

MTA DOKTORI TÉZISEK

HEMOSZTÁZIS ÉS TROMBÓZIS

IN VITRO ÁRAMLÁSI- ÉS KLINIKAI MODELLEK

HÁRSFALVI JOLÁN

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
KLINIKAI KUTATÓ KÖZPONT

Debrecen, 2011

NYILVÁNOS VITA HELYE ÉS IDEJE:

Magyar Tudományos Akadémia Felolvasóterem
(Budapest, V. Széchenyi István tér 9. I. emelet)

2012. december 7. de. 11 óra

AZ MTA ORVOSI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYA JAVASLATA ALAPJÁN A DOKTORI
TANÁCS ÁLTAL KIJELÖLT HIVATALOS BÍRÁLÓK ÉS BÍRÁLÓ BIZOTTSÁGI TAGOK:

BÍRÁLÓK

PROHÁSZKA ZOLTÁN, az MTA doktora

TÓTH KÁLMÁN, az MTA doktora

TORDAI ATTILA, az MTA doktora

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG

KOVÁCS L. GÁBOR, az MTA rendes tagja, elnök

KRENÁCS LÁSZLÓ, az MTA doktora, titkár

PETRÁNYI GYŐZŐ, az MTA rendes tagja, tartalék elnök

CSEH KÁROLY, az MTA doktora

CZIRJÁK LÁSZLÓ, az MTA doktora

GERGELY PÉTER, az MTA doktora

MÁNDI YVETTE, az MTA doktora

VÁSÁRHELYI BARNA, az MTA doktora

Debreceni Egyetem Könyvtészet, 2012. november
A nyomtatott tészfzet a hivatalos bírálók egybehangzó formai kifogását és a nyomtatási követelményt figyelembe véve készült, tartalmában megegyezik a 2011. februárban beadottal.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm az iránymutatást, az alkotásra serkentő feladatokat, a munkalehetőséget és a megvalósításhoz való hozzájárulást vezetőimnek, a hazai és nemzetközi kollaborációs társaimnak, a munkatársaimnak és a tanítványoknak.

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

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

Hazai és nemzetközi kollaborációs társak: Damjanovich 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, Fábíán Mária, Lisbeth van Houtte, Bekéné Debreceni Ildikó, Szabó Zsuzsanna, Tömöri Éva, laboratóriumi technikusok és analitikusok.

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

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

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A vér igen magas fokon differenciálódott, speciálisan fejlődött, folyékony kötőszövet, plazma faktorok oldata és celluláris elemek szuszpenziója. Különböző sebességgel, akadálytalanul áramlik a test ereiben. Az érfal sérülésekor az életet védő hemosztatikus mechanizmus a sérülés korrekciójára törekszik, megakadályozza az elvérzést, de a trombusképződést is. A hemosztázis fő résztvevői az érrendszer, a trombociták, a plazma koagulációs és antitrombotikus valamint fibrinolitikus faktorai, illetve az áramlás során ható erők. A sérülést követő vazokonstrikció, a keringő trombociták kitapadása a szabaddá vált szubendoteliális képletekhez, aktiválásuk, a trombocita dugó képződés, a fibrin létrehozó koagulációs rendszer azonnali aktiválódása és a fibrinháló képződése, majd mindezek lebontását végző fibrinolitikus rendszer megfelelő működése finoman szabályozott, biokémiai reakciók sorozata.

A trombociták vagy a koagulációs faktorok hiánya, csökkent működése, esetleg a folyamat elégtelen szabályozottsága vérzéshez vezethet. Ellentétes változásoknak illetve a folyamat nem megfelelő helyen és időben történő aktiválódásának érelzáródás, trombózis, szívinfarktus vagy agyér-katasztrófa lehet a következménye.

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-, fehérje és immunokémiai-, mikroszkópos-, kombinatorikus kémiát is alkalmazó biotechnológiai módszerekkel tanulmányoztuk a trombózis és hemosztázis mechanizmusait [1-3]. Vizsgáltuk a vaszkuláris rendszert alkotó mátrixok [4], az izolált komponensek - mint a kollagén- és a trombociták kitapadásában fontos szerepet játszó von Willebrand molekulák (VWF) tulajdonságait [5]; a kollagén és a VWF egymással való kölcsönhatását, [6-8]. Bekapcsolódtunk a trombociták egymással való összekapcsolódásában szerepet játszó receptorának vizsgálatába [9]. Tanulmányoztuk a kölcsönhatásokat befolyásoló-, gátló-, szabályozó anyagokat és hatásukat: a kollagént, a VWF-t valamint az extracelluláris mátrix és a 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 [10-18]. 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 [19-24].

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.

A fejezeteken belül, először (1) a trombogén felszín, majd (2) a trombogén felszín és a trombocita kölcsönhatásban résztvevő kofaktor (VWF), annak a felszínnel és a trombocitával való kölcsönhatása, ezt követően (3) a trombocita-trombocita összekapcsolódás, végül (4) a trombocita felszíne által katalizált trombusképződés és lebomlás szabályozhatósága témakörökbe csoportosítva próbálom leírni az eredményeket és értékelésüket.

IRODALMI ÖSSZEFOGLALÁS / HÁTTÉR

A hemosztázis az a folyamat, mely fenntartja egy zárt, nyomás alatt lévő keringési rendszer egységét érsérülés után is. Az érfal sérülése és a vér kilépése a keringésből gyorsan bekövetkező eseményeket indít el az érfalban és a vérben: (1) vazokonstrikció, (2) trombocita aktiváció és trombocita dugó képződés, (3) prokoaguláns és az antikoaguláns rendszer aktiválódása, fibrin alvadék képződése és fibrinolízis. 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 fibrin, trombus képződik, amely az angiogenezis szintén nagyon pontosan szabályozott folyamatában lebomlik. 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 [25-27].

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

Nyíróerő vagy „*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]; $[N] = [10^5 \text{ din}]$). Az erő iránya mindig olyan, hogy a relatív megcsúszást akadályozni igyekszik.

A nyírófeszültség vagy „*shear stress*” (τ , SI dimenziója $[N/m^2]$; CGS rendszerben $[din/cm^2]$; $1 N/m^2 = 1 kg/(m \cdot s)$; $1 N/m^2 = 10 din/cm^2$) 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 egymáson elmozduló rétegekként képzeljük el és feltételezzük, hogy newtoni/összenyomhatatlan folyadékként viselkedik. A 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) párhuzamos elmozdulással (dv) matematikailag kifejezhető, $\tau = -\eta \cdot (dv_z/dr)$, ahol a dv_z/dr a helyi sebességgradienst jelenti (γ), a η pedig a dinamikai viszkozitást (belső súrlódási együttható). Másképpen leírva, $\tau = \eta \cdot \gamma$.

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

A sebességgradiens vagy „*shear rate*” (γ , dimenziója $[1/s]$ vagy s^{-1}) az elmozdulás relatív sebessége, két egymás melletti folyadékréteg között, $\gamma = dv/dr$, $[s^{-1}] = (m \cdot s^{-1}) \cdot m^{-1}$. Tökéletes newtoni folyadék esetén a sebességgradiens egyenesen arányos a nyíró feszültséggel és fordítottan arányos a folyadék dinamikai viszkozitásával, a $\tau = \eta \cdot \gamma$ képletből.

A trombózis folyamata változó reológiai körülmények között, a trombus növekedésével érelzáródás felé halad. A trombózist elindító folyamatban az érfalközi áramlási körülmények is meghatározzák azt, hogy a reaktív komponensek milyen gyorsan érnek el a sérült területre és milyen gyorsan távolodnak el a reakció termékei. Mai 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 és inhibitora és e faktorok génexpresszióját is szabályozzák. Nagy nyíróerők 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 sejttel biokémiai viselkedését, növelik a helyi vérviszkozitást. Tehát a hemodinamikai erők nemcsak specifikus anatómiai helyek trombóziképződésre hajlamosító sajátosságát befolyásolják, de a trombusok biokémiai összetételét és a trombusképződési reakciók útvonalait is [29].

Az áramlás körülményeitől függően regulálják a hemosztázist az erek belső falát borító endotelsejtek is [30]. Az endotel sejtek a vérkeringés során fellépő nyíróerő változásra igen sok válaszreakciót adnak [31]. A nyíróerő változását érzékelő rendszer vizsgálata azonban 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 iránya. Az erőátvitel módjától függően a ligandok helyileg különböző nyírás-indukált válaszreakciókat hoznak létre az endoteliumban [32]. Az erek endotelsejtjeinek szabályozó szerepe döntő fontosságú a hemosztázis aktiválásának és gátlásának egyensúlyában. Az egészséges endotelium hozzájárul az akadálytalan véráramláshoz és meggátolja a hemosztázis aktiválódását kiváltó

sejtek és proteinek kitapadását. Az antitrombotikus hatás azonban nagyon hamar aktivációs hatássá változik, amikor a sérülés hatására az erek endotelsejtjei alatti extracelluláris mátrix (ECM) szabaddá válik. Az ECM összetevőinek kvalitatív és kvantitatív változásai meghatározzák az ECM trombotikus, esetleg vérzékenységet okozó (Ehler-Danlos szindróma) tulajdonságát [33, 34]. Az endotel sejtek leválásakor az első réteg, amellyel az áramló vér találkozik az 50-100 nm vastag hártya, amely az endotel sejtek alapjául szolgál. Ez a réteg legnagyobb mennyiségben laminint, majd fibronektint, entaktint, proteoglikánokat és IV-es típusú kollagént tartalmaz. A proteoglikánok kivételével ezek mindegyike aktiválja a trombocitákat. A hártya 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 kötése 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 plazmában 2-4 g/L koncentrációban keringő fibrinogén molekula 340 kDa molekulatömegű glikoprotein. A hepatociták és a megakariociták szintetizálják [35]. A fibrinogén kutatásának nagy magyar tudósa volt a Szentgyörgyi iskolából Amerikába ment Mihályi Elemér - aki 2010-ben hunyt el - és Laki Kálmán, akinek a neve a XIII-as faktorról, más néven fibrinstabilizáló vagy Laki-Lóránd faktorról kapcsolódott össze [36-41]. Munkásságuk alapján vált ismertté, hogy trombin katalizált proteolitikus folyamatban alakul a fibrinogén fibrinné, a fibrinopeptid A és B lehasítása valamint a polimerizációs végek szabaddá válása közben. A polimerizációs végek szabaddá válása lehetővé teszi a fibrin molekulák egymáshoz kapcsolódását, háló képződését. A XIII-as faktor által katalizált reakcióban a folyamat tovább megy, a fibrinszállakból a fibrin molekulák $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})\text{lizin}$ kovalens kötésével stabil háló képződik. A hálóba fogott trombociták és/ vagy vörös vértestek (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 trombusképződésben betöltött központi szerepe miatt, a trombin gátlása az antikoaguláns terápia fő iránya. Éppen ezért a trombin szerkezete és funkciója közötti összefüggés megismerése a kutatások egyik fő iránya [42].

A VWF vér fehérjéi közül a legnagyobb molekula, a trombociták adhéziójához és a trombus képződéséhez elengedhetetlen, multimer szerkezetű glikoprotein, mely a véráram azon helyein válik irányító szereplővé, ahol a vér áramlásának érfalhoz viszonyított sebességgradiense nagy. A plazmában 10-20 g/L a koncentrációja [43]. A VWF multimer diszulfid hidakkal, különböző számban összekapcsolódó dimer alegységekből áll (2-100). Denaturált formája 80-1300 nm hosszú szálnak vagy laza, 200-300 nm átmérőjű gombolyagnak látszik elektronmikroszkóppal. Többen igazolták azt a feltételezést, hogy a VW molekula globuláris formában kering és áramlás hatására „kitekeredik”, egymáshoz kapcsolódik [44], hosszú fonalat képez [45]. Barg és munkatársai szilanizált csillámpalán nagy sebességgradienssel áramoltatva rögzítettek VWF-t, amelyből trombocitákat kötő, aktív, 300 μm hosszúságot is elérő szállakból 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 dyn/cm^2) nyírófeszültség és alacsony hidrofóbicitású kötő felszín szükséges. Amikor a globuláris VWF multimer kinyúlik, a vérlemezkék egymáshoz és a sérült érfalhoz való kapcsolódását közvetíti, ezáltal nő a molekula és receptor kölcsönhatás valószínűsége, miközben nagy felszínen lesz elérhető a VIII-as alvadási faktor (FVIII) is. A FVIII a vérlemezke felszínén zajló koagulációs folyamatban főszereplő és a májban szintetizálódik, azonban csak VWF-hoz kapcsolódva stabil a keringésben. A VW multimer mérete a konformációjától függő szerepét befolyásolja. Normál körülmények között a VWF-nak a keringésben nincs affinitása a trombocitákhoz.

A VWF az endotelsejtekben, kis mennyiségben a megakariocitákban képződik, az endotelsejtek Weibel-Palade testeiben raktározódik, a plazmában, a trombociták α -granulumaiban és az endotel alatti mátrixban van. Génje a 12-es kromoszóma rövid karján található. A szintézis során $\sim 278 \text{ kDa}$ molekulatömegű alegységek keletkeznek, melyek C terminális diszulfid hidakkal dimerizálódnak, majd a dimérek N-terminális diszulfid hidakkal összekapcsolódva multimert alkotnak. Normál plazma

multimerjeiben a szabályosan növekvő számú dimérből álló egységek, ~540-től 20 ezer kDa tartományban oszlanak el. A multimer szerkezete és mérete, áramlásfüggő konformáció változása befolyásolja a molekula aktivitását, a FVIII, GPIb, GPIIb/IIIa, heparin és kollagén kötőhelyeit [46]. A multimerizáció foka a szintézis alatt is és a keringés folyamán is szabályozott, ami 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, egy 721 aminosavból álló propeptidet és 2050 aminosavszámú érett egységet tartalmaz. Szintézise folyamán az átírás utáni módosulása igen nagyfokú, amely 12 N-kötött és 10 O-kötött glikozilációs oldalláncot eredményez, minden érett monomer egységen. A molekulásúly 20%-a szénhidrát. Négy potenciális N-kötött glikozilációs lehetőség a propeptiden is van. Az N-kötött glikánok mutációjával végzett vizsgálatok igazolták, hogy azok meghatározó szerepet játszanak a molekula szintézisében és expressziójában [47].

Az érett VWF alegység, a monomer csaknem teljes egészében négy 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 trombocita VWF receptor, a GPIb α glikoprotein kötőhelye, de a VI-os típusú kollagén megkötésében is részt vesz. Kötőhelyek találhatók rajta a heparin és a szulfatált glikolipidek számára is. Az Arg-Gly-Asp szekvenciájú, 1744-1746 pozícióban (+743 a 2010 utáni nomenklatúra szerint), a C1 doménben van a GPIIb/IIIa receptor vagy integrin α IIb β 3 kötőhelye. A D'-domén 1-272 (+743) aminosav szakaszán a FVIII valamint heparin kötőhely található. A VWF alegységek doménjeinek konformációja és funkciója valószínűleg független a multimerizáció fokától.

A multimerizáció a képződés helyén befejeződik, ahol azonban a VWF molekulák multimerizáltságának mértéke nagyobb, mint a vérben. A vérben a multimer egyensúly proteolitikus szabályozás alatt áll. A VWF féléletideje a keringésben 12,4 $\pm$ 2,5 óra az antigén szint és 8,5 $\pm$ 2,5 óra a kollagén kötő aktivitásának mérése alapján [48]. Érdekes ez az eredmény, és feltáratlan az aktivitásban és a mennyiségben mért féléletidők közötti különbség oka. Genderen 1997-es közleményében leírta, hogy esszenciális trombocitámiás (ET) betegek esetén a VWF féléletideje antigén szint alapján nem különbözik szignifikánsan a kontrolloktól, 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 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, amely a VWF A2 doménjében található Tyr842-Met843 (1605-1606) aminosavak között hasítja a VW molekulát. (ADAMTS=a disintegrinlike domain, a metalloproteinase domain, and a trombospondin motif.) Igazolt, hogy 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 [49, 50].

A vér áramlása közben a trombociták az érfal közelében haladnak és rendszeresen érintkeznek az érfalat bélelő endotelsejtekkel, miközben a sérülések javításával hozzájárulnak az endotelréteg folytonosságának biztosításához. Ezek a mikroszkopikusan diszkoid alakú, mag nélküli sejtek nyugvó állapotban vannak mindaddig, míg fiziológias vagy patológiás hatás nem készíteti őket aktivációra. Sérülés helyén kitapadnak az érfalhoz, a koaguláció és a sebgyógyulás folyamatának katalizálása közben szolgálják a normál hemosztázis fenntartását [51]. A trombocita a megakariocitákból képződik, az összes alkotórészével együtt (kontraktilis-, az alvadásaktív- és a hormonhatású fehérjék, lipidek és 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 μ m átmérőjű és 1 μ m vastag, amely aktiválódás hatására először gömb alakú lesz, majd zsugorodik és állabakat 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 érfalhoz a hemosztázis egyik legkorábbi lépése. Az endotelium károsodása után azonnal trombociták gyűlnek a felszínre kerülő szubendoteliális struktúrákra. A vénákban vagy nagyobb artériákban, ahol az áramlás során fellépő nyíróerők kicsik, a trombociták GPII és GPIIb/IIIa receptoraik segítségével közvetlenül kötődnek a szubendoteliális kollagénhez. Nagy nyíróerők esetén azonban, különösen arteriolákban és beszűkült erekben, ezek a receptorok önmagukban nem tudják biztosítani a trombociták adhézióját. Feltételezhető volt, hogy ilyen körülmények között lelassulnak az áramló trombociták és ellenállva a nyíróerőknek, kialakítják stabil kötéseiket a sérült érfelülettel. Ezt a folyamatot valósidejű mikroszkópos rendszerek segítségével láthatóvá tették, hogy a trombociták gördülnek szubendoteliumon, mielőtt megállnak. Demonstrálták, hogy ez a jelenség függ a VWF és a trombocita GPIb receptora jelenlététől. Ennek a kölcsönhatásnak a jelentőségét igazolja, hogy a von Willebrand betegség (VWB) 3-as típusának (VWF teljes hiánya) és a Bernard-Soulier szindrómának (GPIb hiánya) jellegzetes tünetei (pl.: nyálkahártyavérzések) olyan ereket érintenek, amelyekben a nyíróerők nagyok. Az áramlási sebességtől függő folyamatban a sérülés helyén kitapadó vérlemezkék először reverzibilisen kapcsolódnak az endotel mátrixhoz és az ott szabaddá váló trombogén anyagokon immobilizált adhezív fehérjékhez. E kapcsolódások miatt az áramlási sebességgel arányos mértékű sebességcsökkenés következik be, a sejt áramló mozgása a felszínen gördülő mozgássá változik. A gördülés alatt a VWF és a GPIb kölcsönhatása elindítja a trombocita aktivációját, és a trombogén mátrixhoz közvetlenül kapcsolódó receptorain keresztül a trombocita stabilan rögzül a felszínen (trombocita adhézió). Az aktiválódó sejt felszíne képessé válik a K-vitamin függő alvadási faktorok lokalizálására, beindul az alvadási kaszkád, amelynek végeredménye a fibrinogén fibrinné alakulása, majd a stabil fibrinháló képződése (koaguláció). Eközben a sejt-sejt kölcsönhatást biztosító receptorok is aktiválódnak és a vérlemezkék a fibrinogén és a VWF által közvetítve egymáshoz kötődnek, mintegy dugót képeznek (trombocita aggregáció), hogy a sérült érfalat lezárják. A folyamat a trombocita receptorok, az adhezív felszín, a vérben keringő faktorok, kofaktorok és a nyíró erők összehangolt kölcsönhatását feltételezi.

A receptorok közül a trombociták felszínén legnagyobb számban az indirekt kölcsönhatásban résztvevő receptorok vannak, mint a GPIIb-IIIa, majd a GPIb-V-IX receptor komplex. Az indirekt kollagén – trombocita interakcióban számos adhezív fehérje játszik szerepet, kapcsolódva a megfelelő trombocita membrán receptorral. A trombociták GPIb/V-IX receptora a VWF-on-, a GPIIb/IIIa receptora ($\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$) a VWF-on és a fibrinogénen-, a GPIIc/IIa receptor a fibronektinen-, a CD47 (*integrin-associated protein*) a trombospondinon-, az $\alpha\text{5}\beta\text{1}$, valamint $\alpha\text{6}\beta\text{1}$ minor integrinek a fibronektinen, illetve lamininen keresztül kapcsolódnak a kollagénhez [52].

Az áramlás körülményeitől függően különbség van trombocita integrin és a ligand működésében. A keringés vénás oldalán, azaz alacsony nyíróerő esetén a GPIIb/IIIa és a fibrinogén kapcsolata, míg a keringés artériás oldalán és a mikrocirkulációban, azaz magas nyíróerővel jellemezhető helyeken GPIb/V-IX és a VWF, valamint a GPIIb/IIIa és VWF közötti kölcsönhatás a döntő. A direkt receptorok közül a GPIa-IIa ($\alpha\text{2}\beta\text{1}$) receptor száma a legnagyobb, ez biztosítja a kollagénhez való direkt kapcsolódást, de a GPIIb 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 trombocitában az érfal adhezív válnak a felszínéhez történő adhézióját 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 A₂ hatására létrejövő trombocita-aggregáció (trombocita - trombocita kölcsönhatás). Az aggregációhoz, amely a trombociták receptoraikon át történő egymáshoz kapcsolódása, a trombociták adhézió során bekövetkező aktivációja szükséges. Fiziológias és patológias trombocita agonisták, jelátviteli útvonalakon keresztül képesek aktiválni a trombociták GPIIb/IIIa receptorait. A legtöbb aktivátor, lokális válaszként, a sérült érfalról szabadul fel, vagy ott szintetizálódik. Ahhoz, hogy stabil trombocita aggregáció alakuljon ki, a fibrinogénen kívül több ligand kötődik az aktivált GPIIb/IIIa-hoz. Pozitív visszacsatoló mechanizmus eredményeképpen keletkezik végül az érsérülés zárásához elegendő méretű és szilárdságú trombocita dugó. 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 VWF funkciója különleges, mert nyírófeszültségtől függően közvetíti a trombociták időszakos rögzülését az érfalon szabaddá váló struktúrákhoz. Ez a szerep az artériákban és a kapillárisokban döntő. A molekula hiánya vagy hibája különböző mértékű, néha az életet veszélyeztető vérzékenységhoz 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 [53, 54]. Sadler összefoglalása szerint a <20% VWF szint általában 1-es típusú Willebrand 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 patológiás állapotok között (vérzés vagy trombózis) 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 raktárhelyéről kilépő VWF multimerek méreteloszlása a nagyon nagy multimerek (ultra-large VWF, ULVWF) felé tolódik el. A ULVWF, amely a trombocita dús trombus képződését sokkal jobban katalizálja, mint a kis-, közepes- és nagy multimereket tartalmazó normál plazma VWF, gyorsan eltűnik a keringésből, a VWF multimer egyensúly normalizálódik. A szintén nyíróerő függő hasítási folyamat pontos mechanizmusának feltárása jelen kutatások tárgya [55]. Feltételezik, hogy a mikroereket érintő trombotikus megbetegedések (trombotikus mikroangiopátia, TMA) hátterében az ULVWF nagy mennyiségben való megjelenése és elégtelen lebontása állhat.

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 [56]. A vér reológiai viszonyainak 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-; síkon forgó kúp- és a pangási vagy álló pontos áramlási kamrák [1, 7].

Humorális oldalról a trombus növekedésének, stabilizációjának főszereplője a trombin, amely a sérülés helyén tapadt trombociták felszínén protrombinból igen gyorsan képződik [42]. Azokban a folyamatokban, amelyekben a trombociták sérült érfalhoz való lokalizációját nem a kollagén iniciálja, a trombin képződésének igen nagy szerepe lehet, amelyet mi is tanulmányoztunk [17].

A mai farmakológiai kutatás egyik vezető iránya hatóanyagok izolálása kigyómérgekből, vérszívó rovarokból, állatokból és azok hatásmechanizmusának vizsgálata [10]. Egyik munkánk célja volt a különböző biotechnológiai technikákkal készült, trombusképződést gátló specifikus anyagok/inhibitorok megismerése. Az általánosan használt antitestek mellett az *in vitro* peptid és fehérje vagy a nukleinsav alapú specifikus felismerő molekulákat alkalmazó nagyteljesítményű technológiák egyre gyorsabban fejlődnek [57]. A peptid/fehérje alapú specifikus felismerő molekulák állíthatók elő fág technológiával (angol irodalomban „phage display” technológia) [58-60]. Ennek a technikának az a lényege, hogy a fágokba -célszerűen valamelyik külső glikoproteinjébe vagy a köpenyfehérjéjébe- idegen peptid vagy antitest szekvenciát, nagy variációban 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, de hosszát a stabilitás limitálja. Általában max. 30 aminosavból álló peptidkönyvtár létezik.

SELEX-Systematic Evolution of Ligands by Exponential- dúsítási eljárás elterjedése olyan oligonukleotid szekvenciák izolálását tette lehetővé, amelyek sok fajta, nagyszámú célmolekula specifikus felismerésére és nagy affinitású kötésére képesek [61]. Ezek az oligonukleotid szekvenciák, más néven aptamer molekulák, az antitestek versenytársai a terápiás és a diagnosztikai alkalmazásban egyaránt. Jellemző a nagy specificitásuk, kémiai és biológiai stabilitásuk, alacsony toxicitásuk és antigenitásuk. Kémiai-, biokémia módszerekkel szintetizálhatóak, amelyek költségghatékony előállítási lehetőséget biztosítanak [62]. 1992-ben Bock és munkatársai trombinkötő képességük alapján azonosítottak 15 nukleotidból álló egyszálú DNS-t [d(GGTTGGTGTGGTTGG)], melyet oligonukleotidok kombinációiból álló könyvtárból választottak és konszenzus trombin aptamernek neveztek (C-15-mer) [63]. Aradi munkacsoportja 4-thiodeoxiuridiláttal (s4dU) módosított oligonukleotidokat szintetizált és leírták, hogy a beépített molekulacsoport redukáló és hidrofil karaktere miatt az új szintetikus aptamereknek nagy affinitása van számos fehérjéhez [64]. A munkánk célja volt azt megvizsgálni, hogy a módosított aptamerek hatékonyabb gátlószerek bizonyulnak-e, mint a C-15-mer [17].

ANYAGOK, KLINIKAI MINTÁK ÉS MÓDSZEREK

Humán VWF (Haemate-P), Aventis Behring, (Marburg, Németország); Sephadex CL-4B Pharmacia (Uppsala, Svédország); fágkönyvtár New England Biolabs (Beverly, MA, USA); humán trombin, hirudin, hirudin fragmentumok 54-65 (a továbbiakban hir54-65), tisztított fibrinogén, tripszin, fibrin polimerizációt gátló peptid (GPRP), 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) cégektől származtak. Rekombináns teljes hosszúságú VWF, $\Delta A1-$ ($\Delta 478-716$), $\Delta A2-$ ($\Delta 729-910$), A3his- ($920-1111$), RGGs- ($1744-1746$), $\Delta D4B-$ ($\Delta 1113-1639$) és $\Delta C-VWF$ ($\Delta 1640-1899$) Peter Lenting ajándéka volt (University Hospital, Utrecht, Hollandia). Fágkönyvtárat a BioLab-tól vásároltunk (New England, USA). Aspecifikus fágok laktoferinen szelektált fágok voltak. A B8-fág, a GPIb N-terminálisára specifikus 24B3 monoklonális antitest (moAb), és a VWF A3 doménjére specifikus 82D6A3 moAb, a 6B4 FmoAb belga kollaborációban készült. Kromogén trombin szubsztrát S-2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-PNA) származási helye Chromogenix (Milano, Olaszország); reptiláz idő reagens (batroboxin) a Diagnostica Stago (Asnieres, Franciaország), Chrono-Lume kit Chrono-log Company (Havertown, USA), ioncserélő kromatográfiával tisztított aptamer 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' (C15-mer) VBC Biotech Services (Bécs, Ausztria), BCATM fehérje meghatározó kit Pierce (Rockford, USA). Aradi János munkacsoportja készítette a 4-tiodeoxiuridiláttal (s4dU) módosított oligonukleotidokat.

A vér minták egészséges önkéntesektől származtak, akik legalább két héttel a vérvétel előtt nem szedtek trombocita ellenes gyógyszereket. 9 rész vért 1 rész 105 mM-os nátrium-citráttal antikoaguláltunk az alvadási idő és a trombocita aggregációs vizsgálatokhoz. 10 U/mL alacsony molekulatömegű heparinnal (LMWH) a trombocita adhézio tanulmányhoz (Fraxiparine, Glaxo Wellcome Production S.A.S. Franciaország). A trombocita dús plazmát (PRP) 150 g-n (15 perc, szobahőmérséklet) és a trombocita szegény plazmát (PPP) 2000 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 1200 g-n 10 percig centrifugálva üleptítettük és annyi PPP-vel szuszpendáltuk, hogy 200 G/L legyen a trombocitaszám. A PPP-ket feldolgozásig -70°C -on tároltuk (nem több mint 6 hónapig). A mosott trombocita szuszpenziót 0,18 μM prosztaglandin E1 tartalmú citrátos vérből készítettük. A PRP-ből centrifugált trombocitákat háromszor mostuk „A” mosó pufferben (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,1 mM MgCl_2 , 10 mM NaHCO_3 , 0,5 mM NaH_2PO_4 , 1 mg/mL glükóz, 10 mM HEPES, pH 7,4), az eredeti vérnek megfelelő térfogatban szuszpendálva. Az utolsó szuszpenzióból trombocita számot határoztunk meg, és centrifugálás után 200 G/L-es trombocitaszámú szuszpenziót készítettünk „B” pufferrel. A „B” puffer az „A” puffertől abban különbözött, hogy 2 mM CaCl_2 -t tartalmazott. Általában 200 G/L-es trombocitaszámú szuszpenzióval dolgoztunk.

A VWF szint (VWF:Ag) mérése ELISA módszerrel történt, jelöletlen és jelzett poliklonális, human VWF ellenes antitestekkel. A VWF:CBA azonos módon történt, csak a fedő antitest helyett kollagént használtunk. A plazma VWF risztocetin kofaktor aktivitásának (VWF:RCO) mérése kittel történt, Helena (Beaumont, TX, USA). A VWF multimer szerkezetének kvantitálása SDS agaróz elektroforézis és immunoblot után denzitometriával történt. ADAMTS-13 aktivitását fluoreszcencia rezonancia energia transzfert kiváltó szubsztrát reakcióval és antigén szintjét ELISA módszerrel mértük (TECHNOZYME® ADAMTS-13, Technoclone GmbH, Bécs, Ausztria).

A trombocita adhézios kísérletekhez párhuzamos lemezű kamrát (angol irodalomból származó rövidített néven PPC, paralell plate chamber) és síkon forgó kúp kamrát (CPC, cone and plate chamber) használtunk. A vért kísérleti tervként különböző, 2,5-, 5-, esetenként 15 percig áramoltattuk, vénás és artériás körülményeket modellező sebességgradiens beállítással, amely általában $\leq 650/\text{s}$ és $\geq 1000/\text{s}$ (gyakran 2600/s vagy még nagyobb) volt. I-es típusú humán kollagénből 1 mg/mL-es oldatot 50 mmol/L-es ecetsav oldattal készítettünk, PBS ellenében dializáltuk, majd Thermanox műanyag fedőlemezre porlasztottuk. Az előző nap előkészített és fedett lemezt másnap reggel szobahőmérsékleten, sötét helyen hagytuk. A vért 37°C -on 5 percig inkubáltuk elő a vizsgálandó anyagokkal. 5 perces áramoltatás és alapos mosás után a kollagénnel fedett lemezeken összegyűlt trombocitákat (a trombust) metanolal dehidráltuk/fixáltuk, majd May-Grünwald/Giemsa-val festettük. A lemeztől véletlenszerűen 30 területet választottunk képanalízishez (IMAN 2.0, Anyagtani Kutató Intézet, Budapest, Magyarország). A trombocitákkal fedett felszínt a teljes felszínhez viszonyított százalékban adtuk meg. A trombocita adhézio csökkenését a gátlóanyag nélküli vérből képződő maximális trombocita adhéziohoz viszonyítva, százalékos értékében fejeztük ki. A trombocita számot a kísérlet előtt és után is Sysmex K4500 hematológiai automatával (Toa Medical Electronics Co., Ltd., Kobe, Japán) határoztuk meg.

A trombocita aggregációt Lumi aggregométerrel mértük (Chrono-log, PA, USA), 260 G/L-es trombocitaszámú PRP-vel vagy mosott trombocita szuszpenzióval. A trombin aggregációt (0,5 U/mL) 1,25mM GPRP jelenlétében végeztük. A Horm kollagént 5µg/mL-es végkoncentrációban használtuk az aggregáció kiváltására. A trombin inhibitorokat (aptamereket és az összehasonlításához használt más gátló anyagokat) 1 percreg inkubáltuk PRP-vel a trombin hozzáadása előtt. Esetenként trombinnal előinkubálva és együtt adva a PRP-hez is alkalmaztuk. A kísérleteket hasonlóképpen végeztük a mosott trombocita szuszpenzióval (WPS-sel) is. A trombocita aggregáció mértékét az aggregációs görbe meredekségével jellemeztük. A trombocita szekréciót az aggregációval egyidejűleg, az ATP felszabadulás mérő luciferin-luciferáz reakcióval követtük. A legmagasabb lumineszcens jel elérése után a mintához 4µM ATP standardot adtunk, a jelmagasság növekedéséből számoltuk a trombocitára vonatkoztatott ATP felszabadulás vagy szekréció (release) mértékét.

Alvadási tesztekben 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. A trombint 5- batroxobin unit (BU)/mL Reptilase-zal helyettesítettük az aptamerek trombin specifikitásának tesztelésére.

Fibrinopeptid A (FpA) mérése folyadékromatográfia – tömegspektrometria (LC-MS) alkalmazásával. Növekvő koncentrációjú aptamerekkel előinkubált plazmához az időmérő indításával egyidőben trombintadtunk 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 3 térfogatrészt 96%-os etanol hozzáadásával állítottunk le, akkor, amikor az aptamer nélküli plazma megolvadt (30 másodpercnél). A precipitátumot centrifugáltuk (13,600 g, 4°C, 15 perc), és 90 µL felülúszót SpeedVac bepárlóban beszárítottunk. A száraz anyagot 90 µL 10%-os acetonitril és 0,1% hangyasavat tartalmazó oldatban oldottuk fel. FpA-t LC-MS alkalmazásával (API 2000, Applied Biosystems) mértünk. 10 µL mintát fecskendeztünk egy 2,1x50 mm-es C18-as fordított fázisú oszlopra és 15-41%-os acetonitril és 0,1% hangyasavat tartalmazó vízzel eluáltuk. Az FpA elúcióját (retenció idő: 3,8 perc) és a belső standardot (retenció idő: 4,7 perc) dupla-protonált tömegük alapján detektáltuk ($m/z=769,3$ és $m/z=870$). Az FpA/belső standard csúcserték arányát a kalibrációs görbéhez hasonlítottuk.

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 idejéből (25 mM-os 0,07 mL CaCl_2) határoztuk meg.

A kollagénhez kötődő VWF morfológiai különbségeinek atomerő mikroszkópos (atomic force microscopy AFM) vizsgálatához alacsony ($0,07 \text{ N/m}^2 = 0,7 \text{ din/cm}^2$) és magas ($4,55 \text{ N/m}^2 = 45,5 \text{ din/cm}^2$) nyírófeszítésű áramlást biztosítottunk, párhuzamos lemezű kamrában. Párhuzamos lemezű áramlási kamrába I-es típusú kollagénnel fedett üveglemezeket tettünk, amelyek felett géliszűrővel tisztított VWF-t áramoltattunk. 1 $\mu\text{g/mL}$ -es VWF oldatból 5- vagy 15 perces perfúzió után a kollagén felszínhez tapadt molekulákat paraformaldehid oldattal fixáltuk. A VWF detektálására kidolgoztunk egy arany gyönggyel jelzett antitestet (Protein A) alkalmazó módszert. Debreceni Egyetem Biofizikai és Sejtbiológiai Intézete az AFM-et részenként vásárolta meg a Twente Egyetemtől (Enschede, Hollandia). Érintő módban, 512x512 pixel-es képek készültek 0,7-1,5 sor/másodperces olvasási sebességgel.

A VWF-hoz kötődő fágok szelekcióját a lineáris heptamer peptid (L-7) könyvtár útmutatója alapján végeztük el. A szelekcióhoz 20 $\mu\text{g/mL}$ -es tisztított VWF-t tartalmazó PBS oldattal fedtük a felszínt egy éjszakán át, majd 30 percig 3%-os kazein oldattal blokkoltuk és PBS-T oldattal mostuk, ezután pedig a fágkönyvtárat adtuk rá az első körben. A második szelekciós körben az első körből szelektált majd amplifikált fágokat vittük a felszínre, majd a harmadik körben a második körben szelektált és amplifikált fágokat. Az elúciót mindegyik körben 0,1 M-os glicin oldattal végeztük. A fágok kötőkapacitásának tesztelésére tisztított VWF-ral fedtünk (10 $\mu\text{g/mL}$ 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-fenilén-diamin (OPD, Sigma) és H_2O_2 (Acros Organics) hozzáadásával kvantitáltuk. Minden inkubáció után 5-ször mostuk PBS-T-vel a lyukakat. Eritop térképezéshez a 96 lyukú lemezt PBS-ben oldott, 10 $\mu\text{g/mL}$ 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.

Az eredmények rendszerezése, az adatok statisztikai elemzése Microsoft Excel és SPSS.15 statisztikai szoftverekkel történt. Az IC_{50} 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 ismertetése a közleményeinkben található.

EREDMÉNYEK

A kutatómunkában a megfelelő téma megválasztása mellett jelentős szerepet tölt be a kutatáshoz alkalmazandó anyagok eszközök, rendelkezésre álló műszerek, módszerek, de nem utolsósorban 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. A saját vagy munkacsoportomban dolgozó kutatók meghatározó hozzájárulásával végzett munkák eredményét írom le, amelyek további részleteit az idézett közlemények tartalmazzák.

A vénás és artériás körülményeket modellező, teljes vért alkalmazó áramlási kamráknak több típusa ismert. A párhuzamos lemezű (PPC) és a viszkoziméterekből kidolgozott síkon forgó kúp (CPC) rendszerű kamrák a leggyakrabban alkalmazottak. Az előbbieket végigéne, 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 adhézión eredmények értelmezhetőségét hogyan befolyásolja az eltérő geometria és a trombogén felszínre vonatkoztatott különböző vértérfogat [1, 2]. A teljes felszínfedettség és az egyes trombusok területe (adhéziós terület) közötti összefüggés vizsgáltuk. (Mivel egyedi trombociták nem vagy alig voltak a kollagénen, a trombocita halmazokat trombusoknak neveztük.) A PPC és a CPC felszínein azonos volt az adhézión területek mintázata. A területet ábrázolva a felszínfedettség függvényében, exponenciális görbe volt legjobban illeszthető a PPC és CPC adatokra, $y = 7,018e^{0,0648x}$; $R^2 = 0,9183$. 25% felszínfedettség alatt alig volt különbség a két kamra között, azonban 25%-nál nagyobb felszínfedettség nem volt a CPC-ben. A trombus magassága 2 és 18 μm között változott. PPC esetén a többség 4 és 6 μm között, a CPC esetén 6 és 8 μm között volt. Az eloszlásfüggvény Gaus görbét követett. Az átlag trombus magasság PPC esetén $6,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ($n=8$), míg CPC esetén $7,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ($n=5$) ($p=0,0144$) volt. Fluoreszcensen jelzett VWF eloszlása hasonló különbséget mutatott. Jelentős volt a keringő vérből eltűnő egyedül álló trombociták száma CPC esetén, lineáris összefüggést mutatva a felszín fedettségével ($y = 0,8562x + 9,413$; $R=0,4897$; $p=0,0021$). PPC esetén nem volt összefüggés statisztikailag ($y = -0,009x + 8,8787$; $R=-0,01233$; $p>0,05$).

Mivel a VWF aktivitása arányos a multimer méretével, azaz multimerizáltságának mértékével, a VWF diagnosztikájában a VWF funkciójának meghatározásához nélkülözhetetlen a multimerek méret szerinti eloszlásának meghatározása. A nátrium lauril szulfáttal (SDS) denaturált VWF SDS-agaróz gélelektroforézissel multimerjeire bontható. Az értékelés a vizsgálandó és a kontroll minta multimerjét képező sávok 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. Módszerünk lehetővé teszi a denzitometriás görbe megfelelő értékelését [5]. A denzitometriás értékelés elsősorban azt a célt szolgálja, hogy a nagy multimerek mennyiségi változását/növekedését tudjuk értékelni. Ennek a célnak az elérése érdekében az elektroforetikus szétválasztást kellett először optimalizálni, hogy a nagy és a kis multimerek is jól értékelhető, különálló sávokat adjanak. Ezt két fontosabb változtatással lehetett elérni: (1) a VWF elektroforézishez általánosan alkalmazott Tris-glicin pufferben a glicin helyett az agaróz forgalmazója által ajánlott borát alkalmazásával, (2) az elektroforetikus elválasztott VWF multimerek gélen történő merkaptolizálásával, amellyel a gélből a membránra történő fehérje transzfert egyenletessé (multimer mérettől függetlenül) lehetett tenni. A multimerek méretének jellemzéséhez első lépés a görbe alatti terület felső 25 százalékához tartozó sávok vándorlási távolságának meghatározása volt. Ehhez a felső 25%-ot 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 multimerjeit jellemző értéknek. A módszer segítségével von Willebrand betegek mintáit, egészséges egyének plazmáit illetve trombocita lizátumait vizsgáltuk. Összevetettük a multimer analízis eredményét a VWF funkcionális tesztekkel (VWF:CB, VWF:RCO) és igazoltuk a multimer méret és a funkcionális teszt eredmények közötti összefüggést. A VWF molekula multimerizációjának fokától függő aktivitása a kollagénnel való kötődését is befolyásolja. Ennek vizsgálatára VWF kollagén kötő módszereket (VWF:CBA) alkalmaztuk. A módszerek (többnyire saját laboratóriumi, de kapható a kereskedelmi forgalomban is) különböző kollagéneket, különböző módon alkalmaznak. A módszervalidálási folyamat során irodalmi felmérést készítettünk [66] és a VWF:CB mérésére módszert állítottunk be, amellyel a fenti összehasonlító méréseket is végeztük.

Az artériás és a kapilláris keringésben a sérült érfelszínen szabaddá váló endotelsejt alatti mátrixra először a trombociták egyrétegben kitapadnak. Erre rétegre receptorokon és ligandjaikon át kapcsolódik a többi trombocita, aggregátum képződik, miközben létrejön a fibrinháló, összességében a trombus. A trombusképződési folyamatot izolált kollagénen, humán mikrovaskuláris endotelsejtek (HMEC-1) és köldökvéna endotelsejtek (HUVEC) által termelt extracelluláris mátrixon (ECM) vizsgáltuk, francia kollaborációs munkánkban [4]. A francia munkacsoport *in situ* ELISA-val és indirekt immunfluoreszcenciával kimutatta, hogy a HMEC-1 ECM-ben IV-es típusú kollagén, fibronektin, laminin és trombospondin volt, 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. A magyar

munkacsoportban készült a HMEC-1 ECM prokoaguláns aktivitásának és trombusképző tulajdonságának a meghatározása, az utóbbihoz egészségesek és VWB betegek vérének alkalmazva. A prokoaguláns aktivitást a sejtmátrixokra mért citrátos plazma rekalcinálással indított alvadási idejéből határoztuk meg, amely 36 ± 5 sec volt a HMEC-1 ECM-en, míg a HUVEC ECM-en 95 ± 6 sec. A trombusképző tulajdonság meghatározása érdekében LMWH-val antikoagulált vért 5 percig áramoltattunk párhuzamos falú áramlási kamrában, 650/s és 2600/s sebességgradienst alkalmazva. A HUVEC ECM-en a vénás áramlási körülmények között egyenként, az artériáson csoportosan tapadtak ki a trombociták és mindkét esetben egyréteget képeztek. 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, alacsonyabb sebességgradiens esetén voltak nagyobb kiterjedésűek. A kollagénnel a jellemző, vénás áramláskor kis-, artériás áramláskor nagy kiterjedésű trombusok képződtek. A plazma VWF szerepét olyan VWF ellenes monoklonális antitest jelenlétében vizsgáltuk, amely a VWF kollagénnel való kölcsönhatását gátolta. VWF ellenes monoklonális antitest gátolta az adhéziót a HUVEC ECM-en, de nem befolyásolta az adhéziót és a trombusképződés a HMEC ECM-en. Hirudin, direkt trombin inhibitor, jelenlétében az adhézió mértéke nem változott egyik mátrixon sem, azonban a trombusképződés elmaradt a HMEC-1 ECM-en de nem változott a kollagén mátrixon. A kontrollhoz hasonló, nagyméretű trombusok képződtek akkor is, amikor artériás áramlási körülmények között súlyos, 3-as típusú VW beteg vérének áramoltattuk a HMEC-1 ECM-en. Ennek a betegnek a vére nem tartalmazott sem plazma-, sem trombocita eredetű VWF-t. Az adhézió és a trombusképződés a VWF hiányára jellemző volt HUVEC ECM-en és a kollagén mátrixon egyaránt. Ez utóbbin alig vagy egyáltalán nem volt kitapadt trombocita artériás áramlási körülmények között. A HMEC-1 VWF nélküli mátrixa erős trombogén tulajdonságot mutatott, annak ellenére, hogy az 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 elmaradt.

Atomerő mikroszkóp alkalmazásával (atomic force microscopy, AFM) meggyőződhetünk arról, hogy az immobilizált kollagénnel, különböző áramlási körülmények között kötődő VWF kitekeredik-e [6]. A hálós kollagén szálaikon kötött, natív állapotában minden dimenzióban jóval kisebb VWF molekulák detektálására kidolgoztunk egy arany gyöngyökkel (átérő: 30- és 15 nm) jelzett Protein A-t alkalmazó módszert. Gélszűrővel tisztított VWF-t párhuzamos lemezű kamrában, I-es típusú kollagénnel fedett mikroszkóp fedőlemezekre, áramoltattunk. A VWF kötésének morfológiai különbségeit alacsony ($0,07 \text{ N/m}^2$) és magas ($4,55 \text{ N/m}^2$) nyírófeszültséget alkalmazva hasonlítottuk össze. A 1/10 hígításban alkalmazott, arannyal jelzett Protein A hatásosan jelölte a VWF-t, az egyedülálló VWF-anti-VWF komplex molekulák teljesen fedve voltak aranygyömbökkel. A nem specifikusan kötött arany partikulumok majdnem kizárólag egyesével fordultak elő. Nagyon alacsony arányban megfigyelhetők voltak kettesével elhelyezkedően, nagyobb aggregátumok viszont egyáltalán nem fordultak elő. 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. $1 \mu\text{g/mL}$ VWF-t tartalmazó oldatot 5 percig áramoltatva, nagy nyírófeszültség esetén a kollagénnel kötődött VWF mennyisége majd kétszerese lett a kis nyírófeszültség esetén kötőthöz képest, valamint megjelentek szokatlan formájú VW molekulák is. Ez a különbség 15 perces áramoltatás esetében – valószínűleg diffúzió következtében - eltűnt. Mosott és fixált trombocita ($68 \times 10^9/\text{L}$) jelenléte nem okozott semmilyen látható változást a VWF morfológiájában a különböző nyíróerők hatása alatt.

Amikor plazma glikokalicint egy olyan monoklonális antitesttel (Ab24B3) rögzítettük trombocitát helyettesítő műanyag gyöngy felszínéhez, amely biztosította az GPIb aktív konformációjának megfelelő formát, a gyöngy több fluoreszcensen jelzett VWF-t kötött különböző áramlási körülmények között [3]. A kidolgozás alatt lévő módszer az aktív VWF mérésének egy új lehetősége.

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, teljest vért alkalmazva. Ezt a módszert és egy tőlük vásárolt kamrát alkalmaztam az itthoni munkacsoportomban, 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 hörcsögben. *In vitro* kísérleteim eredményei szerint a Calin koncentrációfüggően gátolta a VWF-kollagén kölcsönhatást, a trombocita aktivációt és adhéziót, mind statikus, mind dinamikus körülmények között [10, 11]. Statikus körülmények között a Calin a plazma és a tisztított VWF kötődését 3,6 és 3,0 $\mu\text{g/mL}$ IC_{50} -nel jellemezhető koncentrációban gátolta I-es típusú borjúbőr kollagénhez. 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 IC_{50} . A Calin kollagénhez való kötődését valósídejű, felszíni plazmon rezonancia módszerrel mérve is hasonló eredményre jutotunk. A Calin koncentrációfüggően kötődött a kollagénhez és monofázisos disszociációt mutatott, amely $(8,8 \pm 0,3) \times 10^{-4}/\text{s}$ konstanssal jellemezhető. Dinamikus körülmények között, sebességgradienstől függően gátolta a VWF kötődését a kollagénhez. 300/s sebességgradiensnél IC_{50} : 16-19 $\mu\text{g/mL}$, 1300/s-nél IC_{50} : 75-83 $\mu\text{g/mL}$ volt. Annak tisztázása érdekében, hogy vajon a Calin trombusképződést gátló hatása a trombocita-kollagén vagy VWF-kollagén kölcsönhatáson át érvényesül-e, különböző adhezív felszínt és sebességgradienst alkalmazva vizsgáltuk a trombocita adhéziót és a trombusképződést citráttal alvadást gátló teljes vérből. A Calin 300/s és 1300/s sebességgradiensnél egyaránt gátolta a trombocita adhéziót a különböző kollagénekhez. Részleges gátlást fejtett ki humán endotelsejt 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. Nem befolyásolta az eredményeket az, hogy alvadást gátlóként citrátot vagy LMWH-t alkalmaztunk, kivéve az I-es típusú humán kollagén esetét, amelyhez citrátos vérből a trombociták nem tapadtak ki.

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 [18]. Ezekre a peptidekre alapozva, orálisan adható antitrombotikum fejleszthető ki. $2 \cdot 10^9$ különböző fágklónt tartalmazó lineáris heptamer peptid könyvtárát alkalmaztunk (L7) VWF-ral fedett felszínen. Három fág szelekciós kör után 94 egyedi peptidszekvenciát tartalmazó klónok baktériumkultúráit szaporítottunk. Ezek felülíróit teszteltük VWF-ral fedett ELISA-val. A VWF-hoz kötődött fágokat peroxidázzal jelzett M13 ellenes antitesttel majd a peroxidáz szubsztójával detektáltuk. A legmagasabb affinitással kötődő peptideket hordozó fágklónok közül hetet választottunk további vizsgálatokhoz. Egy nem specifikus fágot tartalmazó baktériumtenyésztéssel párhuzamosan, ezeket a fágokat tartalmazó baktériumokat nagy mennyiségben szaporítottuk, majd további vizsgálatokra és szekvencia analízisre izoláltuk a fágokat. Mindegyik izolált fág kötődött VWF-hoz, a fág szám növekedésével telítési görbével jellemezhető módon. A kötődés specifikus volt, mivel 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 GPIIb receptor plazmában szabadon is található extracelluláris részéhez. Az egyedi klónok analízise szerint minden klón tartalmazta a YDPWTPS szekvenciájú peptidet. Ezeket a fágokat tovább teszteltük, hogy képesek-e gátolni a VWF kölcsönhatását két ligandjával, kollagénnel és GPIIb α -val. A specifikus fágok gátolták a VWF kötődését humán I-es és III-as típusú kollagénhez, statikus körülmények között (IC_{50} ≈ 2 és $1 \cdot 10^9$ fág/mL), 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. A fágok nem voltak hatással a kollagén által indukált vérlemezke aggregációra sem. Azt vizsgáltuk a következőkben, hogy a fágok mennyire képesek gátolni a VWF kötődését kollagénhez síkon forgó kúp rendszerű áramlási kamrában, közel fiziológiás körülmények között. A vért 4000/s sebesség gradienssel áramoltattuk, humán I-es vagy III-as típusú kollagénnel fedett fedőlemezen. Ezen körülmények között a fágok részlegesen gátolták a trombociták kitapadását mindkét felszín esetében, ha $1 \cdot 10^{10}$ fág/mL mennyiségben alkalmaztuk. Maximum gátlást értünk el $1 \cdot 10^{11}$ /mL fág szám esetén. Puffer, vagy aspecifikus fág esetén nem tapasztaltunk gátlást. A fágok epitópjának/jainak keresése érdekében a fágok kötődését különböző VWF deléciós mutánsokkal fedett felszínhez is vizsgáltuk. A fágok $(1-10) \cdot 10^8/\text{mL}$ tartományban kötődtek a vad típusú, RGSS-, $\Delta A2$ - és $\Delta D4B$ - VWF-hoz. A kötődés telítési görbékkel volt jellemezhető. Meglepő volt, hogy a VWF-kollagén kölcsönhatást gátló fágok nem az A3 doménhez kötődtek, amely az elsődleges kötőhely I-es és III-as típusú fibrilláris kollagén számára. Normál módon

kötődtek viszont a $\Delta A1$ -VWF-hoz, annak ellenére, hogy ez a domén is tartalmaz másodlagos kötőhelyet a kollagén számára. Mivel a fágok nem kötődtek a ΔC -VWF-hoz, arra következtettünk, hogy a teljes VWF C doménjéhez kötődtek. Egy korábbi, ettől független munkában szintén VWF-kötő fágokat (B8 fágok) szelektáltunk pentadekamer fágkönyvtárból [14]. Ebben a munkában szintén a C doménhez kötődve gátolta a VWF-kollagén kölcsönhatást a szelektált B8 fág. A jelen munka L7 és a B8 fágok hatását összevetve azt találtuk, hogy a biotinált B8-fágok vetélkedtek az L7 fágokkal a VWF-hoz történő kötődésért. Hogy a fágok hatását kizárólag a peptid okozza, a III-as köpenyfehérjén megjelenített sorrendje szerint szintetizált peptidet is vizsgáltuk. Ellentétben az L7 fággal, a szintetikus YDPWTPS L7-peptid nem gátolta a VWF-függő trombocita kitapadást, amikor a peptiddel előinkubált vért kollagénnel fedett felszínen áramoltattuk. Ennek az a lehetséges oka, hogy a monomer peptid aviditása kicsi a fág gazdaszejthez kötődő részén 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-Arg-NH₂, molekulatömege (g/mol) 4724. A négyágú, MAP-ban 6 arginin maradékból és egy (Lys)₃ magból álló rész van, a megfelelő szterikus elrendeződés érdekében. A peptidek kémiaiilag a szabad aminocsoportokhoz és a C-terminális két Lys csoportjához vannak kapcsolva. A kevert MAP-hoz viszonyítva, a YDPWTPS szekvenciasort tartalmazó MAP 148 nmol/L-es koncentrációnál, kollagén felszínhez majdnem teljes mértékben gátolta a vérlemezkék kitapadását.

Trombin gátlását kollaborációban szelektált fágokkal vizsgáltuk. Ciklikus heptapeptid fágkönyvtárból válogatott, humán α trombinhoz kötődő fágok D-fenilalanil-L-prolil-L-arginin klorometil ketonnal (PPACK) 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. Koncentrációfüggően gátolta a trombocita aggregációt és a granulomok kiürülési reakcióját. Vénás és artériás áramlási körülmények között is gátolta a trombocita dús trombus képződését HMEC mátrixon, a teljes vérből [15]

Egy másik munkában a vaszkuláris történéseket jelentősen befolyásoló oligonukleotid inhibitor (aptamer) módosítása hatásának a vizsgálatát írtuk le [17]. A konszenzus trombin aptamer, rövid néven C-15-mer, egy 15 nukleotidból álló egyszálú DNS, [d(GGTTGGTGTGGTTGG)], amelyet kombinatorikus oligonukleotidokból álló, hatalmas könyvtárból, a trombinkötő kapacitása alapján választottak ki, majd sokszorozták. Munkatársunk az összes T-t 4-tiodeoxiuridiláttal (s4dU) cserélte (3,4,7,9,12,13), amely eredménye [d(GGXXGGXGXGGXXGG)] aptamer lett és (aUC-15-mer) nevet kapta. Majd a vicinális T-ket cserélte csak le (3,4,12,13) [d(GGXXGGTGTGGXXGG)] (vUC-15-mer), aztán a 3,7,9,13 helyeken lévő T-ket [d(GGXTGGXGXGGTXGG)] (UC-15-mer). A C-15-mer nanomol koncentrációban gátolja a trombin hatását, a trombin exosite-1-hez, más néven az 1-es anionkötő helyhez kötődve, amely a fő fibrinogén felismerő hely. Hogy meghatározzuk, hogy a módosított aptamerek gátolják-e ezt a régiót és versenyeznek-e ennek a természetes szubsztrátjával, trombin alvadási időt mértünk tisztított fibrinogénnel és humán plazmával, az aptamerek jelenlétében. A kísérletek első sorozataiban az aptamereket preinkubáltuk fibrinogén oldattal, vagy plazmával és aztán trombint adtunk hozzá. A C15-mer és UC15-mer trombinnal együtt adva, gátolta a tisztított fibrinogén és plazma alvadását. Fibrinogén oldat esetén az 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. Mindkét aptamer körülbelül kétszer hatékonyabb volt fibrinogén oldatban, mint plazmában. Ugyanezt a különbséget figyelhettük meg akkor, amikor aptamerekkel preinkubált trombinnal indítottuk a plazma alvadását vagy FpA felszabadulását. Ezeket a próbákat reptilázzal is megismételtük. A reptiláz egy kígyóméreg enzim, amely FpA-t lehasítva a fibrinogén A α -láncáról fibrinkiválást okoz. Az aptamerek egyikének sem volt hatása ezen reakcióra, amely megerősíti az aptamerek trombinspecifikus hatását. A trombin amidolitikus hatását a kromogén szubsztráttal mérve - S-2238-, nem 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 oldania a hirudin gátló hatását. Ahogy azt a kromogén szubsztrát hidrolízisével mértük, az UC15-mer koncentrációja növelésével, versenyez a hirudinnal a trombin exosite 1-ért. Vizsgáltuk az aptamerek hatását a trombin indukált trombocita aktivációra is. PRP-t vagy mosott

trombocita szuszpenziót (WPS) 1 percreg inkubáltunk aptamerekkel, növekvő koncentrációban. A trombocita aktiválódást trombinnal indítottuk. A PRP-ben a C15-mer és UC15-mer dózis-függő módon gátolta az aggregációt és az ATP szekréciót. Mind a két esetben az IC_{50} értéke UC15-merhez csak a fele volt a C15-merhez képest. Sem az IC_{50} értékek, sem a relatív hányados nem változott, amikor először a trombin inkubáltuk aptamerekkel, majd hozzáadtuk a PRP-hez. WSP-ben az IC_{50} értékek jelentősen csökkentek mindkét aptamer esetében, és az UC15-mer tizenkétszer volt hatékonyabb, mint a C15-mer ebben a rendszerben. Megjegyzendő, hogy a trombociták alakváltozására nem volt hatással az aptamer, az aggregációban maximum gátló hatást okozó koncentrációnál négyszer magasabb koncentrációban sem. Az aptamer hatás hiánya a trombin receptor aktiváló peptid 1 (TRAP-1) és a kollagén indukált aggregációra, trombin specifikusságot igazol. Az aptamerek hatását a trombusképződésre fiziológias áramlási körülmények között is vizsgáltuk, teljes vérből, különböző trombogén felszíneken, kúp és sík kamrában. Normál vérből a HMEC-1 mátrixot és trombin kezelt fibrinogén felszín egyformán nagy trombusok borították. Amikor a C15-mer és UC15-mer jelen voltak, mind a HMEC-1 extracelluláris mátrixot, mind a trombin kezelt fibrinogén felszín nagyszámú, de kisebb területű és vékonyabb trombusok valamint sok egyedi trombocita fedte. Az aptamerek hatása a hir54-65 hatásához volt hasonlítható. Kollagén felszínen nem volt változás a trombusképződésben az aptamerek jelenlétében.

Megfelelő minőségi kontrollal, VWF mennyiségi, minőségi és speciális funkcionális vizsgálatokat rutinszerűen végzünk, ezáltal kiegészítjük az alaprutin vizsgálatokat, és hozzájárulunk a klinikusok kutató munkájához, mint szerzett {Tornai, 1999 #136} vagy öröklött betegségek kimutatása. Egyik ilyen tanulmányban négy VWB esetét és fenotipizálását írjuk le, amelyek genotipizálását a belga kollaborációs partner laboratóriumában végezte el a munkacsoportunk doktrandus hallgatója [8]. 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. Egy esettanulmányban igazoltuk a trombociták fokozott kötődését VWF felszínhez [24]. Tanulmányunk, amelyben egy policitémia vera-val (PV) diagnosztizált férfi esetét ismertettük, igazolta a beteg trombocitáinak VWF felszínhez való fokozott kötődését. Más publikációkkal ellentétben, normális trombocitaszám mellett, egyedi volt a trombocita receptorok eloszlása. A nyugvó trombociták felszínén található GPIb receptorok száma a várhatótól eltérően, kétszer-háromszor nagyobb volt aktiválás után, egészséges kontrollokhoz és más PV-ás betegekhez képest. A betegnél súlyos, multiplex, cerebrális isémiás léziókat találtunk. *In vitro* trombusképződési modellben, amelyben teljes vért áramoltattunk vénás és artériás körülmények között, a tisztított VWF-ral fedett felszíneken trombocita aggregáció és trombusképződés jellemző volt, míg az egészséges és a PV kontrollok esetén a trombociták egy rétegben történő kitapadása volt a jellemző. Hasonló, patológiás eredményeket még nem publikáltak PV-val kapcsolatban.

Nagy tanulmányok igazolták, hogy az emelkedett VWF:Ag szint, a VWF növekedett aktivitása, fokozott trombozisz 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. Klinikai kutatásunkban az Emelkedett VWF mennyiség és funkció, normál ADAMTS-13 aktivitás és antigén volt kimutatható májcirrhosisos betegek plazmájából [20], [21]. Különböző eredetű cirrhosisos betegek (n=151; férfi/nő:78/73; Child A/B/C: 32/33/35%) és egészséges önkéntesek (n=64) PPP-t használtuk a vizsgálatokhoz. A kontroll csoporthoz hasonlítva elkedett volt a VWF:Ag (301 ± 122 , kontroll 120 ± 32 %), a VWF:RCo (198 ± 94 , 114 ± 42 %) és a VWF:CB szint (243 ± 107 , 119 ± 33 %). 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) statisztikailag nem különbözött a kontroll csoport aktivitás eredményekből számolt aránytól. A multimerizáció mértéke, analizálva a kis-, közepes-, nagy- és ultra nagy multimer tartományban lévő sávok denzitásának eloszlását, a kis molekulatömegű frakciók mennyiségének növekedése felé tolódott. Az ADAMTS-13 antigén és aktivitás értékek igen nagy szórást mutattak. 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 preeclampsia esetén [23], azonban az ADAMTS-13 aktivitás csökkent krónikus szív elégtelenség esetén [22].

EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Módszerfejlesztési munkánkban a trombocita kitapadást hasonlítottunk össze, magas sebességgradiens mellett CPC és PPC adhéziós modelleket használva (párhuzamos lemezű és síkon forgó kúp kamrák) [1]. Olyan geometriai és reológiai különbségek vannak PPC és CPC között, hogy szükségesnek tartottuk a trombogén felszín és vértérfogat közötti hatást vizsgálni, a trombusképződés szempontjából. Felszínnek a kollagént választottuk, mivel ez a szubendoteliális mátrix igen trombogén komponense, artériás sebességgradiensnél, ahol a VWF a kulcsszereplő. A teljes vér áramoltatási ideje 150 másodperc volt, ez a legrövidebb időintervallum, ami reprodukálható eredményekhez vezetett. A vizsgált felszínfedettség és átlag trombus terület PPC felszíneken egyezik közleményekben található értékekkel. Az, hogy CPC felszínfedettség a PPC-hez képest alacsonyabb maradt, jelzi, hogy elfogyott a keringő vérből a kitapadásra képes trombocita. Pedig elméleti számolás alapján, ha csak a felszínhez tapadnak trombociták, bőven elég lehetne a számuk. Ezért arra lehet gondolni, hogy az aggregáció jelentős CPC-ben keringő vérben. Erre utal a PPC-hez képest nagyobb trombus átlagmagasság is a CPC-ben. A fluoreszcensen jelzett VWF homogén eloszlása a trombusban azt mutatja, hogy a VWF a trombociták felszínhez tapadása mellett a trombus növekedésben is nagy számban vesz részt. Matsui és munkatársai közlésével ellentétben ez az eredmény. Ők nem látták a VW molekulák egyenletes háromdimenziós eloszlását a trombusban, azonban ez az eredményük valószínű az elégtelen immunokémiai festésükkel volt magyarázható, mint ezt egy későbbi közleményükben említik [69, 70]. Az egyedi trombociták számának jelentős csökkenése CPA-ban az adhézó mellett jelentős mértékű aggregációra utal. A síkon forgó kúp rendszer kevés vérigénye miatt alkalmas klinikai kutató és rutin laboratóriumi körülmények között is a vaszkuláris hematológiai betegségek patomechanizmusának vizsgálatára, azonban a felszínen képződött adhéziót az áramló közegben zajló aggregációval együtt kell értékelni. (Valószínű ennek az értékelésnek a hiánya miatt, közleményekben jelenleg is csak néhány munkacsoport, elsősorban a kamra kereskedelmi forgalmazását elindító munkacsoport használja a kamrát.)

A VWF molekulák változó számú dimer alegységekből állnak össze nagy VWF multimer molekulává a szintézis során. Méretüket azonban a keringésbe kerülve specifikus proteolízis csökkenti. A keringésben megtalálható VWF molekulák jellegzetes méretbeli (multimer) eloszlást mutatnak. A molekula méret – az aviditás változása miatt – alapvetően befolyásolja a VWF-trombocita kölcsönhatást. Csak a nagy multimerek képesek hatékonyan közvetíteni a trombocita adhéziót, ugyanakkor a szokásosnál nagyobb multimerek a trombusképződés valószínűségét növelik. A nemzetközi gyakorlatban eddig nem ismert, új eljárást dolgoztunk ki a VWF multimer eloszlásának pontosabb leírására [5]. Az értékelés és a program jelentősége, hogy nemcsak a multimer hiánya, de mennyiségének relatív csökkenése és növekedése is számolható vele. Ez az eljárás lehetővé teszi a 2A, 2B és a trombocita típusú VWF differenciál diagnosztikáját akkor is, amikor a nagy multimerek mennyisége szemmel alig láthatóan csökken. Azonban nagyobb a várható jelentősége annak, hogy a nagy multimerek mennyisége növekszik. Az endotel 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.

Kimutattuk, hogy humán mikrovaszkuláris endotelsejt alatti mátrix (HMEC-1, sejtvonal szubendotelioma) VWF és I-es, III-as és VI-os típusú kollagén hiánya esetén is iniciálja és fenntartja a trombusképződést, artériás és vénás áramlási körülmények között egyaránt [4]. Eredményeink arra utalnak, hogy magas áramlási sebességen a szubendoteliomon adhézió és aggregátum képződés nem csak az I-es III-es és VI-os típusú kollagén hiánya, de a VWF nélkül is bekövetkezhet. Az, hogy trombin inhibitorokkal gátlható a trombus képződése, arra utal, hogy jelentős mértékű trombinképződés/ hatás lehet a folyamat hátterében. A HMEC-1 sejtvonal hasznos lehet olyan tanulmányokban, amelyekben a mikrovaszkuláris szubendoteliom trombin függő trombogén tulajdonságait vizsgálják.

Többen igazolták azt a feltételezést, hogy a VW molekula globuláris formában kering, és áramlás hatására „kitekeredik”, egymáshoz kapcsolódik [44], fonalat képez [45]. Barg és munkatársai szilanizált

csillámpalán nagy sebességgradienssel áramoltatva rögzítettek VWF-t. Trombocitákat kötő, aktív, 300 μm hosszúságot is elérő szálakból álló filamentózus hálózat képződött. AFM-es és immunfluoreszcenciás mikroszkópos megfigyeléssel igazolták, hogy a háló képződéséhez nagy VWF koncentráció, legalább 21 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. Aranyjelzett Protein A-t alkalmazó módszert dolgoztunk ki, amely lehetővé tette az atomerő mikroszkópia alkalmazását az egyes VW molekulák helyzetének meghatározására és a kollagénhez való kötődésük morfológiai analízisére különböző áramlási viszonyok között [6]. Szignifikáns különbség nyíróerőtől függően nem volt a VWF morfológiájában. Az elrendeződés nagyfokú véletlenszerűséget mutatott, azonban magas nyírófeszültség esetén a VWF mennyisége majd kétszeres volt a felszínen. Mosott és fixált trombocita jelenléte a perfuzátumban nem okozott semmilyen látható változást a VWF morfológiájában, a különböző nyíróerők mellett. Mindezekből arra következtetünk, hogy a nyíróerő nem befolyásolta AFM-mel észlelhető módon a VW molekula alakját, miután az a kollagénnel fedett felszínhez kötődött, azonban kis nyíróerő esetén később telítődik a kollagén felszín a VW molekulákkal. Eredményünket alátámasztja egy 2010-es közlemény [71], amelyben a humán III-as típusú kollagénnel fedett felszínhez nagyobb mennyiségben kötődött a VWF a perfúzió első és második percében, amikor 400-, 1700-, 4000/s sebességgradiens jellemezte a VWF és mosott vörösvértest szuszpenzió áramlását. Ez a cikk azt is bemutatja, hogy a sebességgradiens növelésével a felszínhez kötött VWF nagy multimerjeinek a mennyisége nő. Egy 2002-es közlemény [72], amelyben felszíni plazmon rezonancia módszerrel mérik a készülék „csipp”-jéhez konjugált kollagén VWF kötő képességét, arról ír, hogy a nagy multimerek jobban kötődnek a felszínhez. Eredményeinket ezek és más citáló közlemények elfogadják [73-86]. Az, hogy az áramlás során a kollagén felszínhez tapadt VWF nem kerül ki, sokkal kisebb molekulaszervezeti változásokat feltételez. A multimerizáció nem befolyásolja a VWF monomer funkcionális egységeit, azonban egyre több adat bizonyítja, hogy nagy nyírófeszültségű helyeken nő a funkció szempontjából fontos domének hozzáférhetősége. 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 alkalmas, mert a globuláris molekula kitekeredik a nagy nyíróerő hatására és képes a trombocitát mintegy kipányvázni, miközben a VWF számos kölcsönhatási helye hozzáférhetővé válik; a meghosszabbodott VWF polimer kötési potenciálja megnő [87, 88]. A VWF A1 doménjének a trombocita GPIb receptorhoz való kötődése a fő adhézió kölcsönhatás. A VWF kollagénhez való kötődése során válik az A1 domén konformációja alkalmassá erre a szerepre. 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 szubendoteliális molekulák) és a trombociták között, hanem a plazmában lévő VWF molekulák gyorsan hozzákötődnek a felszínhez rögzült társaikhoz (auto-asszociáció). Saját kísérleti eredményeink, különböző fluoreszcensen jelzett VWF-ral nem mutatnak ilyen jellegű asszociációt [7] és ehhez társuló konformáció változást.

Hirudo Medicinalis-ból származó Calin gátolta a trombocita dús trombus képződését hörcsögben a von Willebrand faktor-kollagén kölcsönhatást a kollagén indukálta trombocita aktivációt és adhéziót dinamikus körülmények között [68, 11]. Ez a hatás specifikus, mert a Calin nem vagy alig befolyásolta az ADP, A23187, arachidonsav vagy U46069 aggregációt. Statikus körülmények között koncentrációfüggően, de csak részlegesen gátolta a VWF kötődését a kollagénhez. Mivel a VWF-nak legalább két kollagénekötő helye van, a részleges gátlásnak az lehet az oka, hogy a Calin csak az egyik kötőhelyet foglalja le. Az is bizonyítja, hogy a Calin kapcsolódik a kollagénhez, hogy a 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 alkalmazásával kimutattuk, hogy a Calin nyíró feszültségtől függően befolyásolja a VWF-kollagén kölcsönhatást. Az IC_{50} statikus körülmények között és kis sebességgradiensnél hasonló, de 5-ször nagyobb, mint nagy sebességgradiensnél. Ez arra enged következtetni, hogy a VWF áramlásfüggő konformáció változása is szerepet játszhat a VWF kollagénhez való kötődésében. A sebességgradiens változásának hatása jelentős a trombocita-kollagén kapcsolódás mechanizmusában: nagy sebességgradiensnél a trombocita először kollagénhez kötött VWF-on át a GPIb receptoron, majd GPIa-IIa receptoron közvetlenül kapcsolódik a kollagénhez, míg kis sebességgradiensnél a trombociták

kollagén receptorainak van elsődleges szerepe. Mivel a Calin a kollagénhez kötődik, feltételezhető, hogy mind a két mechanizmuson keresztül hat. Érdekes volt a Calin különböző trombogén felszínhez történő adhézióra való hatását is megvizsgálni, kis és nagy sebességgradienseknél. A Calin koncentrációfüggően gátolta a trombocita adhéziót különböző típusú kollagénekhez. Nagy sebességgradiensnél a Calin alacsonyabb koncentrációban gátolta a trombocita adhéziót, mint a VWF kötődését humán I-es típusú kollagénhez. Bár a kísérleti körülmények nem voltak teljes mértékben azonosak, az a következtetés levonható, hogy a Calin-gátlás nem csak a VWF-kollagén kölcsönhatás gátlásán keresztül érvényesül. Alátámasztva ezzel azt a nézetet, hogy nagy sebességgradiensnél a trombocita GPIa/IIa abszolút szükséges a trombocita adhézióhoz. Humán eredetű I-es és III-as típusú kollagénekhez ötször kevesebb Calin mutatott hasonló trombocita adhézió gátlást, mint a Horm kollagénhez. Az adhézió során sokkal nagyobbak az adhéziós területek, mint bármely más kollagénen és azokon igen intenzív az aggregátumok képződése. Ez azt jelentheti, hogy a Calin nem egyformán kötődik a különböző kollagénekhez, vagy a Horm kollagén olyan aktivátort/okat tartalmaz, amely/ek jelentős mértékű, kollagén receptortól független aktiválódást is kiválthat/nak. Mások közleménye szerint *Haementeria officinalis*-ból izolált *leech antiplatelet protein* (LAPP), és rekombináns technikával előállított formája (rLAPP), szintén gátolta a kollagén-adhéziót, statikus körülmények között vizsgálva, humán 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 fibronektinhez vagy VWF-hoz, a Calinhez hasonlóan. A teljes gátláshoz 3 μ M rLAPP koncentráció volt szükséges, nagy sebességgradiensnél, míg 10-szer nagyobb koncentrációban mutatott hasonló gátlást kicsinél. Gátolta a trombocita adhéziót ateroszklerotikus koronária artéria darabkához is. A Calin csak mérsékelten gátolta a trombocita adhéziót HUVEC extracelluláris mátrixához. Kis sebességgradiensnél a kollagén adhézióhoz hasonló, koncentrációfüggő volt a gátlás, de nagy sebességgradiensnél 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 kötődik a VI-os típusú kollagénhez, amely az ECM-ben az elsődleges VWF kötő kollagén. Mindezek ellenére a Calin hatásos állatkísérletes trombózis modellben. Ebben a modellben egy standardizált metszést ejtenek a hörcsög femorális vénáján, amelyen trombocitadús trombus képződik. Mivel a vénás rendszerben a kis sebességgradiens a jellemző, valószínű, hogy itt a trombocita-kollagén kölcsönhatás gátlása érvényesült. Cikkünk megjelenése óta több összehasonlítás jelent meg a Calin-ről és más trombózis gátló anyagról, amelyek szerint a különböző trombózis modellekben a Calin hasznos a trombocita-kollagén kölcsönhatás tanulmányozására [90, 91].

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 kötés valamelyikét, hatásos antitrombotikus anyagok *in vivo* körülmények között is [12, 13]. Sőt, a többi antitrombotikus anyaggal összevetve, szélesebb a terápiás spektrumuk, mint a ma használt antitrombotikus vegyületeké, mivel a kellő antitrombotikus hatás eléréséhez szükséges dózis alkalmazása nem jár együtt a vérzési idő jelentős mértékű megnyúlásával. Ezen tanulmányok szerint ezek az antitestek és protein fragmentumok csak intravénásan alkalmazandók.

Fágtechnológiát alkalmazva olyan peptidek keresése volt a célunk, amelyek antitrombotikus hatással rendelkeznek. A peptidek az orális antitrombotikus gyógyszerek jó kiindulási alapanyagai lehetnek. Lineáris heptamer (L7) fágkönyvtárat alkalmazva egy YDPWTPS peptidszekvenciát hordozó fágklónt szelektáltunk, amely gátolja a VWF-kollagén kölcsönhatást statikus és áramlási körülmények között egyaránt, ami bizonyítja, hogy hatással van az adhézióra és a trombusképződésre [18]. Érdekes módon a négy YDPWTPS szekvenciát hordozó peptid (MAP) megtartotta az eredeti peptidet hordozó fágklón antitrombotikus képességét, szemben a szimpla peptiddel. A MAP hatékonyan gátolja a vérlemezkék kitapadását kollagénnel fedett felszínre. Artériás áramlási körülmények között, majdnem teljes gátlást mutat 150 nmol/L koncentrációnál, ami jó gyógyszer kiindulási anyaggá teszi. Nem meglepő, hogy a szimpla peptid nem mutatott gátló hatást, mivel a fágtechnológiával válogatott szimpla peptidek affinitása a célmolekulához általában alacsonyabb. A fágok 3-5 példányban fejezik ki a peptidet a felszínükön, ezáltal a megjelenített peptid hatását inkább az aviditás határozza meg, mintsem az egyedülálló peptid affinitása, ami a MAP használatával igazolódott. Bár GPIb-VWF kölcsönhatást gátló

peptid antagonistákat már azonosítottak, tudomásunk szerint ez az első beszámoló olyan peptidről, amely adhéziót és aggregációt gátló hatását a VWF-kollagén kölcsönhatás gátlásával fejt ki. Váratlan, hogy a peptid epitópja a VWF C doménjében helyezkedik el. Régóta bizonyos, hogy az A3 domén tartalmazza a fibrilláris I-es és III-as típusú kollagén számára az elsődleges kötőhelyet, ahogy ezt az A1- és A3-deléciók mutánsokkal folytatott tanulmányok bizonyították. Úgy tűnik, hogy az A1 domén szerepe az I-es és III-as típusú kollagénhez való kötődésben akkor válik nyilvánvalóvá, amikor a D'D3 domén takarása nagy nyírőerő hatására megszűnik. Az A1 doménben található a kötőhely IV-es típusú kollagén számára is. Mostanáig nem derült ki, hogy a C doménnek van-e szerepe az I-es és III-as típusú kollagénhez történő kötődésben. Érdekes módon, egy korábbi tanulmányunkban, amely során pentadekamer (L15) könyvtárat és eltérő szelekciós módszert alkalmaztunk, két fágklónt azonosítottunk RVVCEYVFGRGAVCS és GCCFLVGGLCYSTCA szekvenciákkal, amelyek epitópja a C doménben van, és ezek szintén gátolták a VWF-kollagén kölcsönhatást [14]. Az L7 fágok vetélkednek az L15 fágokkal 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, ilyesfajta kölcsönhatás meglétére még nincs bizonyíték. Lehet, hogy a C doménhez történő kötődéssel a peptid konformációváltozást idéz elő a VWF-on, pontosabban az A3 doménben, így akadályozva a VWF-kollagén kötés kialakulását. Konklúzióként elmondhatjuk, hogy elsőként találtuk az olyan peptidet, amely artériás áramlási körülmények között gátolja a VWF-kollagén kölcsönhatást, valamint a trombocita adhéziót és aggregációt is.

A trombusképződést jelentősen befolyásolta, 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 [17]. 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 aladási tesztben, a C15-mer-hez viszonyítva, tehát az új, módosított aptamer gátló hatása erősebb volt, mint a C15-meré. Az UC15-mer 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 szubsztáttal mért trombin aktivitást az UC15-mer, hasonlóan a C15-merhez, nem gátolta. Ez azt jelenti, hogy aptamer a hatását nem a trombin katalitikus oldalán keresztül fejtette ki. Annak igazolására, hogy az UC15-mer a trombin exosite-1-hez kötődve vett részt a trombin aladási aktivitásának gátlásában, az UC15-mer és a hirudint 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 aladási, mind az amidolitikus aktivitást. Ha az UC15-mer lekötne az exosite 1-et, fel kellene függesztenie a hirudin okozta amidolitikus aktivitás gátlást. Valóban, kromogén szubsztáttal mérhető volt, hogy az UC15-mer jelenléte felfüggesztette a hirudin gátló hatását. A C15-mernek a 4-tio-deoxiuridiláttal való módosítása kétszer erősebb trombin indukálta trombocita aggregáció és szekréció gátlást eredményezett PRP-ben. Esetünkben a C15-merre az IC_{50} a PRP-ben 3-4-szer nagyobb volt, mint a 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 indukálta aggregáció és szekréció trombintól független voltát igazolta, hogy hasonlóan C15-merhez, egyik aptamer sem befolyásolta ezt a két reakciót. 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 aptamer koncentráció sem volt hatással a TRAP-1-indukált trombocita aggregációra. 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 aladás 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, az IC_{50} egy nagyságrenddel alacsonyabb volt UC15-merrel, mint C15-merrel. Szemben az aggregációval és szekrécióval, a trombin indukálta trombocita alakváltozás (shape change) érintetlen volt $4\mu M$ aptamer koncentrációig is. 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. 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. Hogy értékeljük, az aptamerek hatását a trombusképződésre, közel fiziológias állapotban, HMEC-1 mátrixot, trombinkezelte fibrinogén és kollagén felszíneket használtunk, áramlási rendszerben. (A trombinkezelte fibrinogén 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 a reaktív kollagének főbb típusait (I, III és VI típus) nem tartalmazza, de a trombusképződést igen nagymértékben aktiválja. Mások azt mutatták ki, hogy a trombin, vagy trombinkezelte fibrinogén által borított felszínen trombin receptor függő adhézio valósul meg. Kísérleteinkben a nagy trombusok képződését mindkét aptamer gátolta a HMEC-1 mátrixán és trombinkezelte fibrinogénen is, de maga a trombocita adhézio nem változott. Hasonló eredményeket kaptunk a trombin 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 hálóban már kötött trombin is. Mint más trombinspecifikus gátlóanyagok, az aptamerek sem befolyásolták a kollagén indukálta trombocita adhéziót. Az eredmények arra utalnak, hogy a trombociták HMEC-1 és trombinkezelte fibrinogén felszíneken történő trombusképző folyamatában a trombin exosite-1 vesz részt. 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_{50} 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 erősebb gátló oligopeptidet eredményezett. 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 ellenálló a nukleázokkal szemben, ami további előny lehet *in vivo* alkalmazás esetén. Mivel az UC15-mer több, mint 26% tiolált nukleotidot tartalmaz, módosíthatatlan társainál sokkal stabilabb biológiai környezetben. Az aptamereket tartalmazó 4-tiodeoxiuridilát további optimalizációja lehetőséget jelent hatékonyabb trombingátló aptamerek létrehozására, amelyek új, potenciális antitrombotikus gyógyszerek. Eredményünket az aptamerek molekulamodellézési és szerkezet módosítási munkákban használják [92, 93].

Tanulmányunk, amelyben egy policitémia vera-val (PV) diagnosztizált férfi esetét ismertettük, igazolta a beteg trombocitáinak VWF felszínhez való fokozott kötődését, amit az emelkedett GPIb receptor szám magyaráz. Az eredmény alátámasztja azt a nézetet, hogy a normál trombocitaszámmal rendelkező PV betegeknek is szükséges antitrombocita terápia [24].

Prospektív epidemiológiai tanulmányok alapján a VWF-t aterotrombotikus rizikófaktorként tartják számon. Trombotikus megbetegedések; érgyulladások, diabetesz, elhízás, magas vérnyomás, máj- és malignus megbetegedések kísérő jelensége a plazma VWF szintjének emelkedése. Emelkedett szintjét az endotelt ért stimulus illetve sérülés bizonyítékeként figyelték meg perifériás artériás megbetegedésekben; valamint mind akut, mind ischaemiás stroke-ot vagy tranziens ischaemiás történést követően. A VWF szerepét hangsúlyozzák nagy-artériás aterotrombózis valamint rádiófrekvenciás szívkatéterezésem átesett betegek

esetén [94]. Ezekhez az adatokhoz járultunk hozzá a krónikus szívelégtelenség és preeclampsia esetében kimutatott VWF emelkedés és ADAMTS-13 szint változás kimutatásával [22, 23]

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 endotel aktiváció markerének tartott VWF-nak a szintje igen magas e betegek plazmájában [95, 96]. Különböző eredetű és súlyosságú májcirrhosisos beteg esetében a VWF különböző módszerekkel mért aktivitását a mennyiségi változása függvényében vizsgáltuk és az eredményeket összevetettük 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 mennyiségi többletét mutatta. Ez 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 endotel perturbáció következménye lehet. A VWF:CB is csökkent a betegség legsúlyosabb fázisában, ami utalhat a szintetizálódott VWF multimerizációjának hibájára. Valószínű a kompenzatórikusan fokozott endotel funkció okozza ezeket a változásokat [20, 21].

ÖSSZEFOGLALÁS

A von Willebrand faktor (VWF) nyíróerő függő struktúrájának és funkciójának megértésére irányuló kutatásaink; új trombin inhibitor hatásmechanizmusának feltárása; a trombociták és az endotelsejtek valamint az extracelluláris mátrix közötti összehangolt folyamat molekuláris szintű elemzésének a célja, a normál hemosztázis és patológiás vérzés vagy trombózis mechanizmusának jobb megismerése, amely közelebb vihet a trombózis, hemosztázis és vaszkuláris betegségek gyógyításához.

Munkám során igazoltuk, hogy kapilláris, artériás és vénás áramlási körülmények között egyaránt jelentős a trombocitadús trombus képződése. Eközben új vizsgálóeljárásokat dolgoztunk ki, *in vitro* trombózis modellt fejlesztettünk tovább, amely alkalmas klinikai kutatásokra. Különböző geometriájú, fiziológiás és patológiás áramlást modellező rendszereket hasonlítottuk össze. A párhuzamos lemezű kamrákhoz viszonyítva, a kis vérigényű, síkon forgó kúp kamrában a trombocita adhézió mellett az aggregáció folyamata is jelentős, amelyet a kísérletek tervezésénél és értékelésénél nem szabad elhanyagolni.

A különböző méretű VWF multimereket statisztikai analízisre alkalmas számmal jellemeztük, amelynek az a jelentősége, hogy a VW multimer méretétől függő szerepét a vérzékenységtől a trombotikus állapot rizikójáig vizsgálhatjuk. A VWF multimer szerkezetének az értékelésére általunk kidolgozott teljesen új módszer a VW betegség pontosabb tipizálása mellett a fokozott endotel aktivációra utaló nagy multimer mennyiségi növekedésének kvantitálására alkalmas. A módszernek nagy jelentősége lehet a klinikai kutatásban.

Humán mikrovaszkuláris endotelsejtek mátrixán, hasonlóan a trombinnal kezelt fibrinogén felszínhez, trombin útvonalon, nyíróerőtől és VWF-től függetlenül képződik a trombus. Ez köldökvéna endotelsejt- és kollagén mátrixokon nyíróerő és VWF függő folyamat. Ebben a folyamatban a trombin 1-es anionkötő helyét foglaló, ismert inhibitorok és azoktól hatékonyabb, általunk módosított aptamer gátolja a trombin alvadási- és trombocita aggregáló aktivitását, a trombusképződést is, de a trombocita egyréteg kialakulását (adhéziót) nem. A trombocita egyréteg a trombogén mátrix passzíválást szolgálhatja.

A VWF multimerizáltságának mértéke szerint közvetíti a trombociták és a fibrilláris kollagén közötti, nyíróerőtől függő kapcsolatot. Kollagén mátrixon a VW molekula nagy nyíróerő hatása alatt sem változtatja a morfológiáját, nem nyúlik ki, atomerő mikroszkóppal értékelhető mértékben. A különböző antitestek és fágtechnológiával kiválasztott peptidek hatása szerint azonban, konformációja változik, megnő az A1 domén és a trombocita glikoprotein Ib α (GPIb) lánc közötti összekapcsolódás valószínűsége. A fágselekción a VWF új kollagénkötő helyének vagy a meglévő kötőhely molekulán belüli kapcsolaton át érvényesülő (domén hatás) kifejeződésének a felismerésére is vezetett. A kombinatórikus kémián alapuló fágpeptid szelekciós eljárásokkal nyert molekuláink a trombusképződést befolyásoló gyógyszerkutatás alapmolekulái lehetnek.

Megállapítottuk és új adatokat szolgáltatunk arra, hogy a trombusképződés a trombogén felszíntől és a sebességgradienstől függően gátolható, trombin vagy VWF elleni specifikus inhibitorokkal.

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

A von Willebrand betegség fenotípus vizsgálatainknak genetikai vizsgálatokkal való kiegészítése hat 2B típusú beteg esetében új mutáció felismerésére vezetett, amely fontos adat a betegek szempontjából is.

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

AZ MTA DOKTORI MŰ ÉS A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. 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.
2. **Harsfalvi**, J., *Measurement of thrombus formation: Comparison of two methods*. Clinica Chimica Acta, 2005. 355: p. S206-S206.
3. Udvardy ML, K.J., **Hársfalvi** J, *Glycocalicin coated beads for studying platelet GPIb function*. Platelets, 2007. 18(1 supp 1): p. 1 - 23.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. **Hársfalvi** J., S.M., *A von Willebrand factor és a vascularis haematologia*. Mikrocirkuláció, 2005. Suppl./1: p. 39-44.
8. Szanto, T., A. Schlammadinger, S. Staelens, S.F. De Meyer, K. Freson, I. Pareyn, S. Vauterin, J. **Harsfalvi**, H. Deckmyn, and K. Vanhoorelbeke, *The A/T1381 polymorphism in the A1-domain of von Willebrand factor influences the affinity of von Willebrand factor for platelet glycoprotein Ibalph*. Thromb Haemost, 2007. 98(1): p. 178-85.
9. 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.
10. **Hársfalvi** J, S.J.M., Van Houtte E., Sayer R.T., Vermynen J., Deckmyn H., *Hirudo Medicinalisból származó calin gátolja a von willebrand faktor-collagen kölcsönhatást statikus és dinamikus körülmények között*. Belorvosi Archivum, 1994. XLVII: p. 468-473.
11. **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.
12. 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.
13. 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 Ibalph reveals interaction between the leucine-rich repeat N-terminal and C-terminal flanking domains of glycoprotein Ibalph*. Blood, 2001. 98(3): p. 652-60.
14. Ulrichts, H., H. Depraetere, J. **Harsfalvi**, and H. Deckmyn, *Selection of phages that inhibit vWF interaction with collagen under both static and flow conditions*. Thromb Haemost, 2001. 86(2): p. 630-5.
15. Meiring, 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.
16. Ulrichts, 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.
17. Mendelboum 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.
18. 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.
19. Tornai, I., Z. Boda, A. Schlammadinger, A. Juhasz, N. Cauwenberghs, H. Deckmyn, and J. **Harsfalvi**, *Acquired Bernard-Soulier syndrome: a case with necrotizing vasculitis and thrombosis*. Haemostasis, 1999. 29(4): p. 229-36.
20. 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.

21. 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.
22. Gombos, T., V. Mako, L. Cervenak, J. Papassotiriou, J. Kunde, J. **Harsfalvi**, Z. Forhecz, Z. Pozsonyi, G. Borgulya, L. Janoskuti, and Z. Prohaszka, *Levels of von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity predict clinical events in chronic heart failure*. Thromb Haemost, 2009. 102(3): p. 573-80.
23. 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.
24. 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.
25. Boda, Z., *Thrombosis és Vérzékenység*. 2006, Budapest: Medicina Könyvkiadó Rt.
26. Pfliegler, G., *Vénás tromboembolia*. 2002, Budapest: B+V MEDICAL+TECNICAL LAP-ÉS Könyvkiadó.
27. Brass, L., *In the shadow of the thrombus*. Nat Med, 2009. 15(6): p. 607-8.
28. Wagner, D.D. and P.S. Frenette, *The vessel wall and its interactions*. Blood, 2008. 111(11): p. 5271-81.
29. Hathcock, J.J., *Flow effects on coagulation and thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(8): p. 1729-37.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Watson, S.P., *Platelet activation by extracellular matrix proteins in haemostasis and thrombosis*. Curr Pharm Des, 2009. 15(12): p. 1358-72.
35. Hantgan, R.R. and S.T. Lord, *Fibrinogen structure and physiology*, in *Hemostasis and Thrombosis*, R.W. Colman, et al., Editors. 2006, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 285-316.
36. Laki, K., *The action of thrombin on fibrinogen*. Science, 1951. 114(2965): p. 435-6.
37. Laki, K., *The polymerization of proteins; the action of thrombin on fibrinogen*. Arch Biochem, 1951. 32(2): p. 317-24.
38. Mihalyi, E., *Transformation of fibrinogen into fibrin. I. Electrochemical investigation of the activation process*. J Biol Chem, 1954. 209(2): p. 723-32.
39. Mihalyi, E., *Transformation of fibrinogen into fibrin. II. Changes in pH during clotting of fibrinogen*. J Biol Chem, 1954. 209(2): p. 733-41.
40. Laki, K., *Fibrinogen*, ed. K. Laki. 1968: Marcel Dekker, New York. 397.
41. Mihalyi, E., *Review of some unusual effects of calcium binding to fibrinogen*. Biophys Chem, 2004. 112(2-3): p. 131-40.
42. Di Cera, E., *Thrombin*. Mol Aspects Med, 2008. 29(4): p. 203-54.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.

47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. Luken, B.M., L.Y.N. Winn, J. Emsley, D.A. Lane, and J.T.B. Crawley, *The importance of vicinal cysteines, C1669 and C1670, for von Willebrand factor A2 domain function*. Blood, 2010. 115(23): p. 4910-4913.
51. Furie, B. and B.C. Furie, *Mechanisms of thrombus formation*. N Engl J Med, 2008. 359(9): p. 938-49.
52. Clemetson, K.G. and G. Clemetson, M., *Platelet Receptors*, in *Platelets*, A.D. Michelson, Editor. 2007, Academic Press. p. 117-139.
53. Sadler, J.E., *von Willebrand factor: two sides of a coin*. J Thromb Haemost, 2005. 3(8): p. 1702-9.
54. 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.
55. 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.
56. Harrison, P., *Review: Progress in the assessment of platelet function*. British Journal of Haematology, 2000. 111(3): p. 733-744.
57. Pál, G., *Milliárdok versengése: irányított evolúció a fehérjetudományban*. Biokémia, 2008. 32: p. 82–87.
58. 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.
59. Gronwall, C. and S. Stahl, *Engineered affinity proteins--generation and applications*. J Biotechnol, 2009. 140(3-4): p. 254-69.
60. Rothe, A., R.J. Hosse, and B.E. Power, *In vitro display technologies reveal novel biopharmaceuticals*. FASEB J, 2006. 20(10): p. 1599-610.
61. 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.
62. Jayasena, S.D., *Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics*. Clin Chem, 1999. 45(9): p. 1628-50.
63. 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.
64. Tarkanyi, I., A. Horvath, I. Szatmari, H. Eizert, G. Vamosi, S. Damjanovich, E. Segal-Bendirdjian, and J. Aradi, *Inhibition of human telomerase by oligonucleotide chimeras, composed of an antisense moiety and a chemically modified homo-oligonucleotide*. FEBS Lett, 2005. 579(6): p. 1411-6.
65. Cejka, J., *Enzyme immunoassay for factor VIII-related antigen*. Clin Chem, 1982. 28(6): p. 1356-8.
66. Szekeres-Csiki, K., L. Udvardy Miklos, T. Varga-Fekete, and J. Harsfalvi, *Von Willebrand-faktor es laboratoriumi diagnosztikai szerepe*. Orvostudományi Értesítő, 2008. 81(1): p. 45-48.
67. Siedlecki, C.A., B.J. Lestini, K.K. Kottke-Marchant, S.J. Eppell, D.L. Wilson, and R.E. Marchant, *Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor*. Blood, 1996. 88(8): p. 2939-50.
68. Deckmyn, H., De Reys, S., *Functional effects of human antiplatelet antibodies*. Semin Thromb Hemost, 1995. 21: p. 46-59.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. 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.

73. Hsu, C.C., W.B. Wu, and T.F. Huang, *A snake venom metalloproteinase, kistomin, cleaves platelet glycoprotein VI and impairs platelet functions*. JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, 2008. 6(9): p. 1578-1585.
74. Weller, F.F., *Platelet deposition in non-parallel flow*. Journal of Mathematical Biology, 2008. 57(3): p. 333-359.
75. 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.
76. Chen, J.M. and K.A. Lopez, *Interactions of platelets with subendothelium and endothelium*. Microcirculation, 2005. 12(3): p. 235-246.
77. 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.
78. 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.
79. 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.
80. 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.
81. 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.
82. Ruggeri, Z.M., *Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2003. 1(7): p. 1335-1342.
83. Ruggeri, Z.M., *Von Willebrand factor*. Current Opinion in Hematology, 2003. 10(2): p. 142-149.
84. 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.
85. 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.
86. Singh, I., E. Themistou, L. Porcar, and S. Neelamegham, *Fluid Shear Induces Conformation Change in Human Blood Protein von Willebrand Factor in Solution*. Biophysical Journal, 2009. 96(6): p. 2313-2320.
87. 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.
88. Arya, M., J.A. Lopez, G.M. Romo, J.F. Dong, L.V. McIntire, J.L. Moake, and B. Anvari, *Measurement of the binding forces between von Willebrand factor and variants of platelet glycoprotein Ibalpha using optical tweezers*. Lasers Surg Med, 2002. 30(4): p. 306-12.
89. 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.
90. Yoshida, S., T. Sudo, M. Niimi, L.A. Tao, B. Sun, J. Kambayashi, H. Watanabe, E. Luo, and H. Matsuoka, *Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline antiplatelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito*. Blood, 2008. 111(4): p. 2007-2014.
91. 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.
92. Pasternak, A., F.J. Hernandez, L.M. Rasmussen, B. Vester, and J. Wengel, *Improved thrombin binding aptamer by incorporation of a single unlocked nucleic acid monomer*. Nucleic Acids Res, 2010. 39(3): p. 1155-64.
93. 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.
94. 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.
95. Tornai, I., J. Harsfalvi, Z. Boda, M. Udvardy, G. Pfliegler, 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.
96. Rak, K., J. Harsfalvi, I. Tornai, G. Pfliegler, Z. Boda, and M. Misz, *Desmopressin and bleeding time in patients with cirrhosis*. Br Med J (Clin Res Ed), 1986. 292(6513): p. 138.

KIEGÉSZÍTÉS AZ OPPONENSEK KÉRÉSÉRE 2012-08-29

A doktori mű alapját képező közlemények és előadások, a megjelenés éve szerinti sorrendben

Sorszám (hivatkozási szám a doktor műben és a tézisfüzetben)

Közlemények

1. (8, 5) Udvardy M L, Szekeres-Csiki K, Hársfalvi J
Novel evaluation method for densitometric curves of von Willebrand factor multimers and a new parameter to describe the degree of multimerisation
THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS 102:(2) pp. 412-417. (2009)
IF: 4.451 Független idéző: 5 Összesen: 5
2. (27, 24) Toth J, Kappelmayer J, Udvardy ML, Szanto T, Szarvas M, Rejto L, Soltesz P, Udvardy M, Hársfalvi J
Increased platelet glycoprotein Ib receptor number, enhanced platelet adhesion and severe cerebral ischaemia in a patient with polycythaemia vera
PLATELETS 20:(4) pp. 282-287. (2009)
IF: 2.272 Független idéző: 3 Függő idéző: 1 Összesen: 4
3. (21, 18) Szántó T, Vanhoorelbeke K, Tóth G, Vandenbulcke A, Tóth J, Noppe W, Deckmyn H, Hársfalvi J
Identification of a VWF peptide antagonist that blocks platelet adhesion under high shear conditions by selectively inhibiting the VWF-collagen interaction.
JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS 7:(10) pp. 1680-1687. (2009)
IF: 6.069 Független idéző: 2 Függő idéző: 2 Összesen: 4
4. (26, 23) Molvarec A, Rigo J Jr, Boze T, Derzsy Z, Cervenak L, Mako V, Gombos T, Udvardy ML, Hársfalvi J, Prohaszka Z
Increased plasma von Willebrand factor antigen levels but normal von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity in preeclampsia
THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS 101:(2) pp. 305-311. (2009)
IF: 4.451 Független idéző: 15 Függő idéző: 3 Összesen: 18
5. (25, 22) Gombos T, Mako V, Cervenak L, Papassotiriou J, Kunde J, Hársfalvi J, Forhecz Z, Pozsonyi Z, Borgulya G, Janoskuti L, Prohaszka Z
Levels of von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity predict clinical events in chronic heart failure
THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS 102:(3) pp. 573-580. (2009)
IF: 4.451 Független idéző: 6 Függő idéző: 1 Összesen: 7
6. (87, 66) Szekeres-Csiki Katalin, Udvardy Miklós László, Varga-Fekete Tímea, Hársfalvi Jolán
Von Willebrand-faktor és laboratóriumi diagnosztikai szerepe
ORVOSTUDOMÁNYI ÉRTESÍTŐ - AZ ERDÉLYI MÚZEUM-EGYESÜLET
ORVOSTUDOMÁNYI SZAKOSZTÁLYÁNAK KÖZLEMÉNYEI 81:(1) pp. 45-48. (2008)
7. (20, 17) Mendelboum Raviv S, Horvath A, Aradi J, Bagoly Z, Fazakas F, Batta Z, Muszbek L, Hársfalvi J
4-thio-deoxyuridylate-modified thrombin aptamer and its inhibitory effect on fibrin clot formation, platelet aggregation and thrombus growth on subendothelial matrix.
JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS 6:(10) pp. 1764-1771. (2008)
IF: 6.291 Független idéző: 8 Összesen: 8
8. (11, 8) Szanto T, Schlamadinger A, Staelens S, De Meyer SF, Freson K, Pareyn I, Vauterin S, Hársfalvi J, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K
The A/T1381 polymorphism in the A1-domain of von Willebrand factor influences the affinity of von Willebrand factor for platelet glycoprotein Ib α .
THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS 98:(1) pp. 178-185. (2007)
IF: 3.501 Független idéző: 2 Összesen: 2
9. (4, 1) Szarvas M, Oparaugo P, Udvardy ML, Toth J, Szanto T, Daroczi L, Vereb G, Hársfalvi J
Differential platelet deposition onto collagen in cone-and-plate and parallel plate flow chambers
PLATELETS 17:(3) pp. 185-190. (2006)
IF: 1.679 Független idéző: 4 Függő idéző: 3 Összesen: 7
10. (19, 16) Ulrichs H, Hársfalvi J, Bene L, Matko J, Vermeylen J, Ajzenberg N, Baruch D, Deckmyn H, Tornai I
A monoclonal antibody directed against human von Willebrand factor induces type 2B-like alterations

- JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS 2:(9) pp. 1622-1628. (2004)
IF: 4.831 Független idéző: 3 Függő idéző: 3 Összesen: 6
11. (9, 6) Novak L, Deckmyn H, Damjanovich S, Harsfalvi J
Shear-dependent morphology of von Willebrand factor bound to immobilized collagen
BLOOD 99:(6) pp. 2070-2076. (2002)
IF: 9.631 Független idéző: 21 Függő idéző: 7 Összesen: 28
 12. (18, 15) Meiring MS, Litthauer D, Harsfalvi J, van Wyk V, Badenhorst PN, Kotze HF
In vitro effect of a thrombin inhibition peptide selected by phage display technology
THROMBOSIS RESEARCH 107:(6) pp. 365-371. (2002)
IF: 1.494 Független idéző: 3 Függő idéző: 1 Összesen: 4
 13. (17, 14) Ulrichs H, Depraetere H, Harsfalvi J, Deckmyn H
Selection of phages that inhibit vWF interaction with collagen under both static and flow conditions.
THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS 86:(2) pp. 630-635. (2001)
IF: 4.910 Független idéző: 2 Függő idéző: 5 Összesen: 7
 14. (139) Mátyus L, Bene L, Harsfalvi J, Alvarez MV, González-Rodríguez J, Jenei A, Muszbek L, Damjanovich S
Organization of the glycoprotein (GP) IIb/IIIa heterodimer on resting human platelets studied by flow cytometric energy transfer
JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B-BIOLOGY 65: pp. 47-58. (2001)
IF: 1.251 Független idéző: 2 Függő idéző: 1 Összesen: 3
 15. (16, 13) Cauwenberghs N, Vanhoorelbeke K, Vauterin S, Westra DF, Romo G, Huizinga EG, Lopez JA, Berndt MC, Harsfalvi J, Deckmyn H
Epitope mapping of inhibitory antibodies against platelet glycoprotein Iba α reveals interaction between the leucine-rich repeat N-terminal and C-terminal flanking domains of glycoprotein Iba α .
BLOOD 98:(3) pp. 652-660. (2001)
IF: 9.273 Független idéző: 21 Függő idéző: 27 Összesen: 48
 16. (7, 4) Bonnefoy A, Harsfalvi J, Pfliegler G, Fauvel-Lafeve F, Legrand C
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.
THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS 85:(3) pp. 552-559. (2001)
IF: 4.910 Független idéző: 9 Függő idéző: 5 Összesen: 14
 17. 15, 12) Cauwenberghs N, Meiring M, Vauterin S, van Wyk V, Lamprecht S, Roodt JP, Novak L, Harsfalvi J, Deckmyn H, Kotze HF
Antithrombotic effect of platelet glycoprotein Ib-blocking monoclonal antibody Fab fragments in nonhuman primates
ARTERIOSCLEROSIS THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY 20:(5) pp. 1347-1353. (2000)
IF: 5.111 Független idéző: 46 Függő idéző: 23 Összesen: 69
 18. (22, 19) Tornai I, Boda Z, Schlamadinger A, Juhasz A, Cauwenberghs N, Deckmyn H, Harsfalvi J
Acquired Bernard-Soulier syndrome: a case with necrotizing vasculitis and thrombosis
HAEMOSTASIS 29:(4) pp. 229-236. (1999)
IF: 0.872 Független idéző: 4 Függő idéző: 2 Összesen: 6
 19. (140) Udvardy M, Posa E, Palatka K, Altorjay I, Harsfalvi J
Effect of L-arginine on in vitro plasmin-generation and fibrinogenolysis
THROMBOSIS RESEARCH 87:(1) pp. 75-82. (1997)
IF: 1.461 Független idéző: 11 Összesen: 11
 20. (14, 11) Harsfalvi J, Stassen JM, Hoylaerts MF, Van Houtte E, Sawyer RT, Vermeylen J, Deckmyn H
Calin from Hirudo medicinalis, an inhibitor of von Willebrand factor binding to collagen under static and flow conditions
BLOOD 85:(3) pp. 705-711. (1995)
IF: 8.569 Független idéző: 40 Függő idéző: 14 Összesen: 54
 21. (13, 10) Harsfalvi J, Stassen J M, Van Houtte E, Sayer R T, Vermeylen J, Deckmyn H
Hirudo Medicinalis-ból származó Calin gátoja a von Willebrand faktor-kollagen kölcsönhatást statikus és dinamikus körülmények között.
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM XI:(VII) pp. 468-473. (1994)
 22. (141) Udvardy, M., E. Posa, and J. Harsfalvi, Altered lysis resistance of platelet-rich clots in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. THROMB RESEARCH, 1995. 79(1): p. 57-63.
IF: 1.443 Független idéző: 5 Függő idéző: 1 Összesen: 6

Kongresszusi előadások

1. (24, 21) Tornai I, Papp M, Udvardy M L, Orosz P, Harsfalvi J
The alterations of von Willebrand factor and its cleaving protease, ADAMTS-13 show an opposite change of directions in patients with liver cirrhosis
JOURNAL OF HEPATOLOGY.2008,48; S2 A262.
2. (6, 3) Udvardy ML, Kappelmayer J, Harsfalvi J
Glycocalacin coated beads for studying platelet GPIIb function
PLATELETS, 2007, 18;S1,.P98.
3. (23, 20) Tornai I, Papp M, Udvardy ML, Harsfalvi J
VWF functions, ADAMTS-13 activity and antigen levels in patients with liver cirrhosis
HEPATOLOGY 2007,46 S1.P808
4. (5, 2) Harsfalvi J
Measurement of thrombus formation: Comparison of two methods
CLINICA CHIMICA ACTA 2005; 355,S206.
5. (10, 7) Hársfalvi J, Szarvas M
A von Willebrand factor és a vascularis haematologia
ÉRBETEGSÉGEK Suppl. 1: pp. 39-44. (2005)
6. (12, 9) 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. PM123.

A mű alapját képező közlemények tudománymetriai adatai MTMT-ről 2012 májusi frissítés szerint:

IF: 86,9

Független idéző: 212, Fügő idéző: 99 Összesen: 311

(28 idéző a beadás utáni publikációkban van, de a programban nem állítható dátum)