

**MTA doktori mű**

## **Hemosztázis és trombózis**

*In vitro áramlási-* és klinikai modellek

Hársfalvi Jolán

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum  
Klinikai Kutató Központ

Debrecen, 2011

## TARTALOM

|                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....                                                                               | III       |
| RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....                                                                              | V         |
| ÖSSZEFOGLALÁS .....                                                                                     | 1         |
| BEVEZETÉS ÉS A MŰ CÉLJA .....                                                                           | 3         |
| <b>IRODALMI ÖSSZEFOGLALÁS / HÁTTÉR .....</b>                                                            | <b>5</b>  |
| <i>Véráramlás, reológia.....</i>                                                                        | <i>6</i>  |
| <i>Trombogén felszín, adhézió molekulák és molekulaháló szerepe a trombusképződésben ..</i>             | <i>10</i> |
| Endotélsejtek alatti mátrix, kollagén és a kollagén mátrix .....                                        | 11        |
| Fibrinogén, fibrin és a fibrin háló képződés, a trombin szerepe.....                                    | 12        |
| VWF és a VWF háló .....                                                                                 | 14        |
| <i>A trombociták és szerepük a trombusképződésben .....</i>                                             | <i>17</i> |
| <i>A VWF funkciója.....</i>                                                                             | <i>20</i> |
| A VWF mennyiségi és minőségi eltéréseinek klinikai jelentősége.....                                     | 22        |
| Fokozott trombusképződésre hajlamosító állapotot okozó VWF abnormalitások.....                          | 24        |
| <i>A trombusképződés modelljei, trombocita funkció vizsgálata .....</i>                                 | <i>26</i> |
| <i>Trombusképződést gátló anyagok / inhibitorok .....</i>                                               | <i>30</i> |
| Kígyómérgek, vérszívó rovarok, állatok hatóanyagai .....                                                | 31        |
| Antitestek, fágpeptidek és aptamerek.....                                                               | 31        |
| <b>ANYAGOK, KLINIKAI MINTÁK ÉS MÓDSZEREK .....</b>                                                      | <b>34</b> |
| <i>Anyagok.....</i>                                                                                     | <i>34</i> |
| <i>Klinikai minták, mintakezelés .....</i>                                                              | <i>34</i> |
| <i>A VWF analízise, rutin módszerek.....</i>                                                            | <i>35</i> |
| <i>Trombocita adhézió, aggregáció és aktiváció mérése .....</i>                                         | <i>37</i> |
| <i>Trombin alvadási és amidolitikus aktivitás mérése .....</i>                                          | <i>39</i> |
| <i>Fibrinopeptid A (FpA) mérése folyadékkromatográfia – tömegspektrometria (LC-MS)</i>                  | <i>40</i> |
| <i>alkalmazásával.....</i>                                                                              | <i>40</i> |
| <i>Sejttenyészetek, mátrixok és vizsgálatuk.....</i>                                                    | <i>40</i> |
| <i>Atomerő mikroszkópos módszer a kollagénhez artériás áramlási körülmények között</i>                  | <i>41</i> |
| <i>kapcsolódott VWF molekula vizsgálatára. ....</i>                                                     | <i>41</i> |
| <i>VWF tisztítása .....</i>                                                                             | <i>41</i> |
| <i>Felszíni plazmon rezonancia mérés (Biospecific Interaction Analysis) .....</i>                       | <i>42</i> |
| <i>Biotechnológia (kombinatorikus kémia és fág technológia).....</i>                                    | <i>42</i> |
| <i>A VWF multimer eloszlásának kvantitatív jellemzése .....</i>                                         | <i>43</i> |
| <b>EREDMÉNYEK .....</b>                                                                                 | <b>45</b> |
| MÓDSZERTANI EREDMÉNYEK .....                                                                            | 45        |
| Vénás és artériás körülményeket modellező, teljes vért alkalmazó áramlási kamrák vizsgálata .....       | 45        |
| A VW molekula multimerizáció fokának kvantitatív jellemzése.....                                        | 47        |
| Módszer a VFW és a trombocitán lévő receptora, a GPIb közötti kölcsönhatást vizsgálatára .....          | 49        |
| A TROMBUSKÉPZŐDÉS ÉS TROMBOGÉN FELSZÍN, A VWF ÉS A TROMBOCITÁK VIZSGÁLATA,                              |           |
| ALAPKUTATÁSI EREDMÉNYEK .....                                                                           | 49        |
| Trombogén felszín vizsgálata, VWF nélküli endotélsejt mátrixon történő adhézió és trombusképződés ..... | 49        |
| Kollagénhez artériás áramlási körülmények között kapcsolódott VWF molekula vizsgálata .....             | 51        |
| Humán VWF ellenes antitest 2B típusú VWB-hez hasonló eltéréseket okoz.....                              | 53        |

|                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| GPIIb-IIIa topológiája a trombocita felszínén .....                                                      | 55        |
| KOLLAGÉN VWF KÖLCSÖNHATÁS ÉS A TROMBUSKÉPZŐDÉS GÁTLÁSA, INHIBITOR MOLEKULÁK,                             |           |
| GYÓGYSZER HATÁS POTENCIÁL .....                                                                          | 55        |
| Pióca nyálából izolált peptid (calin) specifikus gátló hatása a VWF-kollagén kölcsönhatásra artériás     |           |
| áramlási körülmények között.....                                                                         | 55        |
| VWF konformáció függő kötőhelyeinek vizsgálata, trombusképződés gátlása a VWF-kollagén                   |           |
| kölcsönhatásra specifikus fágokkal és fágpeptiddel.....                                                  | 57        |
| A VWF és a trombocita GPIb receptora közötti kölcsönhatás és gátlása .....                               | 60        |
| Trombin gátló peptid és DNS molekulák, hatásuk a trombózis hemosztázis folyamatára,                      |           |
| plazmingeneráció .....                                                                                   | 61        |
| HEMOSZTÁZIS, TROMBUSKÉPZŐDÉS, TROMBOCITA ÉS VWF VONATKOZÁSÚ KLINIKAI KUTATÁSOK.....                      | 64        |
| 2B típusú von Willebrand betegek feno- és genotipizálása.....                                            | 64        |
| Szerzett Bernard-Soulier szindróma esetének ismertetése .....                                            | 65        |
| Emelkedett trombocita GPIb receptorszám, fokozott trombocita adhézió és súlyos <i>cerebrális ishemia</i> |           |
| <i>polycythemia vera</i> esetén.....                                                                     | 66        |
| Inzulin függő cukorbetegség plazmájából képzett trombocita dús alvadék lizis rezisztenciája.....         | 69        |
| Emelkedett VWF mennyiség és funkció, ADAMTS-13 aktivitás és antigén különböző betegségekben.             |           |
| .....                                                                                                    | 69        |
| <b>EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE .....</b>                                                                       | <b>71</b> |
| MÓDSZERTANI EREDMÉNYEK.....                                                                              | 71        |
| Vénás és artériás körülményeket modellező, teljes vért alkalmazó áramlási kamrák .....                   | 71        |
| A VWF mennyiségi és minőségi vizsgálata, a VW molekula multimerizációjának kvantitatív jellemzése        |           |
| .....                                                                                                    | 72        |
| A TROMBUSKÉPZŐDÉS ÉS TROMBOGÉN FELSZÍN, A VWF ÉS A TROMBOCITÁK VIZSGÁLATA,                               |           |
| ALAPKUTATÁSI EREDMÉNYEK.....                                                                             | 72        |
| Trombogén felszín vizsgálata, VWF nélküli endotélsejt mátrixon történő adhézió .....                     | 72        |
| Kollagénhez artériás áramlási körülmények között kapcsolódott VWF molekula vizsgálata .....              | 73        |
| Humán VWF ellenes antitest 2B típusú eltéréseket okoz.....                                               | 74        |
| KOLLAGÉN VWF KÖLCSÖNHATÁS ÉS A TROMBUSKÉPZŐDÉS GÁTLÁSA, INHIBITOR MOLEKULÁK,                             |           |
| GYÓGYSZER HATÁS POTENCIÁL .....                                                                          | 75        |
| Pióca nyálából izolált peptid (Calin) specifikus gátló hatása a VWF-kollagén kölcsönhatásra artériás     |           |
| áramlási körülmények között.....                                                                         | 75        |
| VWF konformáció függő kötőhelyeinek vizsgálata, trombusképződés gátlása a VWF-kollagén                   |           |
| kölcsönhatásra specifikus fágokkal és fágpeptiddel.....                                                  | 77        |
| A VWF és a trombocita GPIb receptora közötti kölcsönhatás és gátlása .....                               | 78        |
| Trombin aktivitás gátlásának hatása a trombusképződésre .....                                            | 78        |
| HEMOSZTÁZIS, TROMBUSKÉPZŐDÉS, TROMBOCITA ÉS VWF VONATKOZÁSÚ KLINIKAI KUTATÁSOK.....                      | 82        |
| <b>HÍVATKOZÁSOK .....</b>                                                                                | <b>83</b> |

## 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. Külön köszönöm azoknak, akik az allábbi nevek között nem szerepelnek, de hosszabb - rövidebb ideig munkatársként, barátként, talán ellenségeként mellettem voltak és kölcsönösen tanulhattunk egymástól.

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<sup>†</sup> professzor, Muszbek László és Fésüs László akadémikusok.

**Hazai és nemzetközi kollaborációs társak:** Damjanovics Sándor akadémikus, Szöllősi 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 György, 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, laboratórumi 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 Mendelbourn, Batta Zoltán PhD hallgatók; Szilágyi Gábor, Nagymihály Richárd, Uhrinyi Márk TDK hallgatók.

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

## Rövidítések jegyzéke

|                  |                                                                                          |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| AC               | akrilát gyanta                                                                           |
| AD               | autoszomális domináns                                                                    |
| ADAMTS13         | "a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13"      |
| ADP              | adenozin-difoszfát                                                                       |
| AFM              | atomerő mikroszkóp                                                                       |
| Ang.             | angolul                                                                                  |
| APT1             | aktivált parciális tromboplasztin idő                                                    |
| AR               | autoszomális recesszív                                                                   |
| Arg-Gly-Asp      | arginin-glicin-asparagin                                                                 |
| Asn              | aszparagin                                                                               |
| ATP              | adenozin-trifoszfát                                                                      |
| BM-40 fehérje    | a SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) más elnevezése                    |
| BSA              | szarvasmarha szérum albumin                                                              |
| BSS              | Bernard-Soulier szindróma                                                                |
| C-terminális     | karboxi-terminális                                                                       |
| CD               | Cluster of Differentiation, Differenciálódás szerinti osztályozás                        |
| CGS              | centiméter-gramm-másodperc mértékegységrendszer                                          |
| CHF              | Chronic heart failure, krónikus szívelégtelenség                                         |
| CI               | Confidence Interval, valószínűségi határ                                                 |
| CPC              | Cone and Plate Chamber, síkon forgó kúp kamra                                            |
| Cys              | cisztein                                                                                 |
| DDR2             | diszkoidin domén receptor 2                                                              |
| EC               | endotél sejt                                                                             |
| ECM              | extracelluláris mátrix                                                                   |
| EDTA             | etilén-diamin-tetraecetsav                                                               |
| ELISA            | Enzyme Linked Immunosorbent Assay, enzimmel jelzett, szilárd fázisú ellenanyag-vizsgálat |
| ET               | esszenciális trombocitémia                                                               |
| FCS              | magzati borjúsérum                                                                       |
| FPLC             | gyors, protein folyadékkromatográfia                                                     |
| FVIII            | VIII-as faktor                                                                           |
| FVIII:C          | VIII-as faktor koaguláns aktivitás                                                       |
| FXI              | XI-es faktor                                                                             |
| FXII             | XII-es faktor                                                                            |
| Gly              | glicin                                                                                   |
| GP1a-IIa         | glikoprotein Ia-IIa                                                                      |
| GP1b             | glikoprotein Ib (CD42b)                                                                  |
| GP1ba            | glikoprotein Iba (CD42ba)                                                                |
| Gplc/Ila         | glikoproteinIc/IIa                                                                       |
| GPIIb/IIIa       | glikoprotein IIb/IIIa (CD41/CD61, αIIbβ3)                                                |
| GPIIIb           | glikoprotein IIIb                                                                        |
| GPIV             | glikoprotein IV                                                                          |
| GPRP             | glicin-Prolin-Arginin-Prolin                                                             |
| GPVI             | glikoprotein VI                                                                          |
| GTP              | guanozin-trifoszfát                                                                      |
| HELLP            | hemolízis, emelkedett májenzimértékek, trombocitopénia                                   |
| HEPES            | 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinil]-etánszulfonsav                                       |
| HF               | Heart Failure ,szívelégtelenség                                                          |
| HMEC-1           | Human Microvascular Endothelial Cell                                                     |
| HMWK             | nagy molekulatömegű kininogén                                                            |
| HPLC             | nagynyomású folyadékkromatográfia                                                        |
| HRP              | Horse Reddish Peroxidase, tormaperoxidáz                                                 |
| HUVEC            | humán köldökvéna endothel sejt                                                           |
| IC <sub>50</sub> | maximális inhibitor koncentráció 50%-a                                                   |

|                  |                                                                                              |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| IDDM             | inzulin-függő diabetes mellitus                                                              |
| IgG              | immunglobulin G                                                                              |
| LAPP             | Leach Antiplatelet Protein, <i>Haementeria officinalis</i> -ből izolált antiplatelet protein |
| LMWH             | alacsony molekulatömegű heparin                                                              |
| MAP              | négyágú peptid                                                                               |
| MEA              | 2-merkaptó-etanol                                                                            |
| Met              | metionin                                                                                     |
| moAb             | monoklonális antitest                                                                        |
| N -terminális    | amino-terminális                                                                             |
| NEM              | N-Etilmaleimid                                                                               |
| NMR              | mágneses magrezonancia                                                                       |
| OPD              | orto-fenilén-diamin                                                                          |
| PAF              | trombocita növekedési faktor                                                                 |
| PAI-1            | plazminogén aktivátor inhibitor-1                                                            |
| PBS              | Phosphate Buffered Saline, foszfáttal pufferelt fiziológias sóoldat                          |
| Phe              | fenilalanin                                                                                  |
| PI               | protrombin idő                                                                               |
| PMSF             | fenil-metil-szulfonil-fluorid                                                                |
| PPACK            | D-Fenilalanil-L-prolil-L-arginin klorometil keton                                            |
| PPC              | párhuzamos lemezű kamra                                                                      |
| PPP              | trombocitaszegény plazma                                                                     |
| PRP              | trombocitadús plazma                                                                         |
| PSGL-1           | P-szelektin glikoprotein ligand 1                                                            |
| PTFE             | poli-tetrafluor-etilén                                                                       |
| PV               | policitémia vera                                                                             |
| PVC              | poli-vinil-klorid                                                                            |
| PVDF             | poli-vinilidén-fluorid                                                                       |
| QCM              | Quartz Crystal Microbalance, vékony réteg vastagságának mérése                               |
| Rb               | nyúl                                                                                         |
| RD               | relatív denzitás                                                                             |
| RIPA             | Risztocetin indukálta thrombocyta agglutináció                                               |
| rLAPP            | rekombináns technikával előállított antiplatelet protein                                     |
| RNS              | ribonukleinsav                                                                               |
| SDS              | Nátrium-dodecil-szulfát vagy Nátrium lauril szulfát                                          |
| SEM              | átlag a standard hibája                                                                      |
| SI               | <i>Système International</i> , nemzetközileg elfogadott mértékegységrendszer                 |
| SPARC            | savas, ciszteinben gazdag szekretált protein                                                 |
| SPD              | nem aggregált, egyedi trombociták                                                            |
| ssDNS            | egyszálú dezoxiribonukleinsav                                                                |
| Streptavidin-POD | streptavidin-peroxidáz                                                                       |
| TBS              | Tris bázissal pufferelt sóoldat                                                              |
| TBS-T            | Tris bázissal pufferelt sóoldat, amely tartalmaz Tween-20-at is                              |
| TF               | szöveti faktor                                                                               |
| Thr              | treonin                                                                                      |
| TIP              | trombin gátló peptid                                                                         |
| tPA              | szöveti plazminogén-aktivátor                                                                |
| TTP              | trombotikus trombocitopéniás purpura                                                         |
| Tyr              | tirozin                                                                                      |
| VW               | von Willebrand                                                                               |
| VWB              | von Willebrand betegség                                                                      |
| VWF              | von Willebrand faktor                                                                        |
| VWF:Ag           | von Willebrand faktor antigén                                                                |
| VWF:CB           | von Willebrand faktor kollagén kötési kapacitás                                              |
| VWF:FVIII        | VWF-nak a FVIII kötő kapacitása                                                              |
| VWF:RCo          | von Willebrand faktor risztocetin kofaktor aktivitás                                         |
| WPS              | mosott trombocita szuszpenzió                                                                |
| XSF              | szukcinimidil-fluoreszcein                                                                   |



## Összefoglalás

A hemosztázis az a folyamat, amely fenntartja egy zárt, magas nyomás alatt lévő keringési rendszer egységét érsérülés után. Az érfalsérülés és a vér kilépése a keringésből gyorsan bekövetkező eseményeket indít el az érfallban és a vérben, melyek megakadályozzák a vérzést, majd regenerálják az érfallat. Keringő trombociták gyűlnek a sérülés helyére, ahol azok a képződő trombus fő összetevőivé válnak; a szöveti faktor által beindított véralvadás is előrehalad a trombin és a fibrin képződése közben. A fibrin 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. Normál áramlási körülmények alatt a szabályozó folyamatok időben és térben behatárolják a trombus képződést. Amikor patológias folyamatok elnyomják a véralvadás szabályozott folyamatait, csökkent vagy túlzott mértékű lehet az ér sérülését helyreállító folyamat és vérzés vagy trombózis lehet a következmény.

A von Willebrand faktor (VWF) a legnagyobb molekulatömegű glikoprotein, amely a plazmában és a trombocitákban van, az endotélsejtekben és a megakariocitákban szintetizálódik. Nagy nyíróerő hatása alatt lévő érszakaszokban a trombocita adhézió és aggregáció mediátora.

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 patológias 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-től 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, nyíróerő függő kapcsolatot. Kollagén mátrixon a VW molekula nagy nyíróerő hatása alatt sem változtatja a morfológiáját, nem nyúlik ki. A különböző antitestek és fágtechnológiával kiválasztott peptidok hatása szerint azonban, konformációja változik, megnő az A1 domén és a trombocita glikoprotein Ib $\alpha$  (GPIb) lánc közötti összekapcsolódás valószínűsége. A fágselektáció a VWF új kollagékötő helyének a felismerésére is vezetett. A kombinatórikus kémián alapuló aptamer és

fágpeptid selektációs eljárásokkal nyert molekuláink a trombusképződést befolyásoló gyógyszerek alampolekulái lehetnek

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

Különböző geometriájú, fiziológias és patológias áramlást modellező rendszereket hasonlítottuk össze. A párhuzamos lemezű kamrákhoz viszonyítva, a kis vérgényű, 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 jellemezzük, 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 GPIb receptor többletet mutattunk ki, amely fokozott trombusképzéssel járt és a fatális trombotikus történet oka lehetett.

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

**Kulcsszavak:** véráramlás, endotél-sérülés, trombocita adhézió, trombocita aggregáció, trombocita-fibrin alvadék

## Bevezetés és a mű célja

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 sérülések 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 fiziológias 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. Ezen 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 felszíne által katalizált trombusképződés és lebomlás szabályozhatósága témakörökbe csoportosítva írom le az eredményeket és értékelésüket.

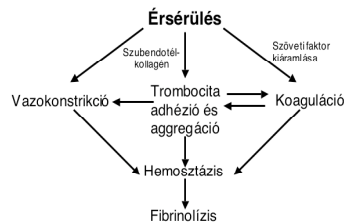
A tézisekben és az értekezésben a Magyar Tudományos Akadémia iránymutatásának megfelelően igyekeztem a magyar helyesírás szabályai szerint használni a szakmai nyelvet. Olyan esetekben, ahol nincs, vagy nem megfelelő a magyar változat, dőlt betűkkel az eredeti *terminus technicus* vagy időzójelben használtam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

A munkához és leírásához a munkahelyi vezetőim, a munkatársaim, a hazai és nemzetközi kollaborátorok, a doktorandus, és az orvos-, vegyész, molekuláris biológus, orvosi diagnosztikai- és kutató laboratóriumi képzésben résztvevő és tudományos diákköri munkát végző hallgatók nagymértékben hozzájárultak.

## 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, és 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 és trombózis folyamatának valamint szabályozhatóságának a mind jobb megismerése a betegellátást és a gyógyítást szolgálhatja.

A hemosztázis fő folyamatai a (1) vazokonstriktió, (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 folyamatában lebomlik (1. ábra).



1. ábra. A hemosztázis vázlata [28]

A képződő trombus vaszkuláris és koagulációs faktoroktól függő volta, az érfal és a vér trombogén potenciálja, az alvadási faktorok és a trombociták szerepe és működése nagyon sok részletében ismert. Még alig feltárt terület azonban az áramlásnak és az eközben fellépő

erőknek maguknak a szabályozó szerepe, amely nemcsak a vér sejtjes elemeinek mozgására és aktiválódására valamint az endotélsejtek aktiválódására van hatással hanem, az áramló molekulákra is. Az áramlás során fellépő erőknek különösen nagy szerepe van akkor, amikor a sérülés helyén kitapadni igyekvő sejtekre, molekulákra hatnak, miközben a képződő trombus okozta érkeresztmetszet alakváltozás hatására az áramló folyadék reológiája is változik.

## Véráramlás, reológia

Az élő szervezet működésének alapvető feltétele a folyamatos anyagforgalom, melynek a jól szabályozott vérkeringés alapfeltétele. A rendszer felépítésében az érrendszer / vaszkulatura és a benne keringő vér – alakos (vörösvértestek, fehérvérsejtek, vérlemezkék) és nem alakos elemei (plazma alvadási faktorai és ionjai, molekulái) - vesznek részt. Ezek összehangolt működése biztosítja a homeosztázist.

A folyamat az erekben uralkodó áramlási viszonyok által meghatározott törvényszerűségeknek megfelelően működik.

A folyadékok áramlási tulajdonságával már az időszámítás előtti 4. évezredben is foglalkoztak, ekkor a kínaiak már víz folyadék tulajdonságain alapuló időmérő eszközt használtak. Az időszámítás előtt több mint egy évezreddel Amenemhet fáraó megállapította, hogy a hőmérséklet befolyásolja a víz viszkozitását, ezáltal a vízórat is. A vérkeringés áramlási tulajdonságainak tanulmányozása lényegesen később kezdődött: 1616-ban William Harvey jutott arra a következtetésre, hogy a vér zárt rendszerben körbe forog, 1686-ban Marcello Malpighi tanulmányozta a tüdő kapilláris ereiben a vér körforgását. Az áramlástan történetében fontos lépésként 1687-ben Newton megalkotta a viszkozitásra vonatkozó törvényt, miszerint az áramlási sebesség és az erő (súrlódási erő) közötti arány állandó. A nyírófeszültséget az áramlás irányába eső egységnyi felületre ható érintő erőnek definiálta [29]. Folyadékok esetében a nyírófeszültség ( $\tau$ ) lineárisan arányos a sebességgradienssel ( $\dot{\gamma}$ ). Ez az arányossági állandó a folyadék viszkozitása ( $\eta$ ;  $\tau = \eta \cdot \dot{\gamma}$ ). Az 1840-es években Poiseuille tanulmányozta a bioreológiai jelenségeket, *in vitro* és *in vivo*, - ez utóbbit állatok mikrocirkulációján - és megalkotta a viszkozus közeg áramlásáról a törvényét. 1921-ben Fahraeus írt egy átfogó tanulmányt a vér szuszpenzió stabilitásáról.

Tüdőembólia tanulmányozása alapján Virchow már 150 éve leírta, hogy a képződő trombus vaszkuláris és koagulációs faktoroktól függ [30]. Az áramlási paramétereket később, mások tették Virchow elméletéhez, de „Virchow's triad”-ként emlegetik e három – modern formában: sztázis, endotél-sérülés és hiperkoagulabilitás - tényezőt.

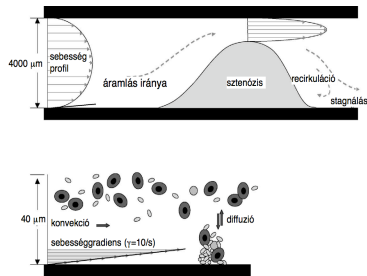
Mára már elfogadott állítás, hogy a trombusképződés alapjai a vér áramlási paramétereinek a változása, az érfal egységének és a vér trombogén potenciáljának a változásai.

A trombózis és hemosztázis kutatás viszonylag új területe az áramlás során fellépő erők hatásának a vizsgálata [31].

A véráramlás mechanizmusának megértéséhez az érrendszert egy hosszú, állandó átmérőjű hengernek, a vért összenyomhatatlan / newtoni folyadéknak tekintjük, amely állandó nyomás hatására, laminárisan áramlik. Réteges, vagy lamináris áramlás esetén a folyadékrétegek belső súrlódásának hatására az egyes részecskék egymással és az ér tengelyével párhuzamosan haladnak, sebességük az áramlás tengelyében a legnagyobb, az érfalnál a legkisebb. A vér (elképzelt) rétegei ilyen körülmények között különböző sebességgel csúsznak el egymáson és egy parabola alakú áramlási (sebességi) profilt képeznek az ér átmérőjén. A sebesség gradiens – és



így a nyíróerő nagysága is – ilyen módon az érfalnál lesz a legnagyobb és az érben áramló vér tengelye felé csökken. Az alakos elemek közül legnagyobb sebességgel a vörösvértestek haladnak az ér, illetve az áramlás tengelyében. A fehérvérsejtek kisebb sebességgel, az érfalhoz közelebb sodródhatnak a vérárammal, míg a trombociták haladnak a legkisebb sebességgel, közvetlenül az érfal mellett, viszont rájuk hat a legnagyobb nyíróerő, (2. ábra) [32].



**2. ábra.** Az áramló vér hemodinamikája, az intravaszkulárisan fellépő nyírófeszültség és sebességgradiens.

Felső rész. A vér parabola áramlási profilt képez, felgyorsul amint az ér szűkületén halad, közel a sztenózis csúcánál sokkal nagyobb lesz a sebességgradiens ( $\gamma_w$ ) értéke. A sztenózis után a folyadékrétegek szeparálódhatnak egymástól, amint lassulnak. Stagnáló zónákat és visszaáramló területeket képezhetnek.

Alsó rész. Míg konvektív erők viszik előre a sejteket, koagulációs faktorokat és ihibitorokat, az ér közepén áramló rétegben, a diffúziós erők a radiális mozgást mediálják a faltól el és vissza. Az áramlási profil nagyon alacsony sebességgradienst mutat ( $\gamma_w$ ). Az ábrán egy jellemző koronária ér van, mindkét rész méretarányos.

mutat ( $\gamma_w$ ). Az ábrán egy jellemző koronária ér van, mindkét rész méretarányos.

**Nyíróerő** 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] =  $[10^6 \text{ din}]$ ). Az erő iránya mindig olyan, hogy a relatív megcsúszást akadályozni igyekszik.

A **nyírófeszültség** vagy „ang.: *shear stress*” ( $\tau$ , SI dimenziója  $[\text{N/m}^2]$ ; CGS rendszerben  $[\text{din/cm}^2]$ ;  $1 \text{ N/m}^2 = 1 \text{ kg/(m*s)}$ ;  $1 \text{ N/m}^2 = 10 \text{ din/cm}^2$ ) 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  $\text{N/m}^2$  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,  $\tau = \eta (dv_z/dr)$ , ahol a  $dv_z/dr$  a helyi sebességgradienst jelenti, az  $\eta$  pedig a dinamikai viszkozitást (belső súrlódási együttható).  $\tau = \eta \cdot \gamma$  [ $\text{N/m}^2 = 10 \text{ dyne/cm}^2$ ] normál vérré számolva a nyírófeszültség,  $\tau = 0.04 \gamma$ , vagy  $\tau = \gamma / 25$  (vagyis a nyírófeszültség= sebességgradiens / 25).

A dinamikus **viszkozitás** a folyadék anyagi minőségének és állapotának (hőmérséklet) jellemzője (jele a  $\eta$ , de gyakran használják a  $\mu$ -t, SI mértékegysége  $[\text{Pa*s}]$  vagy  $[\text{N/m}^2 * \text{s}]$ ; CGS mértékegysége a [P] (poise, Jean Louis Marie Poiseuille neve után);  $1 \text{ P} = 0,1 \text{ Pa*s}$

A viszkozitás a normál vérré jó közelítéssel  $0,0038 \text{ Pa*s}$ , kerekítve  $\sim 4 \times 10^{-3} \text{ Pa*s}$ .

A **sebességgradiens** vagy „ang.: *shear rate*” ( $\gamma$ , dimenziója  $[1/\text{s}]$  vagy  $[\text{s}^{-1}]$ ) 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.  $\gamma = dv/dr$ ,  $[\text{s}^{-1}] = (\text{m/s})/\text{m}$ . Lassú áramlás mellett a

vér viszkozitása magasabb, mint nagy áramlási sebességeknél. A vörösvértestek rendeződése és a fibrinogén növeli a viszkozitást, ami azt eredményezi, hogy alacsony áramlási sebességek esetén a vér nem tekinthető tökéletes Newtoni folyadéknak. A határérték, amelytől a vér már Newtoninak tekinthető,  $200 / \text{s}$  sebességgradiens. Az alacsonyabb sebességnél tapasztalható magasabb viszkozitást általában a kis sebességnél a szorosan egymáshoz tapadó, (pénztekercsbe rendeződő) vörösvértestek hatásával magyarázzák. Magasabb sebességnél, azonban ez a hatás megszűnik, mivel a szabályosan rendezett vörösvértest alakzatok szétesnek. Egészséges nagy erekben a vér newtoni folyadéknak tekinthető, mivel az ér átmérője jelentősen meghaladja a vérben található részecskék méretét és a sebességgradiens is elegendően nagy ahhoz, hogy a részecske interakciók hatása ne legyen jelentős.

A fenti összefüggés segítségével meghatározható az artériákban, vénákban, ill. azok sztenotikus szakaszaiban fennálló nyírófeszültsége, (1. táblázat). (A dimenziók alsó indexében néhol „w” van feltüntetve, ami a „wall of the vessel” vagyis az érfalra utal.) Szűkült erek esetében a nyírófeszültség a  $15 \text{ N/m}^2$ -t is meghaladhatja.

| Ér                  | Átmérő [cm]       | Q; áramlási sebesség [cm <sup>3</sup> /s] | „shear rate” [s <sup>-1</sup> ] | „shear stress” [N/m <sup>2</sup> ] |
|---------------------|-------------------|-------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| A. ascendens        | 2,3 - 4,5         | 100                                       | 50 - 300                        | 0,17 - 1                           |
| A. femoralis        | 0,5               | 4                                         | 325                             | 1,1                                |
| A. carotis communis | 0,6               | 5                                         | 235                             | 0,8                                |
| Carotis sinus       | 0,5               | 3                                         | 240                             | 0,8                                |
| A. carotis externa  | 0,4               | 2                                         | 330                             | 1,1                                |
| Kis artéria         | 0,03              | $4 \cdot 10^{-3}$                         | 1500                            | 5,3                                |
| Arteriola           | $3 \cdot 10^{-3}$ | $6 \cdot 10^{-6}$                         | 1900                            | 6                                  |
| Kapillaris          | $6 \cdot 10^{-4}$ | $0,8 - 6 \cdot 10^{-8}$                   | 370 - 2800                      | 1,2 - 9,3                          |

**1. táblázat.** Néhány ér áramlási jellemzője [33].

A reológiai alapok ismerete lehetőséget ad az áramlásfüggő trombusképződés tanulmányozására, azonban a funkcionális vaszkuláris hálózat sokkal bonyolultabb összefüggéseket feltételez. Pl. metabolikus stimulus hatására az erek átmérőjének adaptív változása [34], vagy a viszkozitás változása az erek átmérőjének és a felszíni endotélsejt rétegvastagságának függvényében [35]. Azt is figyelembe kell venni, hogy a trombus dinamikus reológiai körülmények között növekszik, hiszen a növekedésével az ér átmérője egyre kisebb lesz.

A trombózis folyamata változó reológiai körülmények között, a trombus növekedésével érelzáródás felé halad. A trombózt 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 szöveti faktor (tissue faktor, TF) és a TF útvonal inhibitor, 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, melyek mindamellett, hogy megváltoztatják az aggregátum vagy a sejtfa biokémiai viselkedését, hatékonyan növelik a helyi vérviszkozitást. Tehát a hemodinamikai erők nemcsak specifikus anatómiai helyek trombózisképződésre hajlamosító sajátosságát befolyásolják, de a trombusok biokémiai összetételét és a trombusképződési reakciók útvonalait is. [32]

A súlyos megbetegedések jelentős hányadát teszik ki a szívinfarktus és az agyi trombózisokkal összefüggő artériás megbetegedések, a vénás tromboembóliás események, amelyek során a trombusképződés folyamatának a szabályozása elégtelen. Továbbá, a rákos betegek elhalálozásának a második fő oka a vénás trombózis. Ezért a trombusképződés molekuláris és sejtszintű alapjainak a kutatása igen fontos terület [36], [31].

Az érrendszeri sérülések során biztosan lejátsszódó folyamat a trombocita aggregáció, a hemosztázis és az artériás trombózis. Már régóta feltételezett, hogy a trombocita aggregációt és a trombus növekedését az érrendszeri sérülés során nem az érendotél alatti trombogén anyag indítja be, hanem ott keletkező, de oldható agonista. Nesbitt munkacsoportja nagyfelbontású intravitális képalkotó technikákat és hidrodinamikai analízist alkalmazva kimutatta, hogy a trombocita aggregációt elsősorban a vér áramlási paramétereinek a változása hajtja (reológia), és a folyékony agonistáknak csak másodlagos szerepük van, mégpedig az aggregátumok képződésének a stabilizálása. Cikkükben azt írják, hogy válaszul az érrendszeri sérülésre, a trombusok kezdetben korong alakú trombocitákból álló aggregátumok fokozódó stabilizációján keresztül alakulnak ki. A vérkeringés dinamikájának elemzésével bizonyították, hogy az alacsony nyírófeszültségű zónákban, amelyek az áramlási vonalak mögött képződnek a távolodó áramlás során, korong alakú trombociták kapcsolódnak a képződő trombusokhoz. Eközben stabilizálódnak a membránköthelyek dinamikus átrendezésétől függő aggregátumok. A tanulmány a vérkeringési paraméterek változásainak protrombotikus hatását, mint a trombocita aggregációt és trombus növekedést vivő folyamatoknak az alapvető fontosságát hangsúlyozza [37].

Az áramlás körülményeitől függően regulálják a hemosztázist az erek belső falát borító endotélsejtek is [38].

|                                                       |                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Extracelluláris mátrix komponensek                    | Fibronektin, Laminin, Kollagén I, II, III, IV, VIII, XVIII, Proteoglikánok, Proteázok                       |
| Hemosztatikus funkciókat ellátó faktorok, aktivátorok |                                                                                                             |
| Antikoaguláns aktivitás                               | PGI <sub>2</sub> , Thrombomodulin, AT III, tPa, heparin szulfát                                             |
| Prokoaguláns aktivitás                                | VWF, TXA <sub>2</sub> , Tromboplasztin, Faktor V, PAF, PAI-1, PAI-2                                         |
| Lipid anyagcsere                                      | LDL-receptor, Lipoprotein lipáz                                                                             |
| Gyulladásos mediátorok                                | IL-1, 6, 8, LTB <sub>4</sub> , C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> , E <sub>4</sub> , MCP-1, MCP-2, MHC II, CAM |
| Vazomotoros funkciókat ellátó faktorok, aktivátorok   |                                                                                                             |
| Vazodilatáció                                         | NO, PGI <sub>2</sub> /E <sub>2</sub> , EDHF                                                                 |
| Vazokonstriktó                                        | ACE, TXA <sub>2</sub> /F <sub>2a</sub> , EDCF, Leukotriének, Szabad gyökök, Endotelin                       |
| Növekedési faktorok                                   | PDGF, EDGF, FGF, IGF, TGF-β, GM-CSF, G-CSF                                                                  |

2. táblázat. Az endotélsejt [38]

Az erek belső falát borító endotél sejtek a vérkeringés során fellépő nyírófeszültség változásra igen sok válaszreakciót adnak [39]. 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 nyírási-indukált válaszreakciókat hoznak létre az endotéliumban [40]

Trombogén felszín, adhezív molekulák és molekulahálók szerepe a trombusképződésben

A biológiai hálót képző molekulák közül a hemosztázis és trombózis három alap molekulája a fibrinogén, a von Willebrand faktor (VWF) és a kollagén. A fibrinogén a természet egyik legerősebb szálaivá válva fibrin alvadékká alakul, magába kötve a képződés helyén jelenlévő sejteket és molekulákat [41]. A VWF a trombocitát megragadó hálóvá alakul. A kollagén pedig, mint

megfelelően térhálósodott struktúra a VWF molekula rögzülési helye az endotél alatti mátrixon. Elektronmikroszkopos, NMR és röntgenkristallográfiás technikák, az AFM technika (először valamilyen felszínen rögzített molekulák vizsgálata kontakt módon, folyadék alatt vagy levegőben, majd oszcilláló módon, később a molekulák átalakulását is követő dinamikus módon) közelebb vittek ezen molekulák és a feladatuk ellátásához nélkülözhetetlen hálós struktúrák képződésének a megismeréséhez [42].

### Endotélsejtek alatti mátrix, kollagén és a kollagén mátrix

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 endotél sejtek termelik és juttatják a keringésbe, pl. az NO és a  $\text{PGI}_2$  trombocita gátlókat, vagy a felszínükön megjelenítik a CD39-et, amely a trombociták aktiválódásakor keletkező gyors visszacsatoló aktivátort, az ADP-t bontja el. Ez az antitrombotikus hatás azonban nagyon hamar aktivációs hatássá változik, amikor a sérülés hatására az erek endotélsejtjei alatti extracelluláris mátrix (ECM) szabaddá válik. Az ECM összetevőinek kvalitatív és kvantitatív és kvantitatív változásai határozzák meg az ECM trombotikus (esetleg vérékenységet okozó (Ehler-Danlos szindróma) tulajdonságát [43], [44].

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 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 szerkezetük 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 tipikus kollagén minden harmadik aminosava glicin (33%) és általában  $(\text{Gly-X-Y})_n$  ismétlődő tripletekből áll, ahol az X többnyire prolin, az Y pedig hidroxiprolin. Az aminosav sorrendnek ez a szigorú meghatározottsága lehetővé teszi olyan hármas hélix létrejöttét, amelynek belseje tökéletesen hidrofób jellegű. A kollagén mátrix hemosztázis szempontjából alapvető tulajdonsága, hogy jól köti a VWF-t, a nagy nyíróerőknek ellenálló trombus képződésének az alapja a VWF rögzülése. A VWF a kollagénen kívül a dekorinhoz, a heparinhoz, a kondroitin és a dermatán szulfátokhoz is jól kötődik. Az extracelluláris mátrix szerveződésében igen fontos szerepet játszik a dekorin, amely egy kis proteoglikán. *In vitro* kísérletben ez a molekula megakadályozza a VWF heparinhoz való kötődését. [45].

A kollagén triplahélixével létrejövő fehérje-kölcsönhatások fontos szerepet játszanak a kollagén fibrillum képződésben, a sejtadhézióban és a jelátvitelben. Szintetikus triplahelikális peptidek

azonban nem bizonyultak alkalmasnak a kollagén specifikus kötőhelyeinek felismerésére [46]. A szekvencia specifikus kollagén felismerésben két integrin-peptid komplexre korlátozódik a strukturális ismeretünk. A kis sebességgel mozgó trombociták a GPIIb ( $\alpha_2\beta_1$ ) integrinnel kötődnek a kollagénekhez. I-es és II-es típusú kollagénben ennek a fő integrinnek kötőhelye a GFOGER motívum (az O 4-hidroxiprolint jelöl) [47]. 2008-ig ez volt az egyetlen kollagén-protein komplex, amit atomi részletekben sikerült megismerni, tanulmányozva az  $\alpha_2$ I-domén és egy 21 aminosav maradékot tartalmazó triplahelikális kollagén peptid kristályszerkezetét. 2008-ban sikerült azonosítani egy másik kötőhelyet, amely igen konzervatív az I-es és III-as típusú kollagénekben. Ez a GVMGFO motívum, amely kb. 100 aminosavval fejjebb (kb. 30 nm) van a GFOGER motívumtól. A GVMGFO motívum a fibrilláris kollagénekben 3 független fehérjét köt: VWF, a discoidin domén receptor 2-t (DDR2-t), és az extracelluláris mátrix SPARC / osteonectin / BM-40 fehérjét (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine). Egy közleményben 3,2 Angström [Å] felbontásban vizsgálják a SPARC-nak egy tripla-helikális, 33 részből álló kollagén peptid résszel alkotott kristályszerkezetét. A SPARC a glikoproteinek családjába tartozik, 34 kDa a molekulatömegű, sejtekhez és extracelluláris mátrixához kötődik. Három doménből áll, amelyek közül legalább egy részt vesz a sejtek adhéziójában, proliferációjában, a mátrix szintézisében. A figyelem középpontjába került mostanában, az angiogenezis regulációjában, a sebgyógyulásban, a tumor növekedésében betöltött szerepe miatt. A kollagén peptidben közepén GVMGFO motívum van. A SPARC felismeri a GVMGFO motívumot és kollagént láncokká zárja a peptideket, az oldószér számára hozzáférhetetlenné téve 720 Å<sup>2</sup>-nyi területet a kollagén felszínén. A SPARC-kötés nem torzíja a kollagén peptid kanonikus tripla hélix szerkezetét. Ezzel szemben a SPARC-ban a kollagén kötés után egy fontos hurok lényegesen átrendeződik, egy mély zsebet hozva létre, amely befogadja a kollagén láncok fenilalanin maradékát („Phe”-zseb). Ez a nagyon szigorúan rendezett zseb közös a kollagén-kötő integrin I-doménekkel, de nagymértékben különbözik a trombocita receptor glikoprotein VI és a mikrobiális adhezinek sekély kollagén-kötő barázdáitól. A szerzők feltételezik, hogy a GVMGFO kötődése a VWF-hez és a DDR2-höz hasonló változásokat eredményez, és „Phe”-zsebet hoz létre ezekben a molekulákban [48]. A kollagén a koaguláció kontakt fázisát is aktiválja: a XII-es faktort (FXII), a XI-est (FXI), a prekallikreint és a nagy molekulatömegű kininogént (HMWK). Ezzel a kérdéskörrel és a kollagénekhez kapcsolódó fibrinolitikus folyamatokkal kiváló magyar munkacsoport foglalkozik [49].

A VWF kollagén kölcsönhatás mechanizmusának megismerésére törekedtünk egyes munkánkban. A kölcsönhatás gátlásán keresztül ható anyagok az aterotrombózist megelőző gyógyszerek fejlesztésére szolgálhatnak.

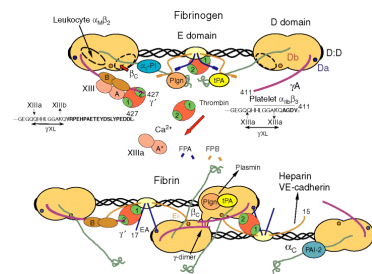
### Fibrinogén, fibrin és a fibrin háló képződés, a trombin szerepe

A plazmában 2-4 g/L koncentrációban keringő fibrinogén molekula 340 kDa molekulatömegű glikoprotein. A hepatociták és a megakariociták szintetizálják [50].

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 faktorról, másnéven

fibrin stabilizáló vagy Laki-Lóránd faktorral kapcsolódott össze.[51], [52], [53], [54], [55], [56]. Munkásságuk alapján vált ismertté, hogy trombin katalizált proteolitikus folyamatban a fibrinogén fibrinné alakul, a fibrinopeptid A és B lehasítása valamint a polimerizációs végek szabadbá válása közben. A polimerizációs végek szabadbá válása lehetővé teszi a fibrin molekulák egymáshoz kapcsolódását, háló képződését. A XIII-as faktor által katalizált reakcióban a folyamat tovább megy, a fibrinszálaból a fibrin molekulák  $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})\text{lizin}$  kovalens kötéseivel stabil háló képződik. A hálóba fogott trombociták és / vagy vörös vértetek (áramlási sebességtől függően) a trombus fő tömegét képezik. A stabil fibrinháló képezi a sejtek megtapadásának az alapját a sebgyógyulás és az angiogenesis folyamatához. A fibrinolitikus folyamatban ez a háló lebomlik. A fibrinogén és a fibrin [fibrin(ogén)] molekula, önmaga is regulálja funkcióját a vérárvadásban, a fibrinolízisben, a sejtek és a mátrixok kölcsönhatásában, a gyulladásos válaszbán, a sebgyógyulásban, és az új sejtek képződésében.

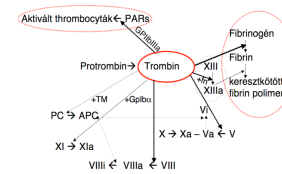
A fibrinogén három polipeptid láncból ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) összecsavarodott, és diszulfid hidakkal dimerizálódott hexamer pálcá-szerű, trinoduláris oktaglobuláris szerkezet, amelynek hossza 46 nm és átmérője 9 nm.



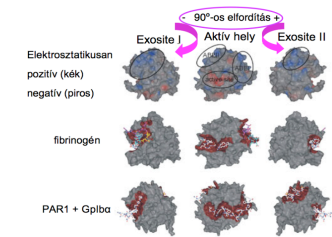
3. ábra. A fibrinogén szerkezetének, fibrinné alakulásának, és a FXIII -FXIIIa átalakulásának rajza. Proteinek, enzimek, receptorok és más, a fibrin(ogén) funkcióját szolgáló molekulák kötőhelyei is meg vannak jelölve [57].

A humán fibrinogén kristályszerkezete 3,3 Å felbontásban kicsit különbözik a korábban meghatározott natív csirke- és részlegesen proteolizált marha fibrinogén molekula szerkezetétől (1) az összetekeredett (*coiled-coil*) régióknak a hajlásában, (2) a  $\beta$  láncok ellentétes irányú, párhuzamos elrendeződésében van egy új kapcsolat és (3) a *coiled-coil* régióknak is van egy tangenciális kapcsolata a szomszédos molekulákkal. Hasonlóan a csirke fibrinogénhez, az  $\alpha$ C domén elektronenzitása nem értékelhető. Ezzel a struktúrával az oldatban lehetséges fibrinogén konformációk száma nő [58] [59].

A fibrinképződés proteolitikus enzime a szerin proteáz trombin. A trombin katalizálja a fibrinogén átalakulását fibrinné, miközben a hemosztázist sok más ponton is befolyásolja (4., 5. ábra) [60], [61]. Aktiválja az V-ös, VIII-as és XI-es faktorokat. Beindítja a trombocita aktiválódást, a porteáz-aktivált receptorok (PAR- 1 és 4), a glikoprotein Ib- $\alpha$  receptoron keresztül [62]. A trombin antikoaguláns hatást fejt ki a protein C és a fibrinolízis inhibitor (TAFI) aktiválása útján. A trombusképződésben betöltött 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 [63].



4. ábra. A trombin hemosztázist befolyásoló hatásai



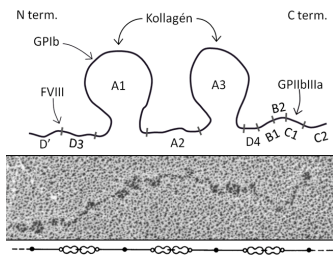
5. ábra. A trombin kötőhelyei [60]

## VWF és a VWF háló

A VWF a vér fehérvérjé 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 [64].

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 (6. ábra).



**6. ábra.** A VWF elektronmikroszkópos képe és multimer szerkezetének sématisztikus ábrázolása. Az ábra felső részén a VWF doménjeinek vázlatos ábrázolása és a nyílakkal jelölve a doméneken a fontosabb kötőhelyek láthatóak. Az alsó részen egy VWF multimer elektronmikroszkópos képe látható [65]

Többen igazolták azt a feltételezést, hogy a VW molekula globuláris formában kering, és áramlás hatására „kitekerekedik”, egymáshoz kapcsolódik [66], fonalat képez [67]. Barg és munkatársai szilánizált csillámpalán nagy sebességgradienssel áramoltatva rögzítettek VWF-t, amelyből trombocitákat kötő, aktív, 300  $\mu\text{m}$  hosszúságot is elérő szálakból álló filamentózus hálózat képződött. Mikroszkópos megfigyelésekkel (AFM és immunfluoreszcencia) igazolták, hogy a háló képződéséhez nagy VWF koncentráció, legalább 2,1  $\text{N/m}^2$  (21  $\text{dyn/cm}^2$ ) nyírófeszültség és alacsony hidrofóbicitású kötő felszín szükséges. Amikor a globuláris VWF multimer kinyúlik, a vérelemek 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 vérelemek 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 esszenciális trombocitámiában (ET), [68].

A VWF az endotélsejteken, kis mennyiségben a megakariocitákban képződik, az endotélsejtek Weibel-Palade testeiben raktározódik, a plazmában, a trombociták  $\alpha$ -granulumaiban és az endotél alatti mátrixban van.

A VWF génje a 12-es kromoszóma rövid karján található (12p13.3, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7450>). A szintézis során ~278 kDa molekulatömegű alegységek épülnek fel, melyek C terminális diszulfid hidakkal dimerizálódnak, majd N-terminális diszulfid hidakkal a dimérek összekapcsolódásával multimeret alkotnak. A multimerben a szabályosan növekvő számú dimérből álló egységek, ~540-tól 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 VWF alegységek az endoplazmás retikulumban dimerizálódnak és a transz-Golgi rendszerben diszulfid kötésekkel multimerekké kapcsolódnak össze. A Golgiban az alacsony pH és a chaperonok hiánya nem kedvez a diszulfid hidak kialakulásának. A VWF esetén ez úgy lehetséges, hogy a propeptid egyfajta chaperonként viselkedik és oxidoreduktáz aktivitással is rendelkezik. A VWF multimereket csőszerű, szorosan összerendezett formát alkotnak az endotélsejtek Weibel-Palade testecskéiben. A multimer szerkezet és a szoros csőszerű elrendeződés függ az alacsony pH-tól és  $\text{Ca}^{2+}$ -tól. Szekréció folyamán az óriás VW multimerek összegabalyodás nélküli kibomlását az extracelluláris közeg semleges pH-ja teszi lehetővé. [69].

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 átirás utáni módosulás igen nagyfokú, amely 12 N-kötött és 10 O-kötött glikozilációs oldalláncot eredményez minden érett monomer egységen. Négy potenciális N-kötött glikozilációs lehetőség van a propeptiden is. Összesen a molekulatömeg 20%-a szénhidrát. Az N-kötött glikánok mutációjával végzett vizsgálatok igazolták, hogy azok meghatározó szerepet játszanak a molekula szintézisében és expressziójában [70].

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 GPIb $\alpha$  glikoprotein kötőhelye, a VI-os típusú kollagén megkötésében is részt vesz, és kötőhelyek találhatók rajta 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  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  kötőhelye. A D'-domén 1-272 aminosav szakaszán a VIII alvadási faktor kötőhelye valamint heparin kötőhely található. A VWF alegységek doménjeinek konformációja és funkciója valószínűleg független a multimerizáció fokától.

A VWF és a GPIb-vel való kölcsönhatása rendelkezik néhány figyelemreméltó tulajdonsággal, amely különösen alkalmassá teszi feladatának ellátására. A VWF nagy, több azonos alegységből felépülő polimer (akár >40 alegység – >20 MDa), mindegyik alegysége rendelkezik GPIb és kollagén kötőhelyekkel, így a kötőhelyek helyi sűrűsége magas. A VWF-GPIb-kölcsönhatás asszociációs és disszociációs sebessége nagy, valamint az örök hatása kétfázisú, amely lehetővé teszi a trombociták görgését, kitapadását és leválását az erőktől függően [71].

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 [72]. Érdekes ez az eredmény és feltáratlan az aktivitásban és a mennyiségben mért féleletidők közötti különbség oka.

Az a megfigyelés, hogy a nagyon nagy VW multimerok fogyása a keringő trombociták számával arányosan fokozott esszenciális trombocitámiában (ET), arra utalt, hogy nem igaz az a feltételezés, hogy a VWF-nak a keringésben nincs affinitása a trombocitákhoz [72].

A vérben a multimer egyensúly proteolitikus szabályozás alatt áll. A normál multimerméret feltétele a normál hemosztázisnak. Genderen 1997-es közleményében az esszenciális trombocitámiás betegek VWF hemosztázisát vizsgálva azt is megállapította, hogy ET betegek esetén a VWF féleletideje antigén szint alapján nem különbözik szignifikánsan a kontrollokétól, azonban a kollagénkötő aktivitás 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 [73], [74].

A plazma ADAMTS13 enzim szintjének és aktivitásának mérését alkalmazzuk klinikai tanulmányainkban, de ezek az eredmények még csak előadásokban szerepeltek, így a mű későbbi részében térek ki az ismertetésükre.

## A trombociták és szerepük a trombusképződésben

A vér áramlása közben a trombociták az érfa közelében haladnak és rendszeresen érintkeznek az érfa bélő endotélsejtekkel, miközben a sérülések javításával hozzájárulnak az endotélréteg folytonosságának biztosításához. Ezek a mikroszkópiusan diszkoid alakú, mag nélküli sejtek nyugvó állapotban vannak mindaddig, míg fiziológias vagy patológias hatás nem kényszeríti őket aktivációra. Sérülés helyén kitapadnak az érfa falhoz, a koaguláció és a sebgyógyulás folyamatának katalizálása közben szolgálnak a normál hemosztázis fenntartását [36].

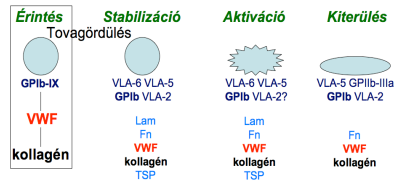
A trombocita a megakariocitákból képződik, az összes alkotórészével együtt (a kontraktilis, az alvadásiaktív és a hormonhatású fehérjék, a lipidek és a membránok). A megakariocitákban alakulnak ki a granulumok, a citoskeletáris rendszer, a nyitott csatornák, a receptor csoportok, majd a megakariociták 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 fiziológias aktivátora van, mint a trombin, a kollagén, az

ADP, a PAF, (nagy áramlási sebességnél a VWF) és egyes farmakológiai anyagok, mint a Ca-ionofor, a ciklikus endoperoxidok stb. Az aktivátorok specifikus receptorokon keresztül hatnak.

A trombociták adhéziója a sérült érfa falhoz 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 érfa lumen felé. 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 (GPIb 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 sebességsökkenés következik be, a sejt áramló mozgása a felszínen gördülő mozgássá változik. A gördülés alatt a VWF és receptorának (GPIb) 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 kaskád, 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 érfa lumen lezárják.

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 (7. ábra), mint a GPIIb-IIIa, majd a GPIb-V-IX receptor komplex.



elindítja más, mint a laminin (Lam), fibronectin (Fn), kollagén, trombospondin (TSP) és a fibrinogén (Fn) receptorok aktiválódását. A receptorok, más sejteken citokinek -very late activation antigens, zárójelben a cluster of differentiation elnevezésük szerepel [75]-, mint VLA-6 (CD49f), VLA-5 (CD49e), VLA-2 (CD49b) aktiválódása közben a receptor ligand kölcsönhatás mellett a trombocita membrán átrendeződik, kapcsolódnak hozzá az aladási faktorok és kialakulnak az aladási kaszkádot vezérlő *tenase* és *prothrombinase* komplexek.

7. ábra. A trombocita változása a receptorok aktiválódása a VWF-fel való kölcsönhatásban. A VWF a trombocita GPIb receptorával kapcsolódva

Az indirekt kollagén – trombocita interakcióban számos adhezív fehérje játszik szerepet a megfelelő trombocita membrán receptorokkal kapcsolódva. A trombociták GPIb/VI/X receptora a VWF-on, a GPIIb/IIIa receptora (αIIbβ3) a VWF-on és a fibrinogénen, a GPIc/IIa receptor a fibronectin, a CD47 (*integrin-associated protein*) a trombospondinon, az α5β1, valamint α6β1 minor integrinek a fibronectin, illetve laminin keresztül kapcsolódnak a kollagénnel [76].

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/VI/X 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 kollagénnel való direkt kapcsolódást, de a GPVI receptor és a CD36 (GPIV, GPIIb) 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. A trombusképződés gátlását célzó legújabb gyógyszerkutatások a trombocita receptorokra irányulnak [77].

Az érfal adhezív váló felszínéhez történő trombocita adhéziót követően három reakciósorozat zajlik egymással párhuzamosan: a szekréció, azaz a vérlemezke alfa-granuluma és a plazmamembrán fúziója, valamint a „flip-flop”-reakció, a trombocitamembrán átrendeződése, s a főleg trombin, ADP, tromboxán A<sub>2</sub> hatására létrejövő trombocita-aggregáció (trombocita - trombocita kölcsönhatás). Az aggregációhoz, amely a trombociták receptoraikon át történő egymáshoz kapcsolódása, a trombociták adhézió során bekövetkező aktivációja szükséges. Fiziológias és patológias trombocita agonisták képesek jelátviteli útvonalakon keresztül aktiválni a trombociták GPIIb/IIIa receptorait. A legtöbb aktivátor, lokális válaszként a sérült érfalról 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 fehérjei mind hozzájárulnak, hogy az érsérülés helyén az aggregálódott trombociták irreverzibilis fúziója jöjjön létre.

A sérülés helyén keletkező trombin a plazmában keringő fibrinogént lokálisan fibrinné alakítja; a trombociták aggregációját és szekrécióját potenciálja, ezen kívül a XIII-as faktort is aktiválja, amely kovalens kötésekkel stabilizálja a képződő fibrinhálót. A receptoraival a felszínhez és egymáshoz rögzült trombociták és a fibrinszálak hálózata a trombuszt a képződés helyén stabilizálja.

A trombocita adhézióban a VWF jelentősége a VW betegséget létrehozó mutációjában nyilvánul meg, ami vérzékenységre hajlamosít.

Nesbitt és munkatársai nagy felbontású, *intravitális* képalkotó technikákat és hidrodinamikai analízist használva megfigyelték, hogy a trombociták aggregációját a vér áramlási paramétereinek a változásai viszik előre, az oldható agonisták / aktivátorok szerepe csak másodlagos, a korábban képződött aggregátumokat stabilizálják [37]. A trombusok a diszkoid alakú trombociták progresszív stabilizálódásaként képződnek. A vér áramlásának dinamikáját analizálva azt igazolták, hogy a képződő trombusoktól lefelé áramolva, az alacsony sebességgradiensű zónákban megtapadnak a diszkoid alakú trombociták és a dinamikus membrán pányvák (tethers) képződésétől függően az aggregátumok stabilizálódnak. A közleményben a vér megváltozott áramlási paramétereinek protrombotikus hatását is hangsúlyozzák. Nagy sebességgradiens esetén, az áramló trombociták adhéziója során, a hemodinamikai húzóerők filamentózus membrán pányvákat -lipid kettősréteg hengereket- húznak ki a diszkoid trombociták felszínéből, amelyeknek a felszíne kofaktorul szolgálhat a koagulációs kaszkádkhoz.

## A VWF funkciója

A nagy áramlási sebességgel jellemezhető erek sérülésekor a von Willebrand faktor (VWF), a szubendotélium és a trombociták között teremt kapcsolatot. Nagy nyíróerők hatása alatt a trombociták rögzülő majd elszabaduló mozgások sorozatából álló gördülését biztosítja. Annak ellenére, hogy a VWF és a trombociták együtt vannak a keringésben, összekapcsolódásuk nem következik be, amíg a VWF kapcsolatba nem lép a szubendotéliummal. Arra is vannak adatok, hogy, ha a fiziológiástól öt-tízszere nagyobb sebességgradiens alakul ki valamelyik érben, a VWF kötődik a keringő trombocitákhoz és közvetíti azok egymáshoz kapcsolódását. Sok kísérleti eredmény utal arra, hogy a VWF sebességgradiens specifikus „aktivitása” a molekula egy-egy doménjén belüli változásaiból vagy a domének illetve ismétlődő alegységek egymáshoz való viszonyának változásából adódó nagyobb affinitást/aviditást eredményező konformációváltozások okozhatják [78].

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

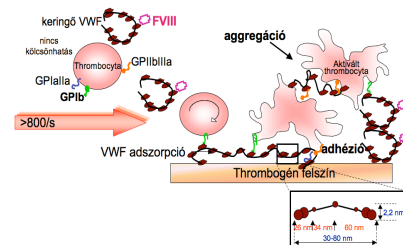


népesség 1%-át érinti). A nagy multimerek hiánya funkció veszteséssel jár, vérzékenységet okoz, a nagyon nagy multimerek viszont nagyon trombogének, a trombusképződés mértékét növelik [79] [80].

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 A1 domén-GPIb kötés mechanokémiai tulajdonságát jellemezi Kim 2010-es közleményében, általuk szintetizált molekulát és optikai-csipeszt alkalmazva [81] és egy új kötéstípust ismertet. A receptor és ligand molekula kötött és nem kötött állapota közötti átmenetet figyelték és az elszakadást mérték, 2-68 pN közötti erőt alkalmazva. A rugalmas kötés egyik állapota 10 pN erő alatt, a másik 10 pN -nél kezdődik, ekkor 20-szor hosszabbá válik a kötés életideje és a stabilítása is nő. Ez utóbbi a rugalmas kötés („flex-bond”) a csúszó („slip-bond”) és a fogó („catch-bond”) kötések közötti kapcsolat, amely szerint nem is fogó kötések jönnek létre a növekvő erő hatására, hanem a csúszókötések egy második populációja. Ezzel a kötésfajtaival jól magyarázható a trombociták VWF-hoz kötődése, majd a növekvő erő ellenében történő trombocitadugó képződés.

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 (GPIb) és a szubendotélium (kollagén és proteoglikánok) között, közvetíti a trombociták egymáshoz való kapcsolódását is a GPIb és GPIIb/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.



**8. ábra.** A VWF szerepe a trombociták adhéziójában és aggregációjában. Ha a sebességgradiens  $> 800\text{s}^{-1}$  vagy normál vér viszkozitással számolva a nyírófeszültség  $> 2,8\text{ N/m}^2$ , akkor a sérült szakaszon a vérzés fiziológiai megszűnése vagy a trombusképződés VWF függő folyamat. Ha a sebességgradiens  $> 2600\text{s}^{-1}$  vagy a nyírófeszültség  $> 10\text{ N/m}^2$ , akkor a trombociták VWF közvetítette aggregációja jelentős. A keretben található kiegészítő ábrán a VWF protomer sematikus elrendeződése látható. A két alegység egy centrális szimmetriatengely mentén illeszkedik, a pálcá és gömb által reprezentált domének dimenzióit jelentik a nyilak közötti nm távolságok [65].

A trombocita adhéziós tanulmányokhoz, a trombusképződési modellkísérletekhez szükséges a vér VWF szintjének és aktivitásának a meghatározása. Mivel a klinikai munkánk során és a kollaborációkban, ezekkel a vizsgálatokkal a von Willebrand betegség klinikai diagnosztizálásához is hozzájárulunk, a következő részben a rutin szintű vizsgálatok jelentőségéről is írok.

### A VWF mennyiségi és minőségi eltéréseinek klinikai jelentősége

A VWF mennyiségi, szerkezeti vagy funkcionális hibáinak a következménye a von Willebrand betegség (VWB). Az öröklött betegség a népesség 1%-át érinti. A betegségre jellemző, hogy a nagy nyíróerőjű áramlással jellemezhető helyeken jelentkeznek a vérzéses tünetek. A bőr- és nyálkahártyavérzések a legjellemzőbbek: orrvérzés, fogínyvérzés, foghúzást követő tartós vérzés, elhúzódó menstruációs vérzés. A molekuláris patomechanizmus ismeretében a betegséget típusokba és altípusokba sorolták.

Az 1-es és 3-as típusú VWB hátterében a VWF mennyiségi rendellenessége áll. Az 1-es típusú VWB-ben a VWF mennyisége enyhén csökkent, öröklődése autoszomális domináns (AD). Az 1-es típusú VWB a leggyakoribb. Genetikai eltéréseket nagyon különböző helyeken találtak, a penetrációja pedig kicsi, ezért a diagnosztikája igen nehéz. Egyik 1988 óta ismert típusa a VWB Vicenza, amelynek a leírásához magyar kutatók is hozzájárultak [82].

A 3-as típusú VWB-ben a VWF nem, vagy alig detektálható a plazmában, a trombocitában és az endotél sejtekben egyaránt, autoszomális recesszív (AR) öröklődésmenetű.

A 2-es típusú VW betegséget átlátásban a nagy multimerek hiánya okozza, kivéve a 2M és 2N típusokat, amelyekben nincs nagy multimer hiány. 2A altípusban a bioszintézis zavart, általában misszensz mutáció az A2 doménben, míg a 2B altípusban fokozott a VWF affinitása a trombocita GPIb receptorhoz. A 2M altípusban csökkent a VWF funkció, míg a 2N altípusban a VWF VIII faktor kötőképesége csökkent. A 2-es típusú VWB-ek AD öröklődésmenetet mutatnak, kivétel a 2N típus, amely AR. A génhibák általában a VW molekula A2 doménjében okoznak mutációt.

A VWB kezelése érdekében igen fontos a pontos tipizálás, amely laboratóriumi tesztek eredményei nélkül lehetetlen. VWB diagnosztikájának két fontos klinikai és laboratóriumi komponense van: a vérzések típusa a személyes és a családi anamnézisben, valamint a VWF (kvantitatív vagy kvalitatív) defektusát alátámasztó laboratóriumi tesztek [83] [84], [85], [80].

A VWB laboratóriumi tipizálásáról az 3. táblázat nyújt áttekintő összefoglalót, amelyet a szerző engedélyével fordítottunk magyarra [86], [87].

A laboratóriumi vizsgálatokat szűrő-, diagnosztikai- és megerősítő-tipizáló módszerek csoportokba foglalva, a módszerek fejezetben ismertetem röviden.



## 3. táblázat

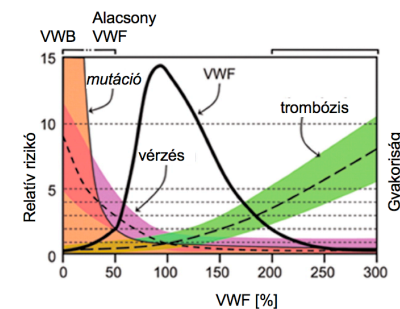
A von Willebrand betegség laboratóriumi tipizálása

| Laboratóriumi vizsgálatok             | von Willebrand betegség típusok |                                       |                            |           |                                             |            |
|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|-----------|---------------------------------------------|------------|
|                                       | 1                               | 2A                                    | 2B                         | 2N        | 2M                                          | 3          |
| <b>Szűrőtesztek</b>                   |                                 |                                       |                            |           |                                             |            |
| PI                                    | N                               | N                                     | N                          | N         | N                                           | N          |
| aPTI                                  | ↑ (N)                           | ↑ (N)                                 | N (↑)                      | ↑ (N)     | N (↑)                                       | ↑          |
| trombocita szám                       | N                               | N                                     | ↓ (N)                      | N         | N                                           | N          |
| PFA-100 záródási idő (kollagén-ADP)   | ↑ (N)                           | ↑/hiányzik                            | ↑/hiányzik                 | N         | ↑/hiányzik                                  | ↑/hiányzik |
| <b>Diagnosztikai tesztek</b>          |                                 |                                       |                            |           |                                             |            |
| FVIII:C                               | ↓ (N)                           | ↓ (N)                                 | ↓ (N)                      | ↓↓↓       | N (↓)                                       | ↓ (< 20%)  |
| VWF:Ag                                | ↓ (< 50%)                       | ↓ (N)                                 | ↓ (N)                      | N (↓)     | N (↓)                                       | ↓↓↓ (< 5%) |
| VWF:RCo                               | ↓ (N)                           | ↓ (< 30%)                             | ↓ (N)                      | N (↓)     | ↓ (N)                                       | ↓↓↓ (< 5%) |
| VWF:CB                                | ↓ (N)                           | ↓↓↓ (< 15%)                           | ↓ (< 40%)                  | N (↓)     | ↓ (N)                                       | ↓↓↓ (< 5%) |
| VWF:Ag/VWF:RCo                        | N (< 1,5)                       | ↑ (> 1,5)                             | ↑ (> 1,5)                  | N (< 1,5) | ↑/N                                         | változó    |
| VWF:Ag/VWF:CB                         | N (< 1,5)                       | ↑ (> 1,5)                             | ↑ (> 1,5)                  | N (< 1,5) | ↑/N                                         | változó    |
| VWF:CB/VWF:Ag                         | N (> 0,7)                       | ↓ (< 0,7)                             | ↓ (< 0,7)                  | N (> 0,7) | ↓ (N)                                       | változó    |
| VWF:CB/VWF:Ag                         | N (> 0,7)                       | ↓ (< 0,7)                             | ↓ (< 0,7)                  | N (> 0,7) | ↓ (N)                                       | változó    |
| <b>Megerősítő és tipizáló tesztek</b> |                                 |                                       |                            |           |                                             |            |
| VWF:FVIII kötő aktivitás              |                                 |                                       |                            |           |                                             |            |
| VWF:Ag/FVIII                          | N (< 1,7)                       | N (< 1,7)                             | N (< 1,7)                  | ↑ (> 1,7) | N (< 1,7)                                   | változó    |
| FVIII/VWF:Ag                          | N (> 0,6)                       | N (> 0,6)                             | N (> 0,6)                  | ↓ (< 0,6) | N (> 0,6)                                   | változó    |
| RIPA: risztocetin                     |                                 |                                       |                            |           |                                             |            |
| 0,5 mg/mL                             | hiányzik                        | hiányzik                              | van                        | hiányzik  | hiányzik                                    | hiányzik   |
| 1,0 mg/mL                             | ↓ (N)                           | ↓                                     | N                          | N         | ↓ (N)                                       | hiányzik   |
| 1,5 mg/mL                             | ↓ (N)                           | ↓ (N)                                 | N                          | N         | ↓ (N)                                       | hiányzik   |
| VWF multimerszerkezet elemzés         | normál sáv-mintázat, ↓ N        | hiányoznak a nagy és közepes multimer | hiányoznak a nagy multimer | N         | N, de lehetséges abnormális sávok jelenléte | hiányzik   |

A VWF csökkent funkcióját okozó mennyiségi vagy minőségi eltérések mellett egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak az emelkedett szintje és aktivitása miatt kialakuló trombotikus rizikónak.

## Fokozott trombusképződésre hajlamosító állapotot okozó VWF abnormalitások

Régóta ismert, hogy a nagy VW multimerek aktivitása nagyobb, mint 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 [79]. Jelenleg a VWF szerepét Sadler foglalta össze a legáttekinthetőbb módon, amint ezt a közleményéből vett ábra mutatja (9. ábra) [80].



**9. ábra.** A VWF szint, a vérzés, a trombózis rizikója és a VWF mutációk közötti összefüggés. A vastag folyamatos vonal a populáció VWF értékei gyakoriságának eloszlását és az 50-200% közötti 95%-os konfidencia intervallumot mutatja. A rövid szaggatott vonal rózsaszín sávval a vérzés rizikója, a hosszú szaggatott vonal zöld sávval a trombózis rizikója, a vékony vonal narancsszínű árnyékolással a VWF génmutációk és a VWF szintek összefüggését mutatja. A VWF 100 %, populáció szintű átlagértékénél 1 a relatív rizikó.

A <20% VWF szint általában 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) patológias állapotok között nincs éles határvonal. További alap kutatások 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.

A trombusképződési folyamatban a VWF közvetíti a trombocita adhéziót és aggregációt magas nyírófeszültség esetén (pl. koszorúartériákban, amelyekben sztenotikus vagy repedt ateroszklerotikus plakk léziók vannak).

Számos tanulmány vizsgálta a plazma VWF-szintje és a tromboembolikus kardiovaszkuláris folyamatok közti kapcsolatot. Annak ellenére, hogy az általános populációban nagyon gyenge a VWF és a vaszkuláris megbetegedésre való hajlam közötti összefüggés, a visszafordíthatatlan kardiális események értékelhető előrejelzője a VWF szint. Hasonlóképpen, a VWF általában emelkedik akut koronária szindróma során, és a VWF felszabadulás mértéke független előjele a klinikai kimenetel rossz irányának ezen betegeknél. Különböző eredetű bizonyítékok jelzik, hogy a VWF nem csak egy marker, hanem egy nagyon fontos közreműködő a miokardiális infarktus patogenezisében. A trombogenezisben betöltött központi szerepe miatt a kutatások ígéretes célpontja lett a VWF [88].

A szroke prevenció és pitvarfibrilláció III tanulmány szerint 1,2-szeresen nő a tromboembóliás sztróknak, a szívinfarktusnak és a halálnak a rizikója minden 20 % VWF szintemelkedéssel [89]. Nagy prospektív tanulmányok hasonló eredményeket közöltek. [90], [91], [92].

A plazma VWF szint a vénás tromboembóliák rizikójával is összefüggött 301 beteg esetét feldolgozó tanulmányban, akiknél az első mélyvénás trombózt követő antikoaguláns kezelés befejezése után legalább három hónappal mérték a VWF:Ag szintet és a FVIII aktivitást [93]. 150% fölött az esély arány 3,0 a 100% szinthez viszonyítva. Egérmodellen igazolták a VWF függő trombocita adhézió szerepét a vénás trombózisokban [94]. A rizikó egy része a FVIII indirekt hatásához köthető. Több mint 19 000 felnőtt eredményét feldolgozó populáció alapú tanulmány szerint 7,8 éves követés folyamán a FVIII és a VWF:Ag szintek külön is összefüggtek a trombózissal [95]. A középkorúak felső negyedben VWF-ra 4,6 volt a veszély aránya a felső 5%-ban pedig 7,6. Mindezek által populáció szinten a vérzés és a trombózis közös útvonalán a rizikó kis változása jelentős indikátor lehet.

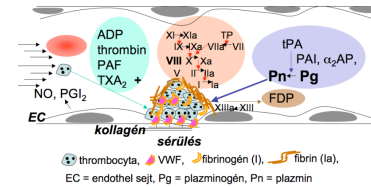
Három nagy prospektív tanulmány igazolta a VWF szint és a koronária vaszkuláris történet közötti összefüggést olyan betegeknek, akiknél kezdetben nem volt egyértelműen bizonyított az isémiás betegség [96], [97], [98].

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 [99]. A folyamat a pontos mechanizmusának feltárása jelen kutatások tárgya. Egyértelműen igazolták az öröklött ADAMTS-13 hiány, a hasítási folyamat elégtelen regulációja ULVWF felhalmozódásában és trombociták trombocitopéniás purpura (TTP) megjelenésében nyilvánul meg [100]. Mostanában megjelent közlemény szerint az ADAMTS-13 inaktivációja plazmin hatására is bekövetkezhet [101]. A TTP-t először 1924-ben Eli Moschowitz írta le. Öt fő kritériuma a hemolitikus anémia, a trombocitopénia, neurológiai és vesefunkció rendellenesség és láz. A tünetegyüttes ma már ritkán látható a korai diagnosztikának és a terápiának köszönhetően. Gyermekeknek a mikroangiopátiás hemolitikus urémiás szindróma (HUS) jár a TTP-nek megfelelő tünetekkel, amelynek a hátterében legtöbbször Shiga toxin okozta bakteriális fertőzés áll. A Shiga toxin VWF faktor szekréciójára kifejtett hatását egérkísérletekkel igazolták mostanában [102].

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.

Most demonstrálták, hogy növekedett a mennyisége a VWF aktív, GPIb kötő konformációjának fiatal nők szívinfarktus után [103].

## A trombusképződés modelljei, trombocita funkció vizsgálata



10. ábra. A trombocita adhézo-aggregáció, koaguláció, fibrinolízis, áramló vér sémás ábrája.

A trombociták adhéziója az érfaalhoz az első meghatározó lépés a trombus kialakulásában mind fiziológiás, mind patológiás állapotokban. A vérzéscsillapításkor a sérült érfaal trombocita-trombus zárja: a szubendoteliális képletek, továbbá a plazmatikus VWF segítségével létrejövő trombocita-adhézió (érfaal - trombocita kölcsönhatás) során. Eközben több reakciósorozat zajlik egymással párhuzamosan: a release-reakció, azaz a vérlemezke alfa-granuluma és a plazmamembrán fúziója, és tartalmának kiáramlása; a „flip-flop”-reakció, a trombocita-membrán átrendeződése, s a főleg trombin, ADP, tromboxán A2 hatására létrejövő trombocita-aggregáció (trombocita - trombocita kölcsönhatás); valamint a trombinképződés. Az aggregációhoz a trombociták adhézió során bekövetkező aktivációja szükséges. A trombocita agonisták jelátviteli útvonalakon keresztül aktiválják a trombociták receptorait, elsősorban GPIIb/IIIa-t. A legtöbb aktivátor lokális válaszként a sérült érfaalról szabadul fel, vagy ott szintetizálódik. Ahhoz, hogy a stabil trombocita aggregáció kialakuljon, több ligand kötődik az aktivált GPIIb/IIIa-hoz (például a VWF, a fibrinogén és feltehetően fibronektin, valamint a CD40 ligand). Pozitív visszacsatoló mechanizmus eredményeképpen végül az érsérülés zárásához elegendő méretű és szilárdságú trombocita dugó keletkezik. A magas koncentrációjú ADP, a *release* reakció során felszabaduló enzimek, és a trombocita kontraktilis fehérjei mind hozzájárulnak, hogy az érsérülés helyén az aggregálódott trombociták irreverzibilis fúziója jöjjön létre. A sérülés helyén keletkező trombin a plazmában keringő fibrinogént fibrinné alakítja; a trombociták aggregációját és szekrécióját potenciálja, ezen kívül a XIII-as faktort is aktiválja, amely kovalens kötésekkel stabilizálja a képződő fibrinhálót. A fibrinszálak hálózata rögzíti a primer trombuszt.

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 [104].

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 trombogénitást szabályozó alkotói.

A biokémiai, immunokémiai, molekuláris biológiai eszközök, modern mikroszkópia mellett háromdimenziós számítógépes modellekkel jellemzik a trombociták hidrodinamikai viselkedését: egymáshoz és a falhoz való ütközését, adhéziójának dinamikáját. Ezekből a számítógépes modellkísérletekből adatokat lehet nyerni arról, hogy egy bizonyos sebességgradiens felett hogyan jöhet létre a trombociták ütközésekből eredő aktivációja, áramlás indukálta aggregációja. [105]. Biofizikailag jellemezhető a GPIb-VWF-GPIIb hídon keresztül létrejövő, nagy nyírás indukálta tranziens aggregáció. A sebességgradienst változtatva a kötési állapotok változnak és a szimulátorok adta eredmények jól egyeznek a VW betegségállapotra leírt jellemzőkkel. A VW ligand mérete alapján a modellel a trombociták sebességgradiens függő adhezív viselkedése előre jelezhető [106].

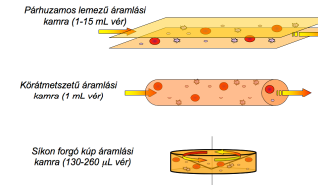
Több mint 30 éve írták le az áramló vérben kialakuló nyíróerők hatását a trombocita adhézióra. Azóta a vér reológiáját is figyelembe veszik a trombózis és hemosztázis kutatások. A vér reológiai viszonyainak a modellezésére számos áramlási kamrát készítettek. Működésük szerint lehetnek *in vivo*, *ex 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.

Az *in vivo* áramlási modellek létrehozására a kisállatokat, de kutyákat és majmokat is használnak. Azonban olyan modell, amelyben pl. állandó vénás trombus tartható fenn és alkalmas terápiás készítmények áramlás alatti kipróbálására, alig van. Sokat vár a tudományos kutatás a „knock out” egér modellektől. Ilyen modell pl. Diaz és munkatársai közleményében ismertetett egér modell, amelyben elektromos *inferior vena cava* trombózist tartottak fenn 15 percig, miközben a vérben megjelenő trombózis markereket, az endotélsejtek aktivációs markereit, a leukocita migrációt, a trombogenezist vizsgálták „*intravital videomicroscopy*” rendszerrel, a történések pillanatában. [107]. Ezt a kísérletes modellt használták a már korábban említett, új trombózis modell kidolgozásában is, amelyben a trombociták, a véralvadási fehérjék és az érfa szerepe komplex megvilágításba került, ahogyan az elő sejt környezetben vizsgálták azok biokémiáját. Ezekből az világos, hogy (1) a trombocita aktiváció és a trombusképződés, a trombin és a fibrin alvadék képződés együtt halad, ezek a biokémiai folyamatok időben és helyben integrálódnak; (2) a trombociták adhéziója nagy áramlási sebességű helyeken nem kizárólag a VWF-től, hanem a több proteintől, pl. a fibrinogéntől és a talán a fibronektintől is függ; (3) a trombocita-trombocita szinapszis a klasszikus szemlélet szerint GPIIb-IIIa és fibrinogén kölcsönhatásán alapszik, azonban ma már valószínű, hogy sokkal több résztvevője van ennek a folyamatnak; (4) a szöveti faktor egy P-szelektin és PSGL-1 függő folyamatban vezet trombusképződéshez és a leukociták

szöveti faktora nem vagy csak a trombusképződés késői fázisában vesz részt; (5) lézer indukálta érfalsérülés a szöveti faktor képződését át vezet trombusképződéshez. Ez az út hasonlít a gyulladás által kiváltott folyamathoz, azonban nem érinti a szubendotéliális mátrix és speciálisan a kollagén által kiváltott folyamatot. Ezzel szemben, az  $\text{FeCl}_3$  indukálta sérülés a szubendotéliális mátrixot teszi szabaddá. A kollagén felszínre kerül és a trombocita GPVI receptorán induló útvonalat aktiválja; (6) az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizáció szükséges a trombociták trombusba épüléséhez; (7) a trombusképződés igen komplex folyamata strukturális és regulatorikus komponenseket is magában foglal és bármelyik komponens hibája/hiánya zavarja a trombusképződés folyamatát. Ezek a kísérletek arra is rámutatnak, hogy mennyire fontos tapasztalati úton haladni az optimális gyógyszerhatás támadáspont megismerése érdekében. Az *in vivo* kísérletek eredményeinek ismeretében az a dogma is felülvizsgálandó, hogy az aktivált trombocita szolgáltatja a trombusképződéshez a membránfelszínt [36].

Az *ex vivo* áramlási rendszerekben valamelyik eret közvetlenül a kamrához csatlakoztatják és a rövid idejű állandó sebességű áramlást a kamra kivezetéséhez csatlakoztatott pumpa biztosítja [108], [109] [110]. Az értékelés az *in vitro* kamrák esetén alkalmazottal azonos (lásd később).

Sokféle *in vitro*, lamináris az áramlási kamrát fejlesztettek ki, amelyekben a nyíróerők különböző áramlási sebességgel modellezhetők; a trombusképződés mértéke kvantitatív és kvalitatív módon jellemezhető (11. ábra).



**11. ábra.** A nyírófeszültség függő trombocita adhézió, aggregáció és a VWF funkciói *in vitro* vizsgálatára szolgáló különböző áramlási kamrák.

A párhuzamos lemezű áramlási vagy perfúziós kamrák két polikarbonát lemezből készülnek, amelyek közé mikroszkóp fedőlemez illeszthető, amely az adhezív felszínt képezi. A fedőlemez maga a kamra egyik oldala is lehet. A párhuzamos lemezű perfúziós kamrában a kamra magassága (a fedőlemez fölötti rés magassága,  $h$ ), szélessége ( $d$ ), a folyadék térfogatban kifejezett áramlás sebessége ( $Q$ ) és a viszkozitás ( $\mu$ ) ismeretében meghatározható a nyírófeszültség (shear stress,  $\tau$ ):  $\tau = 6Q \mu h^{-2} d^{-1}$ .

Kezdetben állati eredetű érszakaszokat használtak kamraként és ezt a technikát fejlesztették [111-114]. A henger alakú áramlási rendszerben a nyírófeszültség:  $\tau = 4\mu Q/\pi r^3 = \mu \dot{\gamma}$ , ahol  $Q$  az áramlási sebesség,  $r$  a henger sugara,  $\mu$  az áramló folyadék viszkozitása;  $\dot{\gamma}$  a sebességgradiens:  $\dot{\gamma} = 4Q/\pi r^3$ . Paralel áramlás gyűrűs csöves és párhuzamos lemezű kamrákban egy pumpával tartható fent a vér mozgása / áramlása. A pumpa mechanikai hatása miatt bekövetkező aggregáció mértéke különböző lehet, amelyet figyelembe kell venni.

Egyszeri átfolyású (single pass) párhuzamos lemezű kamrákat is kifejlesztettek kis mennyiségű vér vizsgálatára [115] (1-2 mL, adhezív felszín kb. 10 mm<sup>2</sup>). Ezzel a kamrával az adhézió vagy a trombusképződés ideje alatti folyamatos mikroszkóvizsgálást is megvalósították (valós idejű megfigyelés). Párhuzamos lemezű / síkú áramlási kamrákat főleg kutatási célra használnak.

A rotációs viszkoziméterekben az egész rendszerben egyenletes áramlás keletkezik, amely egyenletes és állandó nyírófeszültséget fejt ki a folyadék sejtjeire és fehérjéire. A „síkon forgó kúp” áramlási kamrában a vizsgálandó minta egy forgó kúp és egy álló sík felszín között helyezkedik el. Az álló síkon van az adhezív felszín. Az optimális kúpszög 0,3-1,0°, a kialakuló sebességgradiens a kúp szögétől és forgás sebességétől függ:  $\tau = \omega (\tan \alpha) - 1$ .

A tanulmányok egy későbbi csoportja kúp alakú viszkozimétereket használ [116], kevés figyelmet szentelve a keringő vérben bekövetkező aggregációra, amely befolyásolja a trombotikus kitapadását a felszínhez, különösen akkor, amikor az adhezív felszín nagy a vér térfogatához viszonyítva (Ebben a kamrában 10 mm<sup>2</sup>/ 250 µL). Új típusú CPC-t ismertet Furukawa és munkatársai [117], amely lehetővé teszi a valós idejű megfigyelést is felfordított epi-fluoreszcens mikroszkópot alkalmazva. Az áramoltatott térfogat 7,5 µL. Különböző felszíneket vizsgáltak és azt találták, hogy felszínek trombotikus kötő képessége sorrendben más egymáshoz képest: az akrilnitrát gyanta > politetrafluoretilen > polivinilklorid > üveg > HUVEC.

A lineáris áramlású kamrákban a szilárd-folyékony határfelületi, míg a forgó kúp kamrákban viszkozitás függő interakciók dominálnak

A trombotikus felszín leggyakrabban kollagén (különböző fajtából származó és különböző típusú), izolált VWF, fibrinogén, fibrinektin, endotélsejtek extracelluláris mátrixa. Az endotél sejtek is nagyon különbözőek, leggyakrabban humán köldökvénából származó, de lehet bőr mikrovaszkuláris eredetű, állati eredetű sejt is. Lehet szintetikus/rekombináns peptidet, proteint is a kamrák felszínén immobilizálni.

Az áramló vér, lehet humán vagy különböző állatokból eredő. Az *in vitro* rendszerekben különböző módon és mértékben alvadásgátló vért használunk (PPACK, heparin, LMWH, hirudin, EDTA, citrát). Lehet azonban izolált véralvató is, különböző, de a megfelelő viszkozitást biztosító közegben.

Az áramlás lehet állandó vagy pulzáló. A sebesség is lehet állandó vagy változó. Általában kapillárisban, ha teljes vért áramoltatunk, 1-50 N/m<sup>2</sup> nyírófeszültség a jellemző.

Az áramlási kamrák elsősorban a trombotikus adhézió vizsgálatára szolgálnak, de gyakran az aggregáció az adhéziótól elválaszthatatlan, így az adhezív / trombotikus felszíntől és az

alvadásgátló anyagtól függően a trombotikus felszínhez és egymáshoz való tapadása / kapcsolódása egy időben tanulmányozhatók.

A trombotikus kitapadás / adhézió, a trombusképződés folyamatának detektálása lehet végpontos vagy valós idejű (folyamatos). A végpontos értékelés esetén az áramlási idő lejártakor mosás, fixálás és hisztológiai festés következik, azonnal, majd a felszínen lévő trombotikus / aggregátumok értékelése mikroszkóp és képanalizáló programmal történik. A trombotikus felszínhez való kitapadásának megfigyelése, mennyiségi meghatározása történhet a trombotikus direkt jelölésével. PI. radioaktív vagy fluoreszcens anyaggal, a detektálás, pedig folyamatos vagy végpontos is lehet. A jelzés azonban a trombotikus működését befolyásolja, ezért szélesebb körben alkalmazzák a végpontos detektálást.

A mikroszkópos értékelő programok általában kvantitálják a felszín fedettséget, a felszínen kiterülő trombotikus vagy aggregátum méretét.

A valós idejű megfigyelésekhez különböző mikroszkópokat használnak: DIC -- differenciál-interferencia kontraszt mikroszkóp TIRFM -- teljes visszaverődésen alapuló fluoreszcens mikroszkóp RICM -- visszaverődés-interferencia kontraszt mikroszkóp. Az értékelés lehet teljesen vagy részlegesen automatikus, de lehet manuális is.

A trombotikus adhézió és a trombusképződés tanulmányozására szolgáló módszereket igyekeznek standardizálni [118, 119]. Azonban erre kevés lehetőség van, mert a kamrákat egy-egy kutatócsoport gyártatta/egyedi darabonként. Néhány közlemény ismerteti a saját tervezésű kamrát [120]. Megjelennek a kereskedelemben is trombotikus felszín, véráramlást biztosító és a kitapadó trombotikus ill. a képződő trombus vizsgálatára alkalmas eszközök:  $\mu$ -slide VI flow, Integrated BioDiagnostics (ibidi GmbH, München, Németország); mikrokapillárisok, Ibidi (<http://www.ibidi.de>), Bioflux (<http://www.fluxionbio.com>), Cellix Venaflex rendszer (<http://www.cellixltd.com>), Glycotech (<http://www.glycotech.com>), Impact-R (<http://www.matis-medical.com>). A kereslet valószínű nem nagy, mert gyakran változik a termék forgalmazója, vagy a kiállításokon bemutatott termék nem jelenik meg a piacon.

## Trombusképződést gátló anyagok / inhibitorok

Fiziológiai vérárvadás során a sérült ereket a trombotikus dugó nagyon hamar elzárja.

Celluláris oldalról a kollagén, az érfal vesz részt ebben a lokális folyamatban. Kóros vérárvadás vagy ateroszklerotikus érrész sérülése esetén kollagén válhat szabaddá, amely aktiválja a trombotikus sejteket. Néhány klinikumban használt gyógyszer hat erre a folyamatra, de egyik sem fejt ki specifikus gátlást a trombotikus-érfal közötti kapcsolatra. Ismert azonban, hogy azok a betegek, akiknél a trombotikus kollagén receptora hiányzik, vagy gátló, vérzékenységben szenvednek. Vannak specifikus inhibitorok, mint a kollagén receptor (GPII/III és GPIV) elleni antitestek, kollagén eredetű szintetikus peptidok vagy a 41-kDa trombotikus GTP kötő fehérjéje elleni antitest, de ezek mind csak speciális körülmények között működnek,

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 érfa-hoz való lokalizációját nem a kollagén iniciálja, a trombin képződésének igen nagy szerepe lehet [20].

*In vivo* és *in vitro* folyamatokban igen specifikus gátló anyagok választódhatnak ki a különböző biotechnológia eljárásokkal, amelyek megismerése vagy célzott alkalmazása hatékony gyógyszerek kifejlesztéséhez vezethet.

### Kígyómérgek, vérszívó rovarok, állatok hatóanyagai

A mai farmakológiai kutatás egyik vezető iránya a kígyómérgekből, vérszívó rovarokból, állatokból izolálható hatóanyagok és azok hatásmechanizmusának megértése. A munkák célja, a különböző biotechnológiai technikákkal specifikus trombusképződést gátló anyagok/inhibitorok megismerése.

Kígyómérgekből nagyon sok proteint, peptidet izoláltak, amelyek a véralvadást és a trombusképződést gátolják. Közülük jellemeztek olyanokat, amelyek specifikus gátló anyagok, pl. a Bitiscetin-2, amelyik a VWF A3 doménjéhez kötődik és az a feltételezett hatásmechanizmus, hogy gátolja a VWF A1 doménjének a trombocita GPIb-vel való kölcsönhatását [121]. Azok a kígyók azonban, amelyek mérgéből ezek a specifikus inhibitorok kinyerhetők, védett állatok.

Leírtak olyan - vérszívókból izolált - proteineket, amelyek specifikusan a kollagén okozta trombocita aktivációt gátolják. Az Ornithodoros moubata kullancsból és a Haementeria officinalis pióca nyálából izolált proteinek (mobutain és LAPP=leech antiplatelet protein), amelyeket biokémiai jól jellemeztek, és mindegyiket előállították már rekombináns technikával is [122]. Egy harmadik, a pióca eredetű Calin, amelyet a Hirudo medicinalis-ból izoláltak, kevésbé vizsgáltak. Deckmyn szerint a Calin koncentrációfüggően gátolja a trombociták kollagénhez történő adhézióját statikus körülmények között. Gátolja a kollagén indukálta aggregációt is, de az ADP-, arachidonsav-, vagy az U44069- aggregációra nem, vagy csak minimálisan hat. Antitrombotikus hatást fejt ki a trombocita-dús trombus képződésére hőcsőgben [123]. Ezek a munkák azt jelzik, hogy a Calin inkább kollagénnel kapcsolódik, mint a trombocitával. A trombocita-kollagén kölcsönhatás kialakulhat a trombocita receptoron keresztül, közvetlenül vagy von Willebrand faktor (VWF) által közvetítve. Kis áramlási sebességnél a közvetlen trombocita-kollagén kölcsönhatás a domináns, nagy sebességnél a VWF által közvetített.

Ebben a dolgozatban leírom, hogy hogyan vizsgáltuk a Calin áramlásfüggő hatását a VWF-kollagén kapcsolatra és a trombocita adhézióra [14].

### Antitestek, fágpeptidek és aptamerek

Az antitestek, a molekuláknak az a leggyakrabban alkalmazott csoportja, amelyek a molekuláris szinten felismerő tulajdonsággal rendelkeznek, széles körű használatuk több mint 30 éve folyamatos. Ennek eredményeképpen, a diagnosztikai módszerek fejlődését nagymértékben

előmozdították és a klinikai rutinban használt antitest alapú diagnosztikai tesztek nélkülözhetetlen részei lettek.

Az általánosan használt antitestek mellett az *in vitro* peptid és fehérje vagy a nukleinsav alapú specifikus felismerő molekulákat alkalmazó nagyteljesítményű technológiák egyre gyorsabban fejlődnek. Pl. nagyon nagy affinitású humán antitesteket lehet fágtechnológiával izolálni, hatékonyan, egyszerűen és olcsón [124], [125] [126].

A peptid/fehérje alapú specifikus felismerő molekulák fág technológiával (angol irodalomban „phage display” technológia) állíthatók elő [127]. 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.

A VWF konformáció függő kötőhelyeinek megismerésére fágtechnológiát alkalmaztunk. VWF-t kötöttünk műanyag felszínhez és azt vizsgáltuk, hogy az immobilizáció hatására szabadabbá váló molekularész(ek) 7-es és 12-es peptid inzertek lehetséges variációit tartalmazó fágkönyvtárból milyen szekvenciájú peptidet(ket) kötnek meg. A szelekciós körben kötött fágokat nem specifikus elúció után sokszoroztuk. A specifitás növelése érdekében további két szelekciós kör után ssDNS analízissel meghatároztuk az inzertek aminosav szekvenciáit, majd különböző szekvencia összehasonlító programok és szekvencia bank alkalmazásával kerestük a peptidszakaszt az élő szervezet ismert vagy jósolt molekuláiban. Kollaborációban szintetizáltattuk azt a peptidet, amelyik legnagyobb valószínűséggel mutatott hasonlóságot / azonosságot a kollagén molekula egy szakaszához. A fágok és a peptid is gátolja a kollagén VWF kölcsönhatást és a trombocita adhéziót is csökkentti [21], [17].

Jelentős eredmény, hogy a peptiddel csökkenthető a kollagén felszínén, artériás áramlási körülmények között képződő trombus mérete. Ezért a peptid potenciális trombocita adhéziót és aggregációt gátló gyógyszer része lehet.

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 [128].

Az aptamerek kis (peptid) molekulák és antitestek tulajdonságaival egyaránt rendelkeznek: nagy specifitás, 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 [129].

A trombin aptamerek nanomólár koncentrációban gátolják a trombinnak az alvadást aktiváló hatását, a trombin exosite-1 régiójához való kötődésén keresztül. [130]. A Bock és munkatársai által közölt konszenzus trombin aptamer, C-15-mer (ahol a C jelentése: consensus), egy 15 nukleotidból [d(GGTTGGTGTGGTTGG)] álló egyszálú DNS, melyet oligonukleotidok kombinációjából álló hatalmas könyvtárból, trombinkötő képességük alapján azonosítottak.

Az oligonukleotidok módosításával még jobb apamereket lehet találni. Aradi J munkacsoportja 4-tiodeoxiuridilállal (s4dU) módosított oligonukleotidokat szintetizált és leírták, hogy a beépített molekulacsoport redukáló és hidrofíli karaktere miatt az új szintetikus aptamereknek nagy affinitása van számos fehérjéhez [131]. Az eredmények részben bemutatam, hogy módosított aptamerek hatását vizsgáltuk és azt találtuk, hogy egyikük a trombin 1-es anionkötő helyéhez kötődve hatékonyabb gátló szernek bizonyult, mint a C-15-mer [20].

## Anyagok, klinikai minták és módszerek

Ebben a fejezetben röviden leírom azokat a módszereket, amelyeket magam vagy munkacsoportom tagjai: analitikus, doktori fokozatot szerzett vagy annak megszerzésén dolgozó munkatársaim, TDK hallgatók vagy a kollaborációs partnereink végeztek, a hazai laboratóriumunkban. Hivatkozom azokra a közleményeinkre, amelyekben alkalmaztuk és részletesen leírtuk a módszereket. A közleményekben lévő további hivatkozásokat itt nem szerepeltetem.

A kémiai nevek és egyes anyagok többnyire a kereskedelmi forgalomban is alkalmazott rövid nevekkkel szerepelnek a leírásban, az eredeti közleményekben a teljes nevük is szerepel.

## Anyagok

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 fágna laktóferinre szelektált fágokat használtunk. A Gf1B 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'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' (C15-mer) a VBC Biotech Services (Bécs, Ausztria), BCATM fehérje meghatározó kit a Pierce (Rockford, USA).

## Klinikai minták, mintakezelés

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 PPP-vel 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 kiüleptítettük, és a trombocitákhoz az óvatosan levett PPP-ből 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 proszttaglandin E1 tartalmú citrátos vérből készítettük. A PRP-ből centrifugált trombocitákat háromszor mostuk „A” mosó pufferben (140mM NaCl, 2,5mM KCl, 0,1mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 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 CaCl<sub>2</sub> –t tartalmazott. Általában 200 G/L-es trombocitaszámú szuszpenzióval dolgoztunk vagy az adott kísérlethez tervezett számú szuszpenzióval.

Pool-ozott vagy kevert kontroll plazma 25 egészséges önkéntes vérből centrifugált PPP összekeverésével készült. A kevert plazmát alacsony kötőkapacitású csövekben 0,05 mL-enként leosztva, -80C° tároltuk felhasználásig.

A fagyasztott plazmákat a vizsgálat előtt 15 perccel 37C°-os vízfürdőbe tettük és állandó rázogtatás közben engedtuk kiolvadni. A kiolvadt plazmákat fél órán belül feldolgoztuk. A vizsgálati alanyoktól a plazmákat több részletben lefagyaszttva tároltuk és újabb vizsgálatokhoz nem fagyasztottuk vissza, hanem másik aliquotot használtunk. A plazmákat ismert kötőkapacitású csövekben tároltuk.

## A VWF analízise, rutin módszerek

VWF:Ag mérése ELISA módszerrel történt jelöletlen, jelzett poliklonális anti human VWF ellenes antitestekkel [132]. 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 szubsztáreakció és antigén szintjét ELISA módszerrel mértük, a Technoclone-tól beszerzett kittel (TECHNOZYM® ADAMTS-13, Technoclone GmbH, Bécs, Ausztria).

A VWB laboratóriumi diagnosztizálására és tipizálására szolgáló módszerekről a Bevezetés fejezetben a 3. táblázat nyújt áttekintő összefoglalót. A laboratóriumi módszereket szűrő-, diagnosztikai- és megerősítő-tipizáló módszerek csoportokba foglalva, ebben a fejezetben ismertetem röviden.

A VWF rendellenességei okozta betegségek szűrőtesztjei közé tartozik a vérzési idő, amely értékelhető eredményt kizárólag standardizált eszköz használatával ad. A VWB-ben rendszerint megnyúlt, de a VWF enyhe formáiban, mint 1 típusú VWB-ben vagy a normál trombocita VWF-ral rendelkezők esetében normál lehet. Alternatíva a PFA-100 (Dade Behring) készülékkel mérhető záródási idő meghatározása [133]. Az eszközben antikoagulált vér áramlik át kollagénnel és ADP-vel vagy epinefrinnel impregnált membrán 150 µm nagyságú nyílásán, a képződő trombocita dugó elzárja a nyílást. A vérzési idő és a PFA-100 záródási idő 50×10<sup>9</sup>/L trombocita szám alatt, a trombocita számmal fordítottan arányosan -funkcionális eltérés nélkül is- megnyúlik.

A rutin alvadási idők közül az APTI lehet megnyúlt a csökkent FVIII szint miatt 3-as és 2N VWB típusokban. A trombocita szám általában csak a 2B VWB-ben csökkent.

Specifikus diagnosztikai teszteket a pozitív szűrőtesztek esetén végez a laboratórium. A FVIII:C a VIII-as faktor koaguláns aktivitás mérése hiányplazmát alkalmazó egyfázisú alvadási teszttel történik. Alacsony az értéke csökkent VWF:Ag szint esetén, vagy a VW molekulának a FVIII kötési defektusa (2N típusú VWB) esetén. A VWF:Ag (antigén) mérés a VW protein mennyiségét adja meg a plazmában, nem szolgáltat információt a molekula működőképességéről. Mérésére ELISA és immunturbidimetriás VWF:Ag szint meghatározás terjedt el [134]. VWF:RCo (risztocetin kofaktor aktivitás): a risztocetin a VWF és a GPIb molekulákhoz kötődve közvetíti azok kölcsönhatását. Standard trombocita szuszpenzió (liofilizált) és a beteg plazma keverékéhez adva agglutinációt idéz elő, amelynek a mértéke a VWF aktivitásával arányos. A VWF:RCo aktivitás a 2N VWB-et kivételével csökken minden 2-es típusú VWB-ben. A VWF:CB a VWF kollagén kötési kapacitását méri a beteg plazmáját kollagénnel fedett mikrotiter lemezben mérve, a kollagén köti a VWF-t. A kötés mértékét peroxidázzal jelzett poliklonális VWF ellenes antitesttel és szubsztárával lehet mérni. A VWF:CBA módszer összehasonlítva a VWF:RCo módszerrel érzékenyebb a nagy molekulatömegű multimerek jelenlétére. A VWF szerkezeti épsége a VWF funkcionális tesztjeinek (VWF:RCo vagy VWF:CBA) és mennyiségének (VWF:Ag) arányával jellemezhető. Ez az arány normál humán plazmában megközelítőleg 1,0. 1-es típusú VWB-re utal, ha VWF:Ag és a VWF:RCo arányos csökkenése, amikor a RCo/ Ag arány nagyobb, mint 0,7. A hányados 0,7 alá csökkenése 2-es típusú VWB-et valószínűsít. A VWF:FVIIIb (a VWF-nak a FVIII kötő kapacitása) mérésének a 2N típusú VWB és a hemofília elkülönítésében van jelentősége. A risztocetin indukálta trombocita agglutináció (RIPA) mérés a beteg trombocita dús plazmájában 1,2 és 0,6 mg/mL risztocetin által kiváltott aggregációt mért aggregométerrel. Egészséges plazmában csak a magasabb koncentráció, a 2B illetve a trombocita típusú VWB-ben az alacsony koncentráció is agglutinációt vált ki, az előbbinél a VWF, az utóbbinál a GPIb receptor nagyobb affinitása miatt.

A VWF multimer szerkezetének analízisére az VWF SDS-agaróz gélelektroforézis szolgál. A módszer lényege az, hogy denaturálva a VWF molekulát, az a méretével arányos mennyiségű nátrium lauril szulfátot köt meg, negatív töltést vesz fel. Agaróz gélre téve a denaturált mintát, a gél, pedig elektromos erőterbe, a molekulák molekulatömegük szerint vándorolnak és szétválasztódnak. A módszer kivitelezése igen nagy gyakorlatot igényel. Az elválasztott sávok értékelésére, pedig csak szemikvantitatív módszer volt. A nagy multimerek hiányának és

többszörös kuantitatív meghatározására régóta igény. Ezt az igényt a nemzetközi szinten elfogadott módszerfejlesztéssel próbáltuk kielégíteni. Leírása az eredmények részben található.

A kollagénhez kötődő VWF morfológiai különbségeinek AFM vizsgálatához alacsony ( $0,07 \text{ N/m}^2 = 0,7 \text{ din/cm}^2$ ) és magas ( $4,55 \text{ N/m}^2 = 45,5 \text{ din/cm}^2$ ) nyírófeszültséget párhuzamos lemezű áramlási kamrában biztosítottunk.  $1 \mu\text{g/mL}$ -es VWF oldatból 5 vagy 15 perces perfúzió után a kollagén felszínhez tapadt molekulákat paraformaldehid oldattal fixáltuk. Háromállású kapcsolóval a puffer majd a paraformaldehid oldat folyamatos áramlását biztosítottuk. Így valószínű, hogy a felszínen, lazán vagy nem kötött VW molekulákat az áramló oldat elvitte.

### Trombocita adhézió, aggregáció és aktiváció mérése

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 chamber) és amikor egy síklemez fölött forgatott kúppal áramoltattuk a vért, síkon forgó kúp kamrát (CPC, cone and plate chambers) használtunk. A vért kísérleti tervként különböző, 2,5-, 5-, esetenként 15 percig áramoltattuk, vénás és artériás körülményeket modellező sebességgradiens beállítással, amely általában  $<650/\text{s}$  és  $>1000/\text{s}$  (gyakran  $2600/\text{s}$  vagy még nagyobb) volt.

Thermanox mikroszkóp fedőlemezekre (Nunc, Rochester, NY, USA) vittük fel az adhézió felszínét, amely leggyakrabban humán III-as típusú kollagén, tisztított VW-, fibrinogén molekula vagy endotélsejtek mátrixa volt. Az izolált proteinek porlasztással (kollagén  $1 \text{ mg/mL}$ ,  $50 \text{ mM}$ -os ecetsav oldatban) vagy adszorpciós módszerrel (fibrinogén  $100 \mu\text{g/mL}$  vagy VWF  $20 \mu\text{g/mL}$  PBS-ben) kötöttük a lemezhez. Az endotélsejteket humán köldökvénából izoláltuk és tenyésztettük, az immortalizált, humán dermális mikrovaskula eredetű endotélsejteket kaptuk. Leírásukat lásd a Sejttenyészetek, mátrixok részben.

A 6B4 Fab nyíróhatás függő befolyását a trombocita adhézióra kollagén felszínen, párhuzamos lemezű áramlási kamrában  $650/\text{s}$ ,  $1300/\text{s}$  és  $2600/\text{s}$  sebességgrandies beállítással vizsgáltuk. I-es típusú humán kollagénből  $1 \text{ mg/mL}$ -es oldatot  $50 \text{ mmol/L}$ -es ecetsav oldattal készítettünk, PBS ellenében dializáltuk, majd Thermanox műanyag fedőlemezre porlasztottuk. Az előző nap előkészített és fedett lemezt másnap reggel szobahőmérsékleten, sötét helyen hagytuk. Az áramlási kísérlethez  $12 \text{ mL}$ , LMWH-val antikoagulált vért, 6B4 Fab-val  $37^\circ\text{C}$ -on 5 percig inkubáltuk. 5 perces áramoltatás és alapos mosás után a kollagénnel fedett lemezekeken 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 felszín 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  $4000/\text{s}$  áramlási sebességgel, ami  $15,2 \text{ N/m}^2$  ( $152 \text{ dyne/cm}^2$ ) nyírófeszültségnek felel meg. Az áramlási kamrát 5%-os tejpor oldattal blokkoltuk 30 percig, majd Hepes pufferrel mostuk ( $0,01 \text{ mol/L}$  Hepes,  $0,145 \text{ mol/L}$  NaCl, pH: 7,35). A kísérletekben  $250 \mu\text{L}$  vért 10, vagy 30 percig, pufferrel előinkubáltunk, aspecifikus vagy L7-fágokkal, majd 5 percig áramoltattuk kollagénnel fedett fedőlemezen. Perfúzió után a fedőlemezekeken tapadt trombocitákat vagy a trombust TBS-ben mostuk, metanolban dehidráltuk, fixáltuk, majd May-Grünwald (10 perc) és Giemsa (30 perc) szerint festettük, végül kétszer mostuk desztillált vízben. A trombocita adhéziót fénymikroszkópra szerelt monokróm digitális kamerával (Minton, Kent, UK) értékeltük. A felszínfedettséget a teljes felszínhez képest százalékosan számoltuk ki IMAN 2.0 képelemző szoftver segítségével. A lemezeiről, 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) határozattuk meg.

Amikor az adhéziót a belga laboratóriumban lévő mini párhuzamos lemezű kamrával is elvegeztük, akkor Nikon Eclipse TE200 (Nikon, Tokyo, Japán) fénymikroszkóphoz csatlakoztatott Basler 113C RGB (Basler, Ahrensburg, Németország) színes digitális kamerával értékeltük. A felszínfedettséget a teljes felszínhez képest százalékosan számoltuk ki Lucia G verziójú 4,81 (Laboratory Imaging, Prága, Csehország) szoftver segítségével.

A trombociták kitapadásnak és a trombusképződésnek a mértékét leggyakrabban a felszín (a trombogén felület) fedettségével, az összefüggően fedett területek számával és nagyságával (trombusok kiterjedése) és magasságával jellemeztük. A trombusba épült VWF eloszlását konfokális lézer mikroszkóppal is analizáltuk.

Az aptamerek trombusképződésre gyakorolt hatását  $650/\text{s}$  sebességgradiens 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.

Az Impact-R kamráit  $100 \mu\text{g/mL}$  fibrinogénnel fedtük,  $4^\circ\text{C}$ -on egy éjszakán át, majd  $1 \text{ U/mL}$  trombinnal kezeltük, 10 perccel az adhéziós kísérlet előtt (ezt nevezzük trombin kezelt fibrinogén felszínnek). PBS-sel való intenzív mosást követte az adhézió, vagyis 5 percig forgattuk a felszín felett a heparinizált vért, amely C15-mer, UC15-mer vagy hir54-65 tartalmazott, különböző koncentrációban. Az adhézió után a felszín háromszor mostuk PBS-sel, megfestettük May-Grünwald-Giemsa festéssel és a trombusképződést fénymikroszkóppal értékeltük. A trombus fehérje tartalom alapján történő mérését Pierce biciklonsavas fehérjemérő kittel végeztük.

Trombocita adhézió mérése O'Brien filtrációs teszttel is történt.  $4 \text{ mL}$ ,  $20 \mu\text{g/mL}$  1C1E7-tel vagy nélküle inkubált vért nyomtuk át az eszköz üvegszál szűrőjén (Pall U100; Pall Process Filtration, Portsmouth, UK),  $40 \text{ Hgmm}$  állandó nyomással, szobahőmérsékleten. Az automata számláló 5 másodpercenként számolta a vércseppeket, míg a  $4 \text{ mL}$  vér áthaladt. A készülékbe való benyomás előtt és a 10-20 perc között EDTA-t tartalmazó csőbe gyűjtött vérből trombocita számot határozattunk meg.



A trombocita aggregációt Lumi aggregométerrel mértük (Chrono-log, PA, USA), 290 G/L trombocitaszámú 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 (vizsgálható 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 (release) mértékét.

Áramlási citometriás analízis során az 1C1E7 és a 82D1E1 antitesteket szukcinimidil-fluoreszceinnel jelöltük (XSF; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Hogy a trombocita GPIIb/IIIa receptorát gátoljuk, a citrátos vért 20 µg mL<sup>-1</sup> 16 N7C2 antitesttel inkubáltuk, majd 50 µg mL<sup>-1</sup> jelzett anti-VWF-ral és 20 µg mL<sup>-1</sup> 15E7 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 szívtattuk fel az áramlási citométerrel (FACStar, Becton Dickinson). A fluoreszcens jel meghatározásához 10000 sejtet gyűjtött össze a készülék, minden mintából. Kontrollként vagy XSF-jelzett MEM31 vagy nem jelzett trombociták autofluoreszcenciája szolgált. A trombociták fluoreszcencia intenzitásának növekedését (az autofluoreszcenciára vonatkoztatva) az trombocitákhoz kötődő VWF antitesteket kötő képességének tekintettük. XSF-jelzett 82D1E1 volt a kontroll VWF ellenes antitest.

### Trombin alvadási és amidolitikus aktivitás mérése

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

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-HCl, 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 jelenlétében 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 felülszót SpeedVac bepárlóbanban beszáritottunk. A száraz anyagot 90 µL 10%-os acetonitrilt és 0,1% hangyasavat tartalmazó oldatban oldottuk fel.

AZ 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 csúcserték arányát hasonlítottuk a kalibrációs görbéhez.

### Sejtenyészetek, mátrixok és vizsgálatuk

HUVEC sejteket Jaffe szerint izoláltuk humán köldökszínorból, a szülés után nem több mint két órán belül. A sejteket Medium 199 tápoldatban tenyésztettük, amelyet kiegészítettünk 20% magzati borjuszérummal (FCS), 15 mM NaHCO<sub>3</sub>-mal, 2mM glutaminnal, 5mg/L fungizonnal, 100 kU/L penicillinnel és 100 mg/L streptomocinnel (mind Gibco BRL, Life Technologies, Franciaország). HMEC-1 sejteket 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 streptomocinnel, 2 mM glutaminnal, 0,01 mg/L epitéliális növekedési faktorrall 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 passzálas után a HMEC mátrixot a 35-45 passzálas után használtuk. (Ez utóbbit 34 passzálas után kaptuk.)

96 lyukú lemezbe 5x10<sup>4</sup> /0,1mL sejtszuszenziót adtunk. Szérummentes tápoldatokat használtunk a tenyésztéshez, amelyeket 0,1% albuminnal (marha vérből izolált) egészítettük ki. A sejtekkel egyenletesen és teljesen befedett felszint foszfát pufferrel (PBS) mostuk kétszer, majd 0,1 % Triton X-100 és 0,1 M NH<sub>4</sub>OH tartalmú oldattal lizáltuk 20 percig, szobahőmérsékleten. A lizáló oldat inhibitorokat is tartalmazott (5mM NEM és 1 mM PMSF). A mátrixokat vagy direkt használtuk az immunokémiai reakciókhoz, vagy az elektroforetikus szeparáláshoz a mintapuffeiben 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.

Az extracelluláris mátrix relatív prokoaguláns aktivitását a felszínekre mért 37 °C-os citrátos plazma (0,14 mL) rekalcinálási (25 mM-os 0,07 mL CaCl<sub>2</sub>) idejéből határoztuk meg.

A trombocita adhéziót/ trombusképződést LMWH tartalmazó teljes vérrel és párhuzamos lemezű kamrával végeztük, fedőlemezekben tenyésztett sejtek mátrixain. A kamra leírását és az értékelést lásd a „Trombocita adhézió és trombusképződés, aggregáció kísérleti modellje” részben.

**Atomerő mikroszkópos módszer a kollagénhez artériás áramlási körülmények között kapcsolódott VWF molekula vizsgálatára.**

A VWF detektálására kidolgoztunk egy arany gyöngyöket 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 I-es típusú kollagénnel fedett üveglemezeket tettünk, amelyek felett géliszűrővel tisztított VWF áramoltattunk. A kollagénen kötődött VWF-ről AFM-mel alkottunk képet. A VWF kötéseinek morfológiai különbségeit alacsony ( $0,07 \text{ N/m}^2 = 0,7 \text{ din/cm}^2$ ) és magas ( $4,55 \text{ N/m}^2 = 45,5 \text{ din/cm}^2$ ) nyírófeszültséget alkalmazva hasonlítottuk össze [9].

Debreceni Egyetem Biofizikai és Sejtbiológiai Intézete az AFM-et részenként vásárolta meg a Twente Egyetemről (Enschede, Hollandia) és úgy szerelték össze, hogy a piezoelektromos olvasóval különböző, konvencionális üveg tárgylemezekben lévő minta is letapogatható. A fedőlemezek cianoakriláttal lettek a tárgylemezre ragasztva. „Contact-mode” –ban történt a képalkotás, amely csak nagyon alacsony relatív páratartalom mellett volt sikeres, mert egyébként a csúcsok hozzáragadtak a mintához a vékony rétegben felszívott víz miatt. 512x512 pixel-es képek készültek 0,7-1,5 sor/másodperces olvasási sebességgel, egyszerre mérve a csúcsokat és a zajt. A képek nem voltak a tűre korrigálva, de az adott kísérlet összes mintája egy napon volt mérve, tűcsere nélkül, ezáltal biztosítva az összehasonlíthatóságot.

### VWF tisztítása

VWF tisztítására szolgáló eljárás három kromatográfiás lépésben (géliszűrés, anioncsere, affinitás kromatográfia) nagy tisztaságú VWF preparátum előállítására alkalmas. Röviden: az első géliszűrés (Sephacrose 4FF) lépésben elválasztottuk a minta nagy molekulatömegű komponenseit. Ezt a frakciót anioncserélő oszlopon (Q-Sepharose HP) tovább tisztítottuk, majd affinitás kromatográfiás (HiTrap Heparin HP) lépéssel fejeztük be a folyamatot. A módszert FPLC rendszerre adaptáltuk, a tisztítás során végig Tris-HCl puffert alkalmaztunk. Nem tartalmazott kicsapósos lépést. Az alkalmazástól és a kiindulási anyagtól (pl.: trombocita lizátum, plazma) tisztaságától függően a lépések száma és sorrendje megváltoztatható.

### Felszíni plazmon rezonancia mérés (Biospecific Interaction Analysis)

A Calin kollagénhez való kötődési tulajdonságát felszíni plazmonrezonancia módszerrel mértük, BiaCore készülékkel (Pharmacia Biosensor, Uppsala, Sweden). Az érzékelő csip karboxilált dextrans mátrixához a kollagén 20 µg/mL koncentrációjú, 0,1 M-os acetát pufferből (pH 5,0) volt kötve. A 3 µL/perc áramlási sebességgel áthaladó Calin oldat koncentrációja 30-250 µg/mL között volt. Az áramlás és a rezonancia jel detektálása 10 percig tartott. Az értékelés a készülékkel szolgáltatott BIAlogue szoftverrel történt.

### Biotechnológia (kombinatórikus kémia és fág technológia)

A VWF-kötő fágok szelektációját a lineáris heptamer peptid (L-7) könyvtár útmutatója alapján végeztük el. A szelektációhoz 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 szelektációs 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 [21].

A fágok kötőkapacitásának tesztelésére tisztított VWF-ral fedtünk (10 µg/mL VWF PBS-ben, 4°C-on, 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 torna peroxidázzal jelzett M13 fág ellenes poliklonális antitesttel (anti-M13-HRP, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Svédország) inkubáltuk, orto-feniléndiamin (OPD, Sigma) és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Acros Organics) hozzáadásával kvantitáltuk. Minden inkubáció után TBS-T-vel 5-ször mostuk a lyukakat.

A fágok VWF-kollagén kötést befolyásoló hatásának vizsgálatára humán I. vagy III. típusú kollagénnel fedtünk (10 µg/mL, 4°C-on, éjszakán át) 96 lyukú mikrotiter lemezt. 3%-os tejpor oldattal történő blokkolás után L7-, vagy az aspecifikus fágokat hígítási sorozatban vittük fel (0,4% kazeint tartalmazó TBS-ben), ami előtt konstans mennyiségű VWF-t tartalmazó oldattal 30 percig előinkubáltuk, majd a lemezen 90 percig inkubáltuk. Kontrollként fágok és VWF keveréket inkubáltunk fedetlen felszínen. A kötődött VWF-t 1:3000 híg poliklonális, HRP-vel jelzett anti-VWF antitesttel (anti-VWF-HRP, Dako, Glostrup, Dánia) detektáltuk. A mosás és előhívás a korábban leírtak szerint történt.

A fágok trombusképződésre gyakorolt hatásának vizsgálatára sikon forgó kúp rendszerű áramlási kamrát használtunk 4000/s áramlási sebességgel, ami 15,2 N/m<sup>2</sup> (152 dyne/cm<sup>2</sup>) nyírófeszültségnek felel meg. A kísérletekben 250 µL vért 10, vagy 30 percig előinkubáltunk pufferrel, aspecifikus, vagy L7-fágokkal, majd 5 percig áramoltattuk kollagénnel fedett fedőlemezen. A peptideket vizsgáló sorozatban teljes vért 15 percig előinkubáltunk L7-, vagy MAP-hoz kötött (lásd: később) peptiddel (0,7 mg/mL végkoncentrációban), majd 2,5 percig, 37°C-on,

2600/S mellett, párhuzamos falú áramlási kamrában áramoltattuk, amihez humán III. típusú kollagénnel fedett fedőlemez használtunk (100 µg/mL, 50 µL/fedőlemez). 82D6A3 anti-VWF monoklonális antitesttel, 5 µg/mL-es végkoncentrációban, 37°C-on, 15 percig előinkubált teljes vér volt a kontroll.

Epitóp térképezéshez a 96 lyukú lemezt, PBS-ben oldott, 10 µg/mL koncentrációjú vad típusú-, ΔA1-, ΔA2-, 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% tejport tartalmazó TBS-ben oldva). Kontrollként fedetlen lemezen is inkubáltunk fágokat. A kötődött fágokat anti-M13-HRP antitesttel, a korábban leírtak szerint detektáltuk.

A fágok kompetitív hatásának vizsgálatához 96 lyukú lemezt 10 µg/mL koncentrációjú tisztított VWF oldattal fedtünk 4°C-on, egy éjszakán át, majd 4%-os tejpor oldattal blokkoltuk. A B8 fágból készített hígítási sorozatot 30 percig inkubáltuk a lemezen. Ezt követően biotinált L7-fágot adtunk a lemezhez, majd 1,5 órán keresztül inkubáltuk. A kötődött fágokat 1:5000 híg Streptavidin-POD-dal detektáltuk (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Németország).

A fágpeptidek szintézisének részletei a közleményhez csatolt, Anyagok és Módszerek részben vannak részletesen leírva.

Az adatokat átlag +/- SEM formában adtuk meg. Statisztikai analízisre t-próbát alkalmaztunk, a különbségeket  $p < 0,05$  esetén vettük szignifikánsnak.

### A VWF multimer eloszlásának kvantitatív jellemzése

A VWF multimer SDS-agaróz gélelektroforézisét Z.M. Ruggeri és T.M. Zimmermann által leírt módszer alapján végeztünk [135], kisebb módosítással. Röviden: a mintákat 0,05 U/ml antigén szintre hígítottuk, majd minta pufferrel denaturáltuk. 12,5cm×10cm×1,5mm 0,65%-os SDS tartalmú agaróz gélt (Sea Kem HGT Agarose Cambrex Bio Science Rockland, ME, USA) készítettünk módosított szeparáló gél pufferrel (0,1% SDS, 0,375M Tris, pH=8,8), tömörítő gélt nem használtunk. A futtatást követően a proteineket félszáraz elektro-blottal (Trans-Blot SD, Bio-Rad Laboratories Hercules, California, USA) PVDF membránra vittük (Millipore, Bedford, MA, USA) a gyártó által javasolt módszer szerint.

Immunokémiai jelzést (Rb) aHu VWF-HRP (P0226, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) antitesttel, az előhívást diaminobenzidinnel (Sigma, St Louis, MO, USA) végeztük.

A membránokat GS-800 Chemidoc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) kalibrált denzitóméterrel digitalizáltuk és saját szoftverével értékeltük. Háttérlevonás után a mintákat három régióra osztottuk: kis- (1-4 sávok), közepes (5-8 sávok) és nagy (>8 sávok és a homogén rész) molekulatömegű multimeret tartalmazók. A VWF eloszlásának jellemzésére az adott régióban a reflektív denzitás-görbe (RD-görbe) alatti területet használtuk; az összes RD-görbe alatti területét száz százaléknak tekintve az eredményt régióként százalékosan fejeztük ki. A VWF:Ag figyelembevételével a régióban található VWF:Ag mennyiséget is meghatároztuk. A multimerizáció fokát a változó számú multimer tartalmazó nagy multimer régió hosszúságával jellemeztük. A

gélek közötti könnyebb összehasonlítás érdekében a nagy multimer régió hosszúságát a kis multimer régió (első négy multimer) hosszúságához viszonyítottuk.

Az eredmények rendszerezése, az adatok statisztikai elemzése Microsoft Excel és SPSS.15 statisztikai szoftverekkel történt. Az IC<sub>50</sub> értékek számolásához GraFit (Erithacus Software Limited, Horley, UK) szoftvereket használtunk.

Elválasztástechnika (vékonyréteg-kromatográfia, gél- és ioncserélő kromatográfia, gázkromatográfia, HPLC, FPLC, elektroforézis), minőségi és mennyiségi kémiai, biokémiai, biofizikai és immunkémiai módszerek, véralvadási vizsgálatok, áramlási citometriás vizsgálatok és további vizsgálatok leírása meghaladja a dolgozat terjedelmét. Ezek ismertetése az idézett közleményekben található.

## Eredmények

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 vezettek.

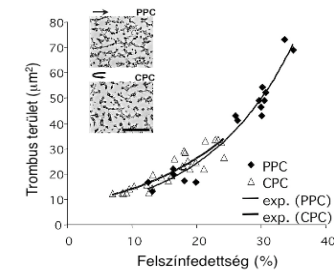
A továbbiakban az eredményeket a nagy nyíróerő hatása alatt végbemenő véralvadási, trombusképződési folyamat jelenleg elfogadott sorrendje szerint igyekszem ismertetni: trombogén felszín, trombogén felszínhez kapcsolódó molekulák, kofaktorok, ezek közreműködésével kapcsolódó trombocita, majd trombocita-trombocita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

## Módszertani eredmények

### Vénás és artériás körülményeket modellező, teljes vért alkalmazó áramlási kamrák vizsgálata

A vénás és artériás körülményeket modellező, teljes vért alkalmazó áramlási kamráknak több típusa ismert. A párhuzamos lemezű és a viszkoziméterekből kidolgozott síkon forgó kúp 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].

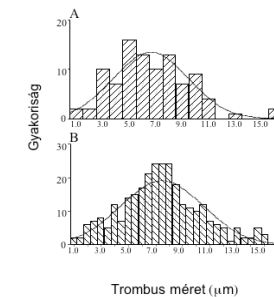
A teljes felszínfedettség és az egyes trombusok (mivel egyedi trombociták nem vagy alig vannak a kollagénen a trombocita halmazokat trombusoknak nevezzük a továbbiakban) területe/adhéziós terület közötti összefüggés vizsgáltuk. Amint a 12. ábrán a beillesztett fénymikroszkópos kép mutatja, a PPC és a 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,  $y = 7,018e^{0,0648x}$ ;  $R^2 = 0,9183$ .



**12. ábra.** Felszínfedettség és az egyes trombusok terület közötti összefüggés. Antikoagulált teljes vért 1000/s sebességgradienssel 150 másodpercig áramoltattuk a kollagén felszínen. Minden pont 40 különálló kép analízisének matematikai átlaga. PPC és a CPC felszínnek fénymikroszkópos képeit a beillesztett kép mutatja. Nyílak jelzik az áramlási irányt, a sávszélesség 50 µm. A trombus területet ábrázolva a felszínfedettség függvényében, legjobban exponenciális görbe illeszthető az összesített PPC és CPC adatokra,  $y = 7,018e^{0,0648x}$ ;  $R^2 = 0,9183$ .

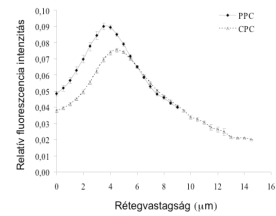
Megfigyelhető, hogy 25% felszínfedettség alatt alig van különbség a két kamra között, azonban 25%-nál nagyobb felszínfedettség a CPC-ben nem érhető el.

A trombus magassága 2 és 18 µm között változott (13. ábra). PPC esetén a többség 4 és 6 µm között (A), a CPC esetén 6 és 8 µm között (B) volt. Az eloszlásfüggvény Gaus görbét követ. Az átlag trombus magasság PPC esetén  $6,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$  ( $n=8$ ), míg CPC esetén  $7,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$  ( $n=5$ ) ( $p=0,0144$ ).



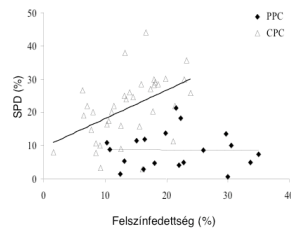
**13 ábra.** Trombus magasságának eloszlása PPC és CPC-nél. A trombus magassága a kollagén felszín és a trombusok teteje közötti távolságként van definiálva (trombus vastagsága a kollagén felszínen). Az oszlopvonalak a trombusok magasságának relatív gyakoriságát mutatják. (Fedőlemezenként legalább 10 látótérben volt a trombusok mérete meghatározva.) 96 és 289 trombuszt számoltunk, 8 - 13 fedőlemezen. A trombus magasság 2 és 18 µm között változott, PPC esetén a többség 4 és 6 µm között (A), 6 és 8 µm között a CPC-nél (B). A trombusmagasság PPC-nél  $6,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$  ( $n=8$ ), míg CPC-nél lényegesen magasabb volt,  $7,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$  ( $n=5$ ) ( $p=0,0144$ ).

A fkuoreszcensen 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.



**14. ábra.** Fluoreszcens jelzett VWF eloszlása a trombusban. A fluoreszcencia intenzitás csúcserőteke 3,5-4 µm a PPC-nél és 4,5-5 µm a CPC-nél. A trombusba épült VWF 0,5 µm vastag optikai rétegenként mért intenzitásának összege a totál fluoreszcencia intenzitás. A maximális trombus vastagság 9 µm PPC-nél és 14,5 µm CPC-nél. A mérések konfokális lézer mikroszkóppal történt.

A keringő vérből eltűnő, egyedül álló trombociták számának az aránya a keringetés előtti trombocitaszámról 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 ( $y = -0,009x + 8,8787$ ;  $R = -0,01233$ ;  $p > 0,05$  (15. ábra)



**15. ábra.** Az egyedüli trombociták eltűnése (single platelet disappearance: SPD) és felületi fedettség viszonya. A lineáris regresszió statisztikailag jelentősnek értékelhető kapcsolatot mutat az SPD és felületi fedettség között CPC-nél ( $y = 0,8562x + 9,413$ ;  $R = 0,4897$ ;  $p = 0,0021$ ). PPC esetén nincs értékelhető kapcsolat ( $y = -0,009x + 8,8787$ ;  $R = -0,01233$ ;  $p > 0,05$ ).

### A VW molekula multimerizáció fokának kvantitatív jellemzése

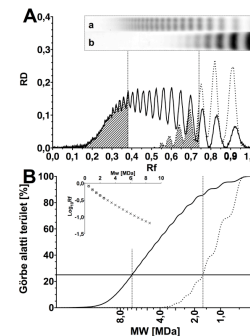
Mivel a VWF aktivitása arányos a multimer méretével, azaz a multimerizáltságának mértékével. A VWB diagnosztikájában a VWF funkciójának meghatározásához nélkülözhetetlen a multimer méret szerinti eloszlásának meghatározása. A nátrium lauril szulfáttal (SDS) denaturált VWF multimerjeire bontható SDS-agaróz 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, grafikus denzitometriás görbe szerkeszthető. A denzitometriás meghatározás nehézsége a görbe ill. az adatok értékelése. Munkacsoportunk doktorandusz hallgatója készített egy programot, amely a denzitometriás görbe megfelelő értékelését és tesztelhető [8]. A denzitometriás értékelés elsősorban azt a célt szolgálja, hogy a nagy multimer mennyiségi növekedését tudjuk értékelni. Ennek a célnak az elérése érdekében az elektroforetikus szétválasztást kellett először optimalizálni, hogy a nagy és a kis multimer 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 elektroforetikus elválasztott VWF multimer gélen történő merkaptolizálásával, amellyel a gélből a membránra történő fehérje transzfert egyenletessé (multimer mérettől függetlenül) lehetett tenni.

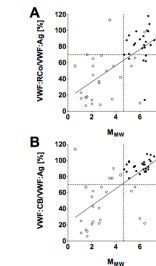
A multimer méretének jellemzéséhez első lépés a görbe alatti terület felső 25 százalékához tartozó sávok vándorlási távolságának meghatározása. Ehhez a felső 25%-t elválasztó vándorlási távolsághoz tartozó molekulaméretet ( $M_{MW25}$ ) - amelyet a mintában található multimer csúcsok, és a hozzájuk tartozó molekulatömeg összefüggése alapján lehet kiszámítani -, tekintettük a minta legnagyobb multimerit jellemző értéknek (16. ábra).

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 ( $r^2 = 0,42$  ill.  $0,43$ ) (17. ábra).



**16. ábra.** Az  $M_{MW}$  paraméter kiszámítása. (A) A reflektív denzitás (RD) a relatív futási front (Rf) függvényében ábrázolva egy normál (folytonos vonal) és egy 2 típusú von Willebrand beteg mintájának (szaggatott vonal) esetén. A szaggatott vonal felső 25%-át jelölő sávok láthatók. A szaggatott vonal felső 25%-át jelölő sávok (nagy molekulatömegű multimerhez tartozó) 25 százalékát jelöli. A kis képen egy normál (a) és egy 2 típusú von Willebrand beteg mintájának (b) elektroforetikus képe látható. (B) Kumulatív görbék. Az abszcisszán a VWF Rf logaritmusából és a hozzá tartozó Rf-ek alapján számított (az összefüggés a kis képen van ábrázolva, normál minta X, 2 típusú VWB O) MW található. Az ordinátán a felső részen ábrázolt görbe alatti terület a választott MW és az origó közötti részének a teljes görbe alatti területre vonatkoztatott százalékos aránya olvasható le. A

25 százalékos küszöb függőleges vonallal van jelölve az ábrákon.



**17. ábra.** A VWF funkciója és a multimerizációjának mértéke ( $M_{MW}$ ) közötti összefüggés. Normál egyének (●) és 2B típusú VWB (○) plazmákkal készült mérések eredményei. 30% alatti VWF:Ag tartalmú mintákhoz tartozó értékek jele négyyszög (◐). A szaggatott vonalak az átlag  $M_{MW}$  -2SD értéket és a 70% VWF aktivitás antigén arányt mutatják. Az A ábrarész a VWF risztocetin kofaktor aktivitás és antigén szintre vonatkoztatott aránya és az  $M_{MW}$  közötti összefüggést mutatja, a B rész a kollagén kötő aktivitás és antigén arányt mutatja az  $M_{MW}$  függvényében.

A VWF molekula multimerizációjának fokától függő aktivitása a kollagénhez való kötődését is befolyásolja. 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 folyamat során irodalmi felmérést készítettünk [87] és a VWF:CB mérésére módszert állítottunk be, amellyel a fenti méréseket is végeztük.

### Módszer a VFW és a trombocitán lévő receptora, a GPIb közötti kölcsönhatást vizsgálata

A lehető legkevesebb komponenst tartalmazó modell rendszert hoztunk létre, amelyben tisztított VWF és a trombocitán lévő receptora, a GPIb közötti kölcsönhatást vizsgáltuk. A konformációváltozás létrejöttéhez a trombociták jelenléte is szükséges lehet, mivel feltételezhető, hogy maguk a trombociták is húzóerőt fejtenek ki a VWF-ra időleges kapcsolódásuk során. Ennek a hipotézisnek a vizsgálatához a trombocitákat funkcionálisan aktív GPIb-vel fedett poliszitíren gyöngyökkel helyettesítettük. Ehhez 3  $\mu\text{m}$  átmérőjű karboxilát poliszitíren gyöngyökhöz kovalensen 24B3 antitesteket kötöttünk. A 24B3 monoklonális antitest képes a glicocalicin (a GPIb receptor extracelluláris protelitikus fragmense) aktív konformációban lévő megkötésére. Felhasználás előtt a 24B3 gyöngyöket glicocalicinnel inkubáltuk, majd mostuk; glicocalicin forrásként trombocita lisátum szűrletet használtunk. Áramlási citometriás módszerrel ellenőriztük az antitestek jelenlétét a gyöngyökön, majd a gyöngyökön lévő 24B3 glicocalicin kötő képességét. Igazoltuk, hogy botrocetin (kígyóméreg, amely képes a GPIb és a VWF összekapcsolódásának indukálására) jelenlétében a gyöngyök felszínén VWF kötés mutatható ki. Ezzel igazoltuk, hogy a gyöngyök felszínén az immobilizált glicocalicin funkcionálisan intakt. Az általunk kifejlesztett módszer újdonsága a korábbi próbálkozásokhoz képest, hogy a gyöngyök felszínén a glicocalicint a megfelelő orientációban és konformációban rögzítettük. A módszer hasznosságát jelzi, hogy - sajnálatos módon munkacsoportunktól függetlenül - az általunk végzett kísérletekkel párhuzamosan nagyon hasonló eljárást alkalmazó publikáció jelent meg [136], illetve kereskedelmi forgalomban ehhez hasonló gyöngyökön alapuló VWF:RCo teszt is megjelent [6]

Jelentős eredmény, a VWF nagynyomású folyadékkromatográfiával történő tisztítási eljárásának és a trombocitát modellező gyöngy GP-Ib fragmenssel való fedésének kidolgozása. Tervünk a két termék alkalmazása a jövőben kifejlesztendő diagnosztikai célú reagens kitted.

### A trombusképződés és trombogén felszín, a VWF és a trombociták vizsgálata, alapkutatósi eredmények

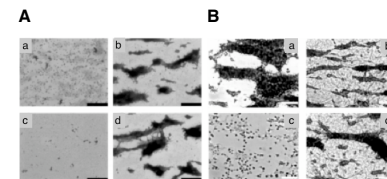
#### Trombogén felszín vizsgálata, VWF nélküli endotélsejt mátrixon történő adhézió és trombusképződés

Az artériás és a kapilláris keringésben a trombózis és hemosztázis első folyamata a sérült érfelszínen szabadbá válni 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 fibrináló, összességében a trombus. A folyamatot izolált kollagénen, humán mikrovaszkuláris endotélsejtek (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, fibronectin, 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 hiányát.

A magyar munkacsoportban készült a HMEC-1 ECM prokoaguláns aktivitásának és trombusképző tulajdonságának a meghatározása. A prokoaguláns aktivitást a sejtmatrixon mért citrátos plazma rekalcinálással indított fibrinolitikus idejéből határoztuk meg, amely  $36 \pm 5$  sec volt az HMEC-1 ECM-en, míg a HUVEC ECM-en  $95 \pm 6$  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 körülmények között egyenként, az artériáson csoportosan tapadtak ki a trombociták, és mindkét esetben egy réteget képeztek (18. ábra, A a,b).

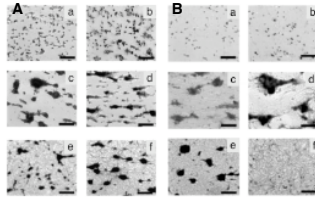


**18. ábra.** Adhézió/ trombusképződés és gátlásuk során kitapadt trombociták fénymikroszkópos képe. Normál LMWH-val antikoagulált vért áramoltattunk 5 percig, 2600/s sebességgradienssel, HUVEC ECM (A a, c) és HMEC-1 ECM (A b, d) felszíneken, 10  $\mu\text{g/ml}$  nonimmun IgG (a,b) vagy MoAb82D6A3 VWF ellenes antitest (c,d) jelenlétében. HMEC-1 ECM (B a,c) és kollagén (B b,d) puffer (a,b) vagy 10  $\mu\text{g/ml}$  hirudin jelenlétében (c,d). Sáv hossz=20  $\mu\text{m}$

A felszínen kitapadt trombociták vagy trombocita csoportok átlagos mérete 16 ill.  $50 \mu\text{m}^2$  a két sebességgradiensnek megfelelően. Az HMEC-1 ECM-en azonban nagy kiterjedésű és rétegvastagságú trombocita aggregátumok/trombusok keletkeztek a vénás és az artériás áramlási körülmények között egyaránt. Átlagos területük  $600\text{--}1200 \mu\text{m}^2$  volt (18. ábra, A c,d). Megfigyelhető, hogy az alacsonyabb sebességgradiens esetén valamivel nagyobb kiterjedésűek a trombusok. A kollagénen a jellemző, vénás áramláskor kis-, artériás áramláskor nagy kiterjedésű trombusok képződtek (18. ábra A e,f). A plazma VWF szerepét olyan 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 trombusképződést az HMEC ECM-en (18. ábra A a,c és B b,d). A trombin inhibitor hirudin jelenlétében az adhézió mértéke nem változott, azonban a trombusképződés elmaradt az HCEM-1 ECM-en (18. ábra B a,c), de nem változott a kollagén mátrixon (18. ábra B b,d).

Érdekes módon, a kontrollhoz hasonló, nagyméretű trombusok képződtek akkor is, amikor artériás áramlási körülmények között súlyos, 3-as típusú VW beteg vérért áramoltattuk a HMEC-1 ECM-en (19. ábra B c,d). 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 (19. ábra B a,b) és a kollagén mátrixon (19. ábra B e,f) egyaránt. Ez utóbbin alig vagy egyáltalán nem volt kitapadt trombocita artériás áramlási körülmények között.



**19. ábra.** Endotél sejt mátrixokon kitapadt trombociták / trombus fénymikroszkópos képe. 650/s vagy 2600/s sebességradienst, kontroll (A) vagy 3-as típusú VWB (B) LMWH-val antikoagulált vére 5 percig volt áramoltatva különböző felszínek felett. HUVEC ECM (a, b), HMEC-1 ECM-je (c, d) vagy kollagén (e, f). Áramlási ir = 20  $\mu\text{m}$ .

A HMEC-1 VWF nélküli mátrixa erős trombogén tulajdonságot mutatott, annak ellenére, hogy az I-es, 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 aggregációja lemaradt.

#### Kollagénhez artériás áramlási körülmények között kapcsolódott VWF molekula vizsgálata

Atomerő mikroszkóp alkalmazásával (atomic force microscopy, AFM) lehetővé vált a nagy nyíróerő hatására kitekeredett VWF vizsgálata [137], azt gondoltuk, hogy hasonló módon meggyőződhetünk arról, hogy az immobilizált kollagénhez, különböző áramlási körülmények között kötődő VWF faktor kitekeredik-e [9].

A hálós kollagén szálaikon 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 analizisét. A géliszűrővel tisztított VWF-t párhuzamos lemezű áramlási kamrában, I-es típusú kollagénnel fedett mikroszkóp fedőlemezekre, áramoltattunk. A kollagénnel kötődött VWF-ről AFM-mel alkottunk képet. A VWF kötéseinek morfológiai különbségeit alacsony ( $0,07 \text{ N/m}^2$ ) és magas ( $4,55 \text{ N/m}^2$ ) nyírófeszültséget alkalmazva hasonlítottuk össze.

Az eredmények értékelhetősége szempontjából fontos volt tisztázni azt, hogy milyen a VWF adszorpciója az alkalmazott üveg mikroszkóp fedőlemezhez és az azon lévő kollagénnel. Ehhez kereskedelmi forgalomból beszerzett FVIII-VWF preparátumot használtuk (Haemate P). A specifikus jelzési eljárás miatt eleinte szükségtelen tartottuk a VWF preparátum tisztítását. Azonban a VWF preparátum -amely 50% humán szérumból albumint és az SDS-PAGE alapján még számos más proteint is tartalmazott- jobban tapadt a csupasz üvegfelszínhez, mint a kollagénnel

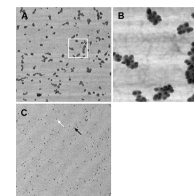
fedett lemezhez. Próbáltuk BSA-val és Tween-20 -al is blokkolni a felszínt, de ez inkább a nem specifikus kötések kialakulásának kedvezett. Ezért géliszűrővel elválasztottuk a VWF-t az albumintól és egyéb proteinektől. A további kísérletek során ezt a tisztított VWF-t használtunk PBS-ben hígítva. Az AFM munkához szűrővel sterilizált adatokat használtunk.

A trombocita kollagén receptorai és a kollagén közti direkt interakció miatt technikai nehézségeket okozott a kollagénnel kötődött VWF-nak a GPIb-vel való kölcsönhatási képességét ellenőrizni, de a tisztított VWF aktív volt a risztocetin indukálta trombocita aggregációs tesztekben. Ismert, hogy a VWF-nak kollagénnel való kötődésével nem szűnik meg a GPIb -hez való affinitása, ezért feltételeztük, hogy a kollagénnel kötött VWF mediálja az áramlásfüggő trombocita adhéziót.

Mivel az aranygömbökkel történő jelzéskor nagy a valószínűsége a nem specifikus kötések kialakulásának, általános a blokkoló anyagok alkalmazása az elektronmikroszkópiában. Ezek az anyagok azonban a vizsgálandó molekulák alakát is befolyásolják. A probléma megoldása érdekében egyes kutatók teljes mértékben kerülnek a blokkoló használatát és inkább nagy hígításban alkalmazzák az antitesteket, ennek azonban alacsony jelölési hatások a következménye. Mivel mi magas jelölési hatásfokot akartunk elérni, a lehető legalacsonyabb háttér mellett, egy kisméretű blokkoló molekula alkalmazását terveztük. A 0,1% -os Tween 20 -at tartalmazó PBS magas háttérrel eredményezett, a PBS-ben oldott 0,5% -os marha kazein valamint a PBS-ben oldott 0,05% -os Tween 80 jónak mutatkoztak. Mivel a kettő közül jobb volt a kazein, a további kísérletek során ezt alkalmaztuk.

A 1/10 hígításban alkalmazott arannyal jelzett „protein A” hatásosan jelölte a VWF-t, az egyedülálló VWF – anti-VWF komplex molekulák teljesen fedve voltak aranygömbökkel. A nem specifikusan kötött arany partikulumok majdnem kizárólag egyesével fordultak elő, nagyon alacsony arányban megfigyelhetők voltak a kettesével elhelyezkedően, nagyobb aggregátumok viszont egyáltalán nem voltak.

Az első kísérletek alkalmazásával kettős jelölést (30- és 15 nm-es aranygömbökkel konjugált antitesteket) használtunk, annak kiderítése érdekében, hogy az arany markerek láthatóak-e a kollagénnel fedett felszínen.



**20. ábra.** A VWF aranygömbökkel konjugált Protein A jelölésének hatásfoka és specifikitása. (A) Az egyedülálló VWF molekulák majdnem teljesen fedve vannak arannyal. A VWF kollagén kötéseket poliklonális anti-VWF antitestekkel majd protein-A-konjugált arannyal (15nm-es átmérőjű gömbök) lettek láthatóvá téve. (B) Az A részben

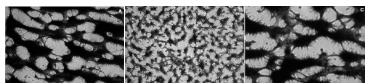
fehér négyzet alapján kinagyított részlet. (C) Nem specifikus immunogold-kollagén kötéseket. VWF nélküli PBS-sel perfuzionált kollagén felszín az előzőekhez hasonlóan volt kezelve. Habár néhány marker jelen van a felszínen (fehér nyíl), azok nem csoportosan helyezkednek el, ezért könnyedén megkülönböztethetők a specifikusan kötöttektől. Egységes kollagénnel borítja a felszínt és formálja az apró filamentumokat (fekete nyíl). A kép „tapping mode” -ban készült, laterális dimenziói 5x  $\mu\text{m}$  (A és C) valamint 1x1  $\mu\text{m}$  (B) vastagsága 0 és 20nm között mozog (világostól a sötétig). Ultralever „D” tip, F = 158 kHz, nagyjából 90%-os szabad vibrációs amplitúdó alapérték.



Az áramlási kamrába helyezett, kollagénnel fedett üveglemezek felett gélfiltrációval tisztított VWF-t áramoltattunk. Az áramlást követő fixálás után levegőn végzett AFM-es képalkotás történt. A kollagénnel 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 kollagénnel kötődött VWF mennyisége majd kétszerese a kis áramlási sebességgel áramoltatott oldatból kikötődőthöz képest, valamint megjelentek szokatlan formájú VWF molekulák is. Ez a különbség 15 perces perfúzió esetében – valószínűleg diffúzió következtében - eltűnt. Mosott és fixált trombocita ( $68 \times 10^9/L$ ) jelenléte nem okozott semmilyen látható változást a VWF morfológiájában a különböző nyíróerők hatása alatt.

#### Humán VWF ellenes antitest 2B típusú VWB-hez hasonló eltéréseket okoz

Munkacsoportunk egyik tagja korábbi munkájában VWF ellenes monoklonális antitestet készített (1C1E7), amely fokozta a risztocetin indukálta vérelemek aggregációt és elősegítette a nagy molekulású VWF multimerok kötődését a trombociták GPIb-jéhez, amely kiváltotta a VWF GPIIb-IIIa-hoz való kötődését is [138]. Ezzel ellentétben, később a közös munkánkban azt találtuk, hogy az 1C1D7 antitest jelentős mértékben gátolta trombociták kollagénnel történő kitapadását párhuzamos lemezű áramlási kamrában, 2600/s sebességgradiens esetén (21. ábra).



**21. ábra:** Adhézió kollagén felszínén (A) PBS (kontroll), (B) 1C1E7 antitest és (C) 23/4B1 antitest jelenlétében. 400x nagyítású fénymikroszkopos felvétel. A PPACK-al alvadást gátló vért 30 percig 20°C-on inkubáltuk 20 µg/mL VWF ellenes 1C1E7, 20 µg/mL 23/4B1 antitesttel, vagy PBS-sel (kontroll). A III-as típusú kollagénnel fedett üveglemezeket a vért 2600/s-en, 5 percig, 37°C-on áramoltattuk. A lemezeket glutaraldehiddel fixáltuk, May-Grünwald-Giemsa szerint festettük.

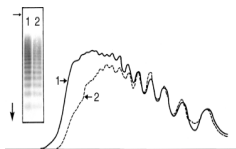
Amikor a citrátsó vért 1C1D7 antitesttel inkubáltuk, áramlási citometriás analízissel spontán VWF-GPIb kötődést mutattunk (4. táblázat).

|                          | Fluoreszcencia intenzitás |            |            |
|--------------------------|---------------------------|------------|------------|
| monoklonális antitestek  | kontroll                  | XSF-1C1E7  | XSF-82D1E1 |
| Nincs antitest           | 32,1 ± 6,9                | 77,6 ± 9,3 | 29,4 ± 9,4 |
| GPIb ellenes 15E7        | 31,1 ± 9,8                | 44,5 ± 4,3 | 32,9 ± 8,7 |
| Szignifikancia szint (P) | NS                        | <0,001     | NS         |

**4. táblázat.** Áramlási citometriás analízis. VWF kötődés trombocitákhoz 1C1E7 antitest jelenlétében. Teljes vér volt szukcimidilfluoreszcinnel (XSF) konjugált VWF ellenes monoklonális antitesttel inkubálva (1C1E7 vagy 82D1E1 funkcionálisan inaktív antitest) 50 µg/mL koncentrációban vagy pufferrel és ± jelöletlen GPIb ellenes, a VWF kötőhelyére specifikus monoklonális antitesttel (15E7) 20 µg/mL koncentrációban, 30 percig, 20 °C-on. A GpIIb-IIIa receptorok 16N7C2 antitesttel gátoltuk minden kísérletben. Majd trombocita dús plazma készült a vérből és a „FACSflow” pufferrel hígítva volt analizálva. Három kísérlet készült,

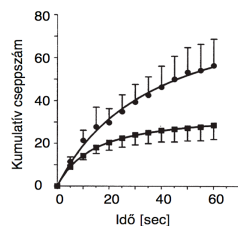
mindegyikben 10 000 trombocita fluoreszcencia intenzitása volt mérve. Átlag ± SD szerepel a táblázatban. NS= nem szignifikáns.

A kötődést teljes mértékben gátolta a GPIb ellenes 6D1 monoklonális antitest. Emellett a legnagyobb molekulatömegű multimerok mennyisége csökkent a plazmában (22. ábra).



**22. ábra.** 1C1E7 antitest jelenlétében és hiányában végzett VWF multimer analízis. A citráttal alvadást gátló vért 30 percig 20°C-on inkubáltuk 20 µg/mL VWF ellenes 1C1E7, vagy 20 µg/mL 82D1E1 (kontroll) antitesttel. Ezt követően SDS-agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük a plazma VWF multimer szerkezetét. Az ábra a minták denzitometriás görbéit mutatja. A nyíl a mintafelvitel helyét jelzi.

Azok a trombociták, amelyek felszínéhez VWF kötődött, makroaggregátumokat alkottak, adhéziós képességük viszont nagymértékben csökkent, amint ezt az előbb említett párhuzamos lemezű áramlási kamrával és az O'Brien filterométerrel végzett kísérletek igazolták. A filterométer üveggyöngyökkel töltött cső és artériás sebességgradiens biztosítva méri az adhéziót és aggregációt. Az O'Brien filterométerben kontroll vér esetén 30 másodpercen belül megszűnt a vér áthaladása, azonban az 1C1E7 antitestet tartalmazó vér szabadon áramlott rajta keresztül. A záródási idő alatt áthaladt vér cseppszámával jellemezve a trombocita dugó képződését az 23. ábra mutatja. Az áthaladt vérből meghatározott trombocitaszám kontroll esetében  $90 \pm 7\%$ , míg az 1C1E7-tartalmazó vérben  $42 \pm 12\%$  ( $P < 0.001$ ) volt a kiindulási vér trombocita számához viszonyítva.



**23. ábra.** Az 1C1E7 antitest hatása O'Brien filterométerben. A citráttal alvadást gátló vért 30 percig 20°C-on inkubáltuk 20 µg/mL VWF ellenes 1C1E7 antitesttel, vagy PBS-sel. 4 ml vért nyomtunk keresztül a szűrőn 40 Hg mm nyomással. Az átjutó vér kumulatív cseppszámát az idő függvényében mutatjuk. Átlag ± SD 10 kísérletben.

Ezek az eredmények nagymértékben hasonlítottak a 2B típusú VWF betegségben megfigyelhető eltérésekre. Az 1C1D7 antitest kötődések az A1 domén egy távoli konformáció változására következtek, mivel az 1C1E7 monoklonális antitest epitópja az alegység N-terminális részén lokalizálódik [19]



Összegezve, a monoklonális antitest 2B típusú VW betegséghez hasonló laboratóriumi eltérést okozott, vizsgálatainknak szerepe van a kóros VWF-GPIIb kölcsönhatások mechanizmusának tisztázásában.

### GPIIb-IIIa topológiája a trombocita felszínén

A trombocita felszínén a fibrinogén és más adhezív proteinek indukálható receptora egy  $\text{Ca}^{2+}$  függő heterodimer, amely egy GPIIb (CD41 vagy  $\alpha_{IIb}$ ) és egy GPIIIa (CD61 vagy  $\beta_3$ ) alegységből áll. Jól ismert ennek a receptornak oldatban és a membránban egyaránt a hőmérséklet-, a pH- és az extracelluláris Ca érzékenysége; a diszulfid hidak lokalizációja és a kötésben résztvevő láncok aminosav szekvenciája. Oldatban az intakt és aktivált heterodimer topográfiája is ismert.

Monoklonális antitestek és fluoreszcencia rezonancia energia transzfer alkalmazása lehetővé tette a trombocita felszíni glikoprotein GPIIb-IIIa heterodimer membrán topológiájának kiegészítését. Igazolni lehetett a IIb hajlított alakját nyugvó állapotban [139]. A DE OEC Biofizika Intézete munkacsoportjának eredményéhez a trombociták preparálásával, jelölésével járultam hozzá, ezért ezeket az eredményeket nem ismertetem.

### Kollagén VWF kölcsönhatás és a trombusképződés gátlása, inhibitor molekulák, gyógyszer hatás potenciál

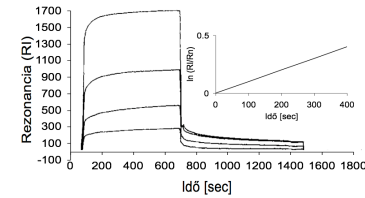
#### Pióca nyálából izolált peptid (calin) specifikus gátló hatása a VWF-kollagén kölcsönhatásra artériás áramlási körülmények között

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

Először 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 hőrscögben.

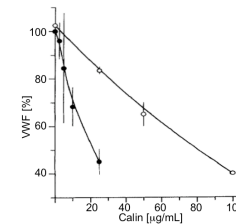
*In vitro* kísérleteim eredményei szerint a Calin koncentrációfüggően gátolta a von Willebrand faktor-kollagén kölcsönhatást, a trombocita aktivációt és adhéziót mind statikus, mind dinamikus körülmények között [14]. Statikus körülmények között a Calin a plazma és a tisztított VWF kötődését I-es típusú borjúbőr kollagénhez 3,6 és 3,0  $\mu\text{g/mL}$   $\text{IC}_{50}$ -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  $\text{IC}_{50}$ . a Calin kollagénhez való kötődését valósidejű, felszíni plazmon rezonancia módszerrel mérve. A Calin koncentrációfüggően kötődött a kollagénhez (24.

ábra), a lemoshatóságának az analízise monofázisos disszociációt mutat (24. ábra, belső grafikonja), amely  $(8,8 \pm 0,3) \times 10^{-4}/\text{s}$  konstanssal jellemezhető.



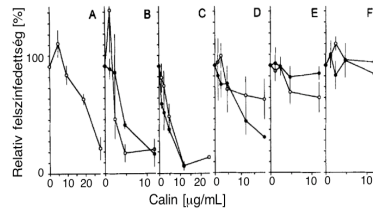
**24. ábra.** Calin és immobilizált III-as típusú kollagén kötődési jellemzője felületi plazmon rezonancia méréssel (BiaCore). A belső ábra a disszociáció logaritmikus transzformációja,  $k_{\text{dissz}} = (8,8 \pm 0,3) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ .

Dinamikus körülmények között, sebességgradienstől függően gátolta a Calin a VWF kötődését a kollagénhez, 300 /s sebességgradiensnél  $\text{IC}_{50}$ :16-19  $\mu\text{g/mL}$ , 1300 /s-nél  $\text{IC}_{50}$ :75-83  $\mu\text{g/mL}$  volt (25. ábra).



**25. ábra.** Calinnal 20 perccig, szobahőmérsékleten előinkubált plazma 5 perccig volt áramoltatva kollagén felszínen, 1,300  $\text{s}^{-1}$  (○) vagy 300  $\text{s}^{-1}$  (●) sebességgradienssel. Az eredmények a Calin nélküli mintához viszonyított %-ban vannak kifejezve. (n = 2). A számoláshoz a perfundált plazmával készült a standard görbe.

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 alvadésgátolt teljes 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 fibrinogénnel fedett felszínekhez mindkét sebességnél. Az eredményeket a 26. ábra mutatja.



**26. ábra.** Calin hatása a trombocita adhézióra, különböző felszíneket és sebességgradienst alkalmazva. Adhézió különböző felszínek felett 5 percig áramoltatott citrátos vérből, a sebességgradiens  $1,300 \text{ s}^{-1}$  (○) vagy  $300 \text{ s}^{-1}$  (●). Az eredmények a Calin nélküli mintához viszonyított relatív felszínfedettségben [%] vannak kifejezve (átlag  $\pm$  SEM): a felszín, a független kísérletek száma, majd a magas és az alacsony sebességgradienst tartalmazó értékek, sorrendben. (A) Horn kollagén,  $n=3$ ;  $13,2\% \pm 4,3\%$ ; (B) humán I-es típusú kollagén,  $n=4$ ;  $6,2\% \pm 4,2\%$  és  $n=3$ ;  $26,7\% \pm 5,2\%$ ; (C) humán III-as típusú kollagén,  $n=6$ ;  $26,0\% \pm 6,7\%$  és  $n=3$ ;  $16,1\% \pm 6,1\%$ ; (D) humán köldökvéna endotél sejtek extracelluláris mátrixa,  $n=5$ ;  $42,9\% \pm 9,1\%$  és  $n=6$ ;  $34,2\% \pm 8,6\%$ ; (E) tisztított VWF,  $n=3$ ;  $71,6\% \pm 7,9\%$  és  $n=3$ ;  $33,2\% \pm 7,5\%$ ; (F) tisztított fibrinogén,  $n=3$ ;  $50,8\% \pm 8,7\%$  és  $n=3$ ;  $46,1\% \pm 11,6\%$ .

A vizsgált maximális Calin koncentrációnál ( $28 \mu\text{g/mL}$ ),  $1300/\text{s}$  sebességgradiensnél, a kontroll  $28 \pm 17\%$ -ára ( $\pm$ SE) csökkent a trombocita adhézió ló inból származó (Horn) kollagénhez képest (26. A. ábra). A Calin majdnem teljesen gátolta a trombociták kitapadását humán kollagén I-es és III-as típusához  $1300/\text{s}$  és  $300/\text{s}$  sebességgradienseknél egyaránt (megfelel  $\text{IC}_{50}$ :  $4,1 \pm 2,8$ ,  $5,1 \pm 1,6$  és  $5,1 \pm 2,1$ ,  $3,0 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ ; 26.B. és C. ábra). Hasonló kísérleti körülmények között, a Calin sebességgradienstől függően, de csak részlegesen gátolta az adhéziót humán köldökvénából preparált endotélsejtek extracelluláris mátrixán.  $\text{IC}_{50}$   $12,1 \pm 4,2 \mu\text{g/mL}$   $300/\text{s}$ -nél, ahol az adhézió inkább kollagén függ (26.D. ábra).  $1300/\text{s}$ -nél  $18 \mu\text{g/mL}$  Calin  $32 \pm 24\%$  gátlást okozott. Ennél a sebességgradiensnél az adhézió gátlása VWF-ral fedett felszínhez  $32 \pm 18\%$  volt,  $12 \mu\text{g/mL}$  Calin koncentrációnál (26.E. Ábra). Nem volt értékelhető adhézió-gátlás alacsony sebességgradiensnél VWF-ral- és egyik sebességnél sem fibrinogénnel fedett felszínekhez (26. ábra E és F).

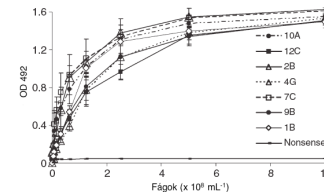
Nem befolyásolta az eredményeket az, hogy alvadásgátlóként citrátot vagy LMWH-t alkalmaztunk, kivéve az I-es típusú humán kollagén esetét, amelyhez citrátos vérből a trombociták nem tapadtak ki.

#### VWF konformáció függő kötőhelyeinek vizsgálata, trombusképződés gátlása a VWF-kollagén kölcsönhatásra specifikus fágokkal és fágpeptiddel

A kollagén, a VWF és a GPIIb/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.

$2 \cdot 10^9$  különböző fágklónt tartalmazó lineáris heptamer peptid könyvtárt 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 felülűzőit teszteltük VWF-ral fedett ELISA lemezbe mérve. A VWF-hoz kötődött fágokat peroxidázzal jelzett M13 ellenes antitesttel majd a peroxidáz szubsztátjával detektáltuk. A legmagasabb affinitással kötődő 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 (27. ábra.). A kötődés specifikus volt, mivel a nyolcadik, 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 glikokalicint egy olyan monoklonális antitesttel (Ab24B3) rögzítettük a felszínhez, amely biztosította az GPIb aktív konformációjának megfelelő formát.



**27. ábra:** A különböző L7-fág klónok kötődése VWF-hoz. 7C, 10A, 2B, 1B, 4G, 9B 12C és aspecifikus fág klónok hígítási sorozata  $10 \mu\text{g/mL}$  VWF oldattal fedett mikrotiter lemezen. A kötődött fágokat anti-M13-HRP antitesttel és szubsztátjával detektáltuk (átlag  $\pm$  SEM,  $n=3$ ).

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 ligandjaival, kollagénnel és GPIIb-a-val. Érdekes módon az L7-fágok gátolták a VWF kötődését I-es és III-as típusú kollagénhez statikus körülmények között, megközelítőleg  $2$  és  $1 \cdot 10^9$  fág/mL-es  $\text{IC}_{50}$ -nél, amíg az aspecifikus fágoknak nem volt hatása. A fágok nem befolyásolták a VWF-GPIIb 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 vérelemzés 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 között. A vért  $4000/\text{s}$  sebesség grádienssel áramoltattuk, humán I-es vagy III-as típusú kollagénnel fedett fedőlemezen. Ezen körülmények között az L7-fágok részlegesen gátolták a trombociták kitapadását mindkét felszín esetében, ha  $1 \cdot 10^{10}$  fág/mL mennyiségben alkalmaztuk őket és maximum gátlást értünk el  $1 \cdot 10^{11} /\text{mL}$  fágszám esetén. Puffer, vagy aspecifikus fág esetén nem tapasztaltunk gátlást (5. táblázat).

| Trombocita adhézió gátlása [%] |     |     |                        |  |           |        |     |      |         |
|--------------------------------|-----|-----|------------------------|--|-----------|--------|-----|------|---------|
| L-7 fág 10 <sup>9</sup> /mL    |     |     | *L-7 fág               |  | L-7 P     | *L-7 P | MAP | *MAP | 82D6A3  |
| 2                              | 10  | 100 | 10 10 <sup>9</sup> /mL |  | 0,7 mg/mL |        |     |      | 5 µg/mL |
| 32                             | 42  | 99  | 4                      |  | 3         | 1      | 91  | 23   | 98      |
| ± 18                           | ± 7 | ± 5 | ± 3                    |  | ± 8       | ± 4    | ± 7 | ± 12 | ± 5     |

**5. táblázat.** L7-fágok és szintetikus fágpeptidek hatása vérlemezkék I-es, vagy III-as típusú kollagénnel fedett felszínre történő kitapadására artériás áramlási körülmények között (4000/s sebességgradiens, 5 perc) Az eredmények átlagai +/- SEM, három kísérletben különböző donoroktól származó vérrrel.  
\* nem specifikus fág vagy kevert peptidsorred

A fágok epitópjának/jainak keresése érdekében az L7 fágok kötődését vizsgáltuk különböző VWF deléciós mutánsokkal fedett felszínhez. A fágok (1-10)\*10<sup>6</sup>/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-VWF-hoz, arra következtettünk, hogy a VWF C doménjéhez kötődtek. Egy korábbi, ettől független munkában szintén VWF-kötő fágokat (B8 fágok) szelektáltunk pentadekamer fágkórvirtárból [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 IC<sub>50</sub>-nél a fágszám 5\*10<sup>9</sup> /mL volt.

Hogy a fágok hatását kizárólag az a peptid okozza amely az L-7-es fágkórvirtárt alkotó, a III-as köpenyfehérjén megjelölt peptid 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 peptiddel előinkubált vért kollagénnel fedett felszínen áramoltattuk (5.táblázat). Ennek az a lehetséges oka, hogy a monomer peptid aviditása kicsi a fág gazdasejthez kötődő részén lévő lévő 5 darab gp3-as köpenyfehérjén megjelenített 5 peptid együttes hatásához viszonyítva. A következő lépésben az alábbi négyágú peptidet szintetizált a kollaborátor. Neve MAP lett, amely a „multi antigen peptides” angol kifejezés rövidítése.

MAP: (H-Tyr-Asp-Pro-Trp-Thr-Pro-Ser)4-Lys2-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH2,

molekulatömege (g/mol): 4724.28

Kevert MAP: (H-Tyr-Ser-Thr-Trp-Pro-Pro-Asp)4-Lys2-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH2,

molekulatömege (g/mol): 4724.28

A négyágú, multiantigén peptidben van 6 arginin maradékból és egy (Lys)<sub>3</sub> magból álló rész, a megfelelő sztérikus elrendeződés érdekében. A peptidok kémiaiilag a szabad aminoscsoportokhoz 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.

**A VWF és a trombocita GPIb receptora közötti kölcsönhatás és gátlása**

A VWF a trombocitákat azok GPIb receptorához kötődve tartják a sérülés során szabaddá való trombogén felszín közelében.

Párhuzamos- és sikon forgó kúp rendszerű adhéziós eszközökkel a vénás és artériás körülményeket modellezve kollaborációs partnerünk GPIb gátlásra irányuló alaputatási munkáiba kapcsolódtunk be.

6B4 monoklonális antitest GPIb ellenes hatásának vizsgálata igazolta, hogy az antitest gátolta a risztocetin és a botrocetin indukálta aggregációt egyaránt, ezen kívül a trombociták kollagénhez való adhézióját artériás áramlási körülmények között. Dél-Afrikai partnerünkénél készültek a további kísérletek. Páviánakba olta a hörcsögben termelt antitestet vagy csak az F(ab')(2) fragmentjét, szinte azonnali trombocitopénia alakult ki, míg az Fab része magában nem váltotta ki ezt a hatást. Az Fab fragmens hatása olyan áramlási modellben volt tovább vizsgálva, amelyben glutáraldehiddel fixált, kollagén gazdag, marha perikardium (0,6 cm<sup>2</sup>) volt a trombogén felszín és a sebeséggradiens 700-1000/s között volt. A majmokat előkezelve 80-640 µg/kg antitest fragmenssel, jelentősen (43-65)%-kal csökkent az indium jelzett trombociták kitapadása ehhez a felszínhez. A legnagyobb mennyiség a vérzési idő kétszeres megnyúlását eredményezte. Az *ex vivo* indukált risztocetin agglutináció is csökkent. 6 percig hagyva trombus képződést, utána 110 µg/kg Fab fragmenet adva nem volt hatás. Az eredményekből úgy látszik, hogy a 6B4 monoklonális antitest a trombusképződést gátló anyag lehet [15];

Az antitest kötődését vizsgálva, igazolódott, hogy az a GPIbα leucin gazdag, ismétlődő alegységei és a C terminális végén lévő domének az antitest kötőhelyei (epitópjai). Áramlási körülmények között vizsgálva öt új, gátló hatású monoklonális antitestet, igazolódott, hogy ezek közül három, egymással versengve gátolta a GPIbα nyíróerő indukálta VWF kötőhelyeit. A kötőhelyük az N-terminálison, az 1-59 aminosav szakaszban volt. A botrocetin vagy a risztocetin indukált VWF kötődést azonban csak maximum 40% mértékben gátolták. Két antitest azonban, a 24G10 és a 6B4, amely minden vizsgált körülmény között gátolta a GPIb-VWF kötődést, a GPIbα különböző helyére kötődik, az egyik 1-81, a másik a 201-268 aminosav szakaszon. 6B4 kötőhelyét fágtechnológiával pontosítva, két aminosav szakaszon, a 259-262 és a 230-242 helyen mutattak azonosság a fágpeptidek. A 230-242 régióban írták le a trombocita típusú VWB-t okozó mutációt (PT-VWB), amelyet funkció nyerő mutációnak neveznek, mivel a VWF-t spontán köti. Azonban az egyezés nem volt teljesen igazolható, mert rekombináns GPIbα PT-VWB fragmenséhez való kötődése csak részben és nem teljesen volt gátolt. A 24G10 azonban sokkal erősebben kötődött.

Bár a két antitest versengett a trombocitákhoz való kötődésben, a 24G10 az 1-81-es helyen kötődött a GPIIb $\alpha$ -hoz [16].

### Trombin gátló peptid és DNS molekulák, hatásuk a trombózis hemosztázis folyamatára, plazmingeneráció

Trombin gátlását érték el szelektált fágokkal és módosított aptamerrel. Mid a kettő jelentősen befolyásolta a trombusképződést teljes vért alkalmazva HMEC mátrixon a különböző áramlási körülményeket modellező kísérleti rendszerünkben.

Ciklikus heptapeptid fágkönyvtárból válogatott, humán  $\alpha$  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 szintetikus is előállított peptid (trombin inhibitor peptid, TIP),  $K_i=0,49$  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 hatásának a vizsgálatát írjuk le [20].

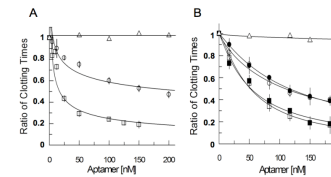
A konszenzus trombin aptamer, rövid néven C-15-mer, egy 15 nukleotidból álló egyszálú DNS, [d(GGTTGGTGGTTGG)], amelyet kombinatorikus oligonukleotidokból álló, hatalmas könyvtárból a trombin-kötő kapacitása alapján választották ki, majd sokszorozták. A C-15-mer nanomolekuláris koncentrációban gátolja a trombin hatását, a trombin exosite-1-hez, más néven az 1-es anionkötő helyhez kötődve.

Egy korábbi tanulmányunkban bemutattuk, hogy 4-tiodeoxiuridilátot (s4dU) tartalmazó oligonukleotidoknak magas affinitása van számos fehérjéhez is, a módosított oligonukleotidok redukált hidrofilitása miatt. Ebben a munkánkban (s4dU) csoporttal módosított C-15-mer aptamerek trombingátló hatását vizsgáltuk.

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 szubsztátjával, 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 trombin adtuk hozzá. A C15-mer és UC15-mer trombinnal együtt adva, gátolta a tisztított fibrinogén és plazma alvadását. Az aUC15-mer és vUC15-mer hatástalan volt. Fibrinogén oldat esetén az  $IC_{50}$  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 (29. ábra).

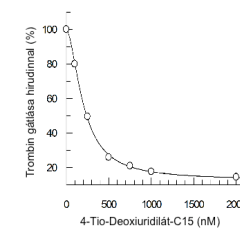


**29. ábra.** Aptamerek hatása a trombin által kiváltott alvadékképződési időre fibrinogén oldatban (A) és plazmában (B). A következő aptamereket használtuk a kísérletben: C15-mer

(○,●), UC15-mer (□,■), és vUC15-mer (△). A kísérletek első sorozataiban tisztított fibrinogén oldatot (A), vagy normál humán plazmát (B) preinkubáltunk az aptamerekkel különböző koncentrációban (○,□). A reakciót trombin hozzáadásával indítottuk el és mértük az alvadékképződési időt. A kísérletek második sorozatában az aptamereket trombinnal preinkubáltuk és a reakciót plazma hozzáadásával kezdtük (●,■). Az eredmények az aptamerek jelenlétében vagy hiányában mért alvadékképződési idők arányát fejezik ki. Négy kísérletet eredményeinek átlaga  $\pm$  SD szerepel az ábrákon.

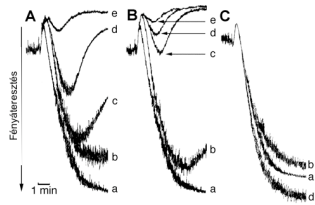
Mindkét aptamer körülbelül kétszer hatékonyabb volt fibrinogén oldatban, mint plazmában. Ugyanezt a különbséget figyelhettük meg akkor, amikor aptamerekkel preinkubált trombinnal indítottuk a plazma alvadását (29.B ábra) vagy FpA felszabadulását. Ezeket a próbákat reptilázal is megismételtük. A reptiláz egy kígyóméreg enzim, amely FpA-t lehasítva a fibrinogén A $\alpha$ -láncáról fibrinkiválást okoz. Az aptamerek egyikének sem volt hatása ezen reakcióra, amely megerősíti az aptamerek trombinspecifikus hatását. A trombin amidolitikus hatását a kromogén szubsztáttrál mérve - S-2238-, nem befolyásolták a reakciót az aptamerek, bizonyítva, 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 szubsztáttrál 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. (30. ábra).



**30. ábra** Az UC15-mer fenntartja a hirudin általi trombin-gátlást. A grafikon a hirudin hatását mutatja aptamerek hiányában. A trombin aktivitást S-2238 kromogén szubsztáttrálal mértük.

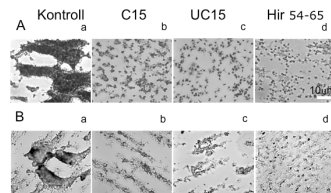
Vizsgáltuk az aptamerek hatását a trombin indukált trombocita aktivációra is. PRP-t vagy WPS-t 1 percig inkubáltunk aptamerekkel, növekvő koncentrációban, a trombocita aktiválódást trombinnal indítottuk. A PRP-ben a C15-mer és UC15-mer dózis-függő módon gátolta az aggregációt (31. ábra) és az ATP szekréciót.



**31. ábra.** Az aptamerek hatása a trombocita aggregációra emberi trombocita dús plazmában. Az 1.25 mM GPRP-t tartalmazó PRP kivonatokat előinkubáltuk a C15-mer (A) vagy UC15-mer (B) különböző koncentrációival: 0 mM (a), 0.1 mM (b), 0.2 mM (c), 0.3 mM (d), 0.5 mM (e) és 0.7 mM (f). Az elegyet 37 °C-on lumino aggregométerben összekevertük és 0.5 U mL<sup>-1</sup> végkoncentrációhoz trombint adtunk. Az eredmények négy hasonló eredményű kísérlet adatait mutatják.

Mind a két esetben az IC<sub>50</sub> értéke UC15-merhez csak a fele volt a C15-merhez képest. Sem az IC<sub>50</sub> értékek, sem a relatív hányados nem változott, amikor először a trombint inkubáltuk aptamerekkel, majd hozzáadtuk a PRP-hez. WSP-ben az IC<sub>50</sub> 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 (31.A,B ábra). Az aptamer hatás hiánya a TRAP-1 és a kollagén indukált aggregációra, trombin specifikusságot mutat.

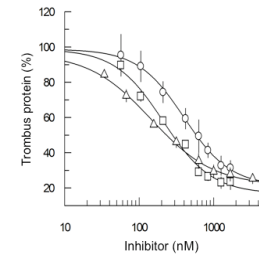
Az aptamerek hatását a trombusképződésre fiziológias áramlási körülmények között vizsgáltuk, teljes vérből, különböző trombogén felszíneken kúp és sík kamrában. Aptamerek és hir54-65 nélküli vérből a HMEC-1 mátrixot és trombinkezelte fibrinogén felszínt egyformán nagy trombusok borították (32. Aa,Ba ábra). Amikor az aptamerek jelen voltak, mind a HMEC-1 extracelluláris mátrixot, mind a trombinkezelte fibrinogén felszínt nagy számú, de kisebb területű és vékonyabb trombusok valamint sok egyedi trombocita fedte (32. Abc, Bbc ábra). Az aptamerek hatása a hir54-65 hatásához volt hasonlítható (32. Ad,Bd ábra). Kollagén felszínen nem volt változás a trombusképződésben az aptamerek jelenlétében (nem mutatjuk).



**32. ábra** Az aptamerek hatása a trombus képződésre, 650 s<sup>-1</sup> sebességgradienssel kúp vagy sík kamrát használva. A fedőlemezeket emberi dermális mikrovaszkuláris sejtekkel (HMEC-1) (A) vagy trombinkezelte fibrinogénnel (B) fedjük. Antikoagulált vérmintákat 10 U mL<sup>-1</sup> LMWH-val előinkubáltunk a következő gátló anyagokkal: 1.5 mM C15-mer (b), 1.5 mM UC15-mer (c), 1.0 μM hirudin fragmens (54-65) (d), vagy azok nélkül (a). 5 percig, 37°C-on áramoltak a mátrixok felett, majd May-Grünwald-Giemsa-val festettük a mintákat. Sávszélesség=10 μm.

A felszínen képződött trombusok mennyiségi meghatározására a bennük lévő fehérjék mennyiségét mértük és használtuk az aptamerek hatásának számszerű értékelésére.

Az így nyert adatokból számolva, (33. ábra) az UC15-mer kétszer hatékonyabb volt a C-15-mernél, az IC<sub>50</sub> értékek 10±29 nM és 400±38 nM között voltak. A hir54-65 és az UC15-mer hatása azonos volt.



fibrinogén felszínen, áramlási körülmények mellett. A kísérleteket az 29.B. ábra jelmagyarázat szerint hajtottuk végre, azzal a kivétellel, hogy ez esetben C15-mer (○), UC15-mer (□) vagy hirudin fragmenst (54-65) (△) emelkedő koncentrációban adtuk a citráttal antikoagulált vérmintákhoz, majd mértük proteint. Az eredményeket ábrázoltuk a felszínen mért összes fehérje [%] és az aptamer vagy hirudin fragmens koncentrációjának arányában. Az IC<sub>50</sub> értékeket a szövegben leírtak alapján számítottuk ki.

**33. ábra.** Aptamer koncentrációfüggő trombusképződés gátlása trombinnal kezelt

A vaszkuláris tónust és a hemostázist befolyásoló L-arginin kötődik a plazminogénhez is, ezért alacsony koncentrációban alkalmazott L-arginin hatását vizsgáltuk a tPA indukálta plazmingenerációra és a fibrin lebomlására. Az *in vitro* plazmingenerációt és fibrin(geno)lízist a plazmin kromogén szubsztátjának kinetikus mérésével és termék elektroforetikus analízisével. Alacsony koncentrációjú L-arginin jelenlétében a plazmingeneráció fokozódott, és a fokozott fibrin lebomlás is detektálható volt. Néhány antitrombotikum L-arginint is tartalmaz, ezért ezt a hatást ott figyelembe kell venni [140].

## Hemosztázis, trombusképződés, trombocita és VWF vonatkozású klinikai kutatások

### 2B típusú von Willebrand betegek fenó- és genotipizálása

A VWF rutin mennyiségi analízisét kiegészítő minőségi analízis és speciális funkcionális vizsgálatok rutinszerűen, megfelelő minőségkontrollal vannak beállítva a laboratóriumunkban, ezáltal kiegészítjük a rutin vizsgálatokat és klinikai esettanulmányokhoz járultunk hozzá. 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 fenó- és genotípusú belga beteg esetét lehetett csatolni, így közösen történt a publikálás, amely szerint az R1306W VWF mutáció okozta a 2B VWB-et.

Szerzett Bernard-Soulier szindróma esetének ismertetése

Egy betegnél antinukleáris antitesteket, poliklonális gammopátiát és magas koncentrációjú, keringő immunkomplexet diagnosztizáltunk. Ezek mellett a betegnek enyhén megnyúlt a vérzési ideje és izolált eltérést tapasztaltunk PRP-vel végzett, risztocetin indukálta trombocita aggregációnál. A beteg plazmája gátolta a RIPA-t normál PRP-ben és normál vérlemezke szuszpenzióban. A plazma VWF aktivitás és multimer szerkezet nem mutatott eltérést. ELISA módszert alkalmazva kimutattunk trombocita receptor GPIb ellenes antitestet. Az adatok szerzett Bernard-Soulier szindrómára utalnak. Úgy találtuk, hogy a beteg GPIb ellenes antitest jelenléte mellett immunkomplex mediált leukocitoklasztos vaszkulitis-szal társult, antinukleáris antitesttermelésben szenvedett. Habár az antitest titer túl alacsony volt, hogy vérlemezke eredetű vérzést okozzon, voltak laboratóriumi eltérések. Továbbá a betegség későbbi fázisában súlyos nekrotizáló vaszkulitisz alakult ki, amit mélyvénás trombózis követett. A VWF receptorával, a trombocita GPIb-vel kapcsolódó antitest okozta szerzett Bernard-Soulier szindrómás esetet diagnosztizált munkacsoportunk. A beteg egyéb autoimmun antitestjei mellett a GPIb ellenes antitestnek alacsony volt a titere, ezért a Bernard-Soulier szindrómás betegre jellemző vérzékenységnek elsősorban csak a laboratóriumi jelei voltak megfigyelhetők.[22].

Párhuzamos- és síkon forgó kúp rendszerű adhéziós eszközökkel a vénás és artériás körülményeket modellezve a klinikai kutatás területén vizsgáltuk különböző vaszkuláris hematológiai betegségek patomechanizmusát.

Emelkedett trombocita GPIb receptorszám, fokozott trombocita adhézió és súlyos cerebrális ishemia polycythemia vera esetén

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. Az alábbi táblázatokban ismertetem az eredményeket.

6. Táblázat. IIHematológiai és immunkémiai eredmények

| Laboratóriumi vizsgálatok     | Referencia tartomány | Beteg #1      | Dimenzió             |
|-------------------------------|----------------------|---------------|----------------------|
| Teljes vér viszkozitás        | 3.5 - 4.2            | 5.8           | mPa×s                |
| Vörösvértestszám              | 4.7 - 6.1            | 7.5 ± 0.1*    | ×10 <sup>12</sup> /l |
| Hemoglobin                    | 13.5 – 17.0          | 14.14 ± 1.13* | g/dl                 |
| Hematokrit                    | 0.40 - 0.52          | 0.50 ± 0.1*   |                      |
| MCV                           | 80 - 99              | 64.7 ± 6.6*   | fl                   |
| MCH                           | 27 - 31              | 19.4 ± 1.5*   | pg                   |
| Fehérvérszám                  | 4.8 - 10.8           | 7.0 ± 1.5*    | ×10 <sup>9</sup> /l  |
| Trombocitaszám                | 150 - 400            | 264.0 ± 31.4* | ×10 <sup>9</sup> /l  |
| Vas                           | 10.6 - 28.3          | 3.4           | μmol/l               |
| Transzferrin                  | 2.0 - 3.8            | 2.5           | g/l                  |
| Transzferrin szaturáció       | 16 - 45              | 5.4           | %                    |
| Oldható transzferrin receptor | 0.9 - 2.3            | 11.1          | mg/l                 |
| Ferritin                      | 16.4 - 323.0         | 11.9          | μg/l                 |

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.

7. Táblázat Véralvadási eredmények

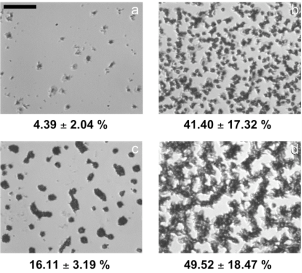
| Laboratóriumi vizsgálatok                        | Kontroll referenciatartomány | Beteg #1      | Unit         |
|--------------------------------------------------|------------------------------|---------------|--------------|
| Protrombin idő                                   | 9.3 - 13.3                   | 10.8 ± 0.4*   | s            |
| APTT                                             | 33.7 - 42.7                  | 61.5 ± 5.6*   | s            |
| Trombin idő                                      | 16.9 - 24.9                  | 17.2 ± 1.8*   | s            |
| Fibrinogén                                       | 1.5 - 4.0                    | 3.1 ± 0.5*    | g/l          |
| APTT-LA                                          | 37.0 - 46.0                  | 70.8 ± 6.9*   | s            |
| APTT-LA beteg-kontroll keverék (1:1)             |                              | 48.9 ± 3.0*   | s            |
| APTT-LA keverő plazma                            |                              | 37.0 ± 1.5*   | s            |
| Ráta: dPT, 50×                                   | < 1.2                        | 1.5 ± 0.2*    |              |
| Ráta: dPT, 500×                                  | < 1.2                        | 1.4 ± 0.2*    |              |
| Antikardiolipin antitest IgG                     | < 15                         | 8.1 ± 4.2*    | U/ml         |
| Antikardiolipin antitest IgM                     | < 12.5                       | 24.4 ± 9.3*   | U/ml         |
| Anti-β <sub>2</sub> -glikoprotein I antitest IgG | < 10                         | 4.0 ± 0.7*    | U/ml         |
| Anti-β <sub>2</sub> -glikoprotein I antitest IgM | < 12                         | 20.3 ± 2.0*   | U/ml         |
| PFA100 záródási idő kollagén/ADP                 | 55 - 118                     | 126.8 ± 15.2* | s            |
| PFA100 záródási idő kollagén/epinefrin           | 63 - 142                     | 191.8 ± 28.4* | s            |
| VWF:Ag                                           | 50 - 160                     | 62.0 ± 8.5*   | %            |
| VWF:RCo                                          | 58 - 166                     | 48.2 ± 7.8*   | %            |
| FVIII:C                                          | 60 - 150                     | 54.2 ± 10.4*  | %            |
| SDS-agaróz elektroforézis                        |                              | normál        |              |
| ATP kiáramlás<br>(500 µg/ml arachidonsav)        | 2.63                         | 0.61          | <sup>a</sup> |
| ATP kiáramlás (10 µmol/l ADP)                    | 1.16                         | 0.53          | <sup>a</sup> |
| ATP kiáramlás (10 µg/ml epinefrin)               | 1.71                         | 0.20          | <sup>a</sup> |
| ATP kiáramlás (1 µg/ml kollagén)                 | 1.66                         | 0.45          | <sup>a</sup> |
| ATP kiáramlás (5 µg/ml kollagén)                 | 2.31                         | 0.41          | <sup>a</sup> |
| ATP kiáramlás (5 U/ml trombin)                   | 3.81                         | 0.97          | <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> Az ATP felszabadulás egysége µmol ATP/10<sup>11</sup> trombocita

8. Táblázat A GP Ib, GP IIb-IIIa és a P-szelektin receptorok száma nyugvó és aktivált trombocitákban, öt egészséges kontroll, a vizsgált személy (Beteg #1) és más PV betegek (#2, #3 valamint #4) esetében. Az átlag és a tartomány van feltüntetve.

| GP Ib receptor/trombocita       |                             |          |                             |
|---------------------------------|-----------------------------|----------|-----------------------------|
|                                 | Kontrollok                  | Beteg #1 | Betegek #2, #3 and #4       |
| Nyugvó trombociták              | 33 929<br>(27 925 - 39 027) | 66 962   | 31 522<br>(29 266 - 35 311) |
| Aktivált trombociták            | 20 556<br>(16 301 - 26 928) | 56 041   | 24 009<br>(17 945 - 28 036) |
| GP IIb-IIIa receptor/trombocita |                             |          |                             |
|                                 | Kontrollok                  | Beteg #1 | Betegek #2, #3 and #4       |
| Nyugvó trombociták              | 52 036<br>(39 099 - 60 574) | 42 968   | 34 035<br>(26 588 - 39 731) |
| Aktivált trombociták            | 72 025<br>(62 929 - 82 443) | 67 121   | 37 974<br>(20 692 - 47 246) |
| P-selectin receptor/trombocita  |                             |          |                             |
|                                 | Kontrollok                  | Beteg #1 | Betegek #2, #3 and #4       |
| Nyugvó trombociták              | 148<br>(44 - 373)           | < 100    | 143<br>(81 - 204)           |
| Aktivált trombociták            | 7 985<br>(4 310 - 12 021)   | 9 935    | 5 383<br>(3 770 – 7 315)    |

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 egészséges és a PV kontrollok esetén a trombociták egyrétegtben történő kitapadása volt a jellemző (34. ábra).



34. ábra Trombocita adhézió a VWF- (A) és kollagén (B) felszínre, nyírófeszültség 0.379 N/m<sup>2</sup> (a, c) és 9.878 N/m<sup>2</sup> (b, d). kontroll (a, b) és a #1 betegnél (c, d). A sávhossz az „a” ábrarészen 50 µm., amely a nagyítást jelenti és minden ábrarészre vonatkozik. Az ábrarészek alatti számok a felszínfedettség átlagát jelentik (n=3).

Hasonló, patológiás eredményeket még nem publikáltak PV-val kapcsolatban. A tanulmány alátámasztja, hogy a normál trombocitaszámmal rendelkező PV betegeknek is szükséges antitrombocita terápia [27].

#### **Inzulin függő cukorbetegség plazmájából képzett trombocita dús alvadék lízis rezisztenciája**

Az artériákban képződött trombocita dús trombus fibrinolitikus rezisztenciája a kutatások egyik célpontja. Cukorbetegség trombocita dús plazmájában (PRP) trombinnal képzett alvadék lízis rezisztenciáját mértük, szöveti plazminogén aktivátort (PAI-1) adva hozzá. A képződött alvadék fényt szóró és áteresztő tulajdonságát mérve. A kezdeti lízist egy második alvadási fázis követte az inzulin függő betegek (IDDM) plazmájának több mint felében, míg ehhez hasonló alvadék lízis nem vagy csak néhány esetben volt megfigyelhető az inzulintól nem függő betegek vagy az egészséges egyének PRP-jében. A gélszűrőssel és mosással izolált trombociták trombin aktiválása után a felülúszó hatását vizsgáltuk a trombocita szegény plazmában képzett alvadék lizálhatóságára. A felülúszó gátolta a PPP-alvadék *in vitro* trombolízisét. Ez a gátlás erősebb volt az IDDM esetekben képzett felülúszóval. Ezekben az esetekben a trombocita lizátumban a felülúszó PAI-1 aktivitás és koncentráció aránya nagyobb volt, arra utalva, hogy a PAI-1 molekula változása állhat a változás hátterében. Ennek a speciális alvadék lízis rezisztencia szerepének a diabetikus vaszkuláris komplikációkban van-e szerepe, még vizsgálendő. [141];

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, ADAMTS-13 aktivitás és antigén különböző betegségekben.**

Emelkedett VWF mennyiség és funkció, normál ADAMTS-13 aktivitás és antigén volt kimutatható májcirrhosisos betegek plazmájából [23].

Különböző eredetű cirrhosisos 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 denzitásabak 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].



## Eredmények értékelése

### Módszertani eredmények

#### Vénás és artériás körülményeket modellező, teljes vért alkalmazó áramlási kamrák

Ebben a tanulmányban trombocita kitapadást hasonlítottunk össze, kollagénnel fedett felszínen, magas sebességgradiens mellett CPC és PPC módszereket használva [4]. Habár geometriai és reológiai különbségek vannak PPC és CPC között, a közlemény a trombusképződés trombogén felszíne és vértér fogat közötti különböző hatásokra fókuszál. Felszínnek a kollagént választottuk, mivel ez a szubendotélialis mátrix igen trombogén komponense, artériás sebességgradiens (1000/s), ahol a VWF a kulcsszereplő. Áramoltatási idő 150 másodperc volt, az a legrövidebb időintervallum, ami reprodukálható eredményekhez vezet. Vizsgálatunk a trombogén felszínre kitapadó trombocitákra irányult. Nem találtunk eltérést a trombusok morfológiájában, habár felszínfedettség és trombus terület között van eltérés. A vizsgált felszínfedettség és átlag trombus terület PPC felszíneken megegyezik más közleményben használt hasonló felszínéével, a módszerbeli eltérésektől függetlenül. Az, hogy CPC felszínfedettség görbéje hamarabb véget ér a PPC-hez képest, jelzi, hogy nincs több keringő trombocita, mely 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 CPC-ben. A fluoreszcensen jelzett VWF homogén eloszlása a trombusban azt mutatja, hogy a VW molekulák a trombociták felszínhez tapadása mellett a trombus növekedésben is nagy számban vesznek részt. Matsui és munkatársai közlésével ellentétben ez az eredmény. Ők nem látták a VW molekulának az egyenletes háromdimenziós eloszlását, azonban ez az eredményük valószínű az elégtelen immunokémiai festésükkel volt magyarázható, mint ezt egy későbbi közleményükben meg is jegyezték [142, 143]. Az egyedi trombociták számának jelentős csökkenése a CPA-ban az adhézió mellett jelentős mértékű aggregációra utal.

A síkon forgó kúp rendszer kevés vérigénye miatt alkalmas klinikai kutató, de akár rutin laboratóriumi körülmények között is a vaszkuláris hematológiai betegségek patomechanizmusának vizsgálatára, azonban a felszínen 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 mennyiségi és minőségi vizsgálata, a VW molekula multimerizációjának kvantitatív jellemzése

A VWF molekulák változó számú dimer alegységekből állnak össze nagy VWF multimer molekulává. Méretüket 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 multimerok képesek hatékonyan közvetíteni a trombocita adhéziót, ugyanakkor a szokásosnál nagyobb multimerok a trombusképződés valószínűségét növelik. A nemzetközi gyakorlatban eddig nem ismert, új eljárást dolgoztunk ki a VWF multimer eloszlásának pontosabb leírására.

Az értékelés és a program jelentősége, hogy 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 multimerok 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 kvantitatív 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.

### A trombusképződés és trombogén felszín, a VWF és a trombociták vizsgálata, alapkutatósi eredmények

#### Trombogén felszín vizsgálata, VWF nélküli endotélsejt mátrixon történő adhézió

Kimutattuk, hogy humán mikrovaszkuláris endotélsejt alatti mátrix (HMEC-1, sejtvonal szubendotélialuma) 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 szubendotélialumon adhézió és aggregátum képződés bekövetkezhet I-es III-es és IV-es típusú kollagén, valamint VWF közreműködése nélkül is.

Trombin inhibitorokkal gátlható 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 szubendotélialum trombogén tulajdonságait vizsgálják. Mivel fibrilláris kollagén és VWF hiányában is igen trombogén a mátrix a trombin aktivitás függő trombózis modellekben javasoljuk a használatát.

## Kollagénhez artériás áramlási körülmények között kapcsolódott VWF molekula vizsgálata

A von Willebrand betegség patomechanizmusának eddigi ismeretei szerint nemcsak a plazma VWF molekula hiánya vagy csökkent mennyisége, hanem a megfelelő mennyiségű, de a multimer molekula nagy multimerjeinek hiánya vagy a molekula kollagén kötő helyének funkció képtelen mutációja is vérzékenységet okoz. Alaputatási és klinikai kutatási eredmények igazolták, hogy a trombocita adhézióhoz VWF nagy molekulatömegű része elengedhetetlen. Az is izolálódott, hogy a multimer molekula szerepe az, hogy ideiglenes megkösse, ezáltal áramlásában lelassítsa a trombocitákat a sérülés helyén szabaddá váló trombogén struktúrához. Az, hogy ehhez a folyamathoz a sérült felszínen kitekerekedő, és elterülő VWF, mint egy tépőzár tapadó része szolgáltat segítséget, vagy egy pontján rögzül, és horgonykötélként funkcionál, még tisztázandó kérdés.

Többen igazolták azt a feltételezést, hogy a molekula globuláris formában kering, és áramlás hatására „kitekerekedik”, egymáshoz kapcsolódik [66], fonalat képez [67]. Barg és munkatársai szilánizált csillámpalán nagy sebességgradienssel áramoltatva rögzítettek VWF-t. Trombocitákat kötő, aktív, 300  $\mu\text{m}$  hosszúságot is elérő szálakból álló filamentózus hálózat képződött. AFM-es és immunfluoreszcenciás mikroszkópos megfigyeléssel igazolták, hogy a háló képződéséhez nagy VWF koncentráció, legalább 21  $\text{dyn/cm}^2$  nyírófeszültség és alacsony hidrofobicitású kötőfelszín szükséges. Ugyan a VWF molekuláris háló létrejöttéhez a nagy nyírófeszültség szükséges, a VWF trombocita kötő képességének az indukálásához elégséges a molekula adszorpciója egy megfelelően trombogén felszínhez.

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 analizisére [9]. E munkánk célja, hogy magyarázatot találjunk a VWF áramlásfüggő kötési kapacitásának növekedésére. Párhuzamos lemezű áramlási kamrában kollagénnel fedett üveglemezeken gél filtrációval tisztított VWF-t áramoltattunk alacsony ( $0.07 \text{ N/m}^2$ ) és magas ( $4.55 \text{ N/m}^2$ ) 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 nyírófeszültség esetén, valamint megjelentek szokatlan formájú 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 alakját, 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 analizisét 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 [144]. 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 csipjéhez konjugált kollagén VWF kötő képességét, arról ír, hogy a multimerok jobban kötődnek a kollagén felszínhez [145]. A mi eredményeinket a citáló közlemények elfogadják, használják saját munkájuk bevezetéséhez vagy magyarázatához, de magához az alapkérdéshez nem tesznek semmit [146] [147], [148-159]. 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 molekulaszervezeti változások történnek.

A multimerizáció nem befolyásolja a VWF monomer funkcionális egységeit, „domain”-jeit, 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 kitekerekedik 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 [160, 161]. 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 [162]. 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 szubendotélialis 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].

## Humán VWF ellenes antitest 2B típusú eltéréseket okoz

Egyértelműen igazoltuk, hogy az 1C1E7 antitest a VWF-nak a trombocita GPIb receptorát kötő helyét befolyásolta, mivel GPIb ellenes antitesttel meg lehetett szüntetni az 1C1E7 hatását, azaz egyedi trombociták számának csökkenését és az aggregátumok képződését. Nagy nyírófeszültségű áramlást modellező rendszerekben (O'Brien filtrómeterben és párhuzamos lemezű áramlási kamrában) azonban a trombocita adhézió csökkent. Ezt a látszólag ellentmondásos eredményt az áramlási citometriás mérések eredménye magyarázza meg, amely szerint az 1C1E7 hatására a VWF a trombociták felszínéhez kötődött. GPIb ellenes antitest

felfüggesztette a VWF többségének a kötődését. A VWF multimerizációjának analízise azt is igazolta, hogy a nagy multimerok kötődtek a trombocitákhoz, mivel ezek tűntek el a vérből. Ez a jelenség teljesen hasonló a 2-es típusú VWB patomechanizmusához. Az 1C1E7 antitestnek jelentős szerepe van a kóros VWF-GPIIb kölcsönhatások mechanizmusának tisztázásában [19]. Ismerve, hogy kb. 25000 GPIIb receptor van egy trombocita felszínén, és a VWF dimer molekulásúlya kb. 500000 Da, az 1C1E7 okozta 21%-os VWF szint csökkenés a GPIIb receptorok 60%-os foglaltságát okozhatja. A VWF nagy multimerai kötődnek a trombocitákhoz, azok aggregációs készségét megtartva, azonban a kollagén felszínhez a kisebb VWF multimerok kötődnek, amelyek kevésbé alkalmasak a trombociták felszínén való gördülését biztosítani. Ez azt is jelenti, hogy nagy nyírófeszültség esetén a VWF-t már tartalmazó trombocita nem képes adhézióra. Eredményünket erősíti az a közlés, amelyben 2B típusú VWB-et okozó VWF rekombináns mutánsa is gátolta a trombocita adhéziót, amikor a rekombináns VWF a GPIIb receptorok 40%-át foglalta le. Egy francia munkacsoport hasonló hatású monoklonális antitestet ismertetett. Erről az antitestről azonban igazolták, hogy az A1 doménhez kötődött és feltételezték, hogy direkt konformációváltozást okoz. Az 1C1E7 a VWF-hoz N terminálisan kötődik és későbbi direkt bizonyítékok alapján, az A1 doménre ható konformációváltozást okoz [163]. Az antitesttel kapcsolatos munka tervét és a kísérleteket a magyar munkacsoport tagjai készítették, azonban a belga közreműködőknek olyan nagy szerepe volt az eredmények értelmezésében, hogy az elsőszerzősség jogát átadtuk Hans Deckmyn munkacsoportjának.

## Kollagén VWF kölcsönhatás és a trombusképződés gátlása, inhibitor molekulák, gyógyszer hatás potenciál

### Pióca nyálából izolált peptid (Calin) specifikus gátló hatása a VWF-kollagén kölcsönhatásra artériás áramlási körülmények között

*Hirudo Medicinalis*-ből 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 [164]. [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. Mivel a VWF-nak legalább két kollagénkötő helye van, a részleges gátlásnak az lehet az oka, hogy a Calin csak az egyik kötéshelyet foglalja le. Az is bizonyítja, hogy a Calin kapcsolódik a kollagénhez, hogy a Calinnal 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 IC<sub>50</sub> 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 GPIIb receptoron, majd GPIIb-IIIa receptoron közvetlenül kapcsolódik a kollagénhez, míg kis sebességgradiensnél a trombociták kollagén receptorainak van elsődleges szerepe. Mivel a Calin a kollagéhez 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 GPIIb/IIIa abszolút szükséges a trombocita adhézióhoz. Humán eredetű I-es és III-as típusú kollagénekhez ötször kevesebb Calin mutatót 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 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 típusú kollagének keveréke. Az adhézió során sokkal nagyobbak az adhéziós területek, mint bármely más kollagénen és azokon igen intenzív az aggregátumok képződése.) *Haementeria officinalis*-ből izolált *leech antiplatelet protein* (LAPP), és a rekombináns technikával előállított formája (rLAPP), szintén gátolta a kollagén-adhéziót, statikus körülmények között vizsgálva, I-es típusú kollagénen. Dinamikus körülmények között gátolta az adhéziót az I-es, III-as IV-es, részlegesen a VI-os típusú kollagénekhez, és befolyásolta az adhéziót fibronectinhez vagy VWF-hoz, a Calinhez hasonlóan. A teljes 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 endotélsejtek extracelluláris mátrixához (ECM). Kis sebességgradiensnél a kollagén adhézióhoz hasonló, koncentráció függő gátlás volt, de nagy sebességgradiensnél, 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 típusú kollagénnel szemben, amely az ECM-ben az elsődleges VWF kötőhely. Mindezek ellenére a Calin hatásos állatkísérletes trombozissal modellen. Ebben a modellben egy standardizált metszést ejtenek a hörcsög femorális vénáján, amelyen trombocita-dús trombus képződik. Mivel a vénás rendszerben a kis sebességgradiens a jellemző, valószínű, hogy itt a trombocita-kollagén kölcsönhatás gátlása érvényesül.

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 [165] [166], a különböző trombózis modellekben hasznos a trombocita-kollagén kölcsönhatás tanulmányozására.

### **VWF konformáció függő kötőhelyeinek vizsgálata, trombusképződés gátlása a VWF-kollagén kölcsönhatásra specifikus fágokkal és fágpeptiddel**

Alap kutatás 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 kötést 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 intravénásan alkalmazandók, tehát csak heveny esetek kezelésére alkalmazhatók. Fágtechnológiát alkalmazva olyan peptidok keresése volt a célunk, amelyek antitrombotikus hatással rendelkeznek. A peptidok az orális antitrombotikus gyógyszerek jó kiindulási alapanyagai lehetnek. Egy lineáris heptamer fág könyvtárat vizsgálva 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 trombus képződésre. Érdekes módon a négy YDPWTPS szekvenciát hordozó négyágú MAP megtartotta az eredeti peptidet hordozó fág klón antitrombotikus képességét, szemben a szimpla peptiddel. A MAP hatékonyan gátolja a vérelemezkek kitapadását kollagénnel fedett felszínre artériás áramlási körülmények közt, majdnem 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 peptidok általában alacsony affinitással rendelkeznek a célmolekula iránt. A fágok 3-5 példányban fejezik ki a peptidet a felszínükön, ezáltal a megjelölt peptid hatását inkább az aviditás határozza mintsem az egyedülálló peptid affinitása. Jelen tanulmányban az aviditás szerepe a MAP használatával igazolódott, hatékony inhibitor volt.

Bár GPIb-VWF kölcsönhatást gátló peptid antagonistákat már azonosítottak, tudásunk szerint ez az első beszámoló egy olyan peptidről, amely adhéziót és aggregációt gátló hatását a VWF-kollagén kölcsönhatás gátlásával feje ki. Váratlanul, de azt figyeltük meg, hogy a peptid epitópja 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 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 közt 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 mód, egy korábbi tanulmányunkban, amely során pentadekamer könyvtárat és eltérő szelekciós módszert alkalmaztunk, két fág klónt azonosítottunk RVVCEYVFGRAVCS 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. Meglehet, hogy a C doménhez történő kötődéssel a peptid konformációváltozást idéz elő a VWF-on, pontosabban az A3 doménben, így akadályozva a VWF-kollagén kötést kialakulását.

Konklúzióként elmondhatjuk, hogy megtaláltuk az első olyan peptidet, amely artériás áramlási körülmények között gátolja a VWF-kollagén kölcsönhatást, valamint a trombocita adhéziót és aggregációt. Egy ilyen peptid jó kiindulási pont lehet egy orálisan adható antitrombotikus gyógyszer kifejlesztéséhez.

### **A VWF és a trombocita GPIb receptora közötti kölcsönhatás és gátlása**

A VWF a trombocitákat azok GPIb receptorához kötődve tartja a sérülés során szabaddá váló trombogén felszín közelében.

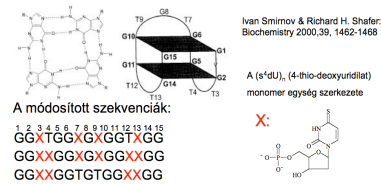
Párhuzamos- és sikon forgó kúp rendszerű adhéziós eszközökkel a vénás és artériás körülményeket modellezve kollaborációs partnerünk GPIb gátlásra irányuló alap kutatási munkáiba kapcsolódunk be. A vizsgálatok igazolják a VWF-GPIb konformáció specifikus kapcsolódását. A 6B4 és a 24G10 monoklonális antitestek GPIb $\alpha$ -ban két fontos kötőhelyet ismertek fel: az egyik az N terminális 1-59 szakaszán, a másik az 1-81 szakaszon, közeli kontaktusban a 201-268 szakasszal. Ráadásul ezek az eredmények tovább erősítik azt az álláspontot, hogy molekulán belüli kölcsönhatás létezik az N-terminális vég (1-81 aa) és a C-terminális (201-268 aa) között [15], [16] Ezeknek az eredményeknek igen nagy haszna van a VWF-GPIb kölcsönhatás gátlására irányuló kutatásokban [167].

### **Trombin aktivitás gátlásának hatása a trombusképződésre**

A trombusképződést jelentősen befolyásolta az áramlási körülményeket modellező kísérleti rendszerünkben a trombin aktivitás gátlása, mind kollagén, mind HMEC mátrixon. Ebben a munkában a vaszkuláris történéseket hatékonyan befolyásoló inhibitor, egy 4-tio-deoxiuridiláttal módosított aptamer (UC15-mer) hatásnak a vizsgálatát írjuk le [20].

Az eredmények könnyebb értelmezhetősége érdekében az aptamerek szerkezetét a 34. ábrán mutatom be.

A konszenzus aptamer szerkezete: GGTTGGTGTGGTTGG



**34. ábra.** A konszenzus és a módosított aptamerek szerkezete

Az irodalomban közölt adatok szerint a C15-mer gátló hatása ( $IC_{50}$ ) 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  $IC_{50}$  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 UC15-mernek 2,2-szer nagyobb gátló hatását igazoltuk plazmával is. Hasonló eredményeket kaptunk, amikor a trombin aktivitást FpA felszabadítással mértük. Az  $IC_{50}$  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 szubszttráttal 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 lekötne az exosite 1-et, fel kellene függesztenie a hirudin okozta amidolitikus aktivitás gátlást. Valóban, kromogén szubszttráttal mérhető volt, hogy az UC15-mer jelenléte felfüggesztette a hirudin gátló hatását.

A C15-mernek a 4-tio-deoxyuridillal való módosítása kétszer erősebb trombin indukálta trombocita aggregáció és szekréció gátlást eredményezett PRP-ben. Esetünkben a C15-merre az  $IC_{50}$  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  $IC_{50}$  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, beigazolvva,

hogy az aptamerek trombinhoz való kötődése blokkolja 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  $IC_{50}$  értékek különbségének mértéke nagyobb volt, mint a plazma és a fibrinogén alvadás gátlását jellemző  $IC_{50}$  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, mint 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  $IC_{50}$  UC15-merre egy nagyságrenddel alacsonyabb volt, mint a C15-merre. Szemben az aggregációval és szekrécióval, a trombin indukált trombocita alakváltozás (shape change) érintetlen volt  $4\mu M$  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 alacsonyabb C15-mer koncentrációnál, de teljes gátlás történt  $1,45\mu M$ -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-kezon 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 folyamat. Az aptamerek hatását a trombusképződésre is vizsgáltuk. Amikor az endotélialis sejtréteg sérül, a trombociták gyorsan hozzátapadnak a szabadbá váló szubendotélium "ragadós" összetevőikhez és aktiválódnak. A trombocita aktivációt felerősíti a helyben képződő trombin és fibrin, melyek az éppen zajló trombusképződés során alakulnak át aktív molekulává. Hogy értékeljük, hogy az aptamerek hogyan hatnak a trombusképződésre, közel fiziológias állapotban, HMEC-1 mátrixot, trombinkezelte fibrinogén és kollagént felszíneket használtunk, egy áramlási rendszerben. (A trombinkezelte 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 trombinkezelte fibrinogén által borított felszínen trombin receptor függő adhézió valósul meg. Kísérleteinkben a nagy trombusok képződését mindkét aptamer gátolta a HMEC-1 mátrixán és trombinkezelte fibrinogéneken 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 eredményeinkhez. 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 folyamatában.

A trombusba zárt fehérjék mérése -amely trombocitákból és plazmából származó proteineket tartalmazza, elsősorban fibrin- egy komplex összképet ad az aptamerek hatásáról a trombusképződés során. Ebben az összetett rendszerben az IC<sub>50</sub> 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-szeres között változott a különböző kísérleti rendszerekben, mint a konszenzus aptamer. Az új aptamer sokkal hatékonyabban csökkentette a trombus depozíciót trombinkezelt fibrinogén felszínén 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 megnövelt 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-tiodeoxiuridiláttal álló homo-oligonukleotid erősen ellenáll a nukleázokkal szemben. Mivel az UC15-mer több, mint 26% tiolált nukleotidot tartalmaz, 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 molekulamodelllezési és szerkezetmódosítási munkákban használják [168], [169].

## Hemosztázis, trombusképződés, trombocita és VWF vonatkozású klinikai kutatások

Egy vérzékeny beteg vizsgálata során az adatok szerzett Bernard-Soulier szindrómára utaltak. Úgy találtuk, hogy a beteg GPIb ellenes antitest jelenléte mellett immunkomplex mediált leukocytoklasztikus vasculitis-szal társult antinukleáris antitesttermelés volt a fő jellemzője a betegség lefolyása alatti adatoknak. Az antitest titer azonban túl alacsony volt, hogy vélemezze eredetű vérzést okozzon a betegnek, de a laboratóriumi eltérések jellemzőek voltak. A betegség későbbi fázisában súlyos nekrotizáló vasculitis alakult ki, amit mélyvénás trombózis követett.

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 endotél ért stimulálása bizonyítékként figyelték meg perifériás artériás megbetegedésekben; valamint mind akut, mind ischémias stroke-ot vagy tranzienis ischémias történetet követően; kiemelten nagy-artériás atherotrombózis okozta ischémias sztrókban; valamint rádiófrekvenciás szívkatéterezésein átesett betegek esetén [88].

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, a VWF-nak a szintje igen magas ezen betegek plazmájában [170], [171]. 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. Ami azt jelentheti, hogy a nagy multimerek vagy nem képződtek elegendő mennyiségben, vagy hamar lebomlottak, esetleg kiürültek. Az esetek 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:Ag mennyiségének növekedése 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].

## Hivatkozások

- Boda, Z., *Thrombosis és Vérzékenység*. 2006. Budapest: Medicina Könyvkiadó Rt.
- 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., Harsfalvi J, *Glycocalicin coated beads for studying platelet GPIIb function*. Platelets, 2007. 18(1 suppl 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. Harsfalvi, *Novel evaluation method for densitometric curves of von Willebrand factor multimers and a new parameter (M(MW)) to describe the degree of multimerisation*. 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.
- Harsfalvi J., S.M., *A von Willebrand factor és a vascularis haematologia*. Mikrocirkuláció, 2005. Suppl./1: p. 39-44.
- Szanto, T., A. Schlamadinger, 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 Iba1alpha*. Thromb Haemost, 2007. 98(1): p. 178-85.
- Matyus, L., L. Bene, M.V. Alvarez, I. Zavodszky, J. Harsfalvi, J. GonzalezRodriguez, and S. Damjanovich, *Lateral organization of IIb/IIIa heterodimer on platelets*. Progress in Biophysics & Molecular Biology, 1996. 65: p. PMI23-PMI23.
- Harsfalvi J, S.J.M., Van Houtte E., Sayer R.T., Vermynen J., Deckmyn H., *Hirudo Medicinalisből származó calin gátlója a von willebrand faktor-collagen kölcsönhatást statikus és dinamikus körülmények között*. Belorvosi Archivum, 1994. XLVII: p. 468-473.
- Harsfalvi, J., J.M. Stassen, M.F. Hoylaerts, E. Van Houtte, R.T. Sawyer, J. Vermynen, 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 Ib-blocking monoclonal antibody Fab fragments in nonhuman primates*. Arterioscler Thromb Vasc 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 Iba1alpha reveals interaction between the leucine-rich repeat N-terminal and C-terminal flanking domains of glycoprotein Iba1alpha*. Blood, 2001. 98(3): p. 652-60.
- Ulrichs, 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.
- Ulrichs, H., J. Harsfalvi, L. Bene, J. Matko, J. Vermynen, 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, *4-thio-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.
- Tornai, I., Z. Boda, A. Schlamadinger, 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. Papassotiropoulos, 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 preeclampsia*. Thromb Haemost, 2009. 101(2): p. 305-11.
- Toth, J., J. Kappelmayer, M.L. Udvardy, T. Szanto, M. Szarvas, L. Rejto, P. Soltesz, 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.
- Jay, R.M. and P. Lui, *How anticoagulants work*. Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management, 2006. 10(2): p. 30-39.
- ISB, <http://www.coe.org/usb>. The International Society of Biorheology 1969.
- Hajdu, S.I., *A note from history: Rudolph Virchow, pathologist, armed revolutionist, politician, and anthropologist*. Ann Clin Lab Sci, 2005. 35(2): p. 203-5.
- Wagner, D.D. and P.S. Frenette, *The vessel wall and its interactions*. Blood, 2008. 111(11): p. 5271-81.
- Hathcock, J.J., *Flow effects on coagulation and thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(8): p. 1729-37.
- Wootton, D.M. and D.N. Ku, *Fluid mechanics of vascular systems, diseases, and thrombosis*. Annu Rev Biomed Eng, 1999. 1: p. 299-329.
- Reglin, B., T.W. Secomb, and A.R. Pries, *Structural adaptation of microvessel diameters in response to metabolic stimuli: where are the oxygen sensors?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. 297(6): p. H2206-2219.
- Pries, A.R. and T.W. Secomb, *Microvascular blood viscosity in vivo and the endothelial surface layer*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. 289(6): p. H2657-64.
- Furie, B. and B.C. Furie, *Mechanisms of thrombus formation*. N Engl J Med, 2008. 359(9): p. 938-49.
- Nesbitt, W.S., E. Westein, F.J. Tovar-Lopez, E. Tolouei, A. Mitchell, J. Fu, J. Carberry, A. Fouras, and S.P. Jackson, *A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation*. Nat Med, 2009. 15(6): p. 665-73.
- 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.
- Lord, S.T., *Fibrinogen and fibrin: Scaffold proteins in hemostasis*. Current Opinion in Hematology, 2007. 14(3): p. 236-241.
- Gaczynska, M. and P.A. Osmulski, *AFM of biological complexes: what can we learn?* Curr Opin Colloid Interface Sci, 2008. 13(5): p. 351-367.
- 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.
- Guidetti, G.F., B. Bartolini, B. Bernardi, M.E. Tira, M.C. Berndt, C. Balduini, and M. Torti, *Binding of von Willebrand factor to the small proteoglycan decorin*. FEBS Lett, 2004. 574(1-3): p. 95-100.
- Farndale, R.W., T. Lisman, D. Bihan, S. Hamaia, C.S. Smerling, N. Pugh, A. Konitsiotis, B. Leitinger, P.G. de Groot, G.E. Jarvis, and N. Raynal, *Cell-collagen interactions: the use of peptide Toolkits to investigate collagen-receptor interactions*. Biochem Soc Trans, 2008. 36(Pt 2): p. 241-50.
- Emsley, J., C.G. Knight, R.W. Farndale, M.J. Barnes, and R.C. Liddington, *Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1*. Cell, 2000. 101(1): p. 47-56.
- Hohenester, E., T. Sasaki, C. Giudici, R.W. Farndale, and H.P. Bachinger, *Structural basis of sequence-specific collagen recognition by SPARC*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(47): p. 18273-7.
- Wohner, N., Z. Keresztes, P. Sotonyi, L. Szabo, E. Komorowicz, R. Machovich, and K. Kolev, *Neutrophil granulocyte-dependent proteolysis enhances platelet adhesion to the arterial wall under high-shear flow*. J Thromb Haemost, 2010. 8(7): p. 1624-31.
- 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.
- 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.
- 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.
- Mosesson, M.W., *Fibrinogen and fibrin structure and functions*. J Thromb Haemost, 2005. 3(8): p. 1894-904.
- Doolittle, R.F., *X-ray crystallographic studies on fibrinogen and fibrin*. J Thromb Haemost, 2003. 1(7): p. 1559-65.
- Kollman, J.M., L. Pandi, M.R. Sawaya, M. Riley, and R.F. Doolittle, *Crystal structure of human fibrinogen*. Biochemistry, 2009. 48(18): p. 3877-86.
- Huntington, J.A., *Molecular recognition mechanisms of thrombin*. J Thromb Haemost, 2005. 3(8): p. 1861-72.
- Swords Jenny, N., R.L. Lundblad, and K.G. Mann, *Thrombin, in Hemostasis and Thrombosis*, R.W. Colman, et al., Editors. 2006, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 193-214.
- Sambrano, G.R., E.J. Weiss, Y.W. Zheng, W. Huang, and S.R. Coughlin, *Role of thrombin signalling in platelets in hemostasis and thrombosis*. Nature, 2001. 413(6851): p. 74-8.
- Di Cera, E., *Thrombin*. Mol Aspects Med, 2008. 29(4): p. 203-54.



64. Sadler, J.E., U. Budde, J.C. Eikenboom, E.J. Favaloro, F.G. Hill, L. Holmberg, J. Ingerslev, C.A. Lee, D. Lillicrap, 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.
65. Fowler, W.E., L.J. Fretto, K.K. Hamilton, H.P. Erickson, and P.A. McKee, *Substructure of human von Willebrand factor*. J Clin Invest, 1985. 76(4): p. 1491-500.
66. 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.
67. Barg, A., R. Ossig, T. Goerge, M.F. Schneider, H. Schillers, H. Oberleithner, and S.W. Schneider, *Soluble plasma-derived von Willebrand factor assembles to a haemostatically active filamentous network*. Thrombosis and Haemostasis, 2007. 97(4): p. 514-526.
68. 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 Ib and IIb-IIIa in the presence of shear stress*. Ann Biomed Eng, 1995. 23(6): p. 787-93.
69. Sadler, J.E., *von Willebrand factor assembly and secretion*. J Thromb Haemost, 2009. 7 Suppl 1: p. 24-7.
70. 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 N-linked glycosylation sites modulate synthesis and secretion of von Willebrand factor*. Blood, 2010. 116(4): p. 640-648.
71. Udvardy, M.L., *Structure-function relationship of von Willebrand factor : doktori értekezés / Miklós László Udvardy ;*. PhD Thesis, 2009.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. COPE, *COPE Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopedia*. <http://www.copewithcytokines.de/>, 2010. Version 24.7.
76. Clemetson, K.G. and G. Clemetson, M., *Platelet Receptors*, in *Platelets*, A.D. Michelson, Editor. 2007, Academic Press. p. 117-139.
77. Varga-Szabo, D., I. Pleines, and B. Nieswandt, *Cell adhesion mechanisms in platelets*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. 28(3): p. 403-12.
78. O'Connor, S.D., A.J. Taylor, E.C. Williams, and T.C. Winter, *Coagulation Concepts Update*. Am. J. Roentgenol., 2009. 193(6): p. 1656-1664.
79. Sadler, J.E., *von Willebrand factor: two sides of a coin*. J Thromb Haemost, 2005. 3(8): p. 1702-9.
80. 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.
81. Kim, J., C.-Z. Zhang, X. Zhang, and T.A. Springer, *A mechanically stabilized receptor-ligand flex-bond important in the vasculature*. Nature, 2010. 466(7309): p. 992-995.
82. Gezsi, A., U. Budde, I. Deak, E. Nagy, A. Mohl, A. Schlammadinger, Z. Boda, T. Masszi, J.E. Sadler, and I. Bodo, *Accelerated clearance alone explains ultra-large multimers in von Willebrand disease*. Vencenza. J Thromb Haemost, 2010. 8(6): p. 1273-80.
83. Schlammadinger, A. and Z. Boda, *Laboratory screening and diagnosis of von Willebrand's disease*. Clin Lab, 2002. 48(7-8): p. 385-93.
84. Adcock, D.M., M. Bethel, and A. Valcour, *Diagnosing von Willebrand disease: a large reference laboratory's perspective*. Semin Thromb Hemost, 2006. 32(5): p. 472-9.
85. Tosetto, A., G. Castaman, and F. Rodeghiero, *Assessing bleeding in von Willebrand disease with bleeding score*. Blood Rev, 2007. 21(2): p. 89-97.
86. Favaloro, E.J., *Laboratory identification of von Willebrand disease: technical and scientific perspectives*. Semin Thromb Hemost, 2006. 32(5): p. 456-71.
87. Szekeres-Csiki, K., L. Udvardy Miklos, T. Varga-Fekete, and J. Hársfalvi, *Von Willebrand-faktor es laboratoriumi diagnosztikai szerepe*. Orvostudományi Értesítő, 2008. 81(1): p. 45-48.
88. 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.
89. Conway, D.S., L.A. Pearce, B.S. Chin, R.G. Hart, and G.Y. Lip, *Prognostic value of plasma von Willebrand factor and soluble P-selectin as indices of endothelial damage and platelet activation in 994 patients with nonvalvular atrial fibrillation*. Circulation, 2003. 107(25): p. 3141-5.
90. Jager, A., V.W. van Hinsbergh, P.J. Kostense, J.J. Emeis, J.S. Yudkin, G. Nijpels, J.M. Dekker, R.J. Heine, L.M. Bouter, and C.D. Stehouwer, *von Willebrand factor, C-reactive protein, and 5-year mortality in diabetic and nondiabetic subjects: the Hoorn Study*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. 19(12): p. 3071-8.
91. Whincup, P.H., J. Danesh, M. Walker, L. Lennon, A. Thomson, P. Appleby, A. Rumley, and G.D. Lowe, *von Willebrand factor and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis*. Eur Heart J, 2002. 23(22): p. 1764-70.
92. Morange, P.E., C. Simon, M.C. Alessi, G. Luc, D. Arveiler, J. Ferrieres, P. Amouyel, A. Evans, P. Ducimetiere, and I. Juhan-Vague, *Endothelial cell markers and the risk of coronary heart disease: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME) study*. Circulation, 2004. 109(11): p. 1343-8.

93. Koster, T., A.D. Blann, E. Briet, J.P. Vandenbroucke, and F.R. Rosendaal, *Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis*. Lancet, 1995. 345(8943): p. 152-5.
94. Brill, A., T.A. Fuchs, A.K. Chauhan, J.J. Yang, S.F. De Meyer, M. Kolimberger, T.W. Wakefield, B. Lammie, S. Massberg, and D.D. Wagner, *von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models*. Blood, 2011. 117(4): p. 1400-7.
95. Tsai, A.W., M. Cushman, W.D. Rosamond, S.R. Heckbert, R.P. Tracy, N. Aleksic, and A.R. Folsom, *Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE)*. Am J Med, 2002. 113(8): p. 636-42.
96. Cortellaro, M., C. Boschetti, E. Cofrancesco, C. Zanussi, M. Catalano, G. de Gaetano, L. Gabrielli, B. Lombardi, G. Specchia, L. Tavazzi, and et al., *The PLAT Study: hemostatic function in relation to atherothrombotic ischemic events in vascular disease patients. Principal results. PLAT Study Group. Progetto Lombardo Atero-Trombosi (PLAT) Study Group*. Arterioscler Thromb, 1992. 12(9): p. 1063-70.
97. Thompson, S.G., J. Kienast, S.D. Pyke, F. Haverkate, and J.C. van de Loo, *Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group*. N Engl J Med, 1995. 332(10): p. 635-41.
98. Folsom, A.R., K.K. Wu, W.D. Rosamond, A.R. Sharrett, and L.E. Chambless, *Prospective study of hemostatic factors and incidence of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*. Circulation, 1997. 96(4): p. 1102-8.
99. Baldauf, C., R. Schneppenheim, W. Stacklies, T. Obser, A. Pieconka, S. Schneppenheim, U. Budde, J. Zhou, and F. Gräter, *Shear-induced unfolding activates von Willebrand factor A2 domain for proteolysis*. J Thromb Haemost, 2009. 7(12): p. 2096-105.
100. Feys, H.B., J. Roodt, N. Vandeputte, I. Pareyn, S. Lamprecht, W.J. van Rensburg, P.J. Anderson, U. Budde, V.J. Louw, P.N. Badenhorst, H. Deckmyn, and K. Vanhoorelbeke, *Thrombotic thrombocytopenic purpura directly linked with ADAMTS13 inhibition in the baboon (Papio ursinus)*. Blood, 2010. 116(12): p. 2005-10.
101. Feys, H.B., N. Vandeputte, R. Palla, F. Peyvandi, K. Peerlinck, H. Deckmyn, H.R. Lijnen, and K. Vanhoorelbeke, *Inactivation of ADAMTS13 by plasmin as a potential cause of thrombotic thrombocytopenic purpura*. J Thromb Haemost, 2010. 8(9): p. 2053-62.
102. Huang, J., D.G. Motto, D.R. Bundle, and J.E. Sadler, *Shiga toxin B subunits induce VWF secretion by human endothelial cells and thrombotic microangiopathy in ADAMTS13-deficient mice*. Blood, 2010. 116(12): p. 3653-9.
103. Peyvandi, F., M.J. Hollestelle, R. Palla, P.A. Merlini, H.B. Feys, K. Vanhoorelbeke, P.J. Lenting, and P.M. Mannucci, *Active platelet-binding conformation of plasma von Willebrand factor in young women with acute myocardial infarction*. J Thromb Haemost, 2010. 8(7): p. 1653-6.
104. Harrison, P., *Review*. British Journal of Haematology, 2000. 111(3): p. 733-744.
105. Mody, N.A. and M.R. King, *Platelet adhesive dynamics. Part I: characterization of platelet hydrodynamic collisions and wall effects*. Biophys J, 2008. 95(5): p. 2539-55.
106. Mody, N.A. and M.R. King, *Platelet adhesive dynamics. Part II: high shear-induced transient aggregation via GPIIb/IIIa-vWf-GPIIb/IIIa bridging*. Biophys J, 2008. 95(5): p. 2556-74.
107. Diaz, J.A., A.E. Hawley, C.M. Alvarado, A.M. Berguer, N.K. Baker, S.K. Wroblewski, T.W. Wakefield, B.R. Lucchesi, and D.D. Myers, Jr., *Thrombogenesis with continuous blood flow in the inferior vena cava. A novel mouse model*. Thromb Haemost, 2010. 104(2): p. 366-75.
108. Sakariassen, K.S., P.A. Aarts, P.G. de Groot, W.P. Houdijk, and J.J. Sixma, *A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrix, and purified components*. J Lab Clin Med, 1983. 102(4): p. 522-35.
109. Aarts, P.A., J.A. van Broek, G.D. Kuiken, J.J. Sixma, and R.M. Heethaar, *Velocity profiles in annular perfusion chamber measured by laser-Doppler velocimetry*. J Biomech, 1984. 17(1): p. 61-3.
110. Sakariassen, K.S., *Blood flow devices in medical research and clinical testing in humans: are we approaching personalized medicine?* Future Cardiol, 2007. 3(1): p. 71-90.
111. Weiss, H.J., V.T. Turitto, and H.R. Baumgartner, *Platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium in platelets deficient in glycoproteins IIb-IIIa, Ib, and storage granules*. Blood, 1986. 67(2): p. 322-30.
112. Turitto, V.T., H.J. Weiss, and H.R. Baumgartner, *Platelet interaction with rabbit subendothelium in von Willebrand's disease: altered thrombus formation distinct from defective platelet adhesion*. J Clin Invest, 1984. 74(5): p. 1730-41.
113. Muggli, R. and H.R. Baumgartner, *Proceedings: Collagen coated gelatine tubes for the investigation of platelet adhesion and subsequent platelet aggregation under controlled flow conditions*. Thromb Diath Haemorrh, 1975. 34(1): p. 333.
114. Baumgartner, H.R., *The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition, and formation of mural thrombi*. Microvasc Res, 1973. 5(2): p. 167-79.
115. Sixma, J.J., P.G. de Groot, H. van Zanten, and I.J. M., *A new perfusion chamber to detect platelet adhesion using a small volume of blood*. Thromb Res, 1998. 92(6 Suppl 2): p. S43-6.
116. Varon, D., R. Dardik, B. Shenkman, S. Kotev-Emeth, N. Farzame, I. Tamarin, and N. Savion, *A new method for quantitative analysis of whole blood platelet interaction with extracellular matrix under flow conditions*. Thromb Res, 1997. 85(4): p. 283-94.
117. Furukawa, K.S., K. Nakamura, Y. Onimura, M. Uchida, A. Ito, T. Yamane, T. Tamaki, T. Ushida, and T. Tateishi, *Quantitative analysis of human platelet adhesions under a small-scale flow device*. Artif Organs, 2010. 34(4): p. 295-300.
118. Zwaginga, J.J., K.S. Sakariassen, G. Nash, M.R. King, J.W. Heemskerk, M. Frojmovic, and M.F. Hoylaerts, *Flow-based assays for global assessment of hemostasis. Part 2: current methods and considerations for the future*. J Thromb Haemost, 2006. 4(12): p. 2716-7.
119. Zwaginga, J.J., G. Nash, M.R. King, J.W. Heemskerk, M. Frojmovic, M.F. Hoylaerts, and K.S. Sakariassen, *Flow-based assays for global assessment of hemostasis. Part 1: Biotheologic considerations*. J Thromb Haemost, 2006. 4(11): p. 2486-7.



120. Schulz, C., E. Heiss, F. Gaertner, M. Orban, M.-L.v. Bruehl, P. Schramm, and S. Massberg, *Novel Methods for Assessment of Platelet and Leukocyte Function Under Flow – Application of Epifluorescence and Two-Photon Microscopy in a Small Volume Flow Chamber Model*. The Open Biology Journal, 2009. 2: p. 130-136.
121. Matsui, T., J. Hamako, and V. Titani, *Structure and Function of Snake Venom Proteins Affecting Platelet Plug Formation*. toxins, 2010. 2: p. 10-23.
122. Fox, J.W. and S.M. Serrano, *Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications*. Curr Pharm Des, 2007. 13(28): p. 2927-34.
123. Deckmyn, H., J.M. Stassen, I. Vreys, E. Van Houtte, R.T. Sawyer, and J. Vermynen, *Calin from Hirudo medicinalis, an inhibitor of platelet adhesion to collagen, prevents platelet-rich thrombosis in hamsters*. Blood, 1995. 85(3): p. 712-9.
124. Pál, G., *Milliórdok versengése: irányított evolúció a fehérvérsejtbiológiában*. Biokémia, 2008. 32: p. 82-87.
125. 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 high-throughput analysis*. PLoS One, 2009. 4(12): p. e8338.
126. Gronwall, C. and S. Stahl, *Engineered affinity proteins-generation and applications*. J Biotechnol, 2009. 140(3-4): p. 254-69.
127. Rothe, A., R.J. Hosse, and B.E. Power, *In vitro display technologies reveal novel biopharmaceuticals*. FASEB J, 2006. 20(10): p. 1599-610.
128. Lee, J.H., M.V. Yigit, D. Mazumdar, and Y. Lu, *Molecular diagnostic and drug delivery agents based on aptamer-nanomaterial conjugates*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. 62(6): p. 592-605.
129. Jayasena, S.D., *Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics*. Clin Chem, 1999. 45(9): p. 1628-50.
130. 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.
131. Tarkanyi, I., A. Horvath, I. Szatmari, H. Elzert, G. Vamosi, S. Damjanovich, E. Segal-Bendirdjian, and J. Aradi, *Inhibition of human telomerase by oligonucleotide chimeras, composed of an antisense moiety and a chemically modified homo-oligonucleotide*. FEBS Lett, 2005. 579(6): p. 1411-6.
132. Cejka, J., *Enzyme immunoassay for factor VIII-related antigen*. Clin Chem, 1982. 28(6): p. 1356-8.
133. Kerenyi, A., A. Schlammadinger, E. Ajzner, I. Szegedi, C. Kiss, Z. Pap, Z. Boda, and L. Muszbek, *Comparison of PFA-100 closure time and template bleeding time of patients with inherited disorders causing defective platelet function*. Thromb Res, 1999. 96(6): p. 487-92.
134. Schlammadinger, A., K. Vanhoorelbeke, P. Laszlo, Z. Bereczky, L. Muszbek, H. Deckmyn, and Z. Boda, *von Willebrand factor antigen latex immunoassays are affected to a different extent by rheumatoid factor*. Clin Appl Thromb Hemost, 2006. 12(2): p. 242-3.
135. Ruggeri, Z.M. and T.S. Zimmerman, *The complex multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor*. Blood, 1981. 57(6): p. 1140-3.
136. Yago, T., J. Lou, T. Wu, J. Yang, J.J. Miner, L. Coburn, J.A. Lopez, M.A. Cruz, J.F. Dong, L.V. McIntire, R.P. McEver, and C. Zhu, *Platelet glycoprotein Iba1 forms catch bonds with human WT vWF but not with type 2B von Willebrand disease vWF*. J Clin Invest, 2008. 118(9): p. 3195-207.
137. 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.
138. Tornai, I., J. Arnout, H. Deckmyn, K. Peerlinck, and J. Vermynen, *A monoclonal antibody recognizes a von Willebrand factor domain within the amino-terminal portion of the subunit that modulates the function of the glycoprotein IIB and IIB/IIIA-binding domains*. J Clin Invest, 1993. 91(1): p. 273-82.
139. Matys, L., L. Bene, J. Hársfalvi, M.V. Alvarez, J. Gonzalez-Rodriguez, A. Jenei, L. Muszbek, and S. Damjanovich, *Organization of the glycoprotein (GP) IIB/IIIA heterodimer on resting human platelets studied by flow cytometric energy transfer*. J Photochem Photobiol B, 2001. 65(1): p. 47-58.
140. Udvardy, M., E. Pósan, K. Palatka, I. Altóray, and J. Hársfalvi, *Effect of L-arginine on in vitro plasmin-generation and fibrinogenolysis*. Thromb Res, 1997. 87(1): p. 75-82.
141. Udvardy, M., E. Pósan, and J. Hársfalvi, *Altered lysis resistance of platelet-rich clots in patients with insulin-dependent diabetes mellitus*. Thromb Res, 1995. 79(1): p. 57-63.
142. 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.
143. 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.
144. Fuchs, B., U. 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.
145. 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.
146. 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.
147. Weller, F.F., *Platelet deposition in non-parallel flow*. Journal of Mathematical Biology, 2008. 57(3): p. 333-359.
148. Barg, A., R. Ossig, T. Goerge, M.F. Schneider, H. Schillers, H. Oberleithner, and S.W. Schneider, *Soluble plasma-derived von Willebrand factor assembles to a haemostatically active filamentous network*. Thrombosis and Haemostasis, 2007. 97(4): p. 514-526.
149. Chen, J.M. and K.A. Lopez, *Interactions of platelets with subendothelium and endothelium*. Microcirculation, 2005. 12(3): p. 235-246.

150. 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.
151. 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 Ib and alpha IIb beta 3 in phosphatidylserine exposure during vWF-collagen-induced thrombus formation*. Journal of Physiology-London, 2004. 558(2): p. 403-415.
152. 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.
153. 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.
154. 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.
155. Ruggeri, Z.M., *Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2003. 1(7): p. 1335-1342.
156. Ruggeri, Z.M., *Von Willebrand factor*. Current Opinion in Hematology, 2003. 10(2): p. 142-149.
157. 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.
158. 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.
159. Singh, I., E. Themistoulis, 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.
160. 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.
161. 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 Iba1 using optical tweezers*. Lasers Surg Med, 2002. 30(4): p. 306-12.
162. 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.
163. Ulrichs, H., M. Udvardy, P.J. Lenting, I. Pareyn, N. Vandeputte, K. Vanhoorelbeke, and H. Deckmyn, *Shielding of the A1 domain by the D'D3 domains of von Willebrand factor modulates its interaction with platelet glycoprotein Ib-IX-V*. J Biol Chem, 2006. 281(8): p. 4699-707.
164. Deckmyn, H., 1995.
165. Yoshida, S., T. Sudo, M. Niimi, L.A. Tao, B. Sun, J. Kambayashi, H. Watanabe, E. Luo, and H. Matsuka, *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.
166. 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.
167. Kiefer, T.L. and R.C. Becker, *Inhibitors of Platelet Adhesion*. Circulation, 2009. 120(24): p. 2488-2495.
168. 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. 38(3): p. 1155-64.
169. 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.
170. Tornai, I., J. Hársfalvi, Z. Boda, M. Udvardy, G. Pfieglér, and K. Rak, *Endothelium releases more von Willebrand factor and tissue-type plasminogen activator upon venous occlusion in patients with liver cirrhosis than in normals*. Haemostasis, 1993. 23(1): p. 58-64.
171. Rak, K., J. Hársfalvi, I. Tornai, G. Pfieglér, Z. Boda, and M. Mész, *Desmopressin and bleeding time in patients with cirrhosis*. Br Med J (Clin Res Ed), 1986. 292(6513): p. 138.