262.
- Gombos, T., V. Mako, L. Cervenak, J. Papassotiriou, J. Kunde, J. Harsfalvi, Z. Forhecz, Z. Pozsonyi, G. Borgulya, L. Janoskuti, and Z. Prohaszka, Levels of von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity predict clinical events in chronic heart failure. Thromb Haemost, 2009. 102(3): p. 573-80.
- Molvarec, A., J. Rigo, Jr., T. Boze, Z. Derzsy, L. Cervenak, V. Mako, T. Gombos, M.L. Udvardy, J. Harsfalvi, and Z. Prohaszka, Increased plasma von Willebrand factor antigen levels but normal von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity in precelampsia. Thromb Haemost, 2009. 101(2): p. 305-11.
- Toth, J., J. Kappelmayer, M.L. Udvardy, T. Szanto, M. Szarvas, L. Reito, P. Sottesz, M. Udvardy, and J. Harsfalvi, Increased platelet glycoprotein Ib receptor number, enhanced platelet adhesion and severe cerebral ischaemia in a patient with polycythaemia vera. Platelets, 2009. 20(4): p. 282-7.
- 28. Wagner, D.D. and P.S. Frenette, The vessel wall and its interactions. Blood, 2008. 111(11): p. 5271-81.
- 29. Hathcock, J.J., Flow effects on coagulation and thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(8): p. 1729-37
- Sumpio, B.E., J. Timothy Riley, and A. Dardik, Cells in focus: endothelial cell. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2002. 34(12): p. 1508-1512.
- Busse, R. and I. Fleming, Vascular Endothelium and Blood Flow, in The Vascular Endothelium, S. Moncada and A. Higgs, Editors. 2006, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. p. 361.
- Chretien, M.L., M. Zhang, M.R. Jackson, A. Kapus, and B.L. Langille, Mechanotransduction by endothelial cells is locally generated, direction-dependent, and ligand-specific. J Cell Physiol, 2010. 224(2): p. 352-61.
- Komorowicz, E., R.D. McBane, 2nd, and D.N. Fass, Physical and enzymatic perturbation of the architecture of the Tunica media destroys its inherent thromboresistance. Thromb Haemost, 2002. 88(5): p. 827-33.
- Watson, S.P., Platelet activation by extracellular matrix proteins in haemostasis and thrombosis. Curr Pharm Des, 2009. 15(12): p. 1358-72.
- Hantgan, R.R. and S.T. Lord, Fibrinogen structure and physiology, in Hemostasis and Thrombosis, R.W. Colman, et al., Editors. 2006, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 285-316.
- 36. Laki, K., The action of thrombin on fibrinogen. Science, 1951. 114(2965): p. 435-6.
- Laki, K., The polymerization of proteins; the action of thrombin on fibrinogen. Arch Biochem, 1951. 32(2): p. 317-24.
- Mihalyi, E., Transformation of fibrinogen into fibrin. I. Electrochemical investigation of the activation process. J Biol Chem, 1954. 209(2): p. 723-32.
- Mihalyi, E., Transformation of fibrinogen into fibrin. II. Changes in pH during clotting of fibrinogen. J Biol Chem, 1954. 209(2): p. 733-41.
- 40. Laki, K., Fibrinogen, ed. K. Laki. 1968: Marcel Dekker, New York. 397.
- Mihalyi, E., Review of some unusual effects of calcium binding to fibrinogen. Biophys Chem, 2004. 112(2-3): p. 131-40.
- 42. Di Cera, E., Thrombin, Mol Aspects Med, 2008, 29(4); p. 203-54.
- Sadler, J.E., U. Budde, J.C. Eikenboom, E.J. Favaloro, F.G. Hill, L. Holmberg, J. Ingerslev, C.A. Lee, D. Lilicrap, P.M. Mannucci, C. Mazurier, D. Meyer, W.L. Nichols, M. Nishino, I.R. Peake, F. Rodeghiero, R. Schneppenheim, Z.M. Ruggeri, A. Srivastava, R.R. Montgomery, and A.B. Federici, Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. J Thromb Haemost, 2006. 4(10): p. 2103-14.
- Savage, B., J.J. Sixma, and Z.M. Ruggeri, Functional self-association of von Willebrand factor during platelet adhesion under flow. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. 99(1): p. 425-430.
- Barg, A., R. Ossig, T. Goerge, M.F. Schneider, H. Schillers, H. Oberleithner, and S.W. Schneider, Soluble plasmaderived von Willebrand factor assembles to a haemostatically active filamentous network. Thrombosis and Haemostasis, 2007. 97(4): p. 514-526.
- McCrary, J.K., L.H. Nolasco, J.D. Hellums, M.H. Kroll, N.A. Turner, and J.L. Moake, Direct demonstration of radiolabeled von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein lb and llb-llla in the presence of shear stress. Ann Biomed Eng, 1955. 23(6): p. 787-93.
- McKinnon, T.A.J., E.C. Goode, G.M. Birdsey, A.A. Nowak, A.C.K. Chan, D.A. Lane, and M.A. Laffan, Specific Nlinked glycosylation sites modulate synthesis and secretion of von Willebrand factor. Blood, 2010. 116(4): p. 640-648.
- van Genderen, P.J., F.J. Prins, I.S. Lucas, D. van de Moesdijk, H.H. van Vliet, R. van Strik, and J.J. Michiels, Decreased half-life time of plasma von Willebrand factor collagen binding activity in essential thrombocythaemia: normalization after cytoreduction of the increased platelet count. Br J Haematol, 1997. 99(4): p. 832-6.
- Levy, G.G., W.C. Nichols, E.C. Lian, T. Foroud, J.N. McClintick, B.M. McGee, A.Y. Yang, D.R. Siemieniak, K.R. Stark, R. Gruppo, R. Sarode, S.B. Shurin, V. Chandrasekaran, S.P. Stabler, H. Sabio, E.E. Bouhassira, J.D. Upshaw, Jr., D. Ginsburg, and H.M. Tsai, *Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura*. Nature, 2001. 413(6855): p. 488-94.
- Luken, B.M., L.Y.N. Winn, J. Emsley, D.A. Lane, and J.T.B. Crawley, *The importance of vicinal cysteines, C1669 and C1670, for von Willebrand factor A2 domain function.* Blood, 2010. 115(23): p. 4910-4913.
- 51. Furie, B. and B.C. Furie, Mechanisms of thrombus formation. N Engl J Med, 2008. 359(9): p. 938-49.

Tézis

- 52. Clemetson, K.G. and G. Clemetson, M., *Platelet Receptors*, in *Platelets*, A.D. Michelson, Editor. 2007, Academic Press. p. 117-139.
- 53. Sadler, J.E., von Willebrand factor: two sides of a coin. J Thromb Haemost, 2005. 3(8): p. 1702-9.
- Sadler, J.E., Low von Willebrand factor: sometimes a risk factor and sometimes a disease. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009; p. 106-12.
- Baldauf, C., R. Schneppenheim, W. Stacklies, T. Obser, A. Pieconka, S. Schneppenheim, U. Budde, J. Zhou, and F. Grater, Shear-induced unfolding activates von Willebrand factor A2 domain for proteolysis. J Thromb Haemost, 2009. 7(12): p. 2096-105.
- 56. Harrison, P., Review. British Journal of Haematology, 2000. 111(3): p. 733-744.
- 57. Pál, G., Milliárdok versengése: irányított evolúció a fehérjetudományban. Biokémia, 2008. 32: p. 82–87.
- Dias-Neto, E., D.N. Nunes, R.J. Giordano, J. Sun, G.H. Botz, K. Yang, J.C. Setubal, R. Pasqualini, and W. Arap, Next-generation phage display: integrating and comparing available molecular tools to enable cost-effective highthroughput analysis. PLoS One, 2009. 4(12): p. e8338.
- Gronwall, C. and S. Stahl, Engineered affinity proteins--generation and applications. J Biotechnol, 2009. 140(3-4): p. 254-69.
- Rothe, A., R.J. Hosse, and B.E. Power, *In vitro display technologies reveal novel biopharmaceutics*. FASEB J, 2006. 20(10): p. 1599-610.
- Lee, J.H., M.V. Yigit, D. Mazumdar, and Y. Lu, Molecular diagnostic and drug delivery agents based on aptamernanomaterial conjugates. Adv Drug Deliv Rev, 2010. 62(6): p. 592-605.
- Jayasena, S.D., Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. Clin Chem, 1999. 45(9): p. 1628-50.
- Bock, L.C., L.C. Griffin, J.A. Latham, E.H. Vermaas, and J.J. Toole, Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. Nature, 1992. 355(6360); p. 564-6.
- Tarkanyi, I., A. Horvath, I. Szatmari, H. Eizert, G. Vamosi, S. Damjanovich, E. Segal-Bendirdjian, and J. Aradi, Inhibition of human telomerase by oligonucleotide chimeras, composed of an antisense molety and a chemically modified homo-oligonucleotide. FEBS Lett. 2005. 579(6): p. 1411-6.
- 65. Cejka, J., Enzyme immunoassay for factor VIII-related antigen. Clin Chem, 1982. 28(6): p. 1356-8.
- Szekeres-Csiki, K., L. Udvardy Miklos, T. Varga-Fekete, and J. Harsfalvi, Von Willebrand-faktor es laboratoriumi diagnosztikai szerepe. Orvostudományi Értesítő, 2008. 81(1): p. 45-48.
- Siedlecki, C.A., B.J. Lestini, K.K. Kottke-Marchant, S.J. Eppell, D.L. Wilson, and R.E. Marchant, Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. Blood, 1996. 88(8): p. 2939-50.
- 68. Deckmyn, H., 1995.
- Matsui, H., M. Sugimoto, T. Mizuno, S. Tsuji, S. Miyata, M. Matsuda, and A. Yoshioka, Distinct and concerted functions of von Willebrand factor and fibrinogen in mural thrombus growth under high shear flow. Blood, 2002. 100(10): p. 3604-10.
- Sugimoto, M., H. Matsui, T. Mizuno, S. Tsuji, S. Miyata, M. Matsumoto, M. Matsuda, Y. Fujimura, and A. Yoshioka, Mural thrombus generation in type 2A and 2B von Willebrand disease under flow conditions. Blood, 2003. 101(3): p. 915-20.
- Fuchs, B., Ú. Budde, A. Schulz, C.M. Kessler, C. Fisseau, and C. Kannicht, Flow-based measurements of von Willebrand factor (VWF) function: binding to collagen and platelet adhesion under physiological shear rate. Thromb Res, 2010. 125(3): p. 239-45.
- Li, F., J.L. Moake, and L.V. McIntire, Characterization of von Willebrand factor interaction with collagens in real time using surface plasmon resonance. Ann Biomed Eng, 2002. 30(9): p. 1107-16.
- Hsu, C.C., W.B. Wu, and T.F. Huang, A snake venom metalloproteinase, kistomin, cleaves platelet glycoprotein VI and impairs platelet functions, JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS. 2008. 6(9): p. 1578-1585.
- 74. Weller, F.F., *Platelet deposition in non-parallel flow*. Journal of Mathematical Biology, 2008. 57(3): p. 333-359.
- Barg, A., R. Ossig, T. Goerge, M.F. Schneider, H. Schillers, H. Oberleithner, and S.W. Schneider, Soluble plasmaderived von Willebrand factor assembles to a halemostatically active filamentous network. Thrombosis and Haemostasis, 2007. 97(4): p. 514-526.
- Chen, J.M. and K.A. Lopez, Interactions of platelets with subendothelium and endothelium. Microcirculation, 2005. 12(3): p. 235-246.
- Gaczynska, M. and P.A. Osmulski, AFM of biological complexes: What can we learn? Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2008. 13(5): p. 351-367.
- Kuijpers, M.J.E., V. Schulte, C. Oury, T. Lindhout, J. Broers, M.F. Hoylaerts, B. Nieswandt, and J.W.M. Heemskerk, *Facilitating roles of murine platelet glycoprotein lb and alpha llb beta 3 in phosphatidylserine* exposure during vWF-collagen-induced thrombus formation. Journal of Physiology-London, 2004. 558(2): p. 403-415.
- Matsui, T. and H. Hamako, Structure and function of snake venom toxins interacting with human von Willebrand factor. Toxicon, 2005. 45(8): p. 1075-1087.
- Mody, N.A. and M.R. King, Platelet adhesive dynamics. Part II: High shear-induced transient aggregation via GPIb alpha-vWF-GPIb alpha bridging. Biophysical Journal, 2008. 95(5): p. 2556-2574.
- O'Seaghdha, M., C.J. van Schooten, S.W. Kerrigan, J. Emsley, G.J. Silverman, D. Cox, P.J. Lenting, and T.J. Foster, Staphylococcus aureus protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. Febs Journal, 2006. 273(21): p. 4831-4841.
- Ruggeri, Z.M., Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2003. 1(7): p. 1335-1342.
- 83. Ruggeri, Z.M., Von Willebrand factor. Current Opinion in Hematology, 2003. 10(2): p. 142-149.
- Shankaran, H., P. Alexandridis, and S. Neelamegham, Aspects of hydrodynamic shear regulating shear-induced platelet activation and self-association of von Willebrand factor in suspension. Blood, 2003. 101(7): p. 2637-2645.
- Singh, I., H. Shankaran, M.E. Beauharnois, Z.H. Xiao, P. Alexandridis, and S. Neelamegham, Solution structure of human von Willebrand factor studied using small angle neutron scattering. Journal of Biological Chemistry, 2006. 281(50): p. 38266-38275.

- Singh, I., E. Themistou, L. Porcar, and S. Neelamegham, Fluid Shear Induces Conformation Change in Human Blood Protein von Willebrand Factor in Solution. Biophysical Journal, 2009. 96(6): p. 2313-2320.
- Arya, M., B. Anvari, G.M. Romo, M.A. Cruz, J.F. Dong, L.V. McIntire, J.L. Moake, and J.A. Lopez, Ultralarge multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers. Blood, 2002. 99(11): p. 3971-7.
- Arya, M., J.A. Lopez, G.M. Romo, J.F. Dong, L.V. McIntire, J.L. Moake, and B. Anvari, Measurement of the binding forces between von Willebrand factor and variants of platelet glycoprotein Ibalpha using optical tweezers. Lasers Surg Med, 2002. 30(4): p. 306-12.
- Morales, L.D., C. Martin, and M.A. Cruz, The interaction of von Willebrand factor-A1 domain with collagen: mutation G1324S (type 2M von Willebrand disease) impairs the conformational change in A1 domain induced by collagen. J Thromb Haemost, 2006. 4(2): p. 417-25.
- Yoshida, S., T. Sudo, M. Niimi, L.A. Tao, B. Sun, J. Kambayashi, H. Watanabe, E. Luo, and H. Matsuoka, Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline antiplatelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. Blood, 2008. 111(4): p. 2007-2014.
- Mamelak, A.J., A. Jackson, R. Nizamani, O. Arnon, N.J. Liegeois, R.J. Redett, and P.J. Byrne, Leech Therapy in Cutaneous Surgery and Disease. Journal of Drugs in Dermatology, 2010. 9(3): p. 252-257.
- Pasternak, A., F.J. Hernandez, L.M. Rasmussen, B. Vester, and J. Wengel, *Improved thrombin binding aptamer by incorporation of a single unlocked nucleic acid monomer*. Nucleic Acids Res, 2010. 39(3): p. 1155-64.
- Reshetnikov, R.V., A.V. Golovin, and A.M. Kopylov, Comparison of models of thrombin-binding 15-mer DNA aptamer by molecular dynamics simulation. Biochemistry (Mosc), 2010. 75(8): p. 1017-24.
- Spiel, A.O., J.C. Gilbert, and B. Jilma, von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes. Circulation, 2008. 117(11): p. 1449-59.
- Tornai, I., J. Harsfalvi, Z. Boda, M. Udvardy, G. Pfliegler, and K. Rak, Endothelium releases more von Willebrand factor and lissue-type plasminogen activator upon venous occlusion in patients with liver cirrhosis than in normals. Haemostasis, 1993. 23(1): p. 58-64.
- Rak, K., J. Harstalvi, I. Tornai, G. Pfliegler, Z. Boda, and M. Misz, Desmopressin and bleeding time in patients with cirrhosis. Br Med J (Clin Res Ed), 1986. 292(6513): p. 138.