

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

Doktori értekezés

Polgár Livia

Semmelweis Egyetem
Elméleti és Transzlációs orvostudományok Doktori Iskola



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

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

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

Budapest
2018

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés.....	6
1.1. Thrombocyta.....	7
1.1.1. Thrombocyta-funkciót vizsgáló módszerek.....	12
1.1.2. Thrombocyta-adhéziót vizsgáló módszerek.....	16
1.2. Célzott gyógyszerbevitel.....	17
1.3. GnRH-III-konjugátumok.....	17
1.3.1. A gonadatropin felszabadító hormon.....	17
1.3.2. GnRH-analógok.....	19
1.3.3. GnRH-alapú gyógyszerfejlesztés.....	20
1.3.4. A GnRH-III konjugátumok kifejlesztése.....	21
1.4. Szív-szövetépítés.....	25
1.4.1. A szívelégtelenség.....	25
1.4.2. Szövetépítés.....	26
1.4.3. A szövetépítéssel létrehozott teljes szív kifejlesztése humán implantációra.....	30
1.5. Impedimetria.....	34
2. Célkitűzések.....	37
3. Módszerek.....	39
3.1. Citotoxikus molekulát tartalmazó GnRH-III hormon alapú peptidkonjugátumok.....	39
3.2. Modellsejtek.....	40
3.2.1. HT-1080 humán fibrosarcoma sejtvonal.....	40
3.2.2. HMEC-1 humán endothelialis sejtvonal.....	40
3.2.3. HCM humán primer cardiomyocyta sejtek.....	40
3.2.4. HUVEC humán endotheliális sejtvonal.....	41
3.3. Thrombocyta-minták.....	41
3.4. Klinikai és laboratóriumi vizsgálatok.....	41
3.5. Decellularizált sertésszív váz előállítás.....	42
3.6. Impedimetriai mérések.....	43
3.6.1. xCELLigence SP készülék.....	43

3.6.2. Thrombocyta-adhézió mérése	43
3.6.3. Thrombocyta-spreading mérése	44
3.6.4. Decellularizált sertésszív vizsgálata – egy sejtréteg	45
3.6.5. Decellularizált sertésszív vizsgálata – „szendvics” kísérlet.....	46
3.6.6. Kardiotoxicitás mérése	47
3.7. Statisztikai kiértékelés	48
4. Eredmények	49
4.1. Thrombocyta-funkció vizsgálata impedimetriával	49
4.1.1. Thrombocytaszám-függés vizsgálata	49
4.1.2. Thrombocyta-adhézió vizsgálata.....	50
4.1.3. Thrombocyta-spreading vizsgálata	52
4.1.4. Klinikai vizsgálatok eredményei thrombocyta-adhézióval összefüggésben .	54
4.1.5. Klinikai vizsgálatok eredményei thrombocyta-spreading-gel összefüggésben	62
4.2. Citotoxicitás vizsgálata impedimetriával	68
4.2.1. Humán endothelsejtekkel (HUVEC) végzett mérések.....	68
4.2.2. Humán cardiomyocytákkal (HCM) végzett mérések.....	73
4.3. Decellularizált sertésszív váz homogenizátum adhéziós tulajdonságainak vizsgálata impedimetriával	78
4.3.1. Sejt – ECM kapcsolat jellemzése monolayer rendszerekben.....	78
4.3.2. Kísérlet „szendvics” elrendeződésű sejtrétegekkel	82
5. Megbeszélés	84
5.1. Thrombocyta	84
5.1.1. Thrombocyta-adhézió és -spreading – impedimetriai mérések.....	84
5.1.2. Klinikai faktorok hatása a thrombocyták adhéziós és spreading tevékenységére	86
5.1.3. Laboratóriumi paraméterek és impedimetriai mérések közötti korrelációk..	87
5.2. Kardiotoxicitás vizsgálatok.....	89
5.3. Szövetépítés vizsgálatok	93
6. Következtetések.....	96
7. Összefoglalás	98
Summary.....	99

8. Irodalomjegyzék	100
9. Saját publikációk jegyzéke	118
10. Köszönetnyilvánítás	120

Rövidítések jegyzéke

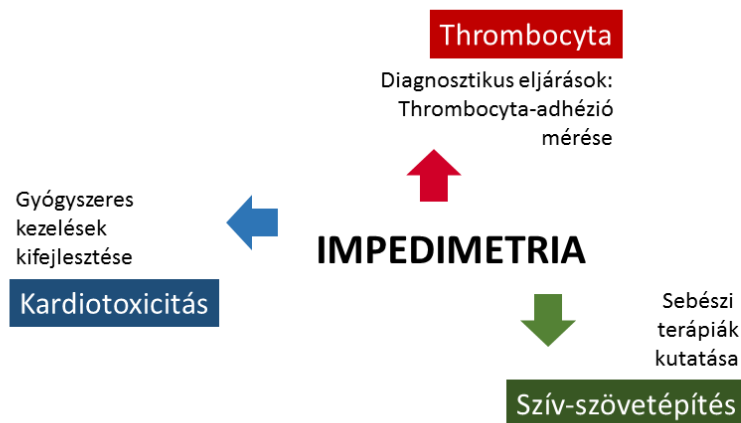
ACS	akut coronaria szindróma
ADP	adenozin-difoszfát
CI	sejtindex (Cell Index)
DNS	dezoxiribonukleinsav
ECM	extracelluláris mátrix
EGF	endothel eredetű növekedési faktor (endothelial growth factor)
FCS	borjúsérum (fetal calf serum)
FN	fibronektin
FSH	folliculus stimuláló hormon
GFLG	tetrapeptid távtartó szekvencia
GnRH	gonadotropin releasing hormone
GP Ib-V-IX	glykoprotein Ib-V-IX
GP VI	glykoprotein VI
HbA1c	hemoglobin A1c
HS	homogenizált sertésszív-váz (heart scaffold)
ISZB	iszkémiás szívbetegség
LH	luteinizáló hormon
NSTEMI	nem ST-elevációval járó myocardialis infarctus
PBS	foszfáttal pufferezt sóoldat
PCI	percutan coronaria intervenció
PRO-BNP	N-terminális agyi nátriuretikus peptid
PRP	vérlemezkében gazdag vérplazma (platelet rich plasma)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulfate)
STEMI	ST-elevációval járó myocardialis infarctus
TTP	thrombotikus thrombocytopeniás purpura
vWf	von Willebrand-faktor
YRRL	tetrapeptid távtartó szekvencia

A dolgozat megírása során, ahol lehetséges, az angol kifejezések helyett magyar megfelelőjük használatára törekedtem. Egyes angol kifejezések (pl. thrombocyt-

spreading) esetében azonban tökéletes magyar fordításuk nem létezik, eredeti formában terjedtek el a szaknyelvben, így a dolgozatban is az eredeti angol kifejezéseket használtam.

1. Bevezetés

Doktori kutatómunkám során a szív- és érrendszeri megbetegedések vizsgálatát három oldalról közelítettem meg: a thrombocyta-funkció diagnosztikája, a szövetépített egész szív kifejlesztése és a gyógyszer-hatóanyagok kardiotoxicitásának csökkentése felől. Mindhárom terület vizsgálatának alapját egy multifunkcionális laboratóriumi metodika, az impedimetriai alapú sejtes adhéziómérés adta. (1. ábra)



1. ábra – Jelen doktori munka felépítése

Az impedimetriai adhéziómérés a diagnosztikus vizsgálatok, gyógyszerkutatás és sebészi terápiák kifejlesztése területén

A kardiovaszkuláris betegségek a fejlett világ legmeghatározóbb megbetegedései közé tartoznak. Vezető helyet foglalnak el a mortalitási és morbiditási statisztikák elején is. (1) A fizikális ártalmakon túl pszichés és szociális téren is károsító hatással bírnak a páciensekre. Az egyén mellett a társadalom számára okozott negatív hatások is jelentősek. Mindezek okán a biomedicinális elméleti és klinikai kutatások jelentős része a kardiovaszkuláris területet célozza.

Az impedimetriát alkalmazó sejtheadhézió-mérés az utóbbi évtizedben a kutatásban egyre elterjedtebben használt technika. Számos alkalmazási lehetőség nyílik az impedimetria számára a kardiovaszkuláris kutatások területén is. A kardiovaszkuláris sejtes alkotóelemek adhéziójának vizsgálatán túl módot adhat a hemosztázis részletesebb

karakterizálására, kardiovaszkuláris területet érintő gyógyszerészeti kísérletek végzésére vagy akár új sebészeti terápiák kifejlesztésére is.

A továbbiakban a doktori értekezés három részének (thrombocytá-adhézió mérése, kardiotoxicitás vizsgálatok, szív-szövetépítés) elméleti háttérét szeretném tárgyalni, majd az ezeket összekötő impedimetriai alapú adhéziómérést szeretném bemutatni.

1.1. Thrombocytá

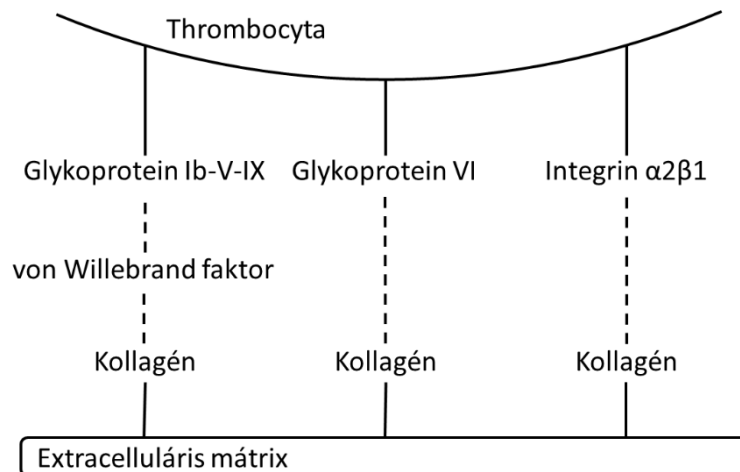
A thrombocytákat egy évszázaddal ezelőtt fedezték fel, fénymikroszkóp segítségével. 2-4 μm x 0,5 μm méretű sejtfragmentumok, melyek a csontvelő megakaryocytákból való leszakadással képződnek. A keringésben átlagosan 10 napos élettartammal vannak jelen. (2) Speciális organellumokkal, α -granulumokkal és denz testekkel (denz granulumok) rendelkeznek, amelyek a belőlük felszabaduló anyagok révén a thrombocytá-aktivációban vesznek részt. (3)

A thrombocytá-funkció defektusaival, thrombusképződés zavaraival járó artériás thrombosisal járó megbetegedések, mint például a szívinfarktus, az iszkémiás stroke, valamint a vénás thromboemboliás megbetegedések a korunk morbiditási és mortalitási statisztikáinak vezető tényezői. Ezeknek a kórképeknek a kialakulásában a thrombocyták és a thrombocytá-felszíni adhéziós receptorok kiemelt szerepet játszanak. Ezért nem meglepő, hogy világszerte rengeteg erőfeszítés folyik thrombocytá-funkciót befolyásoló gyógyszerek kifejlesztésére, amelyek között a thrombocytá-adhéziós molekulákra hatóak is gyakoriak. (4) A thrombocytá-aggregációt gátló terápia az iszkémiás szívbetegség kezelésének egyik alapköve. Az utóbbi években azonban egyre jobban megnőtt az igény az egyénre szabott terápia iránt a vérzéses és egyéb szövődmények elkerülése érdekében. Emiatt az antithrombocytá terápiák hatásának monitorozása egyre nagyobb szerepet kap, és fokozódik a megfelelő thrombocytá-funkciót vizsgáló tesztek kifejlesztésének igénye is. (5)

A thrombocytá-adhézió a thrombusképződéshez vezető folyamatsor első lépése, melyet a thrombocytá-aktiváció és végső soron a thrombocytá-aggregáció követ. Bár a többivel szorosan összefonódó folyamatról van szó, a thrombocytá-adhézió külön receptorokkal, jelátviteli utakkal rendelkező részfolyamat. A thrombocytá-adhézió nem

kardiovaszkuláris vagy thrombotikus betegségekben is megváltozhat. Egy vizsgálatban az Alzheimer-kór egérmellje esetében a thrombocyták fokozott adhéziós képességét mutatták ki. (6) A klasszikusan thrombocytá-aggregációt befolyásoló gyógyszerek közül az clopidogrel és ticagrelol thrombocytá-adhéziót csökkentő hatását mérték akut koronária szindrómás (ACS) betegekben, míg az aspirin nem befolyásolta az adhéziót ebben a betegcsoportban. (7)

A thrombocytá három fő felszíni adhéziós receptora ismert: glykoprotein Ib-V-IX, glykoprotein VI és integrin $\alpha 2\beta 1$. (2. ábra)



2. ábra – Thrombocytá adhéziós receptorok

A glykoprotein Ib-V-IX a von Willebrand faktoron keresztül kötődik a kollagénhez, míg a glykoprotein VI és az integrin $\alpha 2\beta 1$ direkt kollagénreceptorok (részletesen lsd. szöveg).

A glykoprotein Ib-V-IX (GP Ib-V-IX) az extracelluláris mátrixban (ECM) található kollagénhez a von Willebrand faktor (vWf) segítségével kötődik. (8) A kapcsolat a GP Ib α rész és a vWf A1 domain-je között jön létre. Ennek a kötődésnek nagyon magas a disszociációs rátája, így a fő szerepet magas áramlási viszonyok között, a kezdeti kollagénkötés kialakulásában, a thrombocyták érfalhoz való “horgonyzásában” (tethering) kap – stabil adhézió kialakulásához azonban további receptorokra is szükség van. (9) A specifikus kötődés mellett a kötődés mechanikus szilárdságában is szerepet játszik: a GP Ib-V-IX/vWf kötődés egy “catch bond”-ként funkcionál, azaz a húzóerő

növekedésével csökken a disszociációs rátája (tehát a stabilitása fokozódik), emellett a GP Ib-V-IX a thrombocyta citoskeletonjának mechanikus erőhatásait is közvetíti. (10) Bár korábban a GP Ib-V-IX-nek nem volt ismert szerepe a thrombocyta-aktivációban – ez a szerep elsősorban a GP VI-ra hárul –, egy 2010-es vizsgálatban a GP Ib-V-IX által kiváltott thrombocyta-aktivációt is kimutatták, amely mértékében a GP VI által kiváltotthoz volt hasonló. A hatásért szelektíven a GP Iba által kiváltott szignalizációs eseménysor bizonyult felelősnek. (11) A GP Ib-V-IX jelentőségét bizonyítja a Bernard-Soulier szindróma. Ez egy 1948-ban felfedezett, ritka genetikai betegség, melynek hátterében a GP Ib-V-IX defektusa áll. Fokozott vérzési idővel, vérzékenységgel, extrém nagy thrombocytákkal és thrombocytopeniával jár. (12)

A GP Ib-V-IX etiológiai szerepét különböző kórképek kialakulásában is kimutatták. Egy vizsgálat során az Iba régió polimorfizmusát, mint klinikai rizikófaktort azonosították a submasszív és masszív pulmonalis embólia kialakulásában. (13) Egy finn vizsgálatban a GP Iba egy haplotípusát (és a GP VI egy genotípusát) azonosították, mely kora középkorú férfiakban a halálos myocardialis infarctus kialakulásának csökkent kockázatával volt asszociált. (14) Gyógyszerhatásokban a szerepe nem elhanyagolható, egy vizsgálatban az egyik új típusú antikoaguláns, az orális thrombin inhibitor dabigatran szedése mellett GP Ib által mediált, fokozott thrombocyta-adhéziót, így enyhén fokozott thrombosis hajlamot mértek. (15) Kifejlesztés alatt áll egy, a hegyesorrú mokaszinkígyó (*Agkistrodon acutus*) mérgeből előállított GP Ib antitest, az Anfibatid. (16) Ez az antitest egereken *in vivo* csökkentette a thrombusok kialakulását, *ex vivo* pedig gátolta a thrombocyták magas áramlás mellett kialakult adhézióját, aggregációját és a thrombusok kialakulását – amellett, hogy a thrombocyta-aktivációt nem fokozta, a vérzési időt nem növelte, és nem hozott létre nyilvánvaló vérzékenységet a rágcsálómodellben. Jelenleg az Anfibatide-dal fázis I/II vizsgálatok vannak folyamatban nem ST-elevációval járó myocardialis infarctus (NSTEMI) (NCT0158525) és ST-elevációval járó myocardialis infarctus (STEMI) (NCT02495012) kórképekben szenvedő betegek esetében. Egy másik, az egér GP Ib β elleni patkány monoklonális antitest, a RAM.1, egerek esetében csökkentette a thrombusképződést. (17) Szintén a GP Ib-V-IX-vWf interakciót célozza a caplacizumab vagy ALX-0081, mely egy vWf-ellenes nanobody. Ennek hatását TTP-ben és ISZB-ben is vizsgálják (18), és jelenleg fázis I-III vizsgálatok is folyamatban vannak

(NCT01020383, NCT02878603, NCT02553317, NCT03172208, NCT02189733, NCT01151423). (19)

A glykoprotein VI (GP VI) egy direkt kollagénreceptor, mely a thrombocyták aktiválásában játszik szerepet. (20) A GP-VI az immunoglobulin szupercsalád tagja, aktivációjában fontos szerepet kap az FcR γ -alegység. A kollegénkötés hatására a GP VI citoplazmatikus vége a Src tirozinkináz közé tartozó Fyn és Lyn kinázok SH3 domain-jához köt, amelyek ezután a FcR γ -alegység ITAM motívumában lévő tirozinokat foszforilálják. Ez a Syk tirozinkináz kötődését hozza létre, amely egy szignalizációs kaszkádot indít el, ennek végén a foszfolipáz C γ 2 aktiválódik, és másodlagos hírvivők (pl. inositol-1,4,5-trifoszfát) jönnek létre valamint Ca²⁺ szabadul fel az intracelluláris raktárakból a thrombocytá aktivációjához (degranuláció, alakváltozás) vezetve. (21, 22) A GP VI receptorok dimerizációja a thrombocytá-aktiváció egyik fontos lépése, mely akár a thrombocytá-reaktiválódás egy új markere is lehet. (23) A receptoraktivációban és a kollagénhez való kötődésben a dimerképződés mellett a dimerekből létrejövő thrombocytá-felszíni csoportoknak, az ú.n. “clustereknek” is fontos szerepét mutatták ki. A thrombocyták adhéziója és aktivációja során a GP VI dimerek “clusterek”-be tömörülnek, amely a thrombocyták kollagénhez való kötődési hajlamát fokozza, valamint a szignalizációs kaszkád kialakulásának hatékonyságát is növeli. (24) A GP VI egy korábban nem ismert, teljesen új szerepéről ír egy 2015-ben megjelent cikk. (25) Mammadova-Bach és munkatársai a GP VI polimerizált fibrinhez való kötődését mutatták ki, melynek két fő funkcióját találták: a thrombinképződés amplifikációja és a keringő thrombocyták vérrögbe való recruitmentje is indukálódhat általa.

Vélez és munkatársai a GP VI szignalizációs útvonal szerepét vizsgálták STEMI-s és stabil ISZB-s betegekben. (26) A thrombocytá-mintákat izoláció és aktiváció után proteomikai megközelítéssel vizsgálták. Több fehérjét is azonosítottak, melyek kollagén-kapcsolt protein által kiváltott tirozin fosztorilációja fokozottabb volt STEMI-s betegek esetében. Emellett a STEMI-s betegcsoportban fokozott GP VI által kiváltott thrombocytá-aggregációt is mértek. Egy 2014-es vizsgálatban azon primer percutan coronaria intervención (PCI) átesett STEMI-s betegek esetében, ahol “no reflow” jelenséget tapasztaltak (az elzáródás megszűnte után a szövetek vérellátása nem rendeződött), a betegek felvételtkori szolubilis GP VI szintje alacsonyabb volt azokhoz a STEMI-s betegekhez képest, ahol a véráramlás a PCI hatására rendeződött. (27) A

csökkent szolubilis GP VI szint egy másik vizsgálatban a stroke emelkedett rizikójával mutatott összefüggést. (28) Egy fázis I vizsgálat során a Revacept, egy szolubilis, dimer glycoprotein-VI-Fc fúziós fehérje, dózisfüggő módon gátolta a thrombocytá-aggregációt egészséges humán alanyokban. (29) Jelenleg a Revacept hatását carotis stenosis, TIA és stroke megbetegedésekben vizsgáló fázis II vizsgálat van folyamatban (NCT01645306). A GP VI antitesttel való gátlásával rágcsálómodellben *in vivo* sikeresen csökkentették a myocardialis iszkémia utáni reperfüziós károsodást, illetve az elhalt szívizom méretét. (30) Egy másik ígéretes molekula az ACT017, egy humanizált Fab, mely a GP VI működését gátolja. Ez egy 2017-es vizsgálatban sikeresen gátolta a thrombocyták kollagén-indukálta aggregációját anélkül, hogy thrombocytopeniát okozott volna, emellett GP VI depléciót vagy makroszkópos vérzékenységet sem tapasztaltak. (31) A GP VI akár gyógyszer-mellékhatások célpontja is lehet: doxepin, egy triciklikus antidepresszáns gátolta a GP VI által kiváltott Ca^{2+} -szignalizációt thrombocytákban, és gátolta a thrombocyták kollagénhez való kötődését is. (32)

Az integrin $\alpha 2\beta 1$ szintén egy direkt kollagénreceptor, mely elsősorban a stabil adhézió kialakításához járul hozzá. (33) A fő kötőhelye az I. típusú kollagénben található GFOGER (O = hydroxyproline) szekvencia, míg nem kötődik a fibrinogénben és a fibronectinben található RGD szekvenciához. Az integrinekre jellemző módon két affinitási állapotban létezik. Nyugalomban lévő thrombocytákon egy alacsony affinitású állapotban van, és az aktiváció hatására vált át egy magas affinitású állapotba. A kollagénhez való kötődéshez Mg^{2+} ionokat igényel a nyíróerő nagyságától függő módon. Szignalizációjában a Src tirozinkinázok mellett, a GP VI-hoz hasonlóan, a Syk és a foszfolipáz $C\gamma 2$ játszik szerepet. Az utóbbi években kimutatták, hogy a korábban gondoltakkal ellentétben a thrombocytá-aktiváció elindításában is szerepe van. (21) Szerepet játszik a normális thrombocytá-funkció kifejlődésében és a vaszkuláris patológiában (pl. sebgyógyulás, fibrózis kialakulása) is. (34, 35) Egy 2014-es vizsgálat során az integrin $\alpha 2\beta 1$ kiütése egerekben vérzéshajlamot okozott (míg a GP VI kiütése fokozottabb vérzéshajlammal járt). (36) Más eredmények szerint az integrin $\alpha 2\beta 1$ fokozott expressziója fokozott atherothrombotikus hajlammal jár, míg csökkent expressziója nem járt fokozott vérzékenységgel. (4) Egy nanokonjugátum, amelyet egy biomimetikus peptid (LWWNSYY) és poli(glicidil)-metakrilát nanopartikulumok

konjugálásával hoztak létre, blokkolta az integrin $\alpha 2\beta 1$ -kollagén interakciót, és *in vitro* gátolta a thrombocyták adhézióját, illetve a thrombusképződést. (37)

1.1.1. Thrombocyta-funkciót vizsgáló módszerek

Számos laboratóriumi technika ismert, mely a thrombocyta-diszfunkcióról nyújt információt. (2. ábra) A hematológiai tesztek, mint a különböző thrombocyta-számláló módszerek vagy az MPV (mean platelet volume, átlagos thrombocyta-térfogat) mérése csupán mint szűrővizsgálatok javasoltak a thrombocyta-funkció defektusainak kivizsgálásában. A thrombocyta-számot rengeteg tényező befolyásolhatja. Ilyenek például egyes fertőzések, masszív vérzés vagy számos immunológiai betegség, ezek azonban a thrombocyta-funkció egyes szofisztikáltabb tesztjeinek elvégezhetőségére is hatással lehetnek. (38)

A vérzési idő az egyik legrégebben alkalmazott teszt a thrombocyta-funkció vizsgálatára, azonban a szenzitivitása alacsony, így manapság használatára egyre ritkábban kerül sor. (39) Először Milian, majd Duke írták le a XX. század elején. Néhány évtizeddel ezelőttig igen elterjedt szűrővizsgálatnak számított. A technika során egy az alkar bőrének volaris felszínén ejtett kis sebzés rendszeres törlése, ám a sebzés érintetlenül hagyása mellett mérik a vérzés megállásáig eltelt időt. (A módszer standardizálására külön eszközöket is kifejlesztettek, pl. Ivy féle technika. (40)) A vizsgálat eredményét számos technikai tényező befolyásolja, mint például a sebzés iránya, a törlés erőssége vagy a beteg túlzott pszichés stressze. Normál eredmény sem zárja ki a jelentős vérzést invazív beavatkozás esetén, így manapság nem javasolt se műtétek előtt, se egyéb esetben szűrővizsgálatként való alkalmazása. (2)

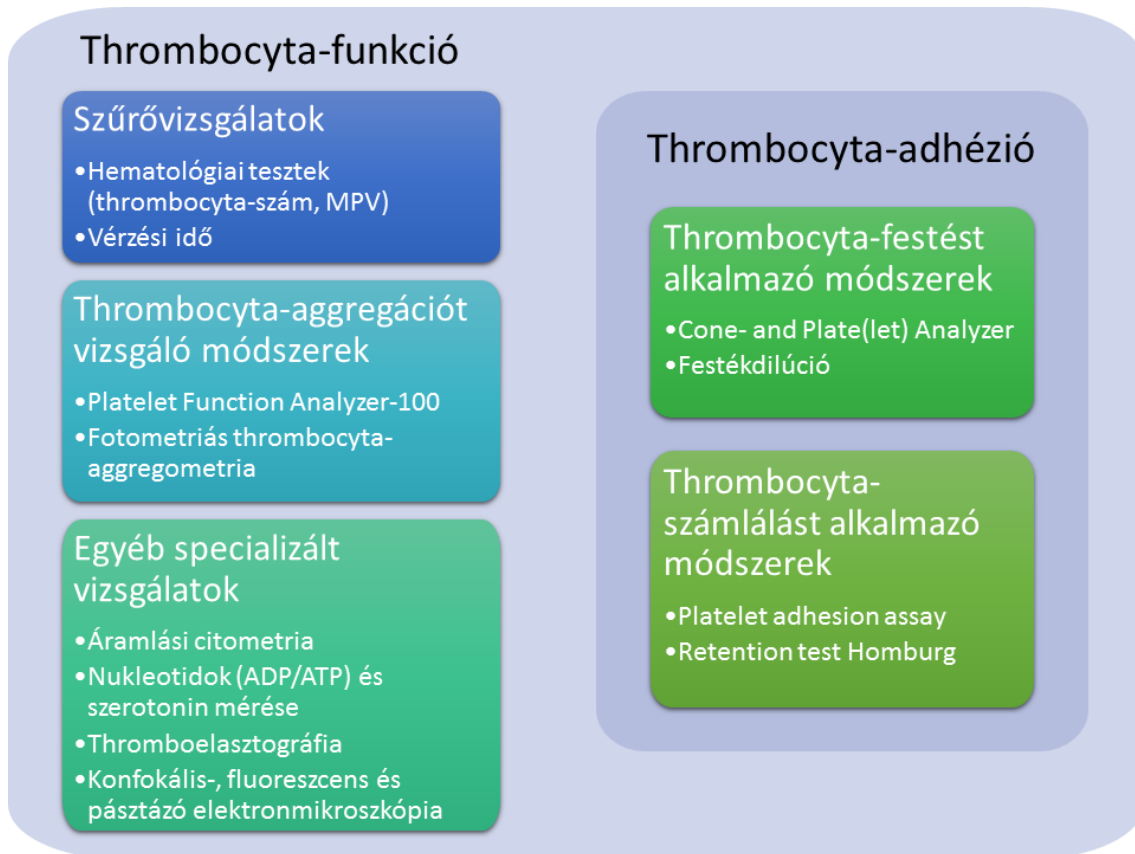
A célzottan thrombocyta-aggregációt vizsgáló módszerek közé tartozik a Platelet Function Analyzer-100 berendezés alkalmazása. E vizsgálat során a thrombocytákat tartalmazó, citrátos teljes vérmintát egy acél kapillárison, illetve kollagénnel és adrenalinnal (CEPI) vagy ADP-vel (CADP) fedett filteren keresztül szívják át. A filteren kitapadó és aggregálódó thrombocyták fokozatosan szűkítik majd elzárják a kapillárison át történő áramlást. A műszer a kapilláris elzáródásáig eltelt időt (closure time = záródási idő) méri. (41) Ez a technika a thrombocyta-adhéziót és -aggregációt együttesen vizsgálja. Régóta alkalmazott szűrő módszer thrombocyta-diszfunkció diagnosztizálására,

azonban nem specifikus a folyamat részleteire, valamint erősen függ a thrombocyta-számtól és a hematokrit értékétől is, továbbá a thrombocyta glykoprotein receptorok denzitása és funkcionális állapota is befolyásolhatja, nem is beszélve arról, hogy a mért értékek diurnális ingadozását is kimutatták. (2, 42, 43) Bár az említett módszer szenzitivitása 85%, specificitása az egyes kórképek esetében csupán 55-75% között mozog (38, 44), bár megjegyzendő, hogy kongenitális betegségekben a szenzitivitása általában a betegség súlyosságával arányos. (2) és von Willebrand-betegség esetén 90%-hoz közeli szenzitivitást is leírtak már.

A thrombocyta-aggregáció vizsgálatának arany standardja a Born és O'Brian által 1962-ben kifejlesztett fotometriás thrombocyta-aggregometria. (2) Ezen módszer során platelet rich plazmát (PRP) használnak, az aggregációt thrombocyta-agonista (adrenalin, ADP, kollagén, stb.) és keverés triggereli. A thrombocyták aggregálódásával párhuzamosan a minta fényáteresztő képessége növekszik. Az aggregáció mértékét a minta optikai denzitásának spektrofotométerrel mért csökkenéséből számítják. A gyenge agonisták (pl. adrenalin vagy alacsony koncentrációjú ADP) hatására kialakuló kezdeti, primer aggregációs hullámot egy – az adenin nukleotidok denz granulumokból való felszabadulásával magyarázható – második aggregációs hullám követi. Az erős agonisták (pl. kollagén vagy thrombin) hatására egyetlen erős aggregációs hullám mérhető – ennek oka az, hogy ezeknek az agonistáknak a hatása nem függ a thrombocyták szekréciónak tevékenységétől. A fotometriás módszerrel mért aggregometria széles körben elterjedt a thrombocytaaggregáció-gátló terápiák eredményességének követésére (45), azonban további standardok beállítása még a klinikumban is elengedhetetlen, hiszen a mérési protokollok jelentősen különböznek az egyes laboratóriumok között. (46) A standardizálásra irányuló törekvések folyamatosak. Ezek közé tartoznak az aggregometriás mérési görbe különböző paramétereit értékelő vizsgálatok, mint például Aradi és munkatársainak a vizsgálata, akik az elterjedtebben használt aggregációs görbe „csúcsi értéke” helyett az 5-6 perccel az ADP hozzáadása utáni „késői aggregáció” paramétert mérték. (47) Szintén hasznos módszer az egyes örökölt vagy szerzett thrombocyta-funkciós defektusok diagnosztizálásában, különösen a thrombocyta-tárolási betegségek esetében (pl. Chédiak-Higashi szindróma, Hermansky-Pudlak szindróma, szürke thrombocyta szindróma), melyet általában egy abnormális második aggregációs hullám jellemez. (2)

A különböző szűrővizsgálatok illetve a thrombocyta-aggregáció célzottan vizsgáló technikák mellett számos egyéb specializált metodika létezik. Az áramlási citometria alkalmazása thrombocyták esetében is elterjedt. A mérés előtt a thrombocytákat fluoreszcensen jelölt monoklonális antitestekkel fedik. Ezután a mintát egy kamrában áramoltatva lézerfényrel világítják meg, ami a fluoreszcens festéket gerjeszti. A kibocsátott fluoreszcens fény, illetve a szórt fénysugarak detektálásával a keresett thrombocyták azonosíthatóak. (2) A technika elsősorban thrombocyta aktivációs markerek, jelátvivő útvonalak és thrombocyták valamint egyéb véralkotó sejtek közti kapcsolatok detektálására használatos. Előnye, hogy igen alacsony thrombocyta-szám esetén is pontos eredményt ad, így thrombocytopenia vizsgálatára az ideális módszer, azonban a megbízható eredmények eléréséhez speciálisan képzett, tapasztalt vizsgálószemélyzet szükséges. (48) További thrombocyta specifikus technika a totál, illetve a szecernált nukleotidok (ADP/ATP) és a szerotonin mennyiségének mérése, mely thrombocyta tárolási betegségek és szekréción defektusok vizsgálatában kap szerepet. (49) A tárolási betegségek esetén a denz granulumok mennyisége csökken, ez pedig megváltozott ADP/ATP aránnyal jár, így ezek a betegségek az adenin nukleotidok mennyiségének mérésével vagy elektronmikroszkóppal diagnosztizálhatóak. (2)

A thromboelasztográfia során a véralvadási kaszkádot teljes vérben 37 °C-on, oszcilláció mellett klasszikusan az intrinsic útra ható, negatív töltésű kaolinnal aktiválják egy küvettában. Egy, a mintába érő tű segítségével az alvadó vér viszkoelasztikus tulajdonságait mérik. A globális hemosztázis dinamikus vizsgálatára alkalmas módszer, egyes módosításokkal (többféle reagensek – aktivátorok vagy inhibitorok – használatával) specifikus paraméterek is mérhetőek – mint például a véralvadás különböző útvonalainak vizsgálata, egyes faktorok vagy a funkcionáló thrombocyták mennyiségének becslése. Szívsebészeti alkalmazása igen elterjedt faktorpótlás, illetve thrombocyta-pótlás megítélése céljából. (2)



3. ábra – Thrombocyt-funkciót vizsgáló módszerek összefoglalása

A thrombocyt-funkciós vizsgálatok részét képezik a thrombocyt-adhéziót mérő módszerek; ezek alapvetően thrombocyt-festés vagy –számlálás útján mérik az adhéziót (részletesen ld. szöveg).

A thrombocyták kiterülésének („spreading”), illetve alakváltozásának vizsgálatára általában vizualizációs technikák terjedtek el. Ezek közé tartozik a konfokális mikroszkópia (50), a fluoreszcens mikroszkópia (51) és a pásztázó elektronmikroszkópia. (52)

Bár számos módszer elérhető a thrombocyt-funkció vizsgálatára, olyan teszt, mely kellő specificitással és szenzitivitással tudná elkülöníteni a thrombusképződés egyes részfolyamatait, még nem áll rendelkezésre. A diagnózis felállításához általában többféle, különböző teszt eredményeinek összegzésére van szükség, melyek sokszor csak kiválasztott, magasszintű orvosi centrumokban érhetők el. (2)

1.1.2. Thrombocytá-adhéziót vizsgáló módszerek

A thrombocytá-adhézió izolált mérésére eddig kevés módszer került kifejlesztésre, és ezek sem terjedtek el széles körben sem a klinikai, sem a kutatói gyakorlatban. (3. ábra) Ezek a technikák alapvetően kétféle megközelítést alkalmaznak. Egyik lehetséges módszer szerint a letapadt thrombocytákat megfestik, majd a festődés mértékét analizálják. A *Cone and Plate(let) Analyzer* (53) technikában a thrombocyták kollagénnel fedett tárgyilemezre tapadnak ki, festékként pedig May-Grünwald festést használnak. A festődés mértékét fénymikroszkóppal és képanalitikai szoftver segítségével elemzik, ennek során a letapadt thrombocyták, illetve az esetlegesen kialakult thrombocytá-aggregátumok számát és méretét értékelik. A *Cone and Plate(let) Analyzer* hatékonyságát kimutatták glykoprotein IIb-IIIa antagonisták hatásának követésében, valamint voltak próbálkozások aszpirin és thienopyridinek hatásának monitorozására is, azonban további vizsgálatok szükségesek, hogy széles körben elterjedhessen. (54) Egy további módszerben a thrombocyták kollagénnel fedett gyöngyökhöz tapadnak ki, majd a festődés mértékét fotometriai módszerrel értékelik.

A másik ismert megközelítés a thrombocytá-adhézió vizsgálatára a thrombocytá-szám mérése a mintában az inkubációs periódus (amelyben az adhézió megtörténik) előtt és után, ezek után pedig a két szám arányából a letapadt thrombocytá-szám kiszámítása. Ezt a megközelítést alkalmazza a „*platelet adhesion assay*”. (55) E technika során a thrombocytá-minta egy küvettába kerül, ahol az adhéziós felületet fibrinogénnel borított gyöngyök képezik. A minta folyamatos rázatás mellett történő inkubációja során a thrombocyták kitapadnak a gyöngyökhöz. A mintában megméri a thrombocytá-számot az inkubáció előtt és után is, ebből következtetnek az adott fedettség melletti adhézió mértékére. Egy másik thrombocytá-számmal operáló technika a *retention test Homburg*. (56) Ennek során a thrombocytá-minta egy speciális kétkamrás tesztcső egyik kamrájába kerül, melyet a másik kamrától egy polikarbonát-filter választ el. A cső centrifugálása során a thrombocyták a filterhez tapadnak ki. A centrifugálás előtt és után mérik a mintában a thrombocytá-számot, illetve a centrifugálás után a filtert mikroszkóp alatt analizálják. Ezen technika során a centrifugálás mértéke (*g*) befolyásolta a kapott eredményeket, továbbá a filter elektronmikroszkópos vizsgálata során a filterhez tapadt, de nem kiterült thrombocytákat is találtak – azaz a thrombocyták spontán adhéziója mellett a centrifugális erő kitapadást kiváltó hatása sem kizárható a mérés során.

Mindezen technikák közös tulajdonsága, hogy ezek a módszerek végpont-esszék, azaz nincs lehetőség a thrombocytá-adhézió valós idejű követésére, illetve a folyamat dinamikáinak vizsgálatára. Továbbá, egyik módszer sem kellően standardizált, és használatuk nem terjedt el a laboratóriumi gyakorlatban.

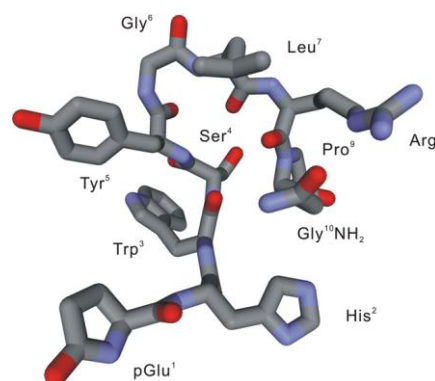
1.2. Célzott gyógyszerbevitel

A célzott gyógyszerbevitel (targeted drug delivery) módszer lényege, hogy a gyógyszerként funkcionáló hatóanyagot (általában citotoxikus hatóanyagot) egy másik molekulához kapcsolják, ezáltal a citotoxikus molekula a hatás helyén nagyobb koncentrációban van jelen, mint a szervezet többi részén – ezzel a gyógyszerhatékonyság növekszik és a mellékhatások kialakulása csökken. A célzott gyógyszerbevitel fogalma Paul Ehrlich „varázslövedék” („magic bullet”, „Zauberkegel”) elméletéig nyúlik vissza, amely olyan gyógyszermolekulák megalkotását jelenti, amelyek receptorokon keresztül célzottan kötődnek a daganatsejthez. (57) A célzott gyógyszerbevitel egyik formája a passzív bevitel – azaz a gyógyszermolekulákat nanohordozókba („nanocarrier”) zárják. Számos hordozó típust fejlesztettek ki – pl. liposzómákat, nanorészecskéket, micellákat, dendrimereket (repetitíve elágazó molekulák). A célzott gyógyszerbevitel másik formája az aktív bevitel – azaz a hatóanyagot egy vivőmolekulához kapcsolják, amely egy receptoron keresztül specifikusan kötődik a targetsejthez. A vivőanyagok lehetnek antitestek, melyek antigén-antitest kölcsönhatással kötődnek a célsejthez, vagy hormon- vagy egyéb molekulák, melyek a tumorsejten megtalálható saját receptoraikhoz kötődnek. (58)

1.3. GnRH-III-konjugátumok

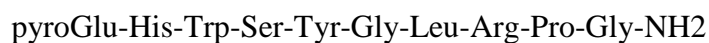
1.3.1. A gonatotropin felszabadító hormon

A gonatotropin felszabadító hormon (gonatotropin-releasing hormon, GnRH, 4. ábra) felfedezése az 1977-es fiziológiai és orvostudományi Nobel-díjat elnyert Andrew V.

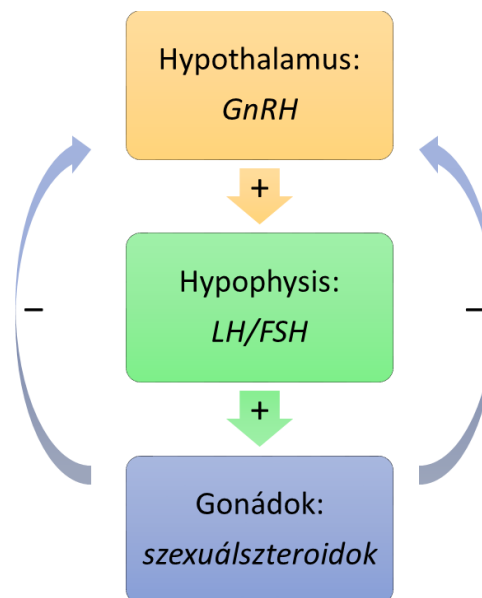


4. ábra – Gonatotropin felszabadító hormon (GnRH)

Schally és Robert Guillemin nevéhez fűződik. (59) Szerkezetileg egy tíz aminosavból álló peptid:



A GnRH-t a hypothalamus termeli, szekréciója pulzatis dinamikát követ. Klasszikusan trophormonként felfedezett hormon, mely hatását elsősorban a hypophysisen fejt ki. A hypothalamus-hypophysis-gonad axis első lépéseként a hypophysisből felszabaduló folliculus stimuláló hormon (FSH) és luteinizáló hormon (LH) termelését serkenti, melyek elsősorban a gonádokon fejtik ki hatásukat. (60) (5. ábra)

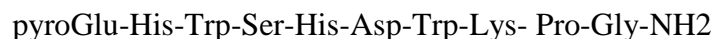


5. ábra – *Hypothalamus-hypophysis-gonád tengely*

A GnRH-nak három izoformáját írták le (GnRH-I, GnRH-II, GnRH-III). Ezek közül a

GnRH-I és GnRH-II emberben is termelődik (61). A GnRH-I a klasszikusan leírt hypophysotrop hormon. A GnRH-II izoforma az előbbitől három aminosavban különbözik, és a GnRH-I-gyel ellentétben a GnRH-II evolúciósan konzervált, fajok között gyakorlatilag eltérést nem mutat. Az idegrendszeren kívül több egyéb szövet sejtjei is szecernálják, fő szerepe szintén a reprodukciós tevékenység szabályozásában van. (62)

A GnRH-III-at 1993-ban izolálták a tengeri ingola (*Petromyzon marinus*) agyából. (63) Szerkezetileg négy aminosavban (5-8. pozíciókban) tér el a GnRH-I izoformától:



A GnRH-receptor a hét transzmembrán domainnel rendelkező G-protein kapcsolt receptorok (GPCR) családjába tartozik. Az emberben megtalálható GnRH-receptor elsősorban a hypophysis gonadotrop sejtjein található meg, amelyeken az elsődleges, LH- és FSH-szekréciót serkentő hatást közvetíti. Emellett azonban több más reproduktív funkcióhoz kapcsolódó szövetben (pl. ovarialis sejtek, endometrium) valamint egyéb szervekben is (pl. máj, szív, vázizom, vese, perifériás vér mononukleáris sejtjei) is

kimutatták. A GnRH-receptor egy másik altípusának a génje is ismert emberben, valamint mRNS-expressziót is kimutattak többféle szervben (pl. szív, hasnyálmirigy, vázizom, hímivarsejt, posztmeiotikus tesztikuláris sejtek, valamint nőgyógyászati tumorokban, hypophysis adenomában és neuroblastoma sejtekben) – azonban funkcionáló receptort még nem sikerült kimutatni. (64, 65)

A GnRH-receptorok fokozott expresszióját több tumoros sejtípuson leírták már, különösképpen rosszindulatú nőgyógyászati tumorok esetében (emlő-, ovarium- és endometrialis carcinoma esetén). (66) A GnRH-receptorok működéséhez és a GnRH hatásának kifejtéséhez elengedhetetlen a GnRH korábban említett pulzatilis dinamikájú szekréciója. Nagy dóziszú, folyamatosan adott GnRH hatására ugyanis a GnRH-receptorok down-regulációja és deszenzitizációja következik be. Ezekből következik, hogy a különböző GnRH-agonisták, illetve analógok, megfelelően adagolva, inhibitor hatást fejthetnek ki, amely hatását hormonfüggő tumorok esetében (prosztata-, emlő-, ovarium- és endometrium carcinoma) ki is használják. (67)

1.3.2. GnRH-analógok

A GnRH-t és különböző GnRH-analógokat antitumor terápiaként alkalmazzák. (68) A GnRH-III tumorelleses hatását többféle daganat esetén is kimutatták. (69-71) Herédi-Szabó és munkatársai kísérleteik során különböző, egy GnRH-III analógokból álló peptid-könyvtárat hoztak létre – ebben az 5-8. pozícióban lévő aminosavakat helyettesítették 19 természetes aminosavval (ciszteinnel nem), majd ezeknek az analógoknak a tumorelleses hatékonyságát vizsgálták. (72) A GnRH-III-mal ellentétben, egy sem volt képes MDA-MB 231 humán emlőcarcinoma sejtek növekedését gátolni – vagyis a GnRH-III bizonyult a legpotensebb tumorelleses molekulának. Egy 2007-es kutatásban módosított GnRH-III molekulákat vizsgáltak. (73) Ennek során egyetlen (láncon belüli) aminosav cseréjével, N- és C-terminális aminosavak módosításával vagy több aminosav cseréjével hozták létre a módosított GnRH-III-molekulákat, valamint a GnRH-III egy kopolimerrel (poli(N-vinilpirrolidon-ko-maleinsav) való konjugátumát is vizsgálták. Méréseik során a GnRH-III egyetlen szubsztituált vagy módosított változata sem rendelkezett magasabb tumorelleses aktivitással humán emlőcarcinoma sejteken, sőt, a GnRH-III hatásához képest általában csökkent hatást mértek. Azonban a GnRH-

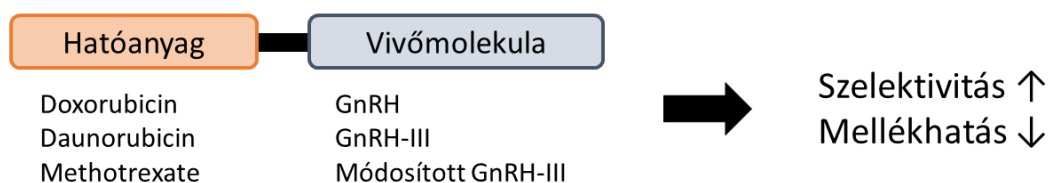
III-kopolimer konjugátum esetében – az endokrin hatások elvesztése mellett – két-háromszorosan emelkedett tumorelles hatást mutattak ki. Mező és munkacsoportja 2007-ben publikált cikkükben általuk kifejlesztett GnRH-III dimereket mutattak be. (69) Ezek a gyógyszermolekulák kísérleteikben a GnRH-III-hoz képest fokozott antiproliferatív hatást mutattak MCF-7 humán emlőcarcinoma és HT-29 humán colon carcinoma sejtvonalakon, továbbá fokozott stabilitással és csökkent LH-szekréciót kiváltó hatással rendelkeztek. Lajkó és munkatársai natív GnRH-izoformák és GnRH-III derivátumok kemotaktikus és adhéziós hatását vizsgálták potenciális targetáló molekulák kifejlesztése céljából. (74) Kísérleteik során minden molekula kemoattraktánsnak és adhéziót fokozónak bizonyult az egysejtű *Tetrahymena* és a Mono Mac 6 humán leukémiás monocyta sejteken egyaránt. Monocytákon legerősebb hatást a natív GnRH-III esetén mutattak ki, mely hatás részben megőrződött a [GnRH-III(C)]₂ és [GnRH-III(Ac-C)]₂ dimerek esetében is.

1.3.3. GnRH-alapú gyógyszerfejlesztés

A GnRH, mivel specifikus receptorai egyes tumorsejteken nagyobb számban megtalálhatók, illetve mivel önálló daganatellenes hatással is rendelkezik, régóta számos gyógyszer-célbajuttatási fejlesztés tárgya – doxorubicint tartalmazó konjugátumát (An-152) Schally munkacsoportja fejlesztette ki, mely csökkent toxicitása mellett fokozott daganatellenes hatással is bír, többek között humán emlő, ovarium, endometrium és prosztata carcinoma sejteken. (75-79) Az An-152 esetében már fázis II vizsgálatokat is végeztek. (80) A GnRH-III alapú citotoxikus gyógyszermolekulát tartalmazó konjugátumokat már régóta kutadják, mint tumorelles terápiák célpontjait. (74)

A GnRH-III konjugátumok alapját onkológiai gyakorlatban széles körben használt citotoxikus hatóanyagok, doxorubicin, daunorubicin és methotrexate képezi. (81, 82) A doxorubicin és a daunorubicin az anthracyclin családba tartoznak, melyek a tumorsejt DNS molekuláját támadják meg. A célsejt DNS-éhez interkalálódnak, ezáltal a topoisoméráz enzim gátlásán keresztül a DNS kettős hélix relaxációját, a DNS és polimeráz gátlása révén a DNS-replikációját gátolják. Emellett a doxorubicin mitokondriális DNS-hez való interkalálódását és az RNS-polimeráz gátlását is leírták. (83) A methotrexate egy antimetabolit, mely a daganatos sejt folsav-anyagcseréjét

gátolja. A dihidrofolát reduktáz enzimhez kompetitíven kötődik, a foláthoz képest ezerszeres affinitással – ezáltal a tetrahydrofolát képzését gátolja. Mivel a folsav elengedhetetlen a DNS-bázis timidin képzéséhez, a methotrexate végső soron – a folsav-anyagcsere gátlásán keresztül – a DNS-szintézist gátolja. (84) Mindhárom citotoxikus gyógyszermolekula széles mellékhatásspektrummal rendelkezik; a doxorubicin és a daunorubicin esetében a kardiovaszkuláris mellékhatások kiemelt jelentőségűek – főképp cardiomyopathia –, és végső soron szívelégtelenség kialakulásához vezethetnek. (85, 86) Ezek a mellékhatások a kemoterapeutikumok alkalmazhatóságát is behatárolják. A doxorubicin, daunorubicin és methotrexate GnRH-III molekulákhoz való kapcsolása célzott gyógyszerbevitel révén csökkentheti a mellékhatások kialakulását. (6. ábra)



6. ábra – GnRH alapú célzott gyógyszerbevitel

A citotoxikus hatóanyagot egy vivőmolekulához kapcsolják, így a gyógyszermolekula szelektivitása nő, a mellékhatások csökkennek (részletesen ld. szöveg).

A doxorubicin, daunorubicin és methotrexate tartalmú GnRH-III-at tartalmazó gyógyszer-célbajuttatási rendszerek fejlesztése során számos eredményt értek el; többek között hatóanyag-leadást fokozó beépített oligopeptid távtartó szekvenciák, multifunkcionális konjugátumok és dimer molekulák kerültek kifejlesztésre a tumorelles hatás fokozása érdekében. (87-90)

1.3.4. A GnRH-III konjugátumok kifejlesztése

Hasonlóan az An-152 konjugátumhoz, a GnRH-III molekulához is kifejlesztették doxorubicin kapcsolását. (91) 2008-ban Mező és munkatársai munkájuk során többféle, különböző GnRH-III derivátumot hoztak létre, és ezekhez doxorubicint kapcsolva szintetizáltak gyógyszerkonjugátumokat. A legpotensebb konjugátumot a

doxorubicinnak a GnRH-III-hoz észterkötéssel való kapcsolása esetében kapták. Az említetten kívül oximkötést és amidkötést alkalmazó doxorubicin-GnRH-III konjugátumokat is létrehoztak. Ezen kívül GFLG tetrapeptid távtartó „spacer” szekvenciát is kifejlesztettek. A konjugátumba épített távtartó szekvenciát intracellulárisan a katepszin B hasítja, ezáltal a hatóanyag intracelluláris leadása fokozódik – ezzel az oximkötés stabilizáló hatását is mérsékelték. Csak a GFLG távtartó szekvenciával rendelkező konjugátumok mutattak antiproliferatív hatást MCF-7 humán emlőcarcinoma sejteken, bár ez a hatás colon carcinoma sejtvonalon már nem volt megfigyelhető.

Ezeket az eredményeket számos további kutatás követte, melyekben citotoxikus hatóanyagot tartalmazó, célzott gyógyszerbevitelre alkalmas GnRH-III-konjugátum került kifejlesztésre. A doxorubicin mellett további hatóanyagmolekulákat is felhasználtak. 2009-ben megjelent cikkükben Szabó és munkatársai közölték a daunorubicin GnRH-III-hoz oximkötéssel történő kapcsolását (Dau-GnRH-III). (92) A konjugátumba itt is GLFG távtartó tetrapeptid szekvenciát építettek be a hatóanyag intracelluláris felszabadulásának fokozása érdekében – a doxorubicint tartalmazó konjugátumokhoz hasonlóan. Méréseik során a Dau-GnRH-III és Dox-GnRH-III is a szabad gyógyszermolekulánál mérsékeltőbb, de szignifikáns daganatellenes hatást mutatott *in vitro*, sőt, a Dau-GnRH-III konjugátumot C26 colon carcinomát hordozó egereknek *in vivo* beadva az egerek nagyobb daunorubicin mennyiséget toleráltak a letális dózisonál, szignifikánsan csökkent a tumortérfogat és az egerek tovább éltek. Az oximkötéssel kapcsolt daunorubicin és GnRH-III daganatellenes hatását és *in vitro* stabilitását, valamint kétféle (GFLG és YRRL) beépített távtartó szekvencia jelentőségét vizsgálták Orbán és munkatársai. (93) Eredményeik szerint a GnRH-III (Dau=Aoa) és a GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) fokozott stabilitást mutatott humán szérumban, míg az YRRL-t tartalmazó konjugátum hamar lebomlott. A katepszin B vagy a lizoszomális homogenizátum mindhárom konjugátumot, valamint a daunorubicint is lebontotta. Ennek ellenére mindhárom konjugátum – bár a daunorubicinhez képest kisebb mértékben –, de tumorelles hatást mutatott MCF-7 humán emlőcarcinoma és HT-29 humán colon carcinoma sejteken. Későbbiekben az oximkötést tartalmazó GnRH-III konjugátumok *in vivo* tumorelles hatásának és toxicitásának vizsgálatára is történtek vizsgálatok. (94) Ezen mérések során a daunorubicint oximkötéssel és egy GFLG tetrapeptid távtartó

szekvencia beépítésével vagy anélkül kapcsolták a GnRH-III-hoz. Mindkét konjugátum *in vivo* szignifikánsan gátolta a tumornövekedést C26 rágszáló és HT-29 humán colon carcinomát hordozó egerek esetében; a távtartó szekvenciát tartalmazó konjugátum gátló hatása még kissé nagyobb is volt. A konjugátumok – a toxikus dózisonál magasabb daunorubicintartalom dózisonál – nem voltak toxikus hatással az egerekre.

Egy másik lehetséges megközelítésben a daunorubicint a módosított GnRH-III ⁴Lys aminosavához kapcsolt különböző rövidláncú zsírsavakon keresztül kapcsolták hozzá. (95) A vizsgálatok során a konjugátumok stabilitása változó volt, tenyésztő médiumban mindegyik stabil maradt, azonban α -chymotripszin emésztőenzim jelenlétében mindegyik degradálódott, bár a rövidláncú zsírsav típusa ennek mértékét befolyásolta. A patkány lizoszomális homogenizátum jelenlétében mindegyik konjugátum degradálódott, és ekkor szabad daunorubicin jelenlétét nem lehetett kimutatni. Mindegyik molekula fokozott tumorelles hatást mutatott MCF-7 humán emlőcarcinoma és HT-29 humán colon carcinoma sejteken.

A konjugátumok hatékonyságának fokozására valamint a mellékhatások csökkentésére alkalmasak a több hatóanyagmolekulát is tartalmazó multifunkcionális konjugátumok. Az első ilyen eredmény volt 2012-ben a Leurs és munkatársai által – a GnRH-receptorok deszenzitizálódása és a tumorelles hatás ellen kialakuló tolerancia elkerülése céljából – két daunorubicin molekulát tartalmazó, multifunkcionális konjugátumokat kifejlesztése: GnRH-III[^{4,8}Lys(Dau=Aoa)] és GnRH-III[⁸Lys(Dau=Aoa-Lys(Dau=Aoa))]. (87) Ezzel a technikával az egy daunorubicint tartalmazó konjugátumokhoz képest fokozott citosztatikus hatással bíró konjugátumokat hoztak létre. Egy évvel később Schreier munkacsoportja daunorubicint tartalmazó, diszulfid hidakkal összekapcsolt, dimer GnRH-III konjugátumokat hoztak létre, amivel szintén fokozott citosztatikus hatást értek el. (90) Harmadik megoldásként Leurs és munkatársai a targetáló molekulához két különböző tumorelles gyógyszer-molekulát kapcsoltak. (89) A módosított GnRH-III molekulához egy daunorubicint és egy methotrexate-ot is hozzáépítettek, ezzel fokozott tumorelles és metasztázisképzést gátló tulajdonságú konjugátumokat hoztak létre.

Módosított GnRH-III-at és daunorubicint tartalmazó konjugátumokat hoztak létre 2011-ben Manea és munkatársai. (88) Ezekben a konjugátumokban a 4-es pozícióban lévő

szerein aminosavat cserélték ki egy lizinre [GnRH-III(⁴Lys,⁸Lys(Dau=Aoa))] vagy egy acetilált lizinre [GnRH-III(⁴Lys(Ac),⁸Lys(Dau=Aoa))], illetve metilációval módosították [GnRH-III(*N-Me*-⁴Ser,⁸Lys(Dau=Aoa))], és hasonlították össze a módosítás nélküli konjugátummal [GnRH-III(⁴Lys,⁸Lys(Dau=Aoa))]. A módosított konjugátumok fokozott stabilitást mutattak humán szérumban – emellett citosztatikus hatásukat sem veszítették el. Későbbi vizsgálatokban Schreier és munkatársai kimutatták, hogy a 4-es pozícióban acetilált lizint tartalmazó, módosított GnRH-III-hoz kapcsolt daunorubicint tartalmazó konjugátum megváltoztatta a HT-29 humán colon carcinoma sejtek proteinexpresszióját. (96) Eredményeik szerint elsősorban chaperon-ok, anyagcsereutakban résztvevő fehérjék és szignálproteinek kifejeződése változott, főképp down-regulálódott a kontrollhoz és a daunorubicinnel kezelt sejtekhez képest. Egy másik vizsgálatban ugyanez a konjugátum és a Dau-GnRH-III antiproliferatív hatást mutatott kasztráció rezisztens prosztatacarcinoma sejteken, mely hatást a GnRH-receptor I. típusán keresztül fejtették ki. (97)

Különböző doxorubicin és daunorubicin tartalmú konjugátumok stabilitását és citosztatikus hatását hasonlították össze Schlage és munkatársai. (98) Targetáló molekulaként GnRH-III-at és [D-Lys⁶]-GnRH-I-et használtak. Nem találtak különbséget a különböző targetáló molekulákat tartalmazó konjugátumok sejtek általi felvételében vagy a citosztatikus hatásban. Az észter és a hidrazolon kötést tartalmazó konjugátumok mutatták a legerősebb citosztatikus hatást humán MCF-7 emlőcarcinoma és HT-29 humán colon carcinoma sejteken, míg az oximkötést tartalmazó konjugátumok citosztatikus hatása durván egy nagyságrenddel gyengébb volt.

Hegedűs és munkatársai a molekulák oldhatóságának fokozása érdekében beépített oligoetilén-glikol szekvenciát tartalmazó konjugátumokat szintetizáltak. (99) A GFLG távtartó szekvenciával is rendelkező konjugátum esetén az oligoetilén-glikol beépítése az oldékonyságot fokozta, míg az egyéb biokémiai paramétereket nem befolyásolta. A modifikált, 4-es pozícióban rövidláncú zsírsavval kapcsolt lizint, valamint két daunorubicin molekulát tartalmazó GnRH-III konjugátum esetén is fokozta az oligoetilén-glikol lánc az oldékonyságot, sőt, a molekula tumorellenes hatását is növelte MCF-7 humán emlőcarcinoma sejteken. Ugyanez a GnRH-III-konjugátum *in vivo* a daunorubicin maximum tolerált dóziséhoz képest fokozott mértékben gátolta a HT-29 humán colon carcinoma növekedését egerekben, és enyhén csökkentette a tumor

proliferációs indexét és erezettségét is. Bár toxikus mellékhatásokat nem tapasztaltak, a konjugátum a tumor metasztázisképzését nem tudta meggátolni.

Mindezek alapján számos olyan doxorubicin és daunorubicin GnRH-III-konjugátum került kifejlesztésre, melyek *in vitro* és *in vivo* tumorellenes tulajdonságuk, kellő stabilitásuk illetve intracelluláris célbajutási potenciáljuk miatt ígéretes molekulák további gyógyszerfejlesztésre a daganatos betegségek terápiájában. Az An-152 az eddigi adatok alapján kardiotoxicitással nem rendelkezik. (100, 101) A GnRH-III-konjugátumok esetében azonban, bár állatkísérletes eredmények alapján ezeknek a toxikus mellékhatásai csökkentek lehetnek, nem történt eddig olyan vizsgálat, amely ezeket a gyógyszermolekulákat kardiotoxicitás szempontjából vizsgálná – holott ezen tulajdonság az anthracyclin alapú terápiának az egyik limitáló tényezője.

1.4. Szív-szövetépítés

1.4.1. A szívelégtelenség

A szívelégtelenség jelentős személyes és társadalmi költségekkel járó, magas mortalitású megbetegedés. Jelenleg a világ lakosságának 2 %-át érinti – prevalenciája az idősebb populációban magasabb. Kialakulásának rizikófaktorai közé tartoznak az iszkémiás szívbetegség ismert rizikófaktorai (hypertonia, hypercholesterinaemia, diabetes, obezitás), pozitív családi anamnézis és kardiotoxikus anyagoknak való kitétel (pl. alkohol, amfetamin, kemoterapeutikumok, sugárzás). A cardiomyocyták pusztulásával fokozódik a szívizom feszülése, a myocardium fibrotikusan átalakul, megváltozik a bal kamra alakja és méretei. A neurohormonális változások hatására fokozódik a vese nátriumvisszatartása, folyadékretenció és oedema jelenik meg. Végső soron a szív pumpafunkciója csökken, mely a klasszikus előre- és visszaható tüneteket okozza. Diagnosztikájában gold standard az echocardiographia, de emellett a biomarker NT-proBNP kiemelt jelentőségű. Kezelésében gyógyszeres és eszközös terápiák is elterjedtek. A gyógyszeres terápiák gerincét az ACE-inhibitorok, angiotenzin receptor blokkolók és mineralocorticoid receptor antagonisták mellett a béta-blokkolók adják. Utóbbi időben az angiotenzin receptor blokkoló neprilysin inhibitorok túlélést növelő hatását is kimutatták, és az ivabradine is indikált bizonyos esetekben. Az eszközös terápiák között az implantálható cardioverter defibrillátorok és a kardiális

reszinkronizációs terápia, valamint az implantálható ventrikuláris assziszt device-ok túlélést növelő hatását bizonyították. (102)

Az előbb felsorolt terápiák azonban mind csupán a tüneteket csökkentik vagy a túlélést növelik – a krónikus szívelégtelenséget egyikkel sem lehet gyógyítani. Jelenleg a végstádiumú szívelégtelenség egyetlen ismert kuratív terápiája a szívtranszplantáció. A donorszívek azonban csak kis számban állnak rendelkezésre, és messze elmaradnak a szívtranszplantációra várók számától, így a transzplantációs listák halálozása igen magas. (103, 104) Emellett a szívtranszplantációnak számos hátrányát is figyelembe kell venni, mint például akut vagy krónikus kilökődési reakciók, az élethosszig tartó immunszuppresszív terápia mellékhatásai, infekciók, malignus tumorok kialakulása. (105) Számos kutatás foglalkozik őssejt-alapú regenerációs terápiák kifejlesztésével, azonban ez a terület még több megoldatlan problémával bír. (106)

A donorszívek hiánya miatt egyre elterjedtebb a mechanikus keringéstámogató eszközök alkalmazása a transzplantációig áthidaló („bridge to transplant”) vagy akár végleges megoldásként („destination therapy”) is. Ezeknek az eszközöknek azonban sok súlyos mellékhatása van, többek között vérzés, thromboemboliás események, stroke, az eszköz meghibásodása vagy infekciója, szepszis és pumpa thrombosis – melyek több, min 50 %-ban már az első év során előfordulnak. (107)

1.4.2. Szövetépítés

A szövetépítés (tissue engineering) koncepciója az 1980-as évek közepéig nyúlik vissza, amikor Vacanti és Langer híres „emberi fül egy egéren” kísérletükben egy egér hátára ültetett biodegradábilis vázat *in vivo* chondrocytákkal implantáltattak. (108) Ezzel elkezdődött a szövetépítés kutatása, melynek során biokompatibilis vázakra sejteket ültetve hoznak létre humán implantációra alkalmas szöveteket vagy akár egész szerveket.

Az allogén szívtranszplantációt kiegészítő lehetséges új alternatívája lehet a szövetépítéssel előállított szívek beültetése. A szövetépítés során először egy biokompatibilis vázat hoznak létre, majd következő lépésben a vázra a recipiens szervezetnek megfelelő sejt típusokat ültetik rá, létrehozva a kész, szövetépített szervet vagy szövetdarabot. Az eljárás számos előnnyel bír, ezek közül az egyik legfontosabb,

hogy mivel a donor szervezet sejtjei eltávolításra kerülnek, így nem kerülnek beültetésre, csökken az immunológiai kilökődési reakciók kialakulásának esélye. Mindez azt is jelenti, hogy a scaffold kialakításoz szükséges donor szervek nem csupán humán donoroktól, hanem egyéb, hasonló morfológiával rendelkező fajokból is nyerhetők (pl. sertés). Ezáltal egy eddig kiaknázatlan, hatalmas donor-pool nyílhat meg transzplantációs célokra. (7. ábra)

A szövetépítést laboratóriumi körülmények között már sikerrel alkalmazták szívelégtelenség kezelésére. Szövetépítéssel létrehozott dobogó szívizomfoltokkal sikeresen kezeltek körülírt szívizomnekrózist. (109) A szövetépítéssel létrehozott teljes szív megalkotását célzó kutatások a szívelégtelenség terápiájának egy új alternatívájának létrehozásán dolgoznak.

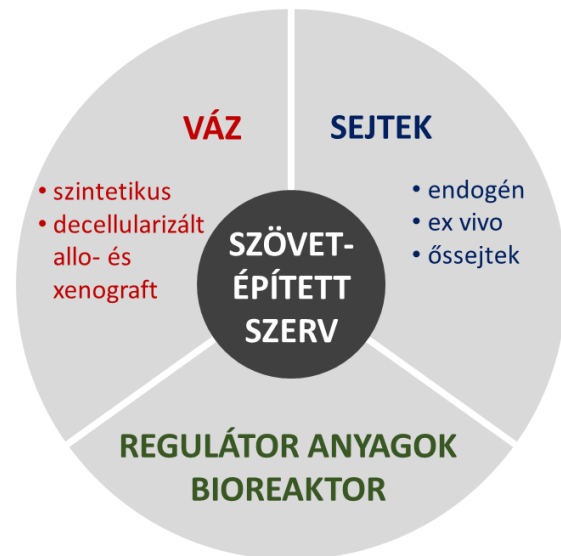
A szövetépítés során egyik alapvető kérdés a váz megalkotása. Szövetfoltok vagy vékony, egy-két sejtrétegű kompozíciók esetében ez kevésbé lényeges kérdés, mint komplex, háromdimenziós szövetek vagy teljes szervek építésénél. Egyik megoldás a szintetikus vázak használata. Ezeket létrehozhatják szintetikus anyagokból vagy biológiai eredetű anyagokból is (pl. fibrin, kollagén). Minden váznál lényeges, hogy egy nem toxikus, felszívódó implantátum legyen, melyet a kardiális ECM elemei könnyen helyettesíthetnek. (110) Egy ilyen vázat fejlesztettek ki Silvestri és munkatársai, akik poli- ϵ -caprolactone (PCL) és polietilén-glikol (PEG) szövethelyettesítő anyagokból képzett vázakkal hoztak létre foltokat az elhalt szívizom pótlására. (111) A másik lehetséges módszer megfelelő váz előállítására az eredeti szövetről vagy szervről a sejtek eltávolításával létrehozott decellularizált vázak alkalmazása. Kezdetben immerziós módszerrel decellularizáltak szívbillentyűket és kisebb szövetdarabokat, azaz a szövetdarabot a decellularizációs folyadékba helyezték, és áztatás mellett rázatást alkalmaztak. Azonban a teljes szervek decellularizációja a perfúziós módszer kifejlesztésével vált lehetővé, ezen eljárás során a szervet a saját érrendszerén keresztül áramoltatott decellularizációs folyadékkal kezelik. (112) A decellularizált szervvázak számos előnnyel rendelkeznek: megőrzik a szerv makroszkópos anatómiáját, megtalálhatóak benne az ECM felépítéséhez szükséges molekulák, serkentik az implantátum endogén sejtekkel való beépülését és makroszkóposan intakt érrendszerrel rendelkeznek. Lehetséges hátrányuk azonban, hogy a biomechanikai tulajdonságaik (pl.

szilárdság és merevség) megváltozhatnak, a decellularizációs folyamat során citotoxikus anyagok maradhatnak hátra, és thrombogén felületet is képezhetnek. (110)

A váz létrehozása után merül fel a recellularizáló sejtek kérdése. (113) Egyik lehetséges megközelítés szerint a vázakat endogén sejtekkel recellularizálják – ehhez a vázakat előbb regulátor anyagokkal (növekedési faktorok, stb.) kezelik. Másik megközelítésben a vázakat *ex vivo* futtatják be sejtekkel. Itt jelentős nehézséget okoz, hogy a cardiomyocyták regenerációs potenciálja és hypoxiatűrése csekély, valamint nagy számban szükségesek a teljes recellularizációhoz. Harmadik lehetséges megközelítési mód a különböző őssejtek vagy progenitor sejtek használata. Ennek előnye, hogy ezek hypoxiatűrése jobb, és így lehetőség nyílik autológ vagy allogén sejtek használatára is. (110) Ezt

megoldást kutatták Arshi és munkatársai, akik a mátrix rigiditásának kardiális differenciációjára gyakorolt hatását vizsgálták humán és patkány embrionális őssejtek használatával, működő szívizomsejtek proliferációját célozva (114) Malischewski és munkatársai humán umbilicalis (vénás és artériás) sejteket alkalmaztak szövetépített mitrális billentyűk recellularizációjára. (115)

A váz és a sejtes elemek mellett mindenképp meg kell említeni bioreaktorok szükségességét. A váz sejtekkel való recellularizációja igen komplex folyamat, melynek rendkívül szabályozott körülmények között (pl. hőmérséklet, CO₂-koncentráció, pH) kell végigmennie, emellett – különösen a kardiális szövetépítés esetében – az épülő szövet perfúzióját, tehát a kísérleti rendszerben áramlást is biztosítani kell. Nem utolsósorban a sejteket a megfelelő anatómiai pozícióba kell juttatni. Mindezek miatt a szövetépített egész szív előállítás – esetleges szállítása – csak megfelelő bioreaktorokban képzelhető el. (105)



7. ábra – A szövetépítés folyamatának alapelemei

A létrehozott vázat humán sejtekkel recellularizálják. Ez bioreaktorban történik, regulátor anyagok segítségével (részletesen ld. szöveg).

Az szívek létrehozása után elengedhetetlenek az olyan vizsgálatok, amelyekkel a beültetésre való alkalmasságot bizonyítják. Egy beültetett szívnek megfelelően kell működnie elektromosan, fiziológiailag és mechanikusan is, ehhez pedig kielégítő vaszkulátúra szükséges. Ezeket különböző képalkotó vizsgálatokkal (pl. echocardiographia, endoszkópia vagy angiographia), EKG-val, szövettani vizsgálatokkal lehet igazolni. Emellett a szív megfelelő sterilitását is biztosítani kell. (116)

A recellularizációra használt sejteken túl számos vizsgálat célozza a váz alapjául szolgáló ECM-et is. Szívsebészeti műtétek során I., V., és VIII. típusú kollagént tartalmazó pericardialis mátrixot alkalmaztak kongenitális pitvari septumdefektus megoldására. A kollagénen kívül a minták elasztint és fibrillint is tartalmaztak. Tömegspektrometriai mérések során III. és IV. típusú kollagént, mikrofibrillum-asszociált protein 4-et (MFAP4) és I. típusú prokollagént azonosítottak az ECM alkotóelemei között. (117) Badylak növekedési hormonok, fibronectin, laminin és glükózaminoglikánok jelenlétét írta le. (118)

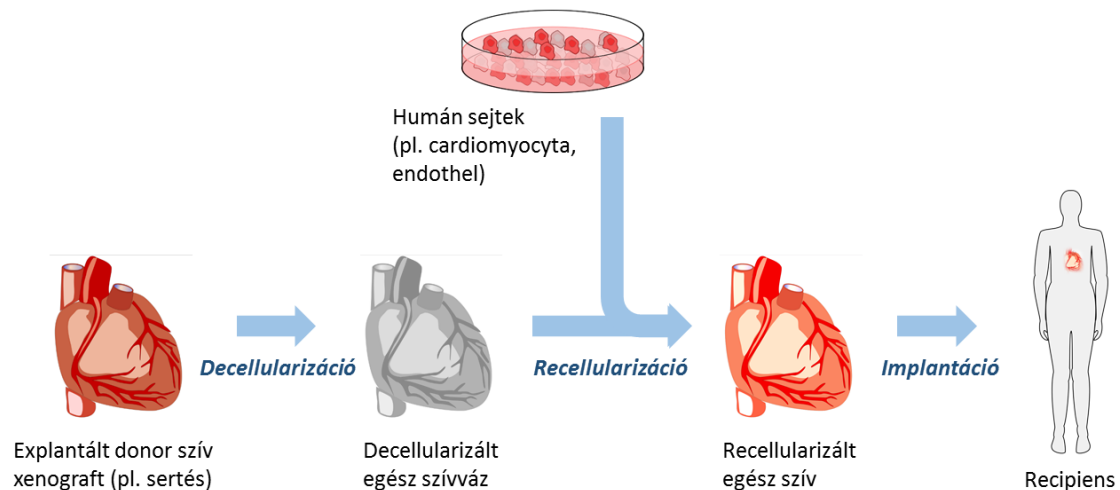
A fibronectin egy nagy molekulatömegű, dimer molekula, mely sok a sejtfelszíni membrán integrinjeivel kapcsolódni képes Arg-Gly-Asp (RGD) szekvenciát tartalmaz. Szolubilis és szöveti izoformái is ismertek. Sejtadhéziót fokozó tulajdonsága régóta ismert (119, 120), és fő alkotóelemét képezi a submucosalis struktúráknak, valamint basalis membránoknak. Jó adhéziós tulajdonságai miatt gyakran alkalmazzák a biokompatibilitás elősegítésére. (121) A RGD aminosavszekvencia az $\alpha_5\beta_1$ integrinen keresztül a sejtadhézió kialakításában játszik szerepet, mint fő tényező a sejt-sejt és sejt-mátrix kapcsolatok kialakításában. (120)

A szövetépítéssel létrehozott graftok egyik fontos alkalmazási területe a gyermekszívsebészet. A kongenitális szívbetegségek negyede kritikus mértékű, azaz a szívfunkció hiányával vagy jelentős csökkenésével jár. A szívsebészeti megoldások egy része szövetpótlást is szükségessé tesz, mint például a pitvari-kamrai septumdefectusok műtétje, vagy a hosszú szakaszú coarctatio aortae megoldása interpozitummal. A szintetikus graftok számos hátránnyal járnak, többek között thromboemboliás szövődmények, stenosis, infectio, illetve nem képesek a csecsemő vagy a gyermek növekedését követni. Ezekre a problémákra adnak választ a Drews és munkatársai által

kifejlesztett szövetépített vaszkuláris graftok, melyeket már humán alanyok kongenitális szívbetegségeinek szívsebészeti megoldása során is sikerrel alkalmaztak. (122)

1.4.3. A szövetépítéssel létrehozott teljes szív kifejlesztése humán implantációra

Az emberi beültetésre alkalmas, szövetépített teljes szív megalkotása hatalmas feladat. (8. ábra) Az ehhez vezető kísérletek sorában elsőként a kisebb modellen kapott eredményeket érdemes tárgyalni. Erre jó példa a patkány egész szíveket felhasználó szövetépítés, melyen Ott és munkatársai értek el jelentős eredményeket. (123) Ezeket a



8. ábra – Egész szív szövetépítés kutatások elvi alapja és folyamatábrája

Az explantált donor (általában sertés) szívet decellularizálják, majd a kész vázra recellularizáció során humán sejteket ültetnek, így humán imlantációra alkalmas szívet nyerve (részletesen ld. szöveg). [Az ábra a <https://openclipart.org> ábrák felhasználásával készült.]

cadaverekből nyert patkány szíveket coronaria-perfúziós módszerrel, SDS, TritoxX100 és polietilénlikol oldatok használatával decellularizálták. A szívvezékben hisztológiai vizsgálattal sejtmagokat vagy kontraktilis elemeket nem tudtak kimutatni, és DNS-tartalmuk is szignifikánsan csökkent. Nem változott a glukózaminoglikán-, I. és III. típusú kollagén-, valamint laminin- és fibronectin tartalmuk sem. A decellularizált szívek falába neonatalis cardiomyocytákat injektáltak, majd bioreaktorba helyezték és perfúzió,

valamint pace-elés (mikroelektrodák létrehozott 1-2 Hz frekvenciájú, 100 ms hosszú, 100 V nagyságú elektromos ingerek) mellett recellularizálták. Az így létrehozott recellularizált szívek elektromos ingerlés hatására kontraktilis tevékenységet mutattak, mely a felnőtt patkányszívhez képest 2%-nak felelt meg. Ezen kívül spontán elektromos aktivitást is megfigyeltek. Hisztológiai vizsgálatok során a recellularizáció az injekciós pontokon volt a legerősebb, és a minta 95%-a megtartotta viabilitását. A kardiális ECM-ek patkány aorta endothel sejtekkel való reendothelizációját is sikeresen elvégezték. A szövetépített egész patkányszív létrehozása jelentős lépés volt, azonban az emberi szív szövetépítése mérete miatt nagyobb kihívást jelentett, és további kísérletekre volt szükség.

Elsőként a váz megalkotása volt kérdés. Mivel a sertés szív méretében megegyezik a humánéval, valamint anatómiailag is nagy a hasonlóság, kifejezetten alkalmasak voltak a decellularizációs kísérletekre. 2010-ben Wainwright és munkatársai intakt sertésszívből kardiális extracelluláris mátrixot állítottak elő. (124) A sertésekből nyert szíveket először lefagyasztották, majd felolvasztás után több különféle decellularizációs oldattal (többek között Triton X, tripszin tartalmú oldat) perfundálták. A kapott kardiális ECM-et immunhisztokémiai módszerekkel vizsgálták, DNS-, glükózaminoglikán- és elasztintartalmat mértek, valamint a biomechanikai tulajdonságait vizsgálták. A kardiális ECM-ből kivágott lemezekre csirke embrionális cardiomyocytákat ültettek. A decellularizált kardiális ECM-ek a perfúzió során kifehéredtek, térfogatuk megnőtt. A kardiális ECM-ekben sejtmagot nem tudtak kimutatni, DNS-tartalmuk szignifikánsan csökkent volt, elektronmikroszkópos vizsgálattal a myocardium a kontrollhoz képest fellazultabb volt, glükózaminoglikán- és elasztintartalmuk nem változott. A biomechanikai tulajdonságok terén csak kevés romlást mutattak ki.

Egy másik sikeres megoldás volt a decellularizált váz előállítására Weymann és munkatársainak módszere. Teljes, humán méretű, sertés szíveket perfúziós módszerrel sikeresen decellularizáltak 2011-ben. (125) A 12 explantált sertésszívet részben egy korábban már publikált, többféle perfúziós oldatot használó protokoll szerint (124), részben egy általuk fejlesztett módszerrel, SDS-t és PBS-t tartalmazó perfúziós oldattal decellularizálták. A szívvezakat makroszkóposan és mikroszkóposan is vizsgálták, valamint DNS-quantifikációt és biomechanikai méréseket végeztek. A decellularizáció után a szívek színüket elvesztették, kifehéredtek és áttetszővé váltak – azonban eredeti

morfológiájuk megmaradt. Hisztológiai vizsgálatok során sejtes elemeket gyakorlatilag nem tudtak kimutatni, DNS-tartalmuk pedig szignifikánsan lecsökkent. A decellularizált szívek a kontrollokéhoz hasonló biomechanikai tulajdonságokat mutattak. Ezek alapján tehát a decellularizált váz elkészült, további lépésben a sejtekkel való beültetésre volt szükség.

Az emberi implantációra alkalmas szívek recellularizációja, többek között méretüknél fogva, igen komplex feladat. Első körben kisebb szervek, szövetek recellularizációját fejlesztették ki. Humán szívbillentyűk humán sejtekkel való sikeres recellularizációjáról már közöltek eredményeket. (126) Ebben a vizsgálatban a pulmonalis és aorta billentyűket szívatültetés során explantált szívekből nyerték, majd rázatásos módszerrel decellularizálták, ennek a sikerességét a billentyűvázak DNS-tartalmának mérésével igazolták. A billentyűvázakat bioreaktorban, perfúziós módszerrel recellularizálták humán vena umbilicalis endothel sejtekkel (HUVEC). A recellularizált billentyűk biokémiai és biomechanikai tulajdonságait is mérték. A decellularizáció hatására a billentyűk alakjukat megtartották, de áttetszővé váltak, a sejtes elemeket elvesztették, DNS-tartalmuk jelentősen lecsökkent, endothelborításuk megszűnt. Kollagén- és elasztintartalmuk, valamint biomechanikai szilárdságuk változatlan maradt. A recellularizáció után a billentyűkön az endothelsejtek sikeresen megtapadtak.

Az eddigi eredmények után következő lépés volt a létrehozott sertésszívűvázak recellularizációja humán sejtekkel, így a szövetépített egész szív megalkotása. Weymann és munkatársai 2014-es cikkükben elsőként humán méretű, sertés eredetű, szövetépítéssel létrehozott teljes szívek létrehozását közölték. (127) Kísérleteik során 32 sertésből explantáltak egész szíveket, majd egy részüket perfúziós módszerrel decellularizálták azokat. A szívek biomechanikai stabilitását, valamint DNS-, glukózaminoglikán- és elasztintartalmát mérték. A teljes szívek recellularizációját bioreaktorban, kontrollált körülmények között, működő pacemaker elektróda beültetésével, perfúziós és injekciós módszerrel végezték. Neonatalis patkány cardiomyocytákat és humán vena umbilicalis endothel sejteket (HUVEC) használtak recellularizációra. A kész szívek viabilitását és elektromos aktivitását vizsgálták. Eredményeik szerint a decellularizáció a perfúziós módszerrel sikeres volt, a szívűvázakban nem tudtak DNS-t vagy kontraktilis elemeket kimutatni, azonban az ECM elemei változatlanul megmaradtak. A vázak megtartották biomechanikai szilárdságukat és stabilitásukat is. A recellularizált szívekben

folytonossági hiányokkal kimutathatóak voltak a megtapadt endothel sejtek a coronariákban, illetve cardiomyocyták is megtalálhatóak voltak, az injektlási pontok közelében több, mint 50 %-ban. A viabilitási vizsgálatok életképes cardiomyocytákat mutattak ki. Tíz nap perfúzió után a recellularizált szívek elektromos aktivitást mutattak. Ez jelentős előrelépés volt, hiszen így megvalósult a szövetépítéssel létrehozott, humán méretű egész szív megalkotása. Bár ez a konstrukció funkciójában még messze elmarad a felnőtt szívetől és humán implantációra egyelőre még nem alkalmas, nagy előrelépést jelent egy működő, beültetésre alkalmas szív megalkotásához.

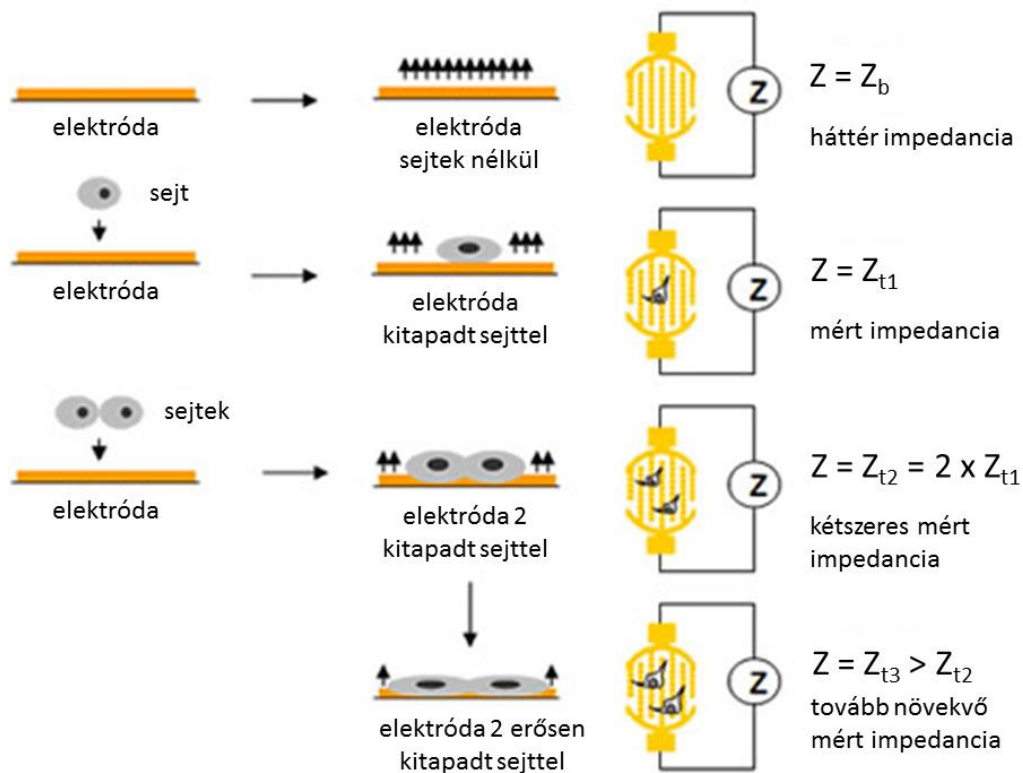
Bár a decellularizált sertésszívvázak számos előnnyel járnak humán implantációra, egyéb próbálkozások is történtek. Sánchez és munkatársai 2015-ben megjelent cikkükben acelluláris humán szív mátrixok létrehozását közölték. (128, 129) Munkájuk során 52, transzplantációra alkalmatlannak ítélt humán szívet használtak fel, melyet az Ott által leírt perfúziós módszerrel (123) decellularizáltak. A decellularizált szíveket makroszkópos vizsgálat mellett endoszkóposan, echocardiographiásan és angiographiásan is vizsgálták, emellett hemodinamikai méréseket és hisztológiai vizsgálatokat és passzív biomechanikai méréseket is végeztek. A szívek citokompatibilitását különböző humán sejttípusokkal való recellularizációs kísérletek segítségével vizsgálták génexpressziós vizsgálatok és elektromos mérések használatával. A makroszkópos és a képalkotó vizsgálatok a szívek anatómiai intaktságát mutatták. A hisztológiai vizsgálatok a vázak teljes acelluláris voltát igazolták, a DNS-tartalom is jelentősen csökkent, míg az extracelluláris mátrix komponensei (kollagén, fibronectin, laminin) változatlanul megmaradtak. Az angiographiás vizsgálatok megtartott vaszkulaturát mutattak. A vizsgált kardiovaszkuláris sejttípusok egy része a mátrixon megmaradt, vagy abba penetrálni is tudott, annak attraktív voltát igazolva, továbbá a recellularizált mátrixon elektromos aktivitást is ki tudtak mutatni.

A decellularizált egész humán szív létrehozása újabb nagy előrelépés a szövetépítés terén. Számos előnye lehetséges ilyen szervek beültetésének. Egy allogén szerv beültetésére nyújt lehetőséget, mely humán volta miatt méretében és felépítésében tökéletesen megfelelő, emellett tovább csökken a immunológiai kilökődéses reakciók esélye. Ugyanaz a hátránya azonban, mint az allogén szívtranszplantációnak – a decellularizációhoz donorok szükségesek, melyek, bár a transzplantációhoz képest talán nagyobb mennyiségben állnak rendelkezésre, de valószínűleg még így is elmaradnak az

egyéb módszerrel előállított decellularizált szívek, mint például a sertésszívek számához képest.

1.5. Impedimetria

Az impedimetria 1984-ben Giaver és Keese által kifejlesztett, sejtadhézió mérésére alkalmas laboratóriumi technika. (130-132) A megfigyelés alapja, hogy elektromos közegben az élő sejtek felszíni membránjuk intakt voltának köszönhetően szigetelő objektumként viselkednek.

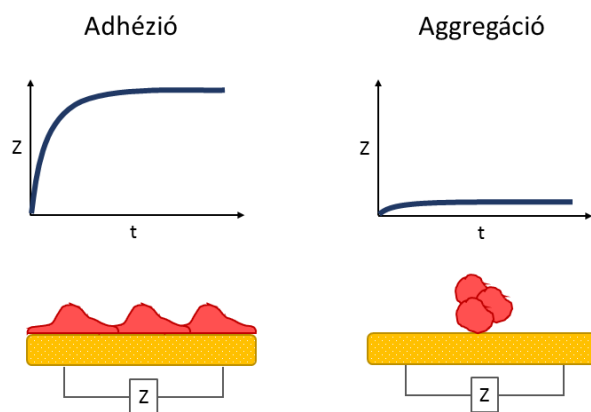


9. ábra – Impedimetria mérési elv

Az elektródákhoz (sárga) letapadó sejtek/thrombocyták (szürke) szigetelő objektumként a lefedettség mértékével arányosan megváltoztatják az elektródán mért elektromos impedanciát (Z), mely az idő függvényében folyamatosan regisztrálható (részletesen ld. szöveg). [Az ábra a <https://www.pharmatching.com/company/2301/49008/picture> ábra (ACEA Biosciences) felhasználásával készült.]

Az impedimetria során az adhézión felületet egy arany elektród vagy elektródhálózat képezi, melyen a műszer az alkalmazott frekvenciájú váltóáramnak megfelelő elektromos impedanciát mér. Az elektródákhoz letapadó sejtek, mint szigetelőanyagok, fokozzák az elektródákon mért elektromos impedanciát. A regisztrált elektromos impedancia mértéke az elektródák lefedettségével – azaz a letapadt sejtek számával és a letapadás („kiterülés”) mértékével – arányos. (9. ábra) Így az impedimetria segítségével a sejtadhézió kvalitatíve és kvantitatíve is jól mérhető. Mivel a regisztrált impedancia értéke a sejtekkel lefedett elektródafelülettel egyenesen arányos, a nem letapadó, csupán az elektródákra „hulló” sejtek esetében, azoknak az elektródákkal érintkező kisebb felülete miatt, alacsonyabb jelet észlel, így azt a valós adhéziótól jól el tudja különíteni a műszer.

Hasonló a helyzet a thrombocyták vizsgálatakor az elektródákra eső összetapadt thrombocytákkal, illetve thrombocytá-aggregátumokkal. Mivel az aggregátum felülete kisebb, mint az azt képező thrombocyták összfelülete, a műszer alacsonyabb impedanciaértéket mér, és el tudja különíteni az adhéziót az aggregációtól. (10. ábra) Az elektromos impedancia regisztrálására nagy frekvenciával, percenként több alkalommal van lehetőség – ennek következtében az impedimetria valós idejű, a sejtadhézió dinamikáját gyakorlatilag folyamatosan követő mérési módszernek tekinthető.



10. ábra – Thrombocytá-adhézió és -aggregáció impedimetriával mérve

Az elektródákhoz (sárga) letapadó thrombocyták (vörös) összfelülete nagyobb, mint az aggregált thrombocyták felülete, ezért magasabb impedanciát (Z) mér a műszer

A módszer kifejlesztése óta eltelt évtizedek során a kutatás területén az impedimetriával történő sejtadhézió-mérés számos alkalmazási területét írták le. A sejtadhézió vizsgálatán túl is sikerrel használják pl. a sejtproliferáció (133), sejtviabilitás (134), sejtthártya-permeabilitás (135) és citotoxicitás (136, 137) mérésére. Ezekén túl számos egyéb, impedanciamérést használó, hibrid-módszert is kifejlesztettek, melyek az impedanciamérést alkalmazzák, ilyenek a plazmon rezonancia analízis (138), az

hanghullám bioszenzor és elektrokémiai impedancia-spektroszkópia (139) vagy a
fényszóródásmérést és az impedancia-spektroszkópiát kombináló mikrochip. (140)

2. Célkitűzések

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3/A. Hogyan befolyásolja a homogenizált decellularizált szívvezet humán endothel sejtek és cardiomyocyták adhéziosját?

3/B. Milyen hatással van az ismerten erős adhézios tulajdonsággal bíró fibronectin a homogenizált decellularizált szívvezet viszonylatában a humán kardiovaszkuláris rendszer sejtjeinek adhéziosjára?

3. Módszerek

3.1. Citotoxikus molekulát tartalmazó GnRH-III hormon alapú peptidkonjugátumok

Kísérleteinkben citotoxikus hatóanyagot (doxorubicint, daunorubicint és methotrexateot) tartalmazó GnRH-III peptid konjugátumok kardiotoxikus hatását vizsgáltuk. (1. táblázat) A 16 peptid előállítását az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport és a Konstanzi Egyetem, Kémiai Tanszék, Analitikai Kémiai és Biopolimer Szerkezetanalitikai Laboratórium végezte.

1. táblázat – A vizsgált GnRH-konjugátumok csoportosítása

Hatóanyag	Vivőmolekula	Monomer	Dimer
Doxorubicin	<i>GnRH-I</i>	An-152	-
	<i>GnRH-III</i>	GnRH-III(Dox-észter)	-
	<i>GnRH-III + spacer</i>	GnRH-III(Dox-oxim-GFLG)	-
		GnRH-III(Dox-amid-GFLG)	-
Daunorubicin	<i>GnRH-III</i>	GnRH-III(Dau)	[GnRH-III(Dau)] ₂
	<i>GnRH-III + spacer</i>	GnRH-III(Dau-GFLG)	-
		GnRH-III(Dau-YRRL)	[GnRH-III(Dau-YRRL)] ₂
	<i>Módosított GnRH-III</i>	(N-MeSer) ⁴ GnRH-III(Dau)	[(N-MeSer) ⁴ GnRH-III(Dau)] ₂
(Lys(Ac)) ⁴ GnRH-III(Dau)		-	
Daunorubicin + Daunorubicin	<i>GnRH-III</i>	(Lys) ⁴ GnRH-III(Dau ⁴ -Dau ⁸)	-
		GnRH-III(Dau ⁸ -Dau ⁸)	-
Daunorubicin + Methotrexate	<i>GnRH-III</i>	(Lys) ⁴ GnRH-III(Mtx ⁴ -Dau ⁸)	-
		GnRH-III(Mtx ⁸ -Dau ⁸)	-

A GnRH peptidek előállítása vegyes Boc/Bzl és Fmoc/tBu, valamint Fmoc/tBu stratégiával, szilárdfázisú szintézissel történt MBHA, valamint Rink-Amid MBHA gyantákon. A hatóanyagok GnRH származékokhoz való konjugálását és a peptidek dimerizációját oldatban végezték a korábban leírtak szerint. (69, 74, 87, 88, 92, 93) A peptidkonjugátumok tisztítása HPLC segítségével történt. A kapott molekulák analitikai karakterizálását Knauer (Knauer H., Bad Homburg, Németország), vagy UltiMate 3000 system (Dionex, Idstein, Németország) RP-HPLC és ESI-MS Bruker Esquire 3000 Plus ioncsapdás Tömegspektrométer (Bremen, Németország) segítségével végezték.

3.2. Modellsejtek

3.2.1. HT-1080 humán fibrosarcoma sejt vonal

A decellularizált sertésszív adhéziós tulajdonságainak karakterizálásaként első lépésben egy ismert, jó adhéziós tulajdonságokkal rendelkező sejt vonalat, a HT-1080 humán kötőszöveti eredetű fibrosarcoma sejt vonalat (ATCC, Manassas, VA, USA) vizsgáltuk. Standard sejttenyésztő inkubátorban (37 °C, 5 % CO₂) tartottuk fent a sejt kultúrát. Tenyésztő médiumként 10 % FCS-t (Fetal Calf Serum) tartalmazó Minimum Essential Medium-ot (ATCC) használtunk.

3.2.2. HMEC-1 humán endothelialis sejt vonal

A szövetépítés kísérleteink folytatásaként a decellularizált sertésszív adhéziós tulajdonságait a kardiovaszkuláris rendszer egyik legfontosabb sejt típusán, endothelialis sejteken vizsgáltuk. Ehhez a HMEC-1 humán microvascularis endothel sejt vonalat (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) használtuk. A sejteket standard sejttenyésztő inkubátorban (37 °C, 5 % CO₂) tartottuk fent. A tenyésztéshez 10 % FCS-t (Lonza Group Ltd. Basel, Svájc), 4 mmol/ml L-glutamint (Gibco®/Invitrogen Corporation, New York, USA), 1 % penicillin/streptomocint (Gibco®/Invitrogen Corporation), 10 ng/mL humán rekombináns EGF-et (Sigma Ltd., St. Luis, USA) és 1 µg/mL hidrokortizont (Sigma Ltd.) tartalmazó MCDB-131 (Sigma Ltd.) médiumot használtunk.

3.2.3. HCM humán primer cardiomyocyta sejtek

Szövetépítési és kardiotoxicitást elemző kísérleteink során humán primer cardiomyocyta modellsejtként a HCM (Human Cardiac Myocyte) sejteket (PromoCell, Biomedica, Bécs, Ausztria) használtuk. A sejteket standard sejttenyésztő inkubátorban (37 °C, 5 % CO₂) tartottuk fent. Tenyésztő médiumként Myocyte Growth Medium-ot (PromoCell, Biomedica) használtunk.

3.2.4. HUVEC humán endotheliális sejtvonal

Citotoxikus drogot tartalmazó peptidkonjugátumaink toxikus hatását cardiomyocyták mellett endothelialis sejteken is vizsgáltuk, ezen kísérletekhez a HUVEC humán umbilicalis véna eredetű endothelialis sejteket használtuk. A sejtvonal fenntartásához standard sejtenyésztő inkubátort (37 °C, 5 % CO₂) használtunk. Tenyésztő médiumként 2% hidrokortizont, 1% penicillin/streptomycint és 0,1 ng/mL EGF-et tartalmazó Endothel Growth Medium-ot (PromoCell, Biomedica) alkalmaztunk.

3.3. Thrombocytá-minták

A thrombocytá-adhézió impedimetriás méréseihez humán eredetű thrombocytá-mintát használtunk. A vérminták a Semmelweis Egyetem, Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika által folytatott *Budakalász Epidemiológiai Vizsgálat* keretein belül nyertük egészséges, gyógyszeres kezelés alatt nem álló, 20-40 év közötti önkéntesektől származtak. Mind a thrombocytá-adhézió, mind a thrombocytá-spreading mérések során 10-10 önkéntes thrombocta-mintáit vizsgáltuk. A vérmintákat rövid vénás sztázis után, komplikációmentes vénszúrásból nyertük 3,5 mL-es 9NC 3,2 % nátrium citrátos koagulációs Vacuette[®] vérvételi csövekbe 18 G-s tűvel. A vérmintákat 500 g-vel 7 percig centrifugáltuk, majd a felülúszóként nyert Platelet Rich Plasma (PRP)-t használtuk fel a mérésekhez. A PRP hígításához 0,9 %-os nátrium-klorid infúziós oldatot, a Salsol A oldatot (TEVA, Debrecen, Magyarország) használtuk.

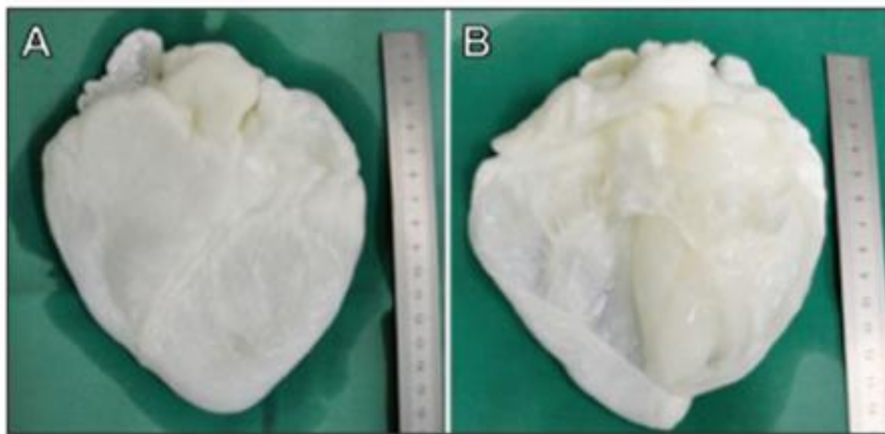
3.4. Klinikai és laboratóriumi vizsgálatok

A vérvételi populáción (a Semmelweis Egyetem, Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika által folytatott *Budakalász Epidemiológiai Vizsgálat* keretein belül vizsgált egészséges, gyógyszeres kezelés alatt nem álló, 20-40 év közötti önkéntesek) standard laboratóriumi vizsgálatokat (vérkép, biokémiai vizsgálatok, enzimek, lipidek) és specializált vizsgálatokat – hemoglobin A1c (HbA1c), N-terminális agyi nátriuretikus peptid (PRO-BNP) – végeztünk. A vizsgálatban szereplő egyének klinikai állapotfelmérését – életkor, testtömeg, testmagasság, derék- és csípőkörfogot, vérnyomás,

jobb- és baloldali boka-kar index – is elvégeztük. Anamnesztikusan a dohányzást, alkoholfogyasztást, ismert allergiás megbetegedést, sporttevékenységet és fizikai aktivitást regisztráltuk.

3.5. Decellularizált sertésszív váz előállítása

A decellularizált sertésszívek előállítása perfúziós technikával történt a Weymann és munkatársai (125) által leírtak szerint. Az explantált sertésszívek perfundálása az aortán keresztül történt kontrollált nyomáson (100 Hgmm) és hőmérsékleten (37 °C) 4% nátrium-dodecilszulfátot tartalmazó foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS) 2 L/min áramlással 12 órán keresztül. Három óránként egy 15 perces átmosás történt PBS oldattal. A 12 órás perfundálás után a szívek 24 órán keresztül voltak átmosva 1,5 L/min PBS oldattal. (11. ábra – (141))



11. ábra – Decellularizált sertésszív

A: decellularizált egész szív; B: decellularizált bal kamra, megtartott ínhúrok

Az impedimetriás mérések elvégzéséhez a decellularizált sertésszív vázakat ultrahangos módszerrel homogenizáltuk. Ehhez egy kb. 1 cm³-es darabot vágunk ki a szívvezetési rendszer apikális részéből, majd pulzatis ultrahanggal (25 pulse/min, amplitude = 60, tune = 50; Vibra Cell VC40, Sonics & Materials Inc., USA) homogenizáltuk, ezután desztillált vízben szuszpendáltuk.

3.6. Impedimetriai mérések

3.6.1. xCELLigence SP készülék

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

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

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

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

3.6.2. Thrombocyta-adhézió mérése

A thrombocyta-adhézió méréséhez a fent leírt módon előállított PRP-t használtuk. Első lépésként hígítatlan PRP minta és három különböző hígítású PRP minta (1:10, 1:100, 1:1000) adhézióját vizsgáltuk. A hígításhoz 0,9%-os nátrium-klorid oldatot használtuk. Ezekhez a mérésekhez az alábbi protokollt alkalmaztuk:

1. Médium (0,9%-os nátrium-klorid) hozzáadása a wellékhez
2. Alapvonal felvétele (1 óra – 37 °C, 5% CO₂)
3. Hígított, ill. hígítatlan PRP minta hozzáadása – mérés leállítása nélkül

4. Adhézió mérése (37 °C, 5% CO₂)

A thrombocytaszám függés után a thrombocyták adhézióját több standard, thrombocytadhézió, ill. –aggregáció mérése során használt agonista jelenlétében vizsgáltuk. Ehhez adrenalin (Richter Gedeon, Budapest, Magyarország) – 5 µM és 10 µM koncentrációban –, adenzin-difoszfátot (ADP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) – 5 µM és 10 µM koncentrációban – és kollagén (Hormon Chemie, München, Németország) – 2 µg/ml koncentrációban – használtunk. A további thrombocytadhézió mérésekhez a később tárgyalt okok miatt 1:10 arányban 0,9%-os nátrium-kloriddal hígított PRP-mintát használtunk. Ezekhez a mérésekhez az alábbi protokollt alkalmaztuk:

1. Médium (0,9%-os nátrium-klorid) hozzáadása a wellékhez (80 µl)
2. Alapvonal felvétele (1 óra – 37 °C, 5% CO₂)
3. Agonista (adrenalin, ADP, kollagén), illetve kontroll (0,9%-os nátrium-klorid) hozzáadása (20 µl) – mérés leállítása nélkül
4. Egyensúlyi állapot (plató) elérése (20-60 perc – 37 °C, 5% CO₂)
5. Thrombocytaminta hozzáadás (100 µl) – mérés leállítása nélkül
6. Adhézió mérése (24 óra – 37 °C, 5% CO₂)

Minden minta esetén 3 párhuzamos mérést végeztünk.

3.6.3. Thrombocytaspredding mérése

A thrombocytaspredding méréséhez szintén 0,9%-os nátrium-kloriddal 1:10 arányban hígított PRP-vel előállított thrombocytamintát használtunk. Ezen mérések során az elektródákhoz már letapadt thrombocyták kiterülésének változását, spredding tevékenységét vizsgáltuk a thrombocytadhézió méréseknél alkalmazott standard agonisták (adrenalin, ADP és kollagén) hatására. Méréseinkhez az alábbi protokollt használtuk:

1. Médium (0,9%-os nátrium-klorid) hozzáadása a wellékhez (80 µl)
2. Alapvonal felvétele (1 óra – 37 °C, 5% CO₂)

3. Thrombocyta minta hozzáadása (100 μ l) – mérés leállítása nélkül
4. Thrombocyták adhéziója, egyensúlyi állapot (plató) elérése (5-8 óra – 37 °C, 5% CO₂)
5. Agonista (adrenalin, ADP, kollagén), illetve kontroll (0,9%-os nátrium-klorid) hozzáadása (20 μ l) – mérés leállítása nélkül
6. Spreading mérése (24 óra – 37 °C, 5% CO₂)

Minden minta esetén 3 párhuzamos mérést végeztünk.

3.6.4. Decellularizált sertésszív vizsgálata – egy sejtréteg

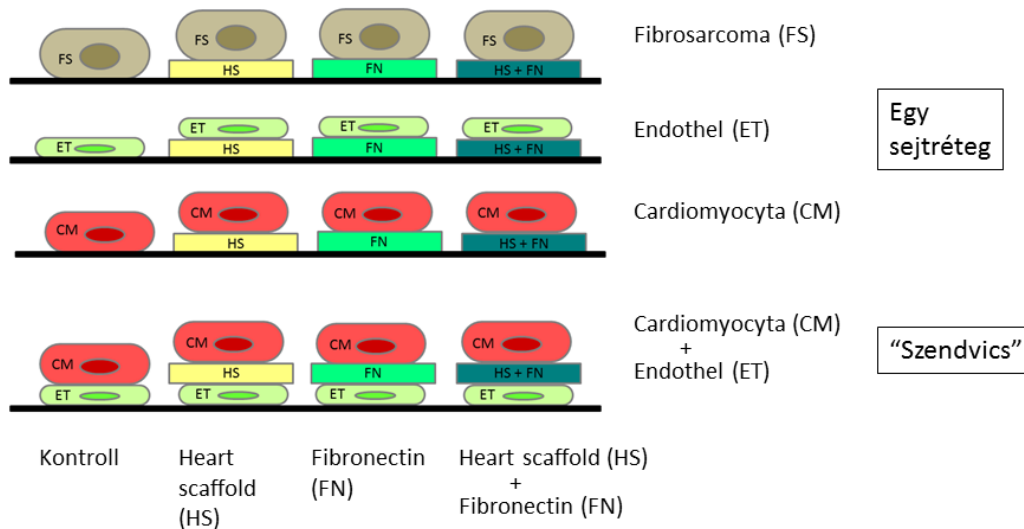
A decellularizált sertésszívvvel végzett vizsgálatok első lépéseként a wellek alján elhelyezkedő elektródákat különböző adhéziót befolyásoló anyagokkal fedtük. Kísérleteink során négy különböző fedést alkalmaztunk: (1) homogenizált sertésszív-váz (heart scaffold, HS), (2) fibronectin (Human Plasma Fibronectin Purified Protein, Merck, Whitehouse station, NJ, USA) desztillált vízben 16 μ g/ml végkoncentrációra hígítva (FN), (3) homogenizált sertésszív-váz és fibronectin keveréke (fibronectin homogenizált sertésszív-vázban hígítva 16 μ g/ml végkoncentrációra) (FN + HS) és (4) desztillált víz (Kontroll). Az elkészített fedő médium 25 μ l mennyiségével szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk a welleket, majd a megmaradó oldatot pipetta segítségével óvatosan aspiráltuk és az elektródákat levegőn megszáritottuk.

Ezután az impedimetriai méréseket az alábbi protokoll szerint végeztük el:

1. Elektródák fedése a fent leírtak szerint
2. 100 μ l médium (a vizsgált sejtvonalnak megfelelően) hozzáadása
3. Alapvonal felvétele (1 óra – 37 °C, 5% CO₂)
4. 100 μ l sejtszuszpenzió hozzáadás
5. Adhézió mérése (72 óra – 37 °C, 5% CO₂)

A kísérletek során minden vizsgált sejtvonal esetén három különböző sejtszámon végeztük a méréseket: 10 000/well, 15 000/well és 20 000/well sejtszámokon a HT-1080

fibrosarcoma sejtek és a HMEC-1 endothel sejtek esetén, és 5 000/well, 10 000/well és 15 000/well sejtszámokon a HCM cardiomyocyták esetén. Minden minta esetében 4 párhuzamos mérést végeztünk. (ld. 12. ábra)



12. ábra – Decellularizált sertésszív vizsgálata – mérési protokoll

Monolayer-vizsgálatok (1-3. sor): a különböző anyagokkal (kontroll, decellularizált szív, fibronectin, ill. az előző kettő keveréke) fedett elektródákra egy sejtrétegben ültettünk fibrosarcoma, endothel és cardiomyocytá sejtet. „Szendvics”-kísérlet (4. sor): az elektródákra kiültetett endothel sejteket különböző anyagokkal (ld. monolayer-vizsgálatok) kezeltük, majd erre ültettünk cardiomyocytá sejtet. FS: fibrosarcoma, ET: endothel, CM: cardiomyocytá, HS: decellularizált sertésszív-homogenizátum, FN: fibronectin, HS + FN: decellularizált sertésszív-homogenizátum és fibronectin keveréke

3.6.5. Decellularizált sertésszív vizsgálata – „szendvics” kísérlet

A „szendvics” kísérletek során két sejtréteg egymásra ültetését vizsgáltuk. (6. ábra) Első lépésként HMEC-1 endothel sejtréteget ültettünk a wellék alján tartó elektróda-hálózatra, melyekre, különböző fedőanyagokkal való kezelés után, HCM cardiomyocytá sejtet ültettünk. Miután az endothel sejtek egy konfluens egysejt-vastagságú bevonatot, monolayert alakítottak ki (ezt az impedimetria görbe plató fázisa jelezte), az egy

sejtvonalas méréseknél használt adhéziót befolyásoló fedő anyagokkal kezeltük. Ehhez 100 µl médium aspirálása után 100 µl anyaggal ((1) homogenizált szívíváz, (2) fibronectin, (3) az előző kettő keveréke, illetve (4) kontrollként fentiek elhagyása – az előző szekcióban leírtak szerint) fedtük a sejteket, majd 30 perc inkubálás következett. Ezután a 100 µl többlet médium oldatot óvatosan aspiráltuk az elektródákról.

A méréseket az alábbi protokoll szerint végeztük:

1. 100 µl médium hozzáadása
2. Alapvonal felvétele (1 óra – 37 °C, 5% CO₂)
3. 100 µl HMEC-1 sejtszuszpenzió (20 000/well) hozzáadása
4. Tenyésztés, endothel monolayer kialakulása (24 óra – 37 °C, 5% CO₂)
5. Endothel monolayer kezelése fedőanyagokkal a fent leírtak szerint
6. 150 µl HCM sejtszuszpenzió hozzáadása
7. Tenyésztés, adhézió mérése (72 óra – 37 °C, 5% CO₂)

A méréseket három különböző HCM cardiomyocytá sejtdeinitással végeztük el: 5000/well, 10 000/well és 15 000/well. Minden minta esetén 4 párhuzamos mérést végeztünk.

3.6.6. Kardiotoxicitás mérése

A toxicitási vizsgálatok során HUVEC endothel sejteken és HCM cardiomyocytákon vizsgáltuk a 16 GnRH-konjugátum toxikus hatását. Első lépésként a sejteket önmagukban adtuk az elektródákhoz, majd miután az adhézió elért egy egyensúlyi helyzetet (ezt jelezte az impedimetriás görbék plató fázisa), hozzáadtuk a vizsgált citotoxikus hatóanyagot. A méréseket az alábbi protokoll szerint végeztük:

1. Médium hozzáadása (80 µl)
2. Alapvonal felvétele (1 óra – 37 °C, 5% CO₂)
3. Sejtszuszpenzió hozzáadás (100 µl)

4. Tenyésztés, sejtadhézió, egyensúlyi helyzet (20-28 óra HCM sejtek esetén, 24-76 óra HUVEC sejtek esetén – 37 °C, 5% CO₂)
5. Citotoxikus hatóanyag hozzáadása (20 µl)
6. Tenyésztés, citotoxicitás impedimetriás mérése (72 óra – 37 °C, 5% CO₂)

Minden minta esetén 4 párhuzamos mérést végeztünk.

3.7. Statisztikai kiértékelés

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

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

A toxicitás és a decellularizált szívíváz anyagaival történt méréseknél a statisztikai eltéréseket egyutas ANOVA teszt segítségével értékeltük. A thrombocyta-adhézió és –spreading vizsgálatoknál páros *t*-próbát alkalmaztunk. A populációs klinikai és laboratóriumi paraméterek vizsgálatánál folyamatos változók esetén Pearson-féle korrelációs együtthatót (*r*-értéket) számítottunk, míg diszkrét változók esetén kétmintás *t*-próbát használtunk.

A statisztikai szignifikancia jelölésére az alábbi sémát használtuk:

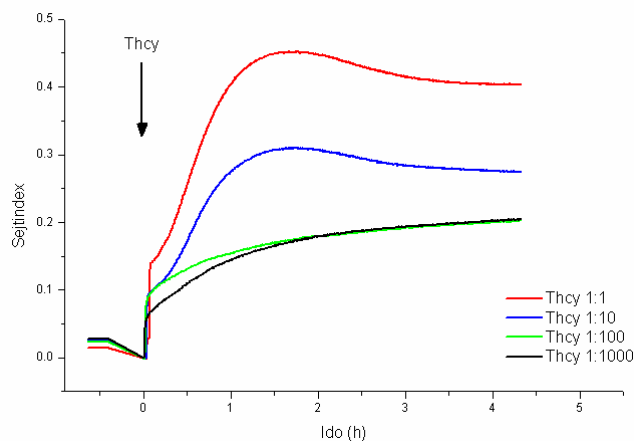
$$x: p < 0,05; \quad y: p < 0,01; \quad z: p < 0,001.$$

4. Eredmények

4.1. Thrombocyta-funkció vizsgálata impedimetriával

4.1.1. Thrombocytaszám-függés vizsgálata

Thrombocyta-adhéziót vizsgáló méréseink során első lépésben különböző denzitású thrombocyta-minták adhéziós viselkedését hasonlítottuk össze. (13. ábra)



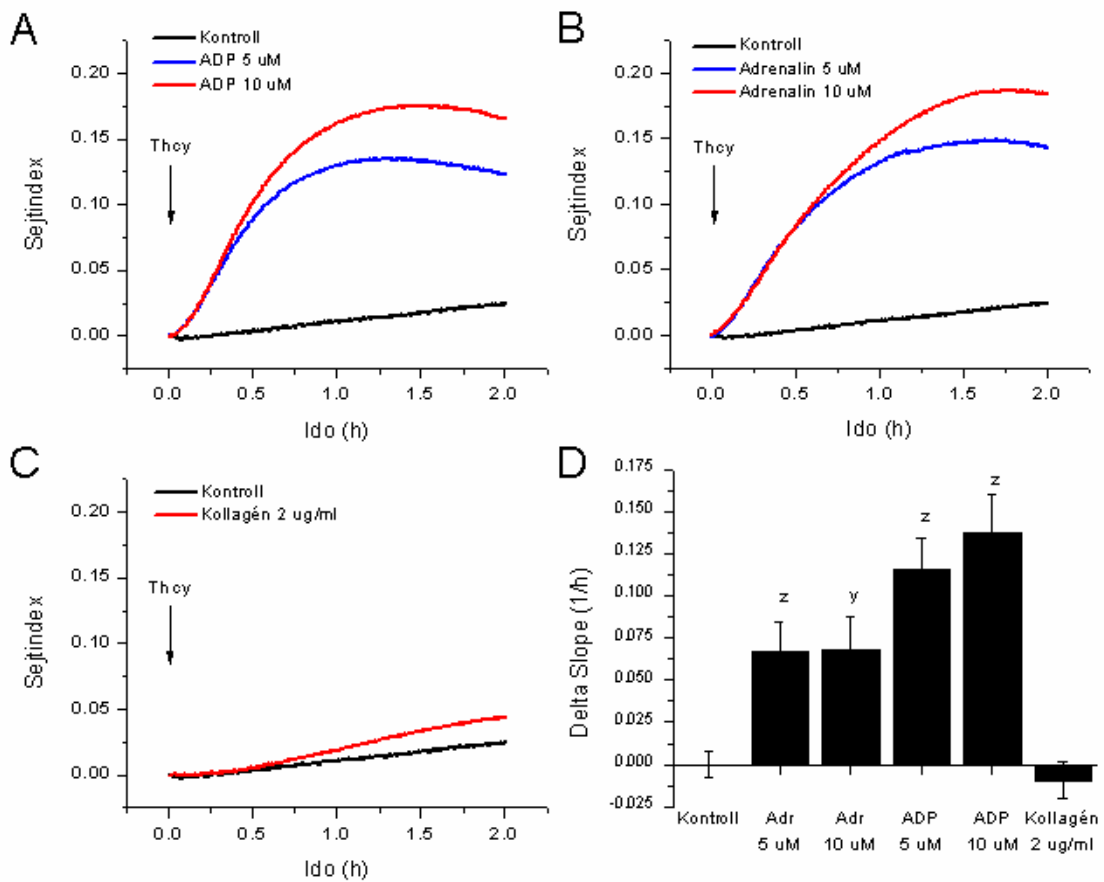
13. ábra – A különböző thrombocyta-számok hatása a thrombocyta-adhézióra

PRP fiziológiás sóoldattal való különböző hígításainak (Thcy 1:1, Thcy 1:10, Thcy 1:100, Thcy 1:1000) impedimetriás (Sejtindex-Idő) görbéi

A görbék első (-40-0 perc) szakasza az alapvonal mérés végét mutatja. A thrombocyták hozzáadása előtti utolsó mérési pontot választottuk nulla pontnak. A mérés során a különböző thrombocyta-számú minták impedimetriás görbéi egyértelműen elkülönültek egymástól. Az ábrán jól látható, hogy a thrombocyta-szuspenzió hozzáadása után (thrombocyta-számtól függően) hirtelen megugrik az elektródákon mért impedancia, majd ezután egy lassabb ütemű impedanciaemelkedést mérünk, ez utóbbi jelzi a thrombocyták elektródákhoz való kitapadását. A leginkább dinamikus választ a magasabb, 1:1 (hígítatlan PRP) és 1:10 sejtszámon kaptuk, 1:10 hígítás esetén enyhébb mértékben. Mivel további méréseink során thrombocyta-agonisták hatását terveztük vizsgálni, ezért ezekhez a mérésekhez az 1:10 hígítást választottuk.

4.1.2. Thrombocyta-adhézió vizsgálata

A thrombocyták adhézióját, illetve annak változását különböző agonisták (adrenalin, ADP, kollagén) hatására, kontroll ellenében, egészséges, fiatal, gyógyszert nem szedő páciensekből álló mintán (n = 10) vizsgáltuk. Az adrenalin és az ADP esetében két koncentrációval (5 és 10 μM) végeztük a méréseket (14. ábra).



14. ábra – Agonisták hatása a thrombocytá-adhézióra

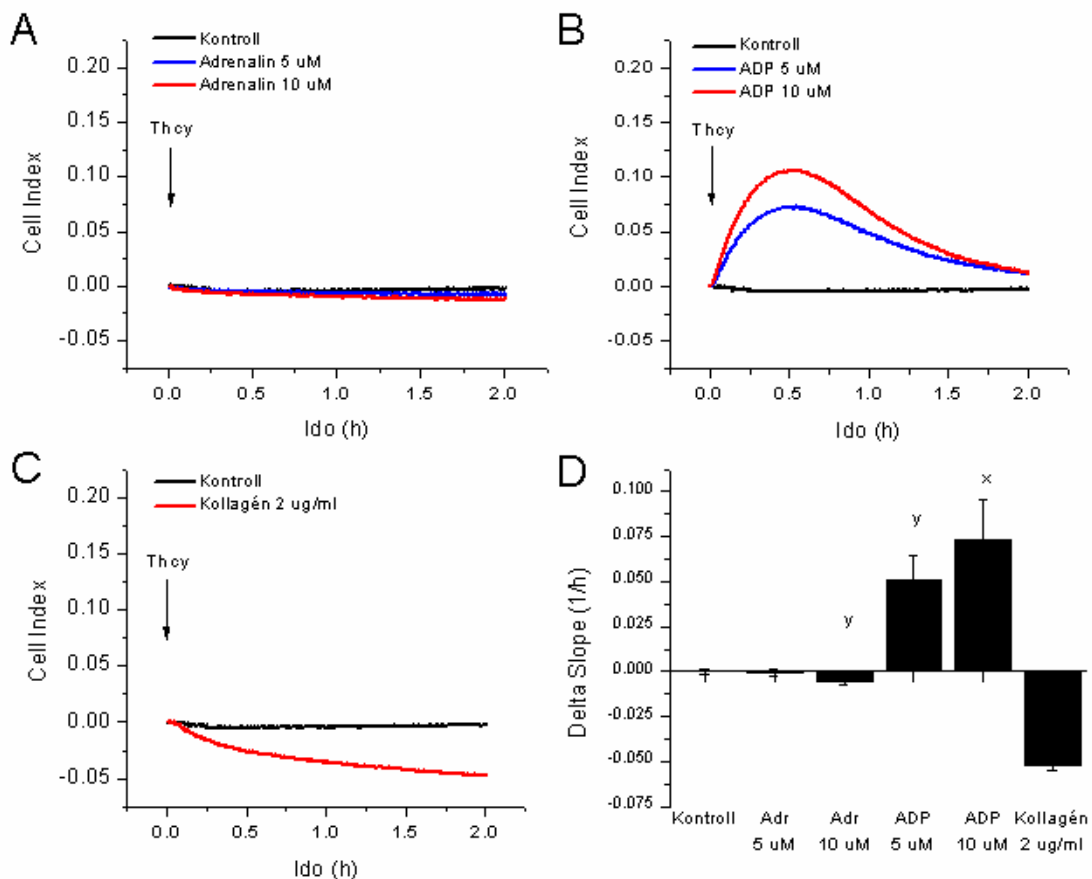
Thrombocytá-adhézió változását különböző fajtájú és koncentrációjú thrombocytá-agonisták jelenlétében (kontrollhoz /fiziológias sóoldathoz/ viszonyítva) mutató reprezentatív impedimetriai (Sejtindex-Idő) görbék: A– adrenalin 5 μM és 10 μM, B – ADP 5 μM és 10 μM, C – kollagén 2 μg/ml. Az impedimetriai görbék a thrombocytá-minták hozzáadása utáni szakaszokat ábrázolják. Különböző fajtájú és koncentrációjú agonisták thrombocytá-adhézióra gyakorolt hatásának összehasonlítása (n = 10): D – Az impedimetriai görbék Slope kiértékelése [a statisztikai analízis menetéről részletes leírás található a Módszerek fejezetben]; x: $p < 0,05$; y: $p < 0,01$; z: $p < 0,001$; Adr: adrenalin

A 14. ábra egy kiválasztott, reprezentatív minta impedimetriás görbéit, valamint a vizsgálat során kapott összes eredményből vont statisztikát mutatja. Az adrenalin és az ADP is mindkét vizsgált koncentráción (5 μM és 10 μM), koncentrációfüggő módon fokozta a thrombocyták adhézióját. Adrenalin esetében 5 μM koncentráción $0,067 \pm 0,017$ ($p <$

0,001) DS értéket, 10 μ M koncentráción $0,068 \pm 0,019$ ($p = 0,003$) DS értéket mértünk (14./A és 14./D ábra). ADP esetén a DS érték 5 μ M koncentráción $0,116 \pm 0,018$ ($p < 0,001$), 10 μ M koncentráción $0,137 \pm 0,023$ ($p < 0,001$) volt (14./B és 14./D ábra). Kollagén (2 μ g/ml koncentrációban) impedimetriával vizsgálva nem mutatott szignifikáns hatást a thrombocyták adhéziójára, azonban egy statisztikailag nem szignifikáns, gyenge negatív tendenciájú hatás tapasztalható volt (DS érték: $-0,009 \pm 0,011$ ($p = 0,315$)) (14./C és 14./D ábra).

4.1.3. Thrombocytá-spredding vizsgálata

A thrombocyták spreading (kiterülés) tevékenységének vizsgálatát szintén egészséges, gyógyszeres kezelés alatt nem álló, fiatal egyénekből álló mintán ($n = 10$) vizsgáltuk. Ezen mérések során az elektródákra előzetesen kitapasztott thrombocytákat kezeltük különböző agonistákkal (adrenalin, ADP, kollagén), és mértük a kiváltott spreading tevékenységet. Az adrenalin és az ADP esetén két különböző koncentrációt is vizsgálatunk (15. ábra).



15. ábra – Agonisták hatása a thrombocytá-spreddingre

Thrombocytá-spredding változását különböző fajtájú és koncentrációjú thrombocytá-agonisták jelenlétében (kontrollhoz /fiziológias sóoldathoz/ viszonyítva) mutató reprezentatív impedimetriai (Sejtindex-Idő) görbék: A– adrenalin 5 μM és 10 μM , B – ADP 5 μM és 10 μM , C – kollagén 2 $\mu\text{g/ml}$. Az impedimetriai görbéknek a thrombocytá-minták hozzáadása utáni szakaszát ábráztoltuk. Különböző fajtájú és koncentrációjú agonisták thrombocytá-spreddingre gyakorolt hatásának összehasonlítása ($n = 10$): D – Az impedimetriai görbék Slope kiértékelése [a statisztikai analízis menetéről részletes leírás található a Módszerek fejezetben]; $x: p < 0,05$; $y: p < 0,01$; $z: p < 0,001$; Adr: adrenalin

A 15. ábra mutatja a spreading mérések során kapott eredményeket (szintén egy kiválasztott, reprezentatív görbesorozatot és az összes kapott eredmény statisztikai kiértékelésének eredményét). A thrombocytá-adhéziós mérésekhez hasonlóan az ADP

mindkét vizsgált koncentráción, koncentrációfüggő módon fokozta a thrombocyták spreading tevékenységét, 5 μM koncentráción $0,051 \pm 0,014$ ($p = 0,008$), 10 μM koncentráción $0,073 \pm 0,022$ ($p = 0,011$) DS értékeket kaptunk (15./B és 15./D ábra).

Ezzel ellentétben az adrenalin az alacsonyabb vizsgált koncentráción (5 μM) semmilyen hatást nem mutatott a thrombocyta-spreading-re (DS: $-0,0005 \pm 0,002$ ($p = 0,680$)), míg a magasabb vizsgált koncentráción (10 μM) statisztikailag ugyan szignifikáns, de arányaiban csekély mértékű negatív hatást kaptunk (DS: $-0,005 \pm 0,002$ ($p = 0,001$)) (15./A és 15./D ábra). A kollagén az egyetlen vizsgált koncentráción (2 $\mu\text{g/ml}$) szintén negatív hatással bírt a mért spreading tevékenységre (DS: $-0,052 \pm 0,004$ ($p < 0,001$)) (15./C és 15./D ábra).

4.1.4. Klinikai vizsgálatok eredményei thrombocyta-adhézióval összefüggésben

A klinikai vizsgálatok között csupán kevés szignifikáns összefüggést tudtunk kimutatni (2. táblázat). A kor negatív korrelációt mutatott az 5 μM koncentrációjú adrenalin által kiváltott thrombocyta-adhézió mértékével ($r = -0,708$, $p = 0,022$). Ezzel ellentétben pozitív irányú összefüggést találtunk a testmagasság és a szintén 5 μM koncentrációjú adrenalin által kiváltott thrombocyta-adhézió mértéke ($r = 0,773$, $p = 0,042$), valamint a kollagén által kiváltott thrombocyta-adhézió és a jobb felkaron mért systoles vérnyomás (SBP) között ($r = 0,893$, $p = 0,007$). Nem találtunk szignifikáns összefüggést a thrombocyta-adhézió mértéke és az egyéb antropometriai paraméterek, valamint a többi vizsgálat vérnyomásérték és a boka-kar indexek között sem.

2. táblázat – A fizikális vizsgálat során mért klinikai paraméterek (átlag ± standard error/SE); valamint a thrombocyta-adhézió és a klinikai paraméterek közti korrelációs együtthatók (r)

Adr = adrenalin, ADP = adenzin-difoszfát, BMI = testtömegindex (body-mass index), SBP = systoles vérnyomás (systolic blood pressure), DBP = diastoles vérnyomás (diastolic blood pressure), RA = jobb kar (right arm), LA = bal kar (left arm), RL = jobb láb (right leg), LL = bal láb (left leg), DPA = arteria dorsalis pedis, PTA = arteria tibialis posterior, ABI = boka-kar index (ankle-brachial index); x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$; Üres nyílak: szignifikáns korreláció a parameter és a thrombocyta-adhézió között egy esetben

Klinikai paraméterek	Átlag ± SE	Thrombocyta-adhézió				
		Korrelációs együttható (r)				
		Adr 10 µM	Adr 5 µM	ADP 10 µM	ADP 5 µM	Koll 2 µg/mL
⇒ KOR (évek)	33,70 ± 2,48	-0,49	-0,71^x	-0,31	-0,42	-0,04
Derékkörfogat (cm)	89,36 ± 3,55	-0,20	-0,56	0,17	0,17	0,09
Csípökörfogat (cm)	103,86 ± 3,94	-0,38	-0,64	-0,12	-0,12	0,07
⇒ Testmagasság (cm)	170,00 ± 2,56	0,66	0,77^x	0,50	0,54	0,22
Testtömeg (kg)	74,87 ± 4,44	-0,23	-0,59	0,15	0,18	-0,03
BMI (kg / m ²)	26,16 ± 2,16	-0,44	-0,75	-0,11	-0,10	-0,10
⇒ SBP RA (Hgmm)	121,86 ± 3,64	0,16	0,01	0,08	-0,03	0,89^y
DBP RA (Hgmm)	75,29 ± 2,88	-0,25	-0,43	-0,16	-0,27	0,44
SBP LA (Hgmm)	124,43 ± 3,57	-0,16	-0,37	-0,01	-0,05	0,57
DBP LA (Hgmm)	78,00 ± 3,76	-0,34	-0,64	-0,05	-0,09	0,13
SBP RL DPA (Hgmm)	126,86 ± 7,65	0,01	-0,31	0,30	0,33	0,28
SBP RL PTA (Hgmm)	129,43 ± 8,69	0,01	-0,28	0,32	0,38	0,06
SBP LL DPA (Hgmm)	125,00 ± 4,47	0,08	-0,20	0,29	0,30	0,44
SBP LL TPA (Hgmm)	131,71 ± 7,94	0,07	-0,21	0,33	0,38	0,23
ABI jobb	1,03 ± 0,05	0,10	-0,20	0,45	0,53	-0,17
ABI bal	1,07 ± 0,04	0,24	-0,07	0,56	0,62	0,01

Az anamnesztikus adatok összehasonlítása a thrombocyta-adhézióval kissé biztatóbb eredményeket hozott (3. táblázat). Az életkort mint diszkrét változót értékelve az előzőhöz hasonló eredményt kaptunk, 5 µM adrenalin jelenlétében mért thrombocyta-adhézió szignifikánsan magasabb volt a 35 évesnél fiatalabb alanyok esetében, mint az idősebb páciensek csoportjában (DS értékek: $0,095 \pm 0,015$ vs. $0,040 \pm 0,011$, $p = 0,018$).

Az allergiás megbetegedés megléte szinte az összes vizsgált agonista esetében szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a fokozottabb thrombocyta-adhézióval. Szignifikánsan erősebb thrombocyta-adhéziót mutattak az anamnézisükben allergiás megbetegedéssel bíró egyének a kontrollcsoporthoz képest 5 μ M ADP-vel (DS: $0,171 \pm 0,027$ vs. $0,073 \pm 0,018$, $p = 0,035$), 10 μ M ADP-vel (DS: $0,224 \pm 0,022$ vs. $0,08 \pm 0,025$, $p = 0,02$) és 10 μ M adrenalinnal (DS: $0,11 \pm 0,011$ vs. $0,024 \pm 0,012$, $p = 0,008$) végzett mérés esetén is. Ezen túl, statisztikailag nem szignifikáns, de tendenciálisan fokozottabb thrombocyta-adhéziót mértünk 5 μ M adrenalin használata esetén is (DS: $0,075 \pm 0,009$ vs. $0,035 \pm 0,009$, $p = 0,051$). Nem találtunk szignifikáns összefüggést a thrombocyta-adhézió mértéke, valamint a dohányzás, alkoholfogyasztás, fizikai aktivitás vagy sportolás között.

3. táblázat – Delta Slope (DS) értékek (1/h) (átlag ± standard error/SE) thrombocyta-adhézió mérése során a különböző betegcsoportokban, és a betegcsoportok összehasonlítása kétmintás t-próbával (p-érték)

ADP = adenozin-difoszfát; x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$; Üres nyilak szignifikáns eltérés a thrombocyta-adhézió tekintetében a különböző betegcsoportok között egy esetben; Fekete nyilak: szignifikáns eltérés a thrombocyta-adhézió tekintetében a különböző betegcsoportok között több esetben

Klinikai paraméter / Thrombocyta-agonista		Thrombocyta-adhézió – DS (1/h)		
		Átlag ± SE	Átlag ± SE	p-érték
⇒	KOR (évek)	< 35	≥ 35	
	Adrenalin 10 µM	0,097 ± 0,021	0,040 ± 0,019	0,082
⇒	Adrenalin 5 µM	0,095 ± 0,015	0,040 ± 0,011	0,018^x
	ADP 10 µM	0,162 ± 0,034	0,113 ± 0,032	0,323
	ADP 5 µM	0,139 ± 0,027	0,092 ± 0,022	0,206
	Kollagén 2 µg/ml	-0,006 ± 0,008	-0,013 ± 0,017	0,699
	<i>Dohányzás</i>	<i>Soha</i>	<i>Igen</i>	
	Adrenalin 10 µM	0,044 ± 0,022	0,060 ± 0,040	0,733
	Adrenalin 5 µM	0,043 ± 0,013	0,055 ± 0,011	0,645
	ADP 10 µM	0,121 ± 0,038	0,121 ± 0,081	0,999
	ADP 5 µM	0,103 ± 0,030	0,098 ± 0,046	0,930
	Kollagén 2 µg/ml	-0,027 ± 0,005	0,013 ± 0,039	0,133
	<i>Alkoholfogyasztás</i>	<i>Soha</i>	<i>Igen</i>	
	Adrenalin 10 µM	0,065 ± 0,019	0,036 ± 0,029	0,473
	Adrenalin 5 µM	0,050 ± 0,013	0,044 ± 0,015	0,763
	ADP 10 µM	0,160 ± 0,023	0,092 ± 0,051	0,334
	ADP 5 µM	0,124 ± 0,017	0,084 ± 0,038	0,436
	Kollagén 2 µg/ml	-0,004 ± 0,029	-0,025 ± 0,006	0,454
➔	<i>Allergia</i>	<i>Nem</i>	<i>Igen</i>	
➔	Adrenalin 10 µM	0,024 ± 0,012	0,110 ± 0,011	0,008^y
	Adrenalin 5 µM	0,035 ± 0,009	0,075 ± 0,009	0,051
➔	ADP 10 µM	0,080 ± 0,025	0,224 ± 0,022	0,020^y
➔	ADP 5 µM	0,073 ± 0,018	0,171 ± 0,027	0,035^x
	Kollagén 2 µg/ml	-0,029 ± 0,005	0,017 ± 0,036	0,076

(folyt.)

3. táblázat – Delta Slope (DS) értékek (1/h) (átlag ± standard error/SE) thrombocyta-adhézió mérése során a különböző betegcsoportokban, és a betegcsoportok összehasonlítása kétmintás t-próbával (p-érték)

ADP = adenozin-difoszfát; $x: p < 0,05$, $y: p < 0,01$; Üres nyilak szignifikáns eltérés a thrombocyta-adhézió tekintetében a különböző betegcsoportok között egy esetben; Fekete nyilak: szignifikáns eltérés a thrombocyta-adhézió tekintetében a különböző betegcsoportok között több esetben

(folytatás)

Klinikai paraméter / Thrombocyta-agonista	Thrombocyta-adhézió – DS (1/h)		
	Átlag ± SE	Átlag ± SE	p-érték
<i>Sport</i>	<i>Jelenleg nem</i>	<i>Igen</i>	
Adrenalin 10 µM	0,066 ± 0,026	0,025 ± 0,020	0,297
Adrenalin 5 µM	0,053 ± 0,013	0,038 ± 0,015	0,506
ADP 10 µM	0,161 ± 0,045	0,068 ± 0,026	0,166
ADP 5 µM	0,131 ± 0,031	0,061 ± 0,015	0,134
Kollagén 2 µg/ml	-0,011 ± 0,022	-0,023 ± 0,005	0,663
<i>Fizikai aktivitás</i>	<i>Nem</i>	<i>Igen</i>	
Adrenalin 10 µM	0,059 ± 0,022	0,034 ± 0,033	0,548
Adrenalin 5 µM	0,053 ± 0,013	0,038 ± 0,016	0,487
ADP 10 µM	0,141 ± 0,043	0,095 ± 0,054	0,526
ADP 5 µM	0,120 ± 0,032	0,077 ± 0,033	0,401
Kollagén 2 µg/ml	-0,028 ± 0,004	0,000 ± 0,027	0,286

A laboratóriumi paraméterek vizsgálata során több szignifikáns összefüggést is találtunk (4. táblázat). A kvantitatív teljes vérkép paraméterek közül az MCHC több agonista által kiváltott thrombocyta-adhézióval is szignifikáns pozitív korrelációt mutatott: ADP esetében mindkét vizsgált koncentráción, 5 µM ($r = 0,85$, $p = 0,016$) és 10 µM ($r = 0,79$, $p = 0,035$) koncentráción is, míg adrenalin esetében a magasabb, 10 µM koncentráción ($r = 0,79$, $p = 0,036$). A hematológiai paraméterek közül az MCHC-n kívül egyedül az RDW esetében mutattunk ki szignifikáns pozitív korrelációt, 5 µM adrenalin használata esetén ($r = 0,82$, $p = 0,025$).

A kémiai paraméterek közül két elektrolitszint, a nátrium és a kalcium esetén is több szignifikáns korrelációt mértünk. A laboratóriumi nátriumszint negatívan korrelált a

thrombocyta-adhézió mértékével 5 μ M adrenalin ($r = -0,87$, $p = 0,010$), 10 μ M adrenalin ($r = -0,96$, $p = 0,001$), 5 μ M ADP ($r = -0,87$, $p = 0,038$) és 10 μ M ADP ($r = -0,85$, $p = 0,015$). Hasonló eredményeket tapasztaltunk a szérum kalciumszinttel való összefüggésben: negatív korreláció 10 μ M adrenalin ($r = -0,84$, $p = 0,019$), 5 μ M ADP ($r = -0,82$, $p = 0,023$) és 10 μ M ADP ($r = -0,84$, $p = 0,018$) esetében. Szintén többszörös negatív korrelációt mutatott a thrombocyták adhéziójával a szérum glükóz szint: 10 μ M adrenalin ($r = -0,91$, $p = 0,005$), 5 μ M ADP ($r = -0,94$, $p = 0,002$) és 10 μ M ADP ($r = -0,93$, $p = 0,003$) esetén. Továbbá a laboratóriumi CK ($r = 0,77$, $p = 0,043$) és CKMB ($r = 0,78$, $p = 0,038$) értékek szignifikáns pozitív korrelációt mutattak az 5 μ M ADP által kiváltott thrombocyta-adhézió mértékével.

4. táblázat – A mért laboratóriumi paraméterek (átlag ± standard error/SE) és korrelációs együtthatók (r) a thrombocyta-adhézió és a laboratóriumi paraméterek között.

Adr = adrenalin, ADP = adenzin-difoszfát, Koll = kollagén, WBC = fehérvérsejtszám (white blood cell count), RBC = vörösvértestszám (red blood cell count), Plt = thrombocytaszám (platelet), x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$; Üres nyilak: szignifikáns korreláció a laboratóriumi parameter és a thrombocyta-adhézió között egy esetben, Fekete nyilak: szignifikáns korreláció a laboratóriumi parameter és a thrombocyta-adhézió között több esetben

Laboratóriumi paraméterek	Normál tartomány	Thrombocyta-adhézió					
		Átlag ± SE	Korrelációs együttható (r)				
			Adr 10 µM	Adr 5 µM	ADP 10 µM	ADP 5 µM	Koll 2 µg/mL
WBC (10 ³ /mm ³)	4,0-10,0	8,26 ± 0,98	-0,05	-0,24	0,07	0,02	0,60
Neutrophil (%)	45,0-79,0	58,23 ± 3,96	-0,42	-0,56	-0,27	-0,28	0,13
Lymphocyte (%)	16,0-45,0	32,33 ± 3,51	0,47	0,65	0,28	0,29	-0,18
Monocyte (%)	0-10,0	6,89 ± 0,65	-0,05	-0,21	0,13	0,15	-0,12
Eosinophil (%)	0-4,0	2,24 ± 0,47	0,13	0,15	0,02	0,00	0,47
Basophil (%)	0-1,0	0,27 ± 0,08	-0,05	0,23	-0,29	-0,35	-0,24
RBC (10 ³ /mm ³)	3,55,0-5	4,80 ± 0,14	0,01	-0,24	0,22	0,26	0,29
Hemoglobin (g/dl)	12,0-16,0	14,37 ± 0,36	0,18	0,05	0,28	0,36	0,18
Hematocrit (%)	35,0-47,0	41,87 ± 0,85	-0,27	-0,38	-0,15	-0,09	0,16
MCV (µM ³)	76-100	87,53 ± 1,34	-0,46	-0,12	-0,69	-0,68	-0,39
MCH (pg)	27,0-33,0	30,00 ± 0,39	0,26	0,59	-0,01	0,05	-0,34
➔ MCHC (g/dl)	31,0-35,0	34,30 ± 0,45	0,79^x	0,71	0,79^x	0,85^x	0,12
⇨ RDW (%)	11,0-15,0	13,06 ± 0,35	-0,60	-0,82^x	-0,38	-0,40	0,16
Plt (10 ³ /mm ³)	150-400	238,57 ± 16,41	-0,46	-0,32	-0,60	-0,67	0,17
➔ Nátrium (mmol/l)	135-145	137,29 ± 0,36	-0,96^y	-0,87^x	-0,85^x	-0,78^x	-0,66
Kálium (mmol/l)	3,5-5,1	4,30 ± 0,08	0,05	0,06	-0,03	-0,16	0,42
➔ Kalcium (mmol/l)	2,15-2,55	2,44 ± 0,07	-0,84^x	-0,69	-0,84^x	-0,82^x	-0,38
Magnézium (mmol/l)	0,66-1,07	0,89 ± 0,02	0,43	0,51	0,41	0,51	-0,26
Kreatinin (µmol/l)	44-80	72,71 ± 5,75	-0,10	-0,30	0,18	0,28	-0,35
Urea (mmol/l)	1,0-8,3	4,76 ± 0,39	0,53	0,44	0,46	0,32	0,63
➔ Glükóz (mmol/l)	4,11-5,89	5,31 ± 0,10	-0,91^y	-0,74	-0,93^y	-0,94^y	-0,39

(folyt.)

4. táblázat – A mért laboratóriumi paraméterek (átlag ± standard error/SE) és korrelációs együtthatók (r) a thrombocyta-adhézió és a laboratóriumi paraméterek között.

Adr = adrenalin, ADP = adenzin-difoszfát, Koll = kollagén, WBC = fehérvérsejtszám (white blood cell count), RBC = vörösvértestszám (red blood cell count), Plt = thrombocytaszám (platelet), x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$; Üres nyilak: szignifikáns korreláció a laboratóriumi parameter és a thrombocyta-adhézió között egy esetben, Fekete nyilak: szignifikáns korreláció a laboratóriumi parameter és a thrombocyta-adhézió között több esetben

(folytatás)

Laboratóriumi paraméterek	Normál tartomány	Thrombocyta-adhézió						
		Átlag ± SE	Korrelációs együttható (r)					Koll
			Adr 10 µM	Adr 5 µM	ADP 10 µM	ADP 5 µM	2 µg/mL	
T. bilirubin (µmol /l)	1,0-21,0	5,86 ± 0,82	0,02	0,06	0,11	0,21		-0,51
D. bilirubin (µmol /l)	0,5-3,4	1,60 ± 0,14	0,26	0,35	0,27	0,34		-0,55
Protein (g/l)	66,0-87,0	73,70 ± 1,29	0,00	-0,34	0,24	0,20		0,58
Albumin	34,0-48,0	49,20 ± 0,85	0,60	0,69	0,41	0,42		0,45
HsCRP (mg/l)	0,1-5	3,13 ± 2,18	-0,55	-0,67	-0,42	-0,45		0,01
Koleszterin (mmol/l)	0-5,2	5,31 ± 0,35	-0,24	-0,36	-0,15	-0,17		0,47
Tg (mmol/l)	0-2,2	1,74 ± 0,44	0,34	0,02	0,59	0,61		0,36
HDL (mmol/l)	1,15-1,68	1,45 ± 0,14	-0,18	0,00	-0,40	-0,48		0,39
LDL (mmol/l)	0,10-3,34	3,20 ± 0,26	-0,27	-0,41	-0,13	-0,15		0,38
Húgysav (mmol/l)	143-339	288,14 ± 24,45	-0,17	-0,41	0,12	0,14		-0,21
GOT (U/L)	0-32	20,29 ± 3,26	-0,14	-0,40	0,18	0,26		-0,16
GPT (U/L)	0-33	18,14 ± 3,33	-0,19	-0,47	0,13	0,18		-0,14
GGT (U/L)	5-36	17,14 ± 2,84	0,05	-0,09	0,17	0,20		0,27
ALP (U/L)	35-104	68,43 ± 5,69	0,00	-0,14	0,12	0,21		0,08
⇒ CK (U/L)	3-167	97,00 ± 14,47	0,74	0,69	0,73	0,77^x		0,04
⇒ CKMB (U/L)	0-25,0	12,21 ± 0,42	0,59	0,32	0,75	0,78^x		0,44
LDH (U/L)	240-480	267,71 ± 18,64	0,53	0,32	0,63	0,62		0,52
HBa1c (mmol/mol)	20-42	35,63 ± 0,99	0,18	-0,13	0,40	0,36		0,56
HBa1c (%)	4,8-5,9	5,39 ± 0,10	0,19	-0,11	0,39	0,35		0,59
NT-proBNP (pg/ml)	5-125	32,54 ± 8,92	-0,06	0,07	-0,10	-0,06		-0,36

4.1.5. Klinikai vizsgálatok eredményei thrombocyta-spreading-gel összefüggésben

A fizikális vizsgálat során nyert klinikai paraméterek közül egyedül a jobb lábon, az *a. tibialis posterior*-on *Doppler*-módszerrel mért systoles vérnyomás mutatott szignifikáns összefüggést a thrombocyták spreading-tevékenységével, pozitív korreláció 5 μ M adrenalinnal végzett mérés esetén ($r = 0,87$, $p < 0,05$). (5. táblázat). Nem volt szignifikáns összefüggés a többi mért vérnyomásértékkel, a boka-kar indexekkel és az antropometriai értékekkel sem.

5. táblázat – A fizikális vizsgálat során mért klinikai paraméterek (átlag ± standard error/SE); valamint a thrombocyta-spreading és a klinikai paraméterek közti korrelációs együtthatók (r)

Adr = adrenalin, ADP = adenzin-difoszfát, BMI = testtömegindex (body-mass index), SBP = systoles vérnyomás (systolic blood pressure), DBP = diastoles vérnyomás (diastolic blood pressure), RA = jobb kar (right arm), LA = bal kar (left arm), RL = jobb láb (right leg), LL = bal láb (left leg), DPA = arteria dorsalis pedis, PTA = arteria tibialis posterior, ABI = boka-kar index (ankle-brachial index); x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$; Üres nyilak: szignifikáns korreláció a parameter és a thrombocyta-adhézió között egy esetben

Klinikai paraméterek	Thrombocyta-spreading					
	Átlag ± SE	Korrelációs együttható (r)				
		Adr 10 µM	Adr 5 µM	ADP 10 µM	ADP 5 µM	Koll 2 µg/mL
KOR (évek)	31,00 ± 2,27	-0,17	-0,14	0,28	0,22	-0,43
Derékkörfogat (cm)	87,67 ± 4,33	0,70	0,63	0,32	0,17	0,21
Csípökörfogat (cm)	100,67 ± 3,40	0,34	0,68	0,62	0,50	-0,45
Testmagasság (cm)	172,17 ± 4,20	0,46	0,59	0,55	0,39	-0,60
Testtömeg (kg)	74,95 ± 7,70	0,56	0,72	0,52	0,37	-0,20
BMI (kg / m ²)	25,05 ± 1,46	0,57	0,66	0,30	0,19	0,28
SBP RA (Hgmm)	121,50 ± 4,76	0,39	0,46	0,22	0,19	0,56
DBP RA (Hgmm)	72,67 ± 3,01	-0,07	0,34	0,67	0,73	0,04
SBP LA (Hgmm)	119,17 ± 4,61	0,50	0,55	0,28	0,25	0,56
DBP LA (Hgmm)	74,67 ± 2,42	-0,14	0,22	0,19	0,32	0,32
SBP RL DPA (Hgmm)	124,67 ± 5,60	0,36	0,35	-0,13	-0,15	0,77
⇒ SBP RL PTA (Hgmm)	131,00 ± 5,72	0,61	0,87^x	0,28	0,22	0,23
SBP LL DPA (Hgmm)	123,67 ± 7,15	0,71	0,67	0,08	0,00	0,59
SBP LL TPA (Hgmm)	130,33 ± 4,54	0,28	0,58	0,17	0,15	0,36
ABI jobb	1,10 ± 0,03	0,22	0,58	-0,06	-0,07	-0,33
ABI bal	1,08 ± 0,02	0,29	0,80	0,43	0,43	-0,26

Az anamnesztikus adatok esetén nem találtunk szignifikáns korrelációt, nem volt összefüggés a kor, dohányzás, alkoholfogyasztás, allergiás megbetegedés megléte, fizikai aktivitás vagy sporttevékenység esetén sem. (6. táblázat).

6. táblázat – Delta Slope (DS) értékek (1/h) (átlag ± standard error/SE) thrombocytaspreading mérése során a különböző betegcsoportokban, és a betegcsoportok összehasonlítása kétmintás t-próbával (p-érték)

ADP = adenozin-difoszfát; x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$

Klinikai paraméter / Thrombocytá-agonista	Thrombocytá-spreading – DS (1/h)		
	Átlag ± SE	Átlag ± SE	p-érték
<i>KOR (évek)</i>	< 33	≥ 33	
Adrenalin 10 µM	-0,005 ± 0,002	-0,006 ± 0,002	0,629
Adrenalin 5 µM	0,001 ± 0,002	-0,002 ± 0,001	0,300
ADP 10 µM	0,059 ± 0,041	0,088 ± 0,025	0,560
ADP 5 µM	0,044 ± 0,028	0,058 ± 0,013	0,670
Kollagén 2 µg/ml	-0,050 ± 0,003	-0,053 ± 0,007	0,768
<i>Dohányzás</i>	<i>Soha</i>	<i>Igen</i>	
Adrenalin 10 µM	-0,009 ± 0,004	-0,005 ± 0,002	0,325
Adrenalin 5 µM	-0,003 ± 0,002	-0,003 ± 0,002	0,901
ADP 10 µM	0,075 ± 0,035	0,080 ± 0,032	0,925
ADP 5 µM	0,056 ± 0,024	0,051 ± 0,016	0,855
Kollagén 2 µg/ml	-0,045 ± 0,012	-0,054 ± 0,007	0,509
<i>Alkoholfogyasztás</i>	<i>Rendszeresen nem</i>	<i>Igen</i>	
Adrenalin 10 µM	-0,007 ± 0,001	-0,006 ± 0,002	0,737
Adrenalin 5 µM	-0,005 ± 0,003	-0,002 ± 0,001	0,260
ADP 10 µM	0,025 ± 0,005	0,105 ± 0,023	0,086
ADP 5 µM	0,024 ± 0,003	0,067 ± 0,012	0,075
Kollagén 2 µg/ml	-0,051 ± 0,007	-0,051 ± 0,008	0,983
<i>Allergia</i>	<i>Nem</i>	<i>Igen</i>	
Adrenalin 10 µM	-0,012 ± 0,001	-0,005 ± 0,001	0,071
Adrenalin 5 µM	-0,005 ± 0,002	-0,002 ± 0,001	0,442
ADP 10 µM	0,109 ± 0,003	0,072 ± 0,026	0,595
ADP 5 µM	0,080 ± 0,001	0,047 ± 0,013	0,348
Kollagén 2 µg/ml	-0,057 ± 0,001	-0,050 ± 0,007	0,703

(folyt.)

6. táblázat – Delta Slope (DS) értékek (1/h) (átlag ± standard error/SE) thrombocytaspreading mérése során a különböző betegcsoportokban, és a betegcsoportok összehasonlítása kétmintás t-próbával (p-érték)

ADP = adenozin-difoszfát; x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$
(folytatás)

Klinikai paraméter / Thrombocytagonista	Thrombocytaspreading – DS (1/h)		
	Átlag ± SE	Átlag ± SE	p-érték
<i>Sport</i>	<i>Jelenleg nem</i>	<i>Igen</i>	
Adrenalin 10 µM	-0,003 ± 0,002	-0,008 ± 0,002	0,218
Adrenalin 5 µM	-0,001 ± 0,001	-0,003 ± 0,002	0,512
ADP 10 µM	0,070 ± 0,050	0,083 ± 0,029	0,817
ADP 5 µM	0,046 ± 0,025	0,056 ± 0,015	0,740
Kollagén 2 µg/ml	-0,051 ± 0,008	-0,052 ± 0,008	0,950
<i>Fizikai aktivitás</i>	<i>Nem</i>	<i>Igen</i>	
Adrenalin 10 µM	-0,009 ± 0,002	-0,004 ± 0,001	0,145
Adrenalin 5 µM	-0,004 ± 0,002	-0,001 ± 0,000	0,259
ADP 10 µM	0,097 ± 0,035	0,060 ± 0,030	0,471
ADP 5 µM	0,064 ± 0,018	0,042 ± 0,015	0,403
Kollagén 2 µg/ml	-0,058 ± 0,008	-0,045 ± 0,007	0,310

A laboratóriumi vizsgálatok közül több esetben találtunk szignifikáns összefüggést (7. táblázat). A hematológiai paraméterek közül a monocytarány szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a 10 µM adrenalin hatására kialakult thrombocytaspreading tevékenység mértékével ($r = 0,87$, $p = 0,025$). Ezzel ellentétben negatív korrelációt találtunk az MCV ($r = -0,85$, $p = 0,032$) és az MCH ($r = -0,87$, $p = 0,024$), valamint a kollagén által kiváltott thrombocytaspreading között. Szintén negatívan korrelált az MCHC az 5 µM adrenalin által kiváltott thrombocytaspreading-gel ($r = -0,92$, $p = 0,010$). A mért lipidszintek közül a HDL-szint szignifikáns negatív korrelációt mutatott a thrombocytaspreading-el 5 µM adrenalin vizsgálva ($r = -0,94$, $p = 0,005$). A mért májenzimszintek közül a GOT ($r = 0,90$, $p = 0,015$) és a GPT is ($r = 0,87$, $p = 0,024$) szignifikáns korrelációt mutatott a kollagén által kiváltott thrombocytaspreading tevékenységgel. A mért GGT-szint szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a thrombocyták 10 µM adrenalin által kiváltott spreading-tevékenységével ($r = 0,83$, $p = 0,039$).

7. táblázat – A mért laboratóriumi paraméterek (átlag ± standard error/SE) és korrelációs együtthatók (r) a thrombocyta-spreading és a laboratóriumi paraméterek között.

Adr = adrenalin, ADP = adenzin-difoszfát, Koll = kollagén, WBC = fehérvérsejtszám (white blood cell count), RBC = vörösvértestszám (red blood cell count), Plt = thrombocytaszám (platelet), x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$; Üres nyilak: szignifikáns korreláció a laboratóriumi parameter és a thrombocyta-adhézió között egy esetben

Laboratóriumi paraméterek	Normál tartomány	Thrombocyta-spreading					
		Átlag ± SE	Korrelációs együttható (r)				
			Adr 10 µM	Adr 5 µM	ADP 10 µM	ADP 5 µM	Koll 2 µg/mL
WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	4,0-10,0	7,42 ± 0,61	0,20	0,43	0,26	0,31	0,50
Neutrophil (%)	45,0-79,0	58,00 ± 1,45	0,65	0,42	0,35	0,30	0,01
Lymphocyte (%)	16,0-45,0	31,35 ± 2,48	-0,74	-0,48	-0,60	-0,50	0,14
⇒ Monocyte (%)	0-10,0	7,15 ± 1,34	0,87^x	0,44	0,31	0,19	0,18
Eosinophil (%)	0-4,0	3,22 ± 0,91	-0,29	0,02	0,63	0,59	-0,64
Basophil (%)	0-1,0	0,28 ± 0,05	-0,17	-0,46	0,00	-0,07	-0,21
RBC ($10^3/\text{mm}^3$)	3,55,0-5	4,42 ± 0,25	0,50	0,01	0,11	0,06	0,69
Hemoglobin (g/dl)	12,0-16,0	13,25 ± 0,45	0,43	-0,06	0,24	0,18	0,50
Hematocrit (%)	35,0-47,0	39,20 ± 1,35	0,60	0,18	0,32	0,24	0,50
⇒ MCV (µM ³)	76-100	89,30 ± 2,39	-0,20	0,27	0,15	0,14	-0,85^x
⇒ MCH (pg)	27,0-33,0	30,18 ± 0,81	-0,42	0,00	0,08	0,10	-0,87^x
⇒ MCHC (g/dl)	31,0-35,0	33,80 ± 0,29	-0,73	-0,92^x	-0,23	-0,16	-0,08
RDW (%)	11,0-15,0	12,50 ± 0,21	0,21	0,47	0,54	0,53	0,23
Plt ($10^3/\text{mm}^3$)	150-400	247,67 ± 20,34	-0,22	0,31	0,15	0,19	0,10
Nátrium (mmol/l)	135-145	138,33 ± 0,49	0,46	0,70	0,43	0,38	0,27
Kálium (mmol/l)	3,5-5,1	4,07 ± 0,09	0,15	-0,10	0,54	0,45	-0,57
Kalcium (mmol/l)	2,15-2,55	2,35 ± 0,09	0,12	-0,26	-0,16	-0,21	0,60
Magnézium (mmol/l)	0,66-1,07	0,93 ± 0,03	0,42	0,77	0,20	0,15	-0,42
Kreatinin (µmol/l)	44-80	76,50 ± 5,96	0,53	0,59	0,64	0,47	-0,42
Urea (mmol/l)	1,0-8,3	4,40 ± 0,32	0,45	0,39	0,19	0,17	0,69
Glükóz (mmol/l)	4,11-5,89	5,41 ± 0,13	-0,60	-0,63	-0,06	0,13	0,14
T. bilirubin (µmol /l)	1,0-21,0	5,41 ± 1,18	-0,29	-0,81	-0,41	-0,39	0,42
D. bilirubin (µmol /l)	0,5-3,4	1,45 ± 0,32	-0,19	-0,77	-0,41	-0,41	0,35

(folyt.)

7. táblázat – A mért laboratóriumi paraméterek (átlag ± standard error/SE) és korrelációs együtthatók (r) a thrombocyta-spreading és a laboratóriumi paraméterek között.

Adr = adrenalin, ADP = adenzin-difoszfát, Koll = kollagén, WBC = fehérvérsejtszám (white blood cell count), RBC = vörösvértestszám (red blood cell count), Plt = thrombocytaszám (platelet), x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$; Üres nyilak: szignifikáns korreláció a laboratóriumi parameter és a thrombocyta-adhézió között egy esetben

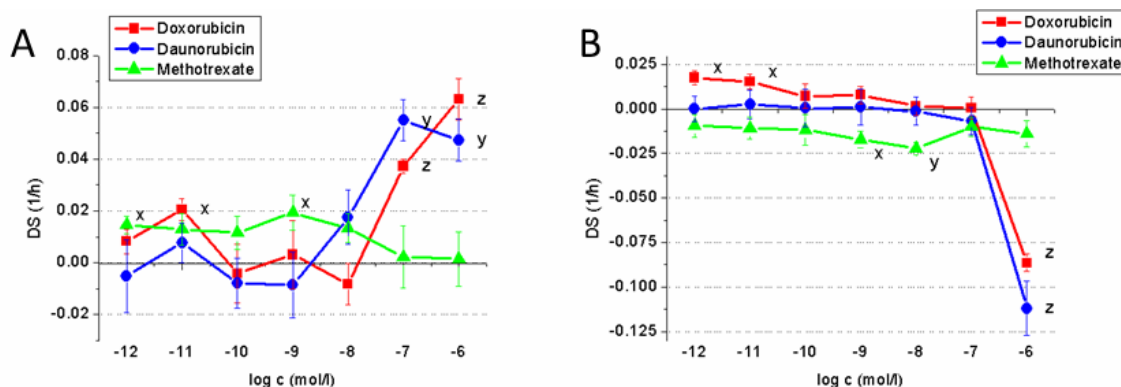
(folytatás)

Laboratóriumi paraméterek	Normál tartomány	Thrombocyta-spreading					
		Átlag ± SE	Korrelációs együttható (r)				
			Adr 10 µM	Adr 5 µM	ADP 10 µM	ADP 5 µM	Koll 2 µg/mL
Protein (g/l)	66,0-87,0	74,77 ± 1,84	0,05	0,05	0,47	0,39	-0,17
Albumin	34,0-48,0	47,85 ± 0,93	-0,12	-0,25	0,02	0,07	0,68
HsCRP (mg/l)	0,1-5	4,25 ± 1,70	0,48	0,41	-0,33	-0,41	-0,19
Koleszterin (mmol/l)	0-5,2	5,32 ± 0,42	-0,20	0,10	0,61	0,68	0,12
Tg (mmol/l)	0-2,2	2,58 ± 0,73	0,29	0,57	0,74	0,63	-0,45
⇒ HDL (mmol/l)	1,15-1,68	1,44 ± 0,17	-0,59	-0,94^y	-0,56	-0,47	0,15
LDL (mmol/l)	0,10-3,34	3,09 ± 0,43	-0,02	0,23	0,47	0,55	0,35
Húgysav (mmol/l)	143-339	268,33 ± 39,22	0,46	0,54	0,31	0,22	0,32
⇒ GOT (U/L)	0-32	20,00 ± 2,58	-0,07	-0,54	-0,51	-0,46	0,90^x
⇒ GPT (U/L)	0-33	19,33 ± 3,76	0,52	0,11	-0,10	-0,12	0,87^x
⇒ GGT (U/L)	5-36	17,67 ± 3,43	0,83^x	0,65	-0,02	-0,12	0,61
ALP (U/L)	35-104	63,50 ± 7,98	0,44	0,79	0,62	0,53	-0,11
CK (U/L)	3-167	199,83 ± 63,06	0,31	0,38	-0,28	-0,30	0,70
CKMB (U/L)	0-25,0	13,65 ± 0,90	-0,33	-0,60	-0,54	-0,52	0,53
LDH (U/L)	240-480	281,33 ± 15,56	-0,32	-0,27	-0,46	-0,40	0,62
HBa1c (mmol/mol)	20-42	32,45 ± 0,85	0,76	0,19	-0,12	-0,21	0,68
HBa1c (%)	4,8-5,9	5,12 ± 0,08	0,72	0,16	-0,08	-0,17	0,70
NT-proBNP (pg/ml)	5-125	55,43 ± 7,47	-0,13	0,31	0,30	0,22	-0,81

4.2. Citotoxicitás vizsgálata impedimetriával

4.2.1. Humán endothelsejtekkel (HUVEC) végzett mérések

Első lépésként a három citotoxikus hatóanyag (doxorubicin, daunorubicin és methotrexate) hatását vizsgáltuk hét koncentráción (10^{-12} , 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L). (16. ábra) Rövidtávon a doxorubicin és a daunorubicin esetében a két legmagasabb koncentráción emelkedett impedancia értéket mértünk (DS: 0,063 és 0,037 a doxorubicin 10^{-6} és 10^{-7} mol/L esetében; 0,047 és 0,055 a daunorubicin 10^{-6} és 10^{-7} mol/L esetében). Hosszútávon ezzel ellentétesen, szignifikáns negatív hatást mértünk 10^{-6} mol/L koncentráción a doxorubicin (DS -0,086) a daunorubicin (DS -0,112) esetében. A methotrexate jóval kisebb mértékű hatással bírt az endothel sejtekre, hosszútávon a középső koncentrációtartományban (10^{-8} és 10^{-9} mol/L) szignifikánsan csökkentette a mért impedancia szintet (DS -0,022 és -0,017). Mivel ezekben az alpmérésekben a legjelentősebb hatásokat a magas koncentrációtartományban tapasztaltuk, további méréseink során ezeket a koncentrációkat vizsgáltuk (10^{-8} , 10^{-7} és 10^{-6} mol/L).

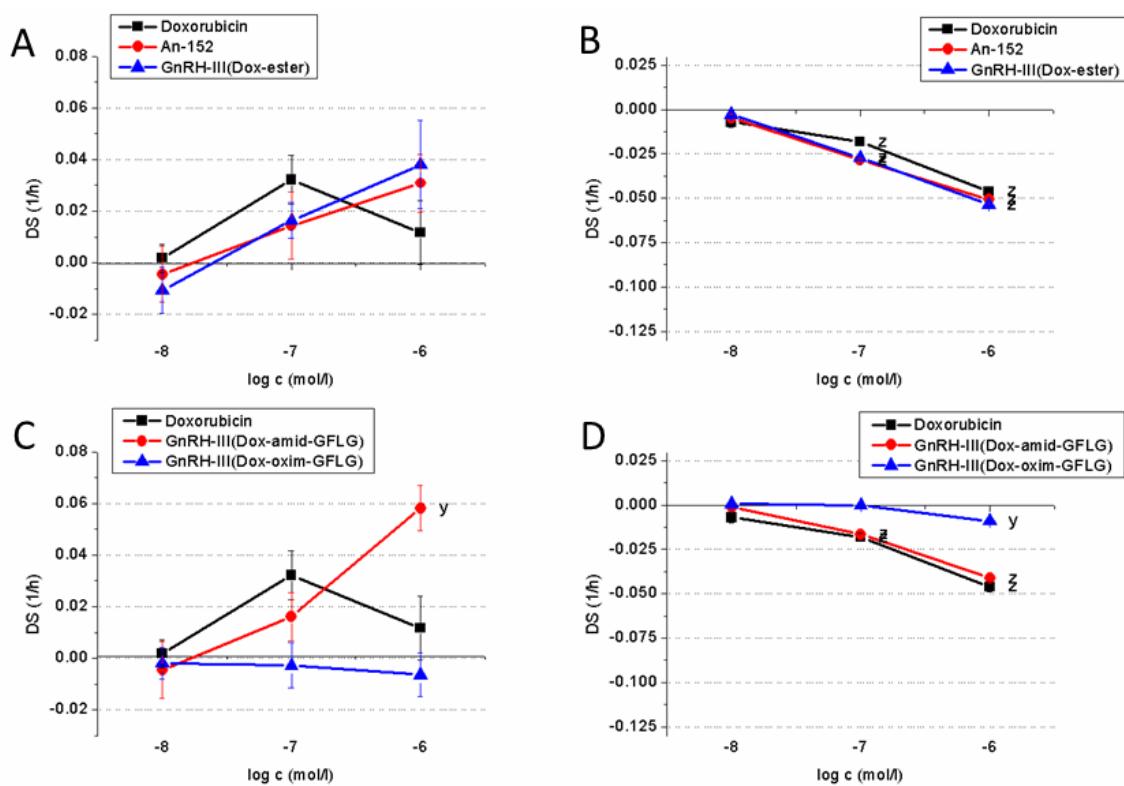


16. ábra – Doxorubicin, daunorubicin és methotrexate citotoxikus hatása HUVEC humán endothel sejteken.

A – rövidtávú hatások; B – hosszútávú hatások; log c: koncentráció (mol/L) 10 alapú logaritmusa, DS: Delta Slope (1/h); x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$, z: $p < 0,001$

További kísérleteinkben doxorubicin tartalmú konjugátumokat vizsgáltunk (17. ábra). Ezek során három doxorubicin tartalmú GnRH-III konjugátumot [GnRH-III(Dox-ester), GnRH-III(Dox-amid-GFLG), GnRH-III(Dox-oxim-GFLG)], és egy doxorubicin tartalmú GnRH-I konjugátumot (An-152) vizsgáltunk. A rövidtávú mérésekben csak egy

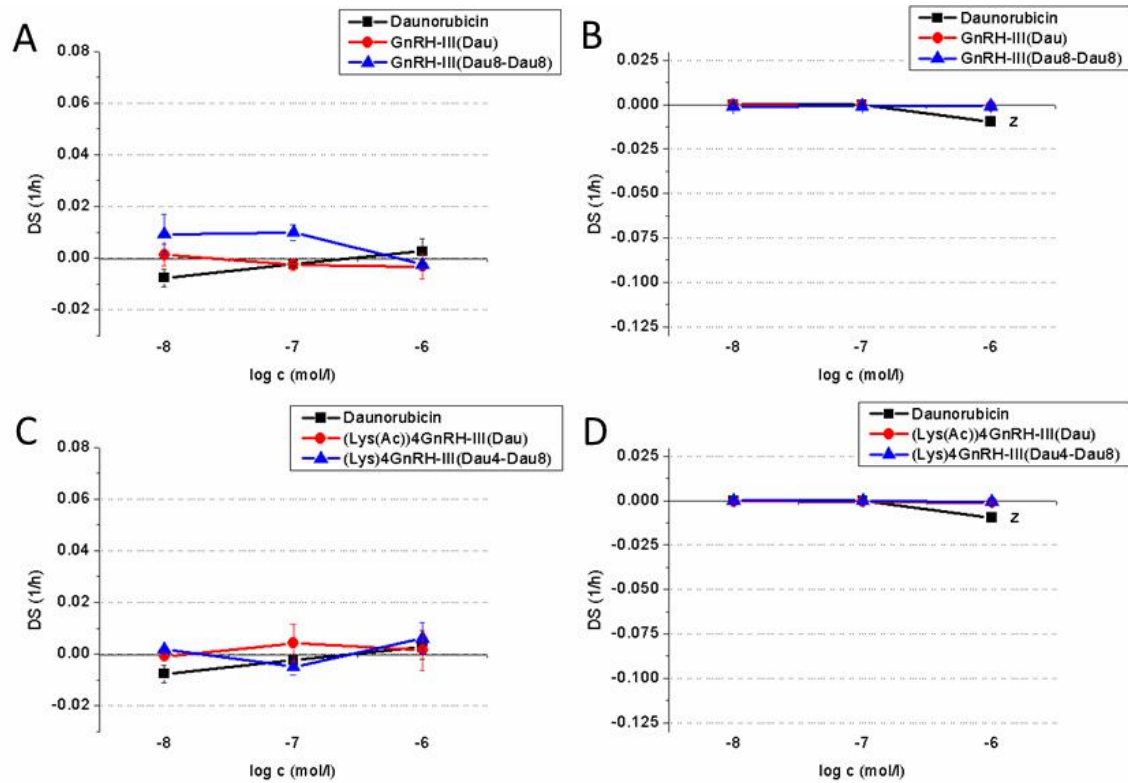
konjugátum, a GnRH-III(Dox-amid-GFLG) mutatott szignifikáns (pozitív) hatást 10^{-6} mol/L koncentráción (DS 0,058), de pozitív tendenciát tapasztaltunk az An-152 és a GnRH-III(Dox-ester) esetén is. Hosszútávon mind a négy vizsgált konjugátum a doxorubicinéhoz hasonló szignifikáns citotoxikus hatást mutatott az endothel sejteken. A doxorubicin 10^{-7} és 10^{-6} mol/L koncentráción (DS -0,018 és -0,046) volt citotoxikus, csakúgy mint az An-152 (DS -0,028 és -0,051), a GnRH-III(Dox-ester) (DS -0,027 és -0,054), a GnRH-III(Dox-amid-GFLG) (DS -0,017 és -0,041). A GnRH-III(Dox-oxim-GFLG) csak a legmagasabb koncentráción (10^{-6} mol/L) és sokkal kisebb mértékben (DS -0,009) mutatott citotoxikus hatást.



17. ábra – Doxorubicin és doxorubicin-GnRH konjugátumok [An-152, GnRH-III(Dox-ester), GnRH-III(Dox-amid-GFLG), GnRH-III(Dox-oxim-GFLG)] citotoxikus hatása HUVEC humán endothel sejteken.

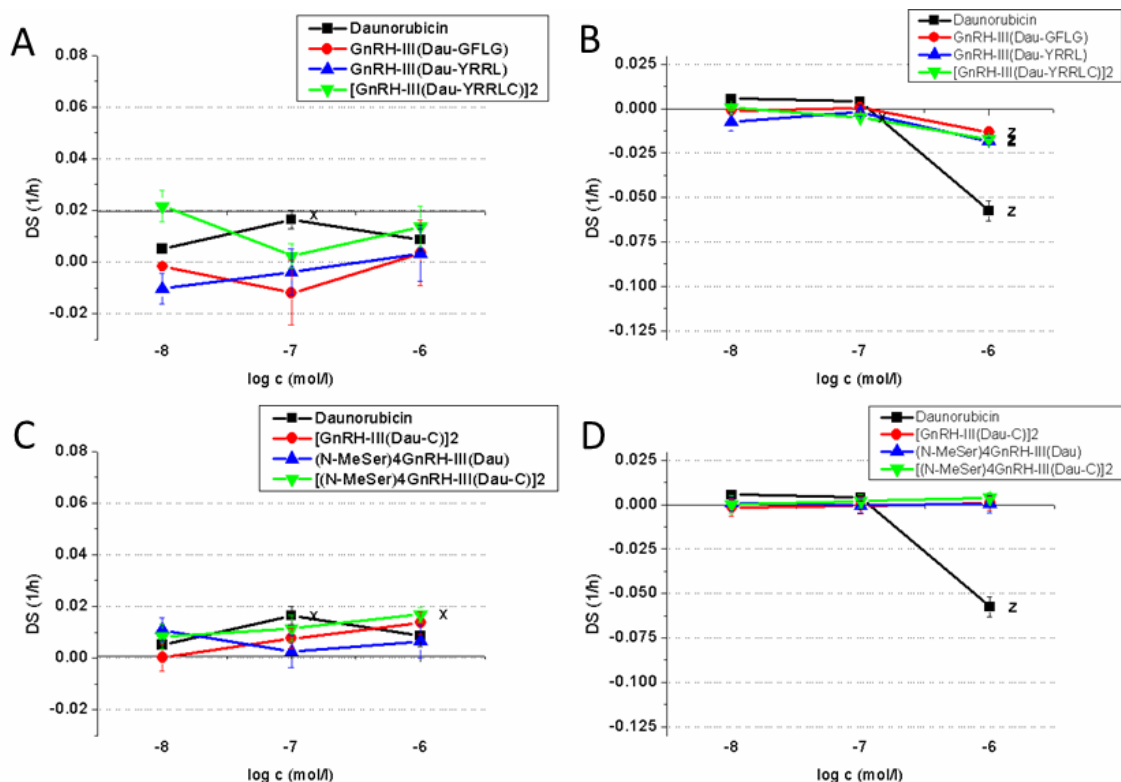
A, C – rövidtávú hatások; B, D – hosszútávú hatások; log c: koncentráció (mol/L) 10 alapú logaritmus, DS: Delta Slope (1/h); x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$, z: $p < 0,001$

A következő lépésben tíz daunorubicin tartalmú GnRH-III konjugátum citotoxikus hatását vizsgáltuk: GnRH-III(Dau), GnRH-III(Dau⁸-Dau⁸), (Lys(Ac))⁴GnRH-III(Dau), (Lys)⁴GnRH-III(Dau⁴-Dau⁸), GnRH-III(Dau-GFLG), GnRH-III(Dau-YRRL), [GnRH-III(Dau-YRRLC)]₂, [GnRH-III(Dau-C)]₂, (NMeSer)⁴GnRH-III(Dau), [(NMeSer)⁴GnRH-III(Dau-C)]₂. (18. és 19. ábrák) Ezek közül hét konjugátum - [GnRH-III(Dau), GnRH-III(Dau⁸-Dau⁸), (Lys(Ac))⁴GnRH-III(Dau), (Lys)⁴GnRH-III(Dau⁴-Dau⁸), [GnRH-III(Dau-C)]₂, (NMeSer)⁴GnRH-III(Dau), [(NMeSer)⁴GnRH-III(Dau-C)]₂] -, teljesen elveszítette a daunorubicin esetében meglévő citotoxikus hatását. Rövidtávon is csupán egy molekula, az [(N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau-C)]₂ váltott ki szignifikáns impedanciaemelkedést, 10⁻⁶ mol/L koncentráción (DS 0,017). A három oligopeptid távtartó („spacer”) szekvenciát tartalmazó molekula [GnRH-III(Dau-GFLG) (DS -0,013 10⁻⁶ mol/L koncentráción), GnRH-III(Dau-YRRL) (DS -0,018 10⁻⁶ mol/L koncentráción) és a dimer [GnRH-III(Dau-YRRLC)]₂ (DS -0,005 10⁻⁷ mol/L és -0,017 10⁻⁶ mol/L koncentráción)] szignifikáns negatív hatást mutatott, azonban ezek a citotoxikus hatások a daunorubicinénál kisebb mértékűek voltak.



18. ábra – Daunorubicin és daunorubicin-GnRH-III konjugátumok [GnRH-III(Dau), GnRH-III(Dau⁸-Dau⁸), (Lys(Ac))⁴GnRH-III(Dau), (Lys)⁴GnRH-III(Dau⁴-Dau⁸)] citotoxikus hatása HUVEC humán endothel sejteken.

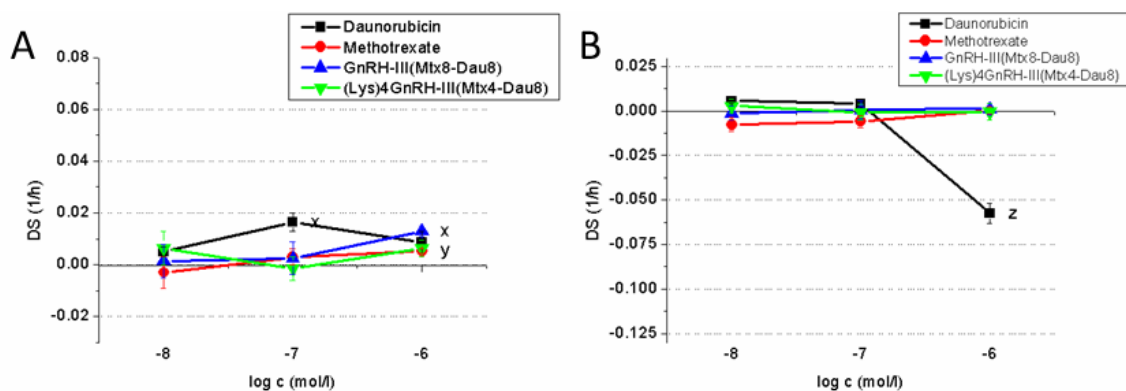
A, C – rövidtávú hatások; B, D – hosszútávú hatások; log c: koncentráció (mol/L) 10 alapú logaritmus, DS: Delta Slope (1/h); x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$, z: $p < 0,001$



19. ábra – Daunorubicin és daunorubicin-GnRH-III konjugátumok [GnRH-III(Dau-GFLG), GnRH-III(Dau-YRRL), [GnRH-III(Dau-YRRLC)]₂, [GnRH-III(Dau-C)]₂, (NMeSer)⁴GnRH-III(Dau), [(NMeSer)⁴GnRH-III(Dau-C)]₂ citotoxikus hatása HUVEC humán endothel sejteken.

A, C – rövidtávú hatások; B, D – hosszútávú hatások; log c: koncentráció (mol/L) 10 alapú logaritmusa, DS: Delta Slope (1/h); x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$, z: $p < 0,001$

A kettős hatóanyagtartalmú GnRH-III konjugátumok közül kettőt vizsgáltunk: GnRH-III(Mtx⁸-Dau⁸), (Lys)⁴GnRH-III(Mtx⁴-Dau⁸) (20. ábra). Rövidtávon a GnRH-III(Mtx⁸-Dau⁸) mellett emelkedett impedanciát mértünk a legmagasabb vizsgált koncentráción (10⁶ mol/L) (DS 0,013), azonban hosszútávon citotoxikus hatást nem tudtunk kimutatni. A másik vizsgált konjugátum, (Lys)⁴GnRH-III(Mtx⁴-Dau⁸), sem rövidtávon, sem hosszútávon nem volt szignifikáns hatással az endothelsejtekre.

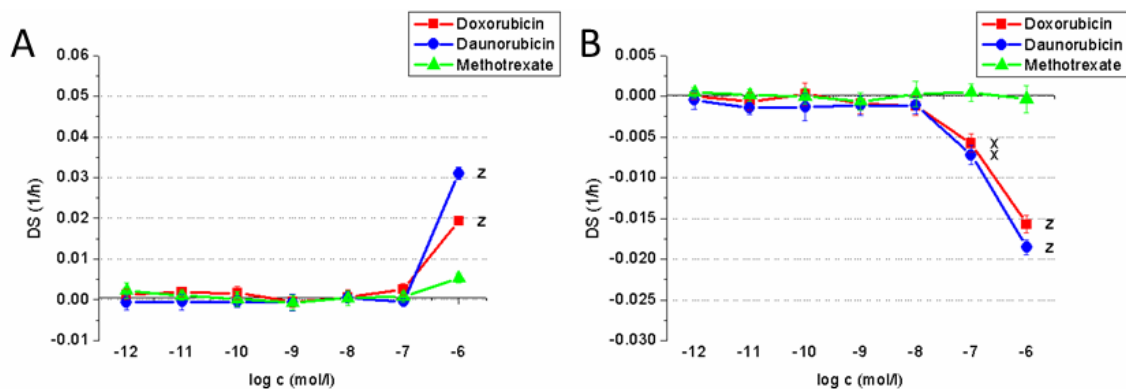


20. ábra – Daunorubicin, methotrexate és daunorubicin-methotrexate-GnRH-III konjugátumok [GnRH-III(Mtx⁸-Dau⁸), (Lys)⁴GnRH-III(Mtx⁴-Dau⁸)] citotoxikus hatása HUVEC humán endothel sejteken.

A, C – rövidtávú hatások; B, D – hosszútávú hatások; log c: koncentráció (mol/L) 10 alapú logaritmus, DS: Delta Slope (1/h); x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$, z: $p < 0,001$

4.2.2. Humán cardiomyocytákkal (HCM) végzett mérések

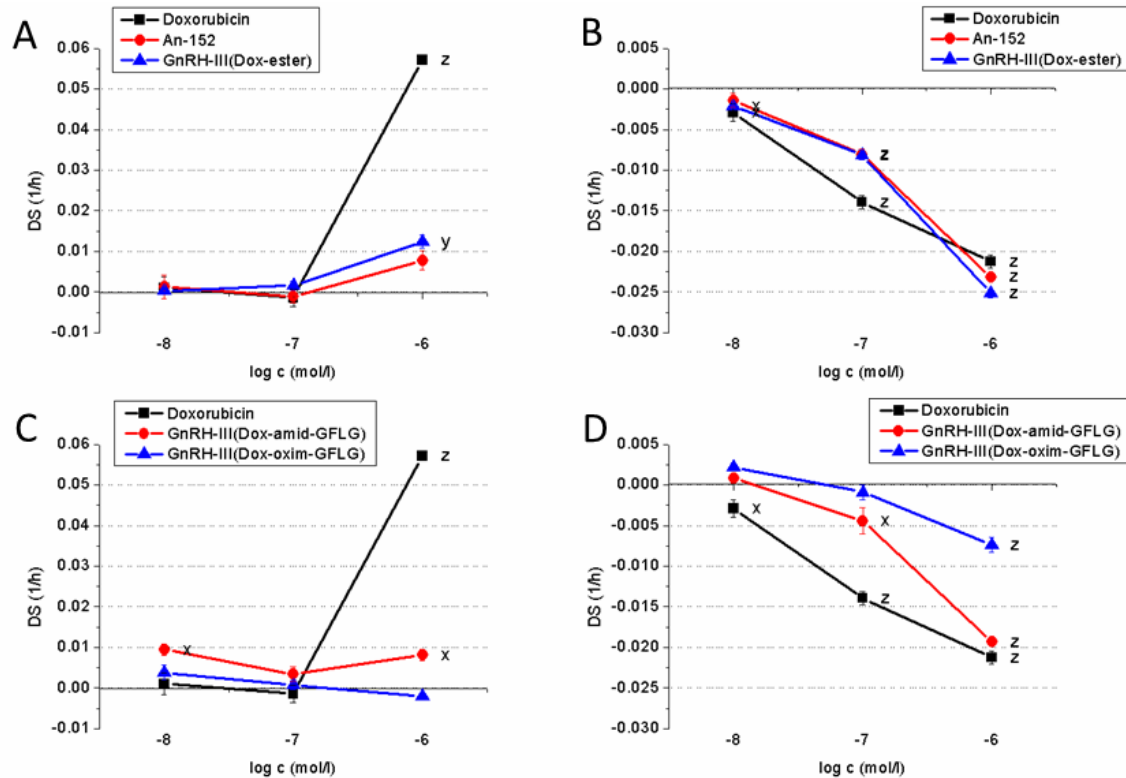
Cardiomyocytákkal végzett méréseink során első lépésben szintén a három alap citotoxikus gyógyszermolekula (doxorubicin, daunorubicin és methotrexate) citotoxikus hatását vizsgáltuk hét koncentráción (10^{-12} , 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L). (21. ábra) Ezekben a mérésekben a cardiomyocyták az endothel sejtekhez hasonló viselkedést mutattak. Rövidtávon mind a doxorubicin, mind a daunorubicin hatására szignifikánsan emelkedett impedancia szintet mértünk a legmagasabb, 10^{-6} mol/L koncentráción (DS 0,019 és 0,031). A hosszútávú mérés során mind a doxorubicin, mind a daunorubicin koncentrációfüggő citotoxikus hatást mutatott (DS -0,006 és -0,016 a 10^{-7} és 10^{-6} mol/L doxorubicin esetében, és DS -0,007 és -0,018 a 10^{-7} és 10^{-6} mol/L daunorubicin esetében). A methotrexate egyetlen vizsgált koncentráción, sem rövid-, sem hosszútávon nem mutatott szignifikáns hatást. Csakúgy, mint az endothel sejtek esetében, további méréseinkhez a három legmagasabb koncentrációt (10^{-8} , 10^{-7} és 10^{-6} mol/L) választottuk.



21. ábra – Doxorubicin, daunorubicin és methotrexate citotoxikus hatása HMC humán cardiomyocita sejteken.

A – rövidtávú hatások; B – hosszútávú hatások; log c: koncentráció (mol/L) 10 alapú logaritmus, DS: Delta Slope (1/h); x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$, z: $p < 0,001$

Következő lépésben a doxorubicin tartalmú konjugátumok citotoxikus hatását vizsgáltuk (22. ábra). A korábban vizsgált három doxorubicin tartalmú GnRH-III konjugátumot [GnRH-III(Dox-ester), GnRH-III(Dox-amid-GFLG), GnRH-III(Dox-oxim-GFLG)], és egy doxorubicin tartalmú GnRH-I konjugátumot (An-152) használtunk. A rövidtávú vizsgálatok során a doxorubicin által kiváltott impedancia emelkedést 10^{-6} mol/L koncentráción tapasztaltuk a GnRH-III(Dox-ester) esetén 10^{-6} mol/L koncentráción (DS 0,012) és a GnRH-III(Dox-amid-GFLG) esetén 10^{-8} mol/L és 10^{-6} mol/L koncentráción is (DS 0,009 és 0,008). A hosszútávú mérések során mind a négy vizsgált konjugátum citotoxikus hatást mutatott. Az An-152 10^{-7} és 10^{-6} mol/L koncentráción (DS -0,008 és -0,023), a GnRH-III(Dox-ester) pedig minden vizsgált (10^{-8} , 10^{-7} és 10^{-6} mol/L) koncentráción ((rendre DS -0,002, -0,008 és -0,025), a doxorubicinéhoz hasonló mértékben hatott. A GnRH-III(Dox-amid-GFLG) is 10^{-7} és 10^{-6} mol/L koncentrációkon mutatott citotoxikus hatást (DS -0,004 és -0,019), azonban az alacsonyabb koncentráción ez már a doxorubicinénál enyhébb hatás volt. Ennél is gyengébb, citotoxikus hatást tapasztaltunk a GnRH-III(Dox-oxim-GFLG) esetében, ahol csupán a legmagasabb, 10^{-6} mol/L koncentráción mértünk szignifikáns citotoxikus hatást (DS -0,007), a doxorubicinéhoz képest csekélyebb mértékűt.

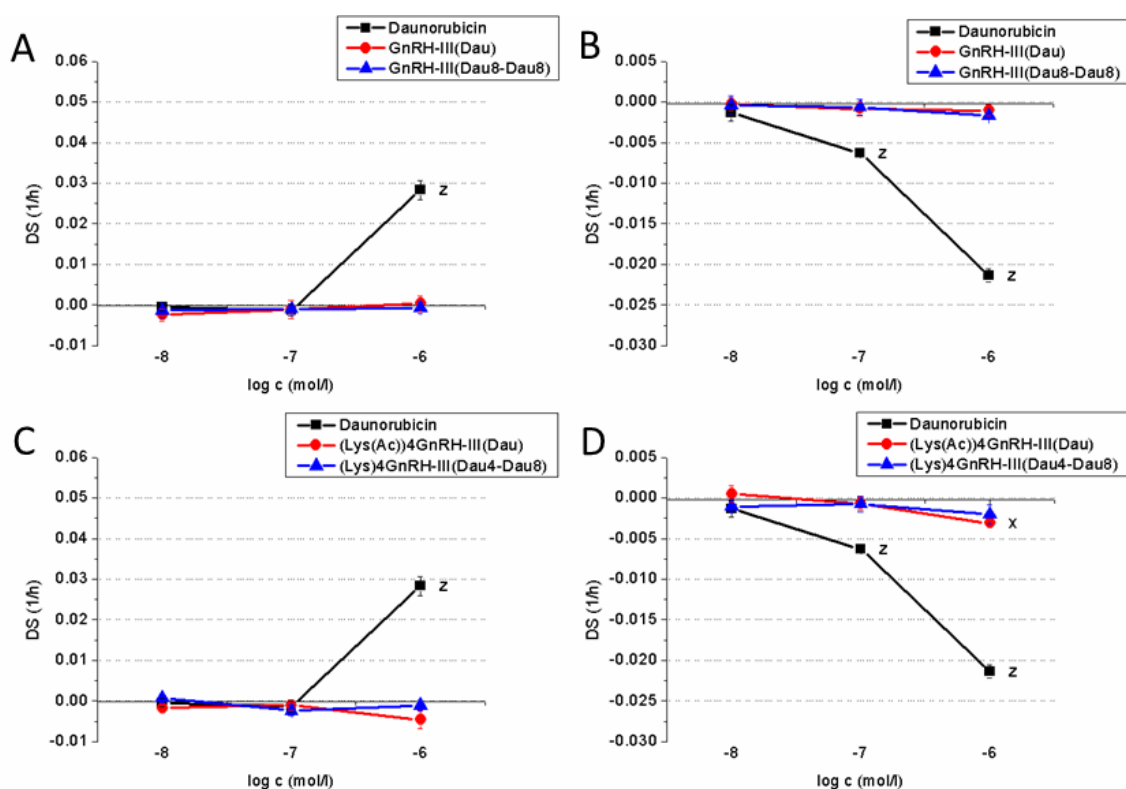


22. ábra – Doxorubicin és doxorubicin-GnRH konjugátumok [An-152, GnRH-III(Dox-ester), GnRH-III(Dox-amid-GFLG), GnRH-III(Dox-oxim-GFLG)] citotoxikus hatása HCM humán cardiomyocytá sejtken.

A, C – rövidtávú hatások; B, D – hosszútávú hatások; log c: koncentráció (mol/L) 10 alapú logaritmus; DS: Delta Slope (1/h); x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$, z: $p < 0,001$

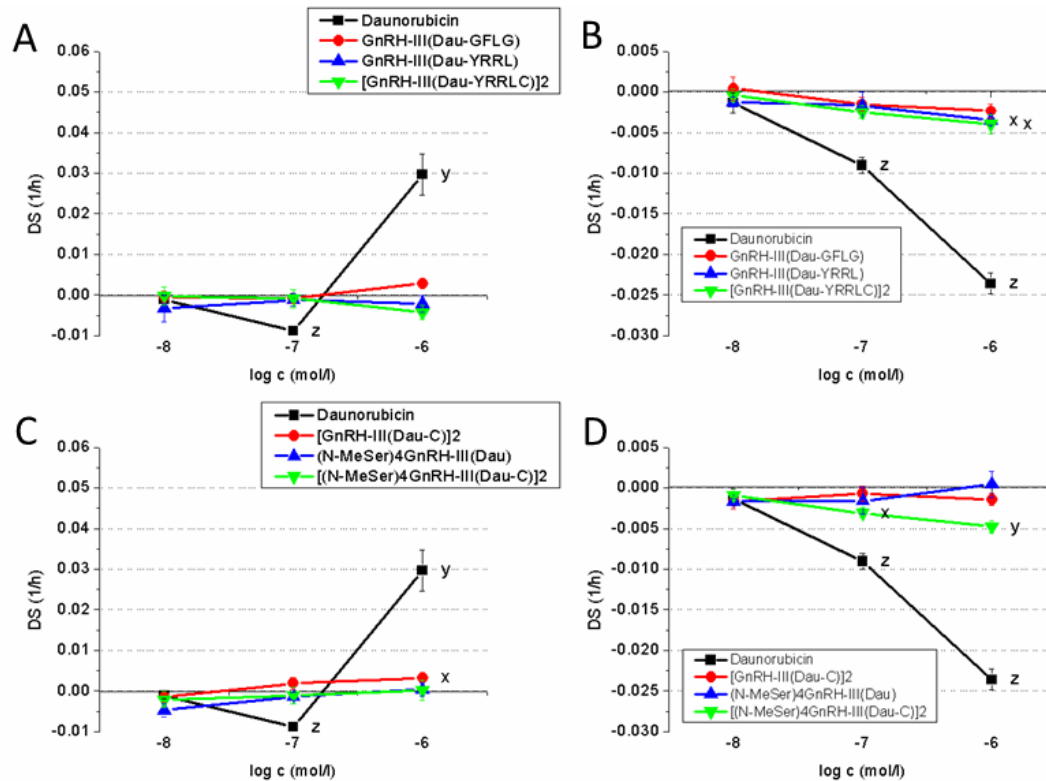
A továbbiakban tíz daunorubicin tartalmú GnRH-III konjugátumot vizsgáltunk: GnRH-III(Dau), GnRH-III(Dau⁸-Dau⁸), (Lys(Ac))⁴GnRH-III(Dau), (Lys)⁴GnRH-III(Dau⁴-Dau⁸), GnRH-III(Dau-GFLG), GnRH-III(Dau-YRRL), [GnRH-III(Dau-YRRLC)]₂, [GnRH-III(Dau-C)]₂, (NMeSer)⁴GnRH-III(Dau), [(NMeSer)⁴GnRH-III(Dau-C)]₂. (23., 24. ábra) A rövidtávú mérések során csupán egy molekula, a [GnRH-III(Dau-C)]₂ váltott ki szignifikáns hatást, a 10⁻⁶ mol/L koncentráción fokozta a mért impedanciát (DS 0,003). A hosszútávú mérések során a vizsgált GnRH-III konjugátumok közül hat [GnRH-III(Dau), GnRH-III(Dau⁸-Dau⁸), (Lys)⁴GnRH-III(Dau⁴-Dau⁸), GnRH-III(Dau-GFLG), [GnRH-III(Dau-C)]₂ és (N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau)] teljesen elveszítette a daunorubicinnál tapasztalt citotoxikus hatást. Három gyógyszermolekula, a (Lys)⁴GnRH-

III(Dau⁴-Dau⁸), GnRH-III(Dau-YRRL) és [GnRH-III(Dau-YRRLC)]₂ a szignifikáns citotoxikus hatást a legmagasabb vizsgált koncentráción (10⁻⁶ mol/L) (DS -0,003, -0,003 és -0,004) mutatta, míg egy konjugátum, [(N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau-C)]₂, 10⁻⁷ mol/L és 10⁻⁶ mol/L koncentráción is szignifikáns citotoxikus hatást váltott ki (DS -0,003 és -0,005). Lényeges különbség azonban, hogy az ez által a négy daunorubicin tartalmú GnRH-III konjugátum által kiváltott citotoxikus hatás a daunorubicinénál lényegesen kisebb mértékű, gyakorlatilag egy nagyságrenddel gyengébb volt.



23. ábra – Daunorubicin és daunorubicin-GnRH-III konjugátumok [GnRH-III(Dau), GnRH-III(Dau⁸-Dau⁸), (Lys(Ac))⁴GnRH-III(Dau), (Lys)⁴GnRH-III(Dau⁴-Dau⁸)] citotoxikus hatása HCM humán cardiomyocytá sejteken.

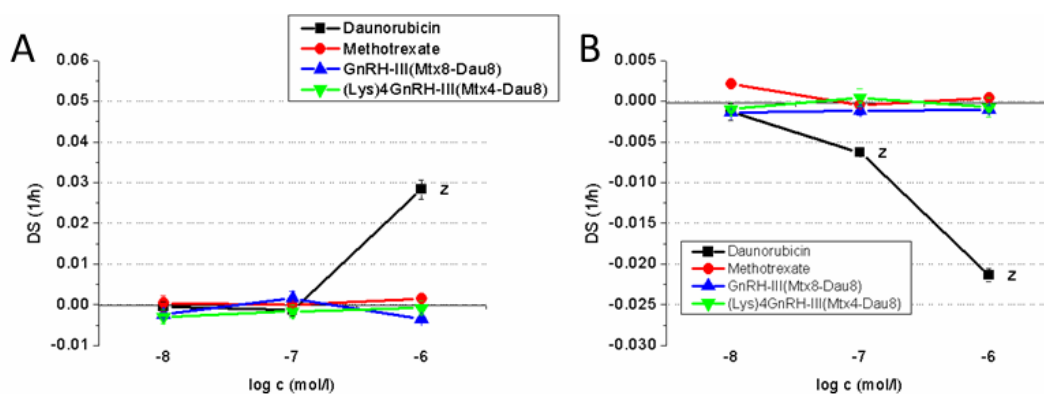
A, C – rövidtávú hatások; B, D – hosszútávú hatások; log c: koncentráció (mol/L) 10 alapú logaritmusa, DS: Delta Slope (1/h); x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$, z: $p < 0,001$



24. ábra – Daunorubicin és daunorubicin-GnRH-III konjugátumok [GnRH-III(Dau-GFLG), GnRH-III(Dau-YRRL), [GnRH-III(Dau-YRRLC)]₂, [GnRH-III(Dau-C)]₂, (NMeSer)⁴GnRH-III(Dau), [(NMeSer)⁴GnRH-III(Dau-C)]₂] citotoxikus hatása HCM humán cardiomyocytá sejtéken.

A, C – rövidtávú hatások; B, D – hosszútávú hatások; log c: koncentráció (mol/L) 10 alapú logaritmus, DS: Delta Slope (1/h); x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$, z: $p < 0,001$

Végezetül a két különböző hatóanyagot is (daunorubicint és methotrexate-ot) tartalmazó két GnRH-III konjugátumot [GnRH-III(Mtx⁸-Dau⁸), (Lys)⁴GnRH-III(Mtx⁴-Dau⁸)] vizsgáltuk (25. ábra). Itt egyik vizsgált molekula sem mutatott citotoxikus hatást, ez megegyezett a methotrexate esetében tapasztaltakkal, és ellentétes volt a daunorubicin esetében mért erős citotoxikus hatással.



25. ábra – Daunorubicin, methotrexate és daunorubicin-methotrexate-GnRH-III konjugátumok [GnRH-III(Mtx⁸-Dau⁸), (Lys)⁴GnRH-III(Mtx⁴-Dau⁸)] citotoxikus hatása HCM humán cardiomyocytá sejteken.

A, C – rövidtávú hatások; B, D – hosszútávú hatások; log c: koncentráció (mol/L) 10 alapú logaritmus, DS: Delta Slope (1/h); x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$, z: $p < 0,001$

4.3. Decellularizált sertésszív váz homogenizátum adhéziós tulajdonságainak vizsgálata impedimetriával

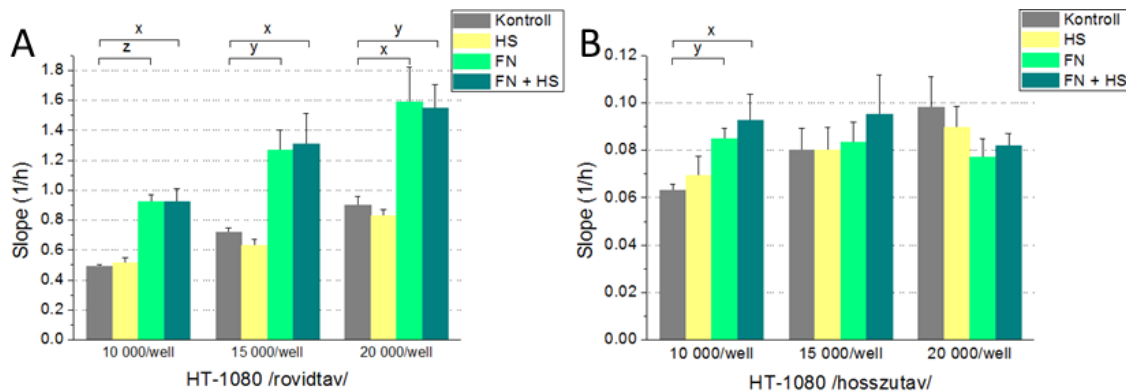
Az eredmények során a rövidtávú és hosszútávú mérésekre vonatkozó időintervallumokat az első mérési ponthoz viszonyítva („Delta Time”) adjuk meg. A kiértékeléshez használt időintervallumok (Time Interval, TI) óra:perc formátumban vannak megadva. Mivel az egyes sejtvonalak adhéziós dinamikája egymástól eltér, az időintervallumok az egyes sejtvonalak között különbözőek.

4.3.1. Sejt – ECM kapcsolat jellemzése monolayer rendszerekben

Első lépésben egy ismertően jó adhéziós tulajdonságokkal rendelkező sejtvonalat, a HT-1080 fibrosarcoma sejtvonalat vizsgáltuk (26. ábra). Rövidtávú (TI: 0:00–1:21) méréseink során a fibrosarcoma sejtek sejt számtól függő mértékű, erős adhéziót mutattak mindhárom vizsgált sejt számon; ezt a hatást a homogenizált szív vázból származó kivonattal történő fedés nem befolyásolta (10 000/well – Kontroll $0,492 \pm 0,012$ vs. HS $0,514 \pm 0,034$; 15 000/well – Kontroll $0,721 \pm 0,029$ vs. HS $0,634 \pm 0,040$; 20 000/well – Kontroll $0,900 \pm 0,057$ vs. HS $0,831 \pm 0,037$). A sejtadhéziós vizsgálatok referencia

anyagának tekintett fibronektin kifejezetten fokozta ugyanezen sejtek letapadását, mindhárom vizsgálat sejtszámon szignifikáns pozitív hatást mértünk (10 000/well – FN $0,923 \pm 0,044$, $p < 0,001$; 15 000/well – FN $1,267 \pm 0,137$, $p = 0,008$; 20 000/well – FN $1,591 \pm 0,233$, $p = 0,03$). Hasonlóan szignifikáns pozitív hatással bírt a fibrosarcoma sejtek adhéziójára a fibronektin és homogenizált szívíváz keveréke, mely arányaiban a fibronektin hatásától nem különbözött jelentősen (10 000/well – FN + HS $0,925 \pm 0,083$, $p = 0,002$; 15 000/well – FN + HS $1,309 \pm 0,203$, $p = 0,03$; 20 000/well – FN + HS $1,545 \pm 0,162$, $p = 0,009$).

Hosszútávon (TI: 2:54–31:00) a kialakult hatások nem változtak szignifikánsan. 10 000/well sejtszám esetén a fibronektin, illetve fibronektin és homogenizált szívíváz keverék fedés mellett további szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a fibrosarcoma sejtek adhéziójában (Kontroll $0,063 \pm 0,002$ vs. FN $0,085 \pm 0,004$, $p = 0,004$, valamint Kontroll $0,063 \pm 0,002$ vs. FN + HS $0,092 \pm 0,011$, $p = 0,04$)



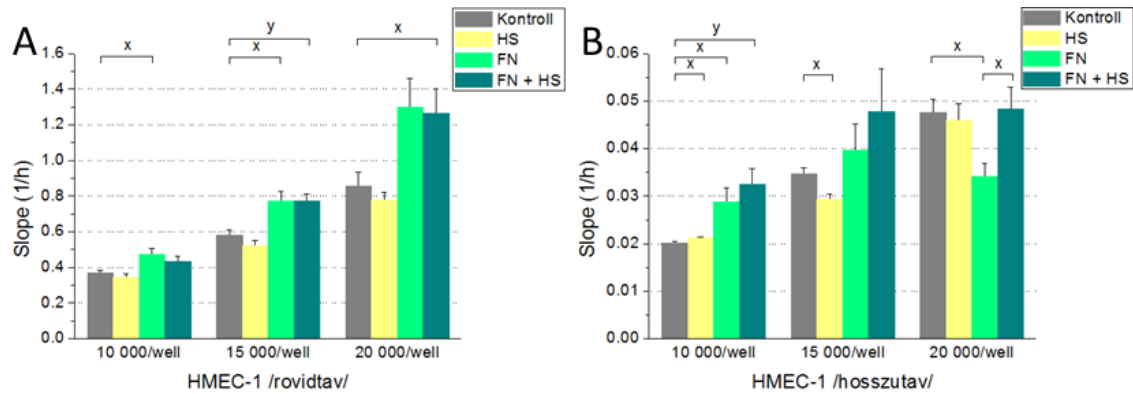
26. ábra – Decellularizált szívíváz homogenizátum és fibronektin elektródafedések hatása HT-1080 humán fibrosarcoma sejtek adhéziójára.

A – rövidtávú hatások; B – hosszútávú hatások; HS: decellularizált szívíváz homogenizátum, FN: fibronektin, FN + HS: fibronektin és decellularizált szívíváz homogenizátum keveréke; x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$, z: $p < 0,001$

További méréseink során a HMEC-1 endothel sejtvonal adhézióját vizsgáltuk (27. ábra). Csakúgy, mint a fibrosarcoma sejtek, az endothel sejtek esetében is már rövidtávon (TI: 0:00–2:25) is sejtszámfüggő, jó adhéziót tapasztaltunk, melyet a szívíváz homogenizátummal való fedés már nem befolyásolt szignifikánsan (10 000/well –

Kontroll $0,369 \pm 0,016$ vs. HS $0,347 \pm 0,019$; 15 000/well – Kontroll $0,581 \pm 0,031$ vs. HS $0,520 \pm 0,032$; 20 000/well – Kontroll $0,856 \pm 0,080$ vs. HS $0,780 \pm 0,042$). A fibronectin a két alacsonyabb vizsgált sejtszámon szignifikánsan fokozta az endothel sejtek adhézióját (10 000/well – FN $0,473 \pm 0,033$, $p = 0,03$; 15 000/well – FN $0,770 \pm 0,056$, $p = 0,03$), míg a legmagasabb vizsgált sejtszámon (20 000/well) ilyen hatást nem tudunk kimutatni. Ezzel ellentétben a fibronectin és a homogenizált szívíváz keveréke (a fibronectintől nem különböző mértékben) a két magasabb sejtszámon mutatott szignifikáns adhéziót fokozó hatást (15 000/well – FN + HS $0,772 \pm 0,040$, $p = 0,009$; 20 000/well – FN + HS $1,263 \pm 0,138$, $p = 0,04$), míg a legalacsonyabb (10 000/well) sejtszámon szignifikáns eltérést nem mértünk.

Hosszútávon (TI: 07:06–47:45) a legalacsonyabb, 10 000/well sejtszámon a homogenizált szívíváz kis mértékben, de szignifikánsan fokozta az endothel sejtek adhézióját (Kontroll $0,020 \pm 0,0004$ vs. HS $0,021 \pm 0,0001$, $p = 0,03$), továbbá, tendenciaszerűen egyre nagyobb mértékben, szignifikánsan tovább fokozta a sejtadhéziót a fibronectin és az előzőek keveréke is (FN $0,029 \pm 0,003$, $p = 0,03$; FN + HS $0,033 \pm 0,003$, $p = 0,009$). A középső, 15 000/well sejtszámon az endothelsejtek adhéziójának gyenge, de szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető a szívíváz homogenizátum mellett (Kontroll $0,035 \pm 0,001$ vs. HS $0,029 \pm 0,001$, $p = 0,03$), míg a fibronectin és a keverék fedőréteg esetén csak pozitív tendenciákat mértünk (FN $0,040 \pm 0,006$; FN + HS $0,048 \pm 0,009$). A legmagasabb, 20 000/well sejtszámon a fibronectin szignifikáns adhéziócsökkentő hatást mutatott (Kontroll $0,048 \pm 0,003$ vs. FN $0,034 \pm 0,003$, $p = 0,014$), melyet a szívíváz homogenizátum fibronectinhez történt hozzáadása gyakorlatilag teljesen visszafordított (FN + HS $0,048 \pm 0,005$, $p = 0,04$).

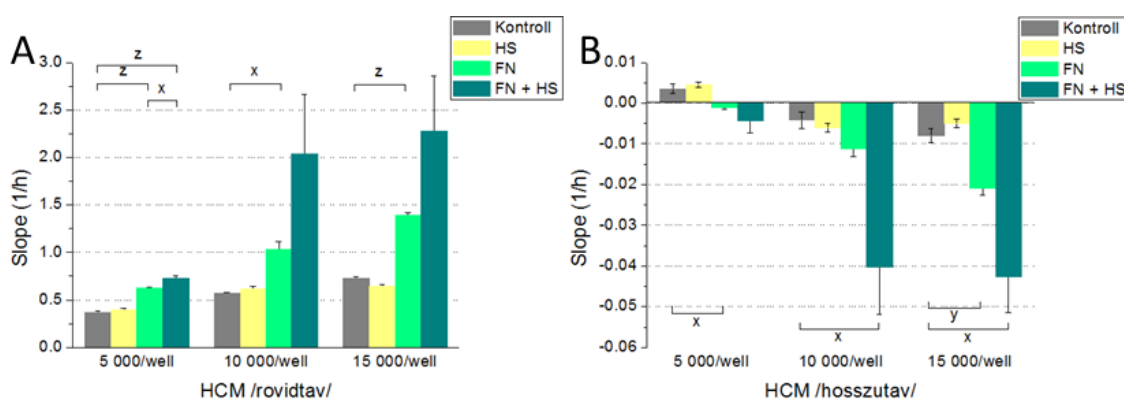


27. ábra – Decellularizált szívíváz homogenizátum és fibronektin elektródafedések hatása HMEC-1 humán endothel sejtek adhézíójára.

A – rövidtávú hatások; B – hosszútávú hatások; HS: decellularizált szívíváz homogenizátum, FN: fibronektin, FN + HS: fibronektin és decellularizált szívíváz homogenizátum keveréke; x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$, z: $p < 0,001$

A HCM sejtvonallal végzett kísérleteink során a cardiomyocyták erős, sejtszámfüggő sejtdhézíót mutattak az impedimetriás mérési összeállításban (28. ábra), melyet a rövidtávú (TI: 00:05–01:09) mérések során a szívíváz homogenizátum nem befolyásolt szignifikánsan (5000/well – Kontroll $0,368 \pm 0,016$ vs. HS $0,390 \pm 0,025$; 10 000/well – Kontroll $0,571 \pm 0,009$ vs. HS $0,613 \pm 0,031$; 15 000/well – Kontroll $0,724 \pm 0,025$ vs. HS $0,640 \pm 0,022$). A fibronektin fedés ezen vizsgált sejtípusnál is szignifikánsan fokozta a sejtdhézíót minden vizsgált sejtszámon (5000/well – FN $0,627 \pm 0,010$, $p < 0,001$; 10 000/well – FN $1,032 \pm 0,082$, $p = 0,02$; 15 000/well – FN $1,394 \pm 0,021$, $p < 0,001$). A szívíváz homogenizátum fibronektinhez való adása tovább fokozta a cardiomyocyták adhézíóját, szignifikánsan az 5 000/well sejtszámon (FN + HS $0,731 \pm 0,026$, $p < 0,001$), és tendenciaszerűen a két magasabb sejtszámon (10 000/well – FN + HS $2,035 \pm 0,630$; 15 000/well – FN + HS $2,278 \pm 0,583$). Ez a pozitív hatás az egyedüli, fibronektinnel való fedéshez képest is mérhető volt, szignifikánsan 5 000/well sejtszámon (FN $0,627 \pm 0,010$ vs. FN + HS $0,731 \pm 0,026$, $p = 0,02$) és tendenciaszerűen a két magasabb sejtszámon (10 000/well – FN $1,032 \pm 0,082$ vs. FN + HS $2,035 \pm 0,630$; 15 000/well – FN $1,394 \pm 0,021$ vs. FN + HS $2,278 \pm 0,583$).

Hosszútávon (TI: 07:52–24:00) a cardiomyocyták adhéziós tevékenységének bizonyos mértékű visszaesése volt mérhető. A kontrollhoz viszonyítva a fibronektin esetében szignifikáns adhéziócsökkenés volt mérhető 5000/well és 15 000/well sejtszámon (5000/well – Kontroll $0,004 \pm 0,001$ vs. FN $-0,001 \pm 0,0004$, $p = 0,02$; 15 000/well – Kontroll $-0,008 \pm 0,002$ vs. FN $-0,021 \pm 0,002$, $p = 0,006$), csakúgy mint a keverék fedőréteg esetén 10 000/well és 15 000/well sejtszámon (10 000/well – Kontroll $-0,004 \pm 0,002$ vs. FN + HS $-0,040 \pm 0,012$, $p = 0,04$; 15 000/well – Kontroll $-0,008 \pm 0,002$ vs. FN + HS $-0,043 \pm 0,009$, $p = 0,02$)



28. ábra – Decellularizált szívvez homogenizátum és fibronektin elektródafedések hatása HCM humán cardiomyocytá sejt adhéziójára.

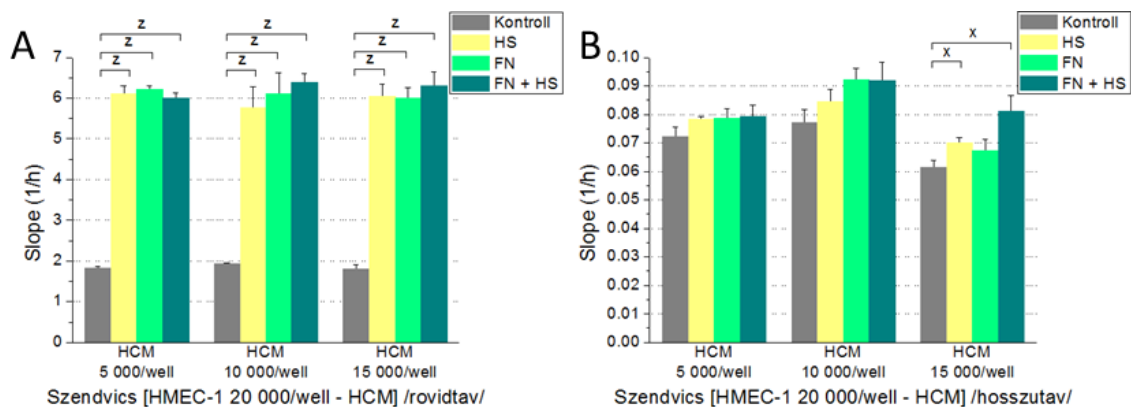
A – rövidtávú hatások; B – hosszútávú hatások; HS: decellularizált szívvez homogenizátum, FN: fibronektin, FN + HS: fibronektin és decellularizált szívvez homogenizátum keveréke; x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$, z: $p < 0,001$

4.3.2. Kísérlet „szendvics” elrendeződésű sejtrétegekkel

A „szendvics”-kísérlet során az elektróda-hálózatra előzetesen kiültetett endothel-sejtréteget kezeltük különböző adhéziót befolyásoló anyagokkal, majd erre ültettük rá a cardiomyocytá sejtréteget és mértük az adhéziót (29. ábra). A rövidtávú (TI: 00:00–00:23) mérés során a cardiomyocyták minden vizsgált sejtszámon erősen kitapadtak az endothel sejtréteghez, és ezt az adhéziót tovább fokozta a homogenizált szívvezaló kezelés (5000/well – Kontroll $1,815 \pm 0,043$ vs. HS $6,104 \pm 0,192$, $p < 0,001$; 10 000/well – Kontroll $1,943 \pm 0,019$ vs. HS $5,774 \pm 0,506$, $p < 0,001$; 15 000/well – Kontroll $1,794 \pm 0,120$ vs. HS $6,048 \pm 0,299$, $p < 0,001$). A fibronektin – az előző mérésekhez hasonlóan

– szintén szignifikánsan fokozta a cardiomyocyták adhézióját, ebben az összállításban minden vizsgált sejtszámon (5000/well – FN $6,215 \pm 0,095$, $p < 0,001$; 10 000/well – FN $6,107 \pm 0,520$, $p < 0,001$; 15 000/well – FN $6,001 \pm 0,258$, $p < 0,001$). A fibronektin és a szívíváz homogenizátum keveréke az előző eredményeknek megfelelően szintén erős adhéziófokozó hatást mutatott minden vizsgált sejtszámon (5000/well – FN + HS $6,006 \pm 0,115$, $p < 0,001$; 10 000/well – FN + HS $6,391 \pm 0,208$, $p < 0,001$; 15 000/well – FN + HS $6,297 \pm 0,344$, $p < 0,001$). Nem volt azonban különbség a fibronektines és homogenizátumos, illetve az azok keverékével történő kezelés adhéziót fokozó hatásának mértékében.

A hosszútávú (TI: 17:01–66:00) mérés azt mutatta, hogy az előbb bemutatott hatások tartósan bizonyulnak. A legmagasabb, 15 000/well cardiomyocyta sejtszám esetén a szívíváz homogenizátum önmagában tovább fokozta a kiváltott cardiomyocyta-adhéziót a kontrollhoz képest (Kontroll $0,061 \pm 0,003$ vs. HS $0,070 \pm 0,002$, $p = 0,03$) és fibronektinnel való keverékben is (Kontroll $0,061 \pm 0,003$ vs. FN + HS $0,081 \pm 0,006$, $p = 0,02$).



29. ábra – „Szendvics” kísérlet: Decellularizált szívíváz homogenizátum és fibronektin fedő kezelésekre HCM humán cardiomyocyta sejtek HMEC-1 humán endothel sejt monolayer-hez való adhéziójára.

A – rövidtávú hatások; B – hosszútávú hatások; HS: decellularizált szívíváz homogenizátum, FN: fibronektin, FN + HS: fibronektin és decellularizált szívíváz homogenizátum keveréke; x: $p < 0,05$, y: $p < 0,01$, z: $p < 0,001$

5. Megbeszélés

5.1. Thrombocyta

A thrombocyta-funkció vizsgálata elengedhetetlen a különböző kardiovaszkuláris és hematológiai kórképek diagnosztikájában, illetve a hemosztázist befolyásoló, thrombocyta-aggregációt gátló terápiák hatásának követésében. Bár számos módszer létezik a hemosztázis és a thrombocyta-aggregáció vizsgálatára, kellően standardizált, szenzitív és specifikus módszer még mindig nem áll rendelkezésre, továbbá, nincs elfogadott mérési módszer a thrombocyta-adhézió izolált mérésére. (131)

Az xCELLigence rendszer az adhézió valós idejű mérésére alkalmas sejtbiológiai vizsgáló technika. Számos eredmény mutatja alkalmasságát az adhézió sejtszintű vizsgálatára, azonban thrombocyta-adhézió vizsgálatára mindezidáig nem írtak le impedimetriás méréseken alapuló eredményeket. A thrombocyták nem valódi sejtek, hanem sejtfragmentumok, sejtekhez képest hiányos sejtalkotókkal, valamint nagyságrendekkel kisebb mérettel is rendelkeznek. Ezek miatt a thrombocyták adhéziójának vizsgálatára egy nagy érzékenységgű vizsgálómódszerre van szükség. Az xCELLigence rendszer impedancia alapú adhéziómérése ezeknek a követelményeknek megfelelt. A letapadó thrombocyták által generált impedanciajel, bár a sejtekéhez képest arányosan kisebb mértékben, de jól detektálható és mérhető volt a készülék által, sőt, a műszer segítségével a különböző thrombocyta-számú minták is jól elkülöníthetőek voltak egymástól. (13. ábra) Bár a híguló vérplazma okozta hatások nem zárhatók ki teljesen, kétségtelen a különböző thrombocyta-szám hatása. A különböző minták eltérő dinamikájú impedanciaemelkedést hoztak létre az elektródákon. Az agonisták hatásainak megfelelő vizsgálatához, ahogy az Eredmények pontban tárgyaltuk, a PRP 1:10 arányú hígítása a legalkalmasabb az impedimetriai mérések során.

5.1.1. Thrombocyta-adhézió és -spreading – impedimetriai mérések

A thrombocyták adhéziója, illetve spreading tevékenysége két olyan folyamat, melyek a thrombocyta funkció lényeges elemei, de ezeket egymástól teljesen elválasztani szinte lehetetlen. Azonban két különböző impedimetriai mérési összeállítás használatával, a folyamat különböző aspektusait vizsgálva, differenciálni tudtunk e két folyamat között.

Az adrenalin, ADP és kollagén számos thrombocyta-funkciós teszt során alkalmazott referencia agonisták. (46) Méréseink során ezeket az agonistákat használtuk a thrombocyta-adhézió és -spreading vizsgálatára.

Az adrenalin és az ADP is gyenge thrombocyta agonista. Impedimetriai mérés során mindkét agonista hatása kimutatható volt: egészséges egyénektől származó thrombocyta-mintákon koncentrációfüggő módon fokozták a mért thrombocyta-adhéziót. Az ADP hasonló koncentrációfüggő módon fokozta a thrombocyták spreading tevékenységét, azonban az adrenalin nem befolyásolta az elektródákhoz már kitapadt thrombocyták kiterülését. Elmondható tehát, hogy az impedimetria segítségével a thrombocyta-adhézió és -spreading, ez két, egymással szorosan összefüggő folyamat, elkülöníthető volt egymástól.

A kollagén egy erős thrombocyta-agonistának számít. Érdekes módon, az impedimetriai mérések során a kollagént használva a thrombocyta-adhézió esetében jobbra negatív hatást mértünk. Erre az ellentmondásosnak tűnő eredményre két különböző magyarázat is felvázolható. Egyrészt nem kizárt, hogy figyelembe kell venni a von Willebrand faktor (vWf) szerepét a thrombocyták indirekt kollagénkötésében. A plazma vWf-szint normál tartománya 50-200 NE/dL közé esik – a 20 NE/dL alatti plazma vWf-szint esetén az esetek nagy részében fokozott vérzékenységgel járó egyes típusú von Willebrand-betegség áll a háttérben. (142) Nem kizárható, hogy thrombocyta-minta fiziológiás sóoldattal történő hígítása során annak vWf-szintje olyan alacsony szintre csökkent, hogy nem volt elégséges a kollagén hatásának kialakulásához, ezért mértünk a vártnál alacsonyabb impedancia szintet.

Egy másik lehetséges magyarázat ezekre az eredményekre a thrombocyták felszínén található direkt kollagénreceptorok szerepe. A thrombocyták felszínén két direkt kollagénreceptor is található, a glykoprotein VI (GP VI) és az integrin $\alpha 2\beta 1$. Ezek a felszíni receptorok nem igényelnek vWf-et a kollagénhez való kötődéshez, mitöbb, a GP VI-nak jelentős szerepe van a thrombocyták aktivációjában is. Az erős thrombocyta-agonista kollagént hasonló koncentrációban alkalmaztuk méréseink során, mint az a fotometriás thrombocyta-aggregometria esetén megszokott. (143) Elképzelhető, hogy – annak ellenére, hogy a fiziológiás sóoldattal alacsonyabb thrombocyta-számot hoztunk létre a mintákban – a thrombocytákhoz adott kollagén aggregációt váltott ki. A

thrombocytá-aggregátumok felülete összességében sokkal kisebb, mint az egyes letapadó thrombocyták összeadott felülete – ez pedig magyarázattal szolgál az alacsonyabb mért Sejtindexre. Hasonló jelenséget figyeltünk meg, amikor az elektródákra már letapadt thrombocytákhoz adtuk hozzá a kollagént: alacsonyabb impedanciaszintet mértünk, mely megfelel annak, amire aggregáció végbemenetele esetén számítunk.

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

A legtöbb impedimetriás görbén egy kezdeti felszálló szakaszt, valamint egy azt követő leszálló szakaszt figyeltünk meg. Ahogy az előbbieken tárgyaltuk, a kezdeti felszálló szakasz mutatja az adhézió vagy a spreading fázisát. A leszálló szakasz ezzel szemben többféle tevékenység eredménye is lehet: lehetséges, hogy az előbb végbement folyamatok leépülését, azok visszafordíthatóságát jelzi, de az sem kizárt, hogy valójában a thrombocyták egyes populációinak pusztulását mutatja.

5.1.2. Klinikai faktorok hatása a thrombocyták adhéziós és spreading tevékenységére

A thrombocyták működését számos különböző tényező befolyásolja. A kardiovaszkuláris vagy hematológiai betegségek során kialakuló prothrombotikus vagy antithrombotikus állapotok a fiziológiástól jelentős eltérést mutatnak. Egy egészséges populációban ezek a különbségek sokkal kisebb mértékűek, melyeket csupán egy nagy érzékenységgű módszerrel lehet kimutatni. Vizsgálatunk során különböző *in vivo* paramétereket regisztráltunk és vetettünk össze a thrombocytá-adhézió változásával, hogy az impedimetriai alapú thrombocytá-adhézió mérést tovább karakterizáljuk.

Az akut és krónikus allergiás megbetegedésekkel vagy egyéb hyperimmun állapotokkal járó fokozott thrombocytá-aktiváció és -reaktivitás többszörösen is leírt adat. (144-147) Az impedimetriai mérés során hasonló összefüggéseket mértünk. Azon egyének esetében, akiknél az anamnézisben ismert volt valamilyen típusú allergiás megbetegedés, szignifikánsan fokozott thrombocytá-adhéziót mértünk.

A diabetes mellitus és a hosszútávú hyperglykaemia a thrombotikus megbetegedések ismert rizikófaktorai. Egy vizsgálatban diabetes-es páciensek esetében fokozott thrombocytá-aggregációt mutattak ki. (148) Azonban vannak olyan adatok is, melyek szerint a vércukorszint és a thrombocytá-reaktivitás között kapcsolat nem mutatható ki (149), vagy esetleg fordított összefüggés található. (150, 151) Ezek a vizsgálatok mind csupán thrombocytá-aggregációt mértek, a thrombocyták adhézióját nem vizsgálták. Impedimetriai méréseink során a thrombocyták adhéziós tevékenysége negatív korrelációt mutatott a szérumb vércukor szinttel, mely az utóbbi eredményeket erősíti meg. Meg kell azonban jegyezni, hogy ezek nem éhomi vércukor szintek voltak, és nem találtunk szignifikáns korrelációt a thrombocytá-adhézió és a szérumb HbA1c szintek – melyek azonban mind normál tartományba estek – között sem.

A kor előrehaladtával jó ismert a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásának rizikója növekszik, és fokozott a thrombocytá-reaktivitás, valamint a thrombocytá-aggregációt gátló gyógyszerek csökkent hatása. (152-155) Ezzel ellentétben az impedimetriai mérések során a thrombocytá-adhézió mértéke negatívan korrelált az életkorral az alacsonyabb (5 μ M) koncentrációjú adrenalin használatakor. Azonban jelen vizsgálatban az alanyok mind fiatal, 20 és 40 év közötti egyének voltak, amely populációban kardiovaszkuláris megbetegedések előfordulásának rizikója alacsony, míg az előzőekben említett tanulmányokban résztvevő páciensek főképp az idősebb populációba tartoztak.

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

5.1.3. Laboratóriumi paraméterek és impedimetriai mérések közötti korrelációk

Az impedimetriai thrombocytá-adhézió mérés klinikai hasznosíthatóságának további vizsgálata céljából a standard laboratóriumi paraméterek és az impedimetriával mért thrombocytá-adhézió, illetve -spreading közti összefüggéseket elemeztük. Részben,

mivel kevés thrombocyta-adhéziót mérő technika létezik, illetve ezek nem terjedtek el széles körben, kevés adat ismert ezzel kapcsolatban, így további vizsgálatok szükségesek.

Az adrenalin és az ADP által kiváltott thrombocyta-adhézió negatív korrelációt mutatott a szérum nátrium és kalcium szintekkel. A szérum nátriumszint thrombocyta-működést befolyásoló hatását taglaló irodalmi források ellentmondásosak. A kalcium hemosztázisban betöltött szerepe közismert. Egy vizsgálatban az ADP és az adrenalin által kiváltott thrombocyta-aggregáció fokozott volt citrátos mintákban. (156) Egy másik kutatás alacsony kalciumkoncentráció mellett csökkent mértékű ADP által kiváltott fibrinogénkötést mutatott ki. (157) A kalciumpótlás *in vivo* thrombocyta-aggregációra gyakorolt klinikai hatását is dokumentálták már. (158) Az általunk végzett kísérletek során a szérum kalcium szint negatívan korrelált az adhézióval, de a mérésekhez szükséges thrombocyta-preparátum készítéséhez citrátos vérmintákat vettünk, így valószínű, hogy ezek az eredmények nem közvetlen összefüggéseket mutatnak. Thrombocyta-mintáinkat fiziológiás sóoldattal hígítottuk a mérések elvégzéséhez, így inkább egy indirekt kapcsolat feltételezhető.

Több ponton is asszociációt találtunk a thrombocyta-adhézió és az MCHC szint között. Az MCHC egy számított paraméter, melyhez a hemoglobinkoncentrációt és a hematokritot használják fel. Ezen két paraméter nem mutatott összefüggést a thrombocyta-adhézióval egy agonista esetében sem, így nem kizárható, hogy az MCHC-vel való korreláció esetén csupán egy statisztikai műterméket látunk.

A spreading jelenség során tapasztalt változások az elektródafelszínhez tapadó thrombocyták esetében jóval gyengébb reakciók, mint amelyeket az adhézió vizsgálata esetén tapasztaltunk. Nem meglepő tehát, hogy a spreading mérések esetében jóval kevesebb korrelációt tapasztaltunk a laboratóriumi paraméterekkel, sőt, a tendenciák is homályosabbak voltak. A szabad koleszterin és a membránban található koleszterin szerepét a thrombocyta-aktivációban és -adhézióban több forrás is leírja. (159, 160) Az általunk végzett mérések során a vizsgált koleszterinértékek közül csupán a HDL esetében tapasztaltunk szignifikáns, negatív korrelációt a thrombocyta-spreading-gel, azonban csupán az 5 μ M koncentrációban alkalmazott adrenalin használatakor, amely semleges hatással volt a spreading-re, így valószínű, hogy ebben az esetben is artefaktot látunk. Hasonló a helyzet a többi paraméter és a spreading esetében is. Mivel a spreading

tevékenység egy kisebb nagyságrendű, finomabb folyamat az adhéziohoz képest, feltételezhető, hogy egy egészséges populációban, ahol a variabilitás kicsi, nehezebb különbségeket kimutatni. Mindez azt mutatja, hogy ezen a téren további vizsgálatok szükségesek, célzott betegcsoportok bevonásával, a spreading mérés standardizálásához. Az azonban, hogy egy egészséges mintán is ki lehet mutatni eltéréseket, azt sugallja, hogy patológiás állapotokban, ahol ezek a különbségek hatványozottan vannak jelen, jó eséllyel vizsgálhatók a thrombocyta-spreading tevékenységbeli különbségek impedimetriával.

5.2. Kardiotoxicitás vizsgálatok

A két kemoterápiában használt gyógyszermolekula, doxorubicin és daunorubicin kardiovaszkuláris mellékhatásait régóta dokumentálták már, míg a methotrexate esetében igen ritka, incidentális kardiovaszkuláris mellékhatások ismertek. (85, 86) Kísérleteink hasonló *in vitro* eredményeket mutattak: a doxorubicin és a daunorubicin esetében citotoxikus hatást mértünk cardiomyocytákon és endothel sejteken is, míg a methotrexate esetében cardiomyocytákon semmilyen toxikus hatást nem tudtunk kimutatni, és az endothel sejtek esetében is csak rövidtávú hatásokat figyeltünk meg, hosszútávon ezek a hatások eltűntek. (16. és 21. ábra)

Az An-152 egy doxorubicin tartalmazó GnRH-I konjugátum, amelynek erős tumorellenes hatását számos humán rosszindulatú daganat esetén leírták, többek között humán prostata carcinoma esetében fázis I és fázis II vizsgálatok is folyamatban vannak. (161) Ezt a molekulát GnRH-III konjugátum esetében, mint kontroll molekulát használják. Saját méréseink során az An-152 a doxorubicinhez hasonlóan citotoxikus hatással bírt a cardiomyocytákra, azonban a doxorubicinhez képest csökkent mértékben, csak a két legmagasabb (10^{-6} mol/L és 10^{-7} mol/L) vizsgált koncentráción. Endothel sejteken az An-152 hasonló toxikus hatást mutatott. Ezek alapján, jó tumorellenes hatása ellenére, a mellékhatások tekintetében nem az An-152 javasolható, mint ideális molekula. (17. és 22. ábra)

A GnRH-III(Dox-ester) az An-152 GnRH-III-at tartalmazó analógja. Ez a konjugátum korábbi vizsgálatok során az An-152-éhez hasonló, illetve annál nagyobb mértékű

antitumor hatást mutatott. (91) Azonban az általunk végzett mérések során a doxorubicinéhoz hasonló citotoxikus hatást mutatott endothel sejteken a két magasabb koncentráción (10^{-7} és 10^{-6} mol/L), és még erősebb mértékben, minden vizsgált koncentráción (10^{-8} , 10^{-7} és 10^{-6} mol/L) a cardiomyocytákon, melyek feltételezhetően limitálnák későbbi felhasználását, mint gyógyszerhatóanyag. (17. és 22. ábra)

Leurs és munkatársainak kutatócsoportja kifejlesztett daunorubicin tartalmú GnRH-III konjugátumokat és két hatóanyag-molekulát tartalmazó bifunkcionális konjugátumokat is. (87) Ezek az irányított gyógyszer-célbajuttatásra alkalmas konjugátumok citosztatikus hatást mutattak humán emlő-, prosztata- és colon carcinoma sejtvonalakon. Azt is kimutatták, hogy a két hatóanyag-molekulát tartalmazó konjugátumok erősebb citosztatikus hatással bírtak az egyetlen daunorubicin molekulát tartalmazó konjugátumoknál. Az általunk végzett kísérletek során a vizsgált monomer konjugátumok közül a GnRH-III(Dau) – a citotoxikus hatású daunorubicinnel ellentétben – nem mutatott toxikus hatást se a cardiomyocyta, se az endothel sejteken. A két, általunk vizsgált bifunkcionális konjugátum, $(\text{Lys})^4\text{GnRH-III}(\text{Dau}^4\text{-Dau}^8)$ és $\text{GnRH-III}(\text{Dau}^8\text{-Dau}^8)$ is hasonló viselkedést mutatott: nem volt toxikus hatással egyik vizsgált sejttípusra sem. Ezen adatok alapján a bemutatott három konjugátum kardiotoxikus mellékhatás nélküli kemoterapeutikumok fejlesztésének jövőbeli célpontjai lehetnek. (18. és 23. ábra)

Mező és munkacsoportja több olyan GnRH-III konjugátumot is megalkottak, amelyekbe egy speciális tetrapeptid távtartó („spacer”) szekvenciát (GFLG vagy YRRL) illesztettek – ezzel a tumorsejtekben a konjugátum lizoszomális hasíthatóságát fokozták, amivel a daganatellenes potenciált fokozták. (91) Saját vizsgálatainkban kettő doxorubicin tartalmú, távtartó szekvenciát tartalmazó konjugátumot vizsgáltunk: GnRH-III(Dox-amid-GFLG) és GnRH-III(Dox-oxim-GFLG). Mindkét molekula megtartotta a doxorubicinra jellemző toxikus hatását cardiomyocytákon és endothelsejteken is, bár cardiomyocyták esetében ez a hatás csökkent mértékű volt, csak a legmagasabb koncentrációban volt kimutatható. Ettől eltérően, az egyik daunorubicin tartalmú, távtartó szekvenciával bíró konjugátum, a GnRH-III(Dau-GFLG) egyik vizsgált koncentrációban sem mutatott toxikus hatást cardiomyocyta sejteken, és az endothel sejtek esetében is csupán a legmagasabb vizsgált koncentrációban. A másik daunorubicin tartalmú, YRRL spacer szekvenciát tartalmazó konjugátum és dimer formája, GnRH-III(Dau-YRRL) és $[\text{GnRH-III}(\text{DauYRRLC})]_2$, viszont a daunorubicinéhoz hasonló mértékben citotoxikus

hatásúak voltak endothel sejteken, míg gyakorlatilag egy nagyságrenddel gyengébben, csupán a legmagasabb vizsgált koncentráción mutattak toxikus hatást cardiomyocytá sejtteken. (17., 19., 22. és 24. ábra)

Több módosított GnRH-III konjugátum is kifejlesztésre került Manea kutatócsoportja által. (88) Ezekben a kísérletekben a GnRH-III molekula négyes pozícióban lévő szerin (⁴Ser) aminosavát cserélték ki annak N-metilált változatára (N-Me-Ser) vagy egy acetilált lizinre [Lys(Ac)]. Az ő méréseikben ezek a módosított GnRH-III konjugátumok megtartották citosztatikus hatásukat humán prosztatata-, emlő és colon carcinoma sejt vonalakon a molekulák fokozott stabilitása mellett. Saját vizsgálatunk során kettő módosított GnRH-III konjugátumot [(Lys(Ac))⁴GnRH-III(Dau) és (N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau)] vizsgáltunk. Endothel sejtekben egyik hatóanyagnál sem tudtunk toxikus hatást kimutatni. Cardiomyocytákon az (N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau) nem mutatott toxikus hatást, de a (Lys(Ac))⁴GnRH-III(Dau) esetében a legmagasabb vizsgált koncentrációban (10⁻⁶ mol/L) toxikus hatást mértünk – ellentétben a daunorubicinnal, mely ezt a toxikus hatást a két alacsonyabb vizsgált koncentráción is mutatta –, továbbá, ez a hatás gyakorlatilag egy nagyságrenddel gyengébb volt a daunorubicinénál. Ezek alapján a ⁴Ser módosítása feltételezhetően nem csak fokozott stabilitású daganatellenes hatást eredményez, hanem a kardiális mellékhatások is csökkenhetnek általa. (18., 19., 23. és 24. ábra)

Schreier és munkatársai munkájuk során dimer daunorubicin tartalmú GnRH-III konjugátumokat szintetizáltak. (90) Ezek a konjugátumok *in vitro* fokozott citosztatikus hatást mutattak humán emlőcarcinoma sejteken. Jelen munka során végzett kísérleteinkben a [GnRH-III(Dau-C)]₂ dimer konjugátum nem volt citotoxikus hatással se az endothel, se a cardiomyocytá sejtkekre – hasonlóan a monomer GnRH-III(Dau) konjugátumhoz. Ezzel ellentétben, a (N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau) monomer konjugátum – mely nem mutatott toxikus hatást – dimer párja, a [(N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau-C)]₂ cardiomyocytá sejtteken toxikus hatással bírt a két magasabb vizsgált koncentráción (10⁻⁶ és 10⁻⁷ mol/L), azonban ez a hatás a daunorubicinénál gyengébb volt. Hasonlóképpen, a dimerizáció fokozta a [GnRH-III(Dau-YRRLC)]₂ dimer konjugátum citotoxikus hatását endothel sejteken, és megtartotta azt cardiomyocytákon is. (19. és 24. ábra)

Komplex, két különböző kemoterápiában használt hatóanyagot tartalmazó, multifunkcionális GnRH-III gyógyszerkonjugátumokat fejlesztettek ki Leurs és munkatársai. (89) Ezen munka során egy acetilált lizint építettek a GnRH-III molekulában, amely stabilizálta azt, ugyanakkor lehetőséget biztosított egy második hatóanyagmolekula hozzákapcsolására – methotrexate a daunorubicin mellett –, ezzel tovább fokozva a konjugátum potenciális tumorelles hatását. Méréseikben ezek a multifunkcionális konjugátumok fokozott tumorelles és metasztázisellenes hatással bírtak humán prosztata-, emlő- és colon carcinoma sejteken az egy hatóanyagot tartalmazó konjugátumokhoz viszonyítva. Saját méréseinkben a kettő vizsgált multifunkcionális konjugátum közül se a GnRH-III(Mtx⁸-Dau⁸), se a (Lys)⁴GnRH-III(Mtx⁴-Dau⁸) nem volt citotoxikus hatással cardiomyocya sejtekre. Bár a GnRH-III(Mtx⁸-Dau⁸) esetében az impedancia csekély emelkedését mértük a legmagasabb (10⁻⁶ mol/L) koncentráción rövidtávon endothel sejteken, a hosszútávú mérés során szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni. A (Lys)⁴GnRH-III(Mtx⁴-Dau⁸) nem mutatott citotoxikus hatást endothel sejteken sem rövid-, sem hosszútávon. Ezek alapján fokozott tumorelles és metasztázisellenes hatásaik mellett a multifunkcionális konjugátumok jó eséllyel kevesebb kardiovaszkuláris mellékhatással is rendelkezhetnek a daunorubicinnál. (20. és 25. ábra)

A kardiotoxicitás mérések során 7 olyan konjugátumot azonosítottunk, melyek nem mutattak citotoxikus hatást sem az endothel, sem a cardiomyocya sejteken. Ezeket a konjugátumokat a 8. táblázat mutatja be.

8. táblázat A citoxikus hatást nem mutató GnRH-konjugátumok (piros színnel kiemelve) összefoglalása

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

5.3. Szövetépítés vizsgálatok

Az utóbbi évtizedekben jelentős előrelépések történtek a szövetépítéssel létrehozandó teljes, működő szív kifejlesztése terén, mindazonáltal számos megoldásra váró probléma van még, különösen a decellularizált teljes szervvázak működő sejtekkel való recellularizációjában. (162) Humán eredetű pulmonalis és aorta billentyű graftok endothellal való befedését már kifejlesztették (126), de a három dimenziós myocardialis vázak cardiomyocyttal való recellularizációja eddig még csupán vékony szívizomfoltok esetén volt sikeres, akkor is csak alacsony sejtsűrűséggel. (163) Patkányból nyert egész szívívázak recellularizációját is elvégezték már, azonban ezek a szívek a felnőtt kontraktilis funkcionak csak egy töredékét mutatták. (123) A recellularizált, működő teljes szív előállítását eddig még nem sikerült elérni.

A szövetépítéssel előállított, humán méretű szívek gyártásához egyik lehetőség cadaverből nyert emberi szívek decellularizációja, mely optimális vázat biztosít, azonban a donorszívek kevés volta miatt feltételezhetően ez is csak elégtelen mennyiséget biztosítana. Sertés szívek vágóhídi sertésekből könnyen, nagy számban nyerhetők, és, a megfelelő decellularizációs kezelés után sejtmentes, potenciálisan immunológiailag

semleges vázak állíthatóak elő. (125) Humán sejtekkel és regulátor anyagokkal való recellularizáció után optimális, beültethető egész szív graftok állíthatóak elő.

A decellularizált szívek adhéziós tulajdonságainak sejtszintű karakterizációja, illetve humán sejtekkel való kapcsolatuk jellemzése a jövőbeni recellularizációs fejlesztések számára hasznosítható információval szolgálhat. A HT-1080 humán fibrosarcoma sejtvonal egy tumoros sejtvonal, melyet, erős adhéziós tulajdonságai miatt, többek között, adhéziós kutatások modellsejtjeként használnak. (164) Kísérleteink során a HT-1080 sejtek jellegzetes, sejtszámfüggő, erős adhéziós tevékenységét mértük, melyet az elektródák fibronectinnel való előzetes fedése tovább fokozott. A sertésszív-homogenizátumból nyert fedés esetén a HT-1080 sejtek hasonlóan erős adhéziós tevékenységét tapasztaltuk, amely mellett szintén megfigyelhető volt a fibronectin pozitív hatása. *Ezen eredmények szerint a decellularizált szívíváz önmagában nem rendelkezik adhéziót gátló hatással.*

Az endothel sejtek kizárólag a kardiovaszkuláris rendszerben megtalálható sejtek, melyek, az erek mellett, az endocardium luminalis, vascularis részét bélelik. Mint ilyenek, a recellularizáció potenciális alanyai, ezért kísérleteink során a decellularizált sertésszívíváz endothelsejtek adhéziójára gyakorolt hatását vizsgáltuk. A kísérleteinkhez használt HMEC-1 endothelsejtek adhéziós aktivitása megtartott volt az elektródák decellularizált szívíváz-homogenizátummal való fedése után, úgy fibronectin hozzáadásával, mint anélkül. Az endothelsejteken kívül a recellularizációhoz szükséges sejtek másik fő célcsoportja a cardiomyocyták sejtek, így ezek kapcsolatát is vizsgáltuk a homogenizált szívívázzal.

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

A „szendvics” kísérletben a homogenizált szívíváz kezelés jelentősen fokozta a cardiomyocyták adhézióját az elektródákra korábban (24 óra) kiültetett konfluens (ezt jelezte az impedimetria görbék plató fázisa) endothel sejtrétegen. Hasonló erős adhéziófokozó hatást figyeltünk meg a fibronektinnel való kezelés esetén is, önmagában, valamint szívíváz homogenizátummal együtt is. Ez az erős pozitív hatás megmaradt a kísérlet során végig (72 óra). Ezek az eredmények decellularizált sertésszív-íváz humán kardiovaszkularis sejtek celluláris szintű adhéziójára gyakorolt neutrális, illetve pozitív hatását mutatják. Mindezek alapján az általunk vizsgálat HMEC-1 humán microvascularis endothel sejtek és a HCM cardiomyocyták ígéretes sejtípusok lehetnek a jövőben szívívázak recellularizációs kísérleteihez.

A decellularizált szívíváz és kardiovaszkuláris sejtek kapcsolatára utaló kedvező eredményektől függetlenül a recellularizációs folyamathoz további regulátor anyagok biztosítása elengedhetetlen. A fibronektin a sejtadhézió ismert fokozó- és szabályozó molekulája. (120) Vizsgálatok bizonyítják a fibronektin jelenlétét decellularizált szívívázakban. (123) Méréseink során a fibronektin kezelés pozitív hatást gyakorolt a HT-1080 fibrosarcoma, HMEC-1 endothel és HCM cardiomyocyta sejtek adhéziójára, valamint az endothel és cardiomyocyta sejtek közti sejt-sejt adhézióra. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a decellularizált aorta graftok fibronektinnel való fedése fokozta a graftok *in vivo* endothelializációját patkányokban. (165) Saját kísérleteink során hasonló eredményeket kaptunk, a decellularizált szívíváz kivonattal és fibronektinnel való kevert fedés fokozta az endothel sejtek adhézióját, sőt a cardiomyocytákét is. *Mindezek alapján eredményeink megerősítik a korábbi feltevést (165), miszerint a fibronektin a jövőben sikerrel alkalmazható lehet adhéziót fokozó és regulátor molekulaként is az egész szívívázak recellularizációjához.*

6. Következtetések

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

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

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

1/C. Az impedimetriai thrombocyta-adhézió mérés segítségével az egészséges egyének közötti különbségek és különböző klinikai faktorokkal asszociált különbségek is kimutathatók. Ezek a különbségek kifejezettebbek az adhézió, mint a spreading vizsgálata esetén. A jövőben betegcsoportokon további vizsgálatok szükségesek a thrombocyta-adhézió egyes kórállapotokban létrejövő változásának vizsgálatára.

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

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

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

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

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

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

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

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

7. Összefoglalás

A kardiovaszkuláris megbetegedések korunk megbetegedéseinek és halálozásának jelentős részét képezik, ezzel nagy terhet róva az egyénre és a társadalomra is. Ezeknek a kórképeknek jelentős hányadát teszik ki a thrombotikus etiológiájú megbetegedések vagy a szívelégtelenség. Egyes daganatellenes szerek alkalmazásának egyik legfőbb gátja a kardiotoxikus mellékhatások kialakulása. Mindezek miatt elengedhetetlen olyan laboratóriumi technikák fejlesztése, mellyel a kardiovaszkuláris kutatás még szélesebb körben folytatható.

Az impedimetria a kutatói gyakorlatban évtizedek óta sikerrel alkalmazott metodika a sejtheadhézió, sejtproliferáció, viabilitás és citotoxicitás vizsgálatára. Jól hasznosítható technika lehet a kardiovaszkuláris kutatások területén is, beleértve a diagnosztikus vizsgálatokat, gyógyszerfejlesztéseket és sebészi terápiák kifejlesztését. Munkám során az impedimetriai alapú vizsgálatokkal végzett (i) thrombocytá-adhézió mérés fejlesztését, (ii) a kardiotoxikus hatással nem rendelkező tumorellenes GnRH-III konjugátumok keresését és (iii) a szövetépített egész szív létrehozását célzó decellularizált szívvezek sejtszociológiai tulajdonságainak karakterizálását tűztem ki célul.

Az impedimetria alkalmasnak bizonyult egészséges egyénektől származó mintákon a thrombocytá-adhézió kvalitatív és kvantitatív mérésére, illetve az adhézió és spreading tevékenység elkülönítésére, valamint a klinikai faktorokkal asszociált különbségek kimutatására. A vizsgált tumorellenes GnRH-III konjugátumok közül hét, potenciálisan kardiovaszkuláris mellékhatás nélküli gyógyszermolekulát azonosítottunk. Mérési összeállításunk a de/recellularizációs modelljét adta a szövetépítési kísérleteknek, melynek során a decellularizált szívvezek cardiomyocyták számára attraktív környezetnek bizonyult.

Mindezek alapján az impedimetriai jól alkalmazható technikának bizonyult mind thrombocytá-adhézió diagnosztikájára, mind a nem-kardiotoxikus kemoterapeutikumok fejlesztésére, mind a szövetépített egész szív megalkotását célzó kutatások területén. Dokumentáltuk, hogy az impedimetria egy érzékeny, sokoldalú sejtszociológiai vizsgálómódszer, melynek a kardiovaszkuláris megbetegedések gyógyításában számos potenciális alkalmazási lehetősége van.

Summary

Cardiovascular disease account for high percentage of today's morbidity and mortality, placing an enormous burden on individual and society. Thrombotic diseases and heart failure make up a bulk of these statistics. Cardiotoxicity is the limiting factor of the use of many anticancer drugs. Therefore, the development of laboratory techniques for the more thorough research of cardiovascular disorders is essential.

Impedmetry is a technique for the measurement of cell adhesion, proliferation, viability and cytotoxicity which has been applied successfully in research for decades. It could be valuable method in the field of cardiovascular research, including diagnostic tests, drug research and the development of surgical therapies. In my work my objectives were (i) the development of impedimetric platelet adhesion measurement, (ii) impedimetric search and characterization of antitumor GnRH-III conjugates without cardiotoxic side effects and (iii) cell-biological characterization of decellularized heart scaffold targetting the tissue-engineered whole heart.

Impedimetry proved to be suitable for qualitative and quantitative measurement of platelet adhesion in healthy human subjects, also for the differentiation of platelet adhesion and spreading, as well as of changes associated with clinical factors. Amongst the investigated anticancer GnRH-III conjugates seven with no potential cardiotoxic effects were identified. Our experimental setup gave a strong de/recellularization model for tissue engineering experiments, where the decellularized heart scaffold proved to be an attractive environment for future recellularization experiments.

In conclusion, impedimetry was shown to be a useful technique in platelet adhesion diagnostics, development of non-cardiotoxic chemotherapeutic drugs and construction of the tissue-engineered whole heart. Impedimetry is a sensitive, multifaceted cell-biological technique, with a variety of potential application in the treatment of cardiovascular disorders.

8. Irodalomjegyzék

1. Joseph P, Leong D, McKee M, Anand SS, Schwalm JD, Teo K, Mente A, Yusuf S. (2017) Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1: The Epidemiology and Risk Factors. *Circ Res.* 121(6): 677-694.
2. Shah U, Ma AD. (2007) Tests of platelet function. *Curr Opin Hematol.* 14(5): 432-437.
3. Induruwa I, Jung SM, Warburton EA. (2016) Beyond antiplatelets: The role of glycoprotein VI in ischemic stroke. *Int J Stroke.* 11(6): 618-625.
4. Xu XR, Carrim N, Neves MA, McKeown T, Stratton TW, Coelho RM, Lei X, Chen P, Xu J, Dai X, Li BX, Ni H. (2016) Platelets and platelet adhesion molecules: novel mechanisms of thrombosis and anti-thrombotic therapies. *Thromb J.* 14(Suppl 1): 29.
5. Gurbel PA, Myat A, Kubica J, Tantry US. (2016) State of the art: Oral antiplatelet therapy. *JRSM Cardiovasc Dis.* 5: 1-10.
6. Canobbio I, Visconte C, Oliviero B, Guidetti G, Zara M, Pula G, Torti M. (2016) Increased platelet adhesion and thrombus formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Signal.* 28(12): 1863-1871.
7. Tsoumani ME, Tatsidou PT, Ntalas IV, Goudevenos JA, Tselepis AD. (2016) Dynamic platelet adhesion in patients with an acute coronary syndrome: The effect of antiplatelet therapy. *Platelets.* 27(8): 812-820.
8. Nuyttens BP, Thijs T, Deckmyn H, Broos K. (2011) Platelet adhesion to collagen. *Thromb Res.* 127 Suppl 2: S26-29.
9. Kaplan ZS, Jackson SP. (2011) The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011: 51-61.
10. Feghhi S, Munday AD, Tooley WW, Rajsekar S, Fura AM, Kulman JD, Lopez JA, Sniadecki NJ. (2016) Glycoprotein Ib-IX-V Complex Transmits Cytoskeletal Forces That Enhance Platelet Adhesion. *Biophys J.* 111(3): 601-608.

11. Gardiner EE, Arthur JF, Shen Y, Karunakaran D, Moore LA, Am Esch JS, 2nd, Andrews RK, Berndt MC. (2010) GPIIb/IIIa-selective activation of platelets induces platelet signaling events comparable to GPIIb/IIIa activation events. *Platelets*. 21(4): 244-252.
12. Lopez JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC. (1998) Bernard-Soulier syndrome. *Blood*. 91(12): 4397-4418.
13. Soylu A, Tokac M, Cora T, Duzenli MA, Acar H. (2009) Platelet glycoprotein IIb/IIIa gene polymorphism and massive or submassive pulmonary embolism. *J Thromb Thrombolysis*. 27(3): 259-266.
14. Pellikka M, Narhi L, Perola M, Penttila A, Karhunen PJ, Mikkelsen J. (2008) Platelet GPIIb/IIIa, GPIV and vWF polymorphisms and fatal pre-hospital MI among middle-aged men. *J Thromb Thrombolysis*. 26(2): 91-96.
15. Petzold T, Thienel M, Konrad I, Schubert I, Regenauer R, Hoppe B, Lorenz M, Eckart A, Chandraratne S, Lennerz C, Kolb C, Braun D, Jamasbi J, Brandl R, Braun S, Siess W, Schulz C, Massberg S. (2016) Oral thrombin inhibitor aggravates platelet adhesion and aggregation during arterial thrombosis. *Sci Transl Med*. 8(367): 367ra168.
16. Lei X, Rehemian A, Hou Y, Zhou H, Wang Y, Marshall AH, Liang C, Dai X, Li BX, Vanhoorelbeke K, Ni H. (2014) Anfibatide, a novel GPIIb/IIIa complex antagonist, inhibits platelet adhesion and thrombus formation in vitro and in vivo in murine models of thrombosis. *Thromb Haemost*. 111(2): 279-289.
17. Maurer E, Tang C, Schaff M, Bourdon C, Receveur N, Ravanat C, Eckly A, Hechler B, Gachet C, Lanza F, Mangin PH. (2013) Targeting platelet GPIIb/IIIa reduces platelet adhesion, GPIIb/IIIa signaling and thrombin generation and prevents arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 33(6): 1221-1229.
18. Bartunek J, Barbato E, Heyndrickx G, Vanderheyden M, Wijns W, Holz JB. (2013) Novel antiplatelet agents: ALX-0081, a Nanobody directed towards von Willebrand factor. *J Cardiovasc Transl Res*. 6(3): 355-363.
19. Holz JB. (2012) The TITAN trial--assessing the efficacy and safety of an anti-von Willebrand factor Nanobody in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfus Apher Sci*. 46(3): 343-346.

20. Broos K, De Meyer SF, Feys HB, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. (2012) Blood platelet biochemistry. *Thromb Res.* 129(3): 245-249.
21. Thijs T, Nuyttens BP, Deckmyn H, Broos K. (2010) Platelet physiology and antiplatelet agents. *Clin Chem Lab Med.* 48 Suppl 1: S3-13.
22. Pasquet J-M, Gross B, Quek L, Asazuma N, Zhang W, Sommers CL, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Judd B, Lee JR, Koretzky G, Love PE, Samelson LE, Watson SP. (1999) LAT Is Required for Tyrosine Phosphorylation of Phospholipase C γ 2 and Platelet Activation by the Collagen Receptor GPVI. *Mol Cell Biol.* 19(12): 8326-8334.
23. Loyau S, Dumont B, Ollivier V, Boulaftali Y, Feldman L, Ajzenberg N, Jandrot-Perrus M. (2012) Platelet glycoprotein VI dimerization, an active process inducing receptor competence, is an indicator of platelet reactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32(3): 778-785.
24. Poulter NS, Pollitt AY, Owen DM, Gardiner EE, Andrews RK, Shimizu H, Ishikawa D, Bihan D, Farndale RW, Moroi M, Watson SP, Jung SM. (2017) Clustering of glycoprotein VI (GPVI) dimers upon adhesion to collagen as a mechanism to regulate GPVI signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 15(3): 549-564.
25. Mammadova-Bach E, Ollivier V, Loyau S, Schaff M, Dumont B, Favier R, Freyburger G, Latger-Cannard V, Nieswandt B, Gachet C, Mangin PH, Jandrot-Perrus M. (2015) Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood.* 126(5): 683-691.
26. Velez P, Ocaranza-Sanchez R, Lopez-Otero D, Grigorian-Shamagian L, Rosa I, Guitian E, Garcia-Acuna JM, Gonzalez-Juanatey JR, Garcia A. (2016) Alteration of platelet GPVI signaling in ST-elevation myocardial infarction patients demonstrated by a combination of proteomic, biochemical, and functional approaches. *Sci Rep.* 6: 39603.
27. Kobat MA, Balin M, Celik A, Baydas A, Dagli MN. (2014) The relationship between platelet collagen receptor glycoprotein VI and no-reflow phenomenon in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction. *J Investig Med.* 62(1): 62-70.

28. Wurster T, Poetz O, Stellos K, Kremmer E, Melms A, Schuster A, Nagel E, Joos T, Gawaz M, Bigalke B. (2013) Plasma levels of soluble glycoprotein VI (sGPVI) are associated with ischemic stroke. *Platelets*. 24(7): 560-565.
29. Ungerer M, Rosport K, Bultmann A, Piechatzek R, Uhland K, Schlieper P, Gawaz M, Munch G. (2011) Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans. *Circulation*. 123(17): 1891-1899.
30. Pachel C, Mathes D, Arias-Loza AP, Heitzmann W, Nordbeck P, Deppermann C, Lorenz V, Hofmann U, Nieswandt B, Frantz S. (2016) Inhibition of Platelet GPVI Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 36(4): 629-635.
31. Lebozec K, Jandrot-Perrus M, Avenard G, Favre-Bulle O, Billiald P. (2017) Design, development and characterization of ACT017, a humanized Fab that blocks platelet's glycoprotein VI function without causing bleeding risks. *MABs*. 9(6): 945-958.
32. Geue S, Walker-Allgaier B, Eissler D, Tegtmeyer R, Schaub M, Lang F, Gawaz M, Borst O, Munzer P. (2017) Doxepin inhibits GPVI-dependent platelet Ca²⁺ signaling and collagen-dependent thrombus formation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 312(6): C765-C774.
33. Nieswandt B, Varga-Szabo D, Elvers M. (2009) Integrins in platelet activation. *J Thromb Haemost*. 7 Suppl 1: 206-209.
34. Surin WR, Barthwal MK, Dikshit M. (2008) Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis. *Thromb Res*. 122(6): 786-803.
35. Heino J. (2000) The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biol*. 19(4): 319-323.
36. Shida Y, Rydz N, Stegner D, Brown C, Mewburn J, Sponagle K, Danisment O, Crawford B, Vidal B, Hegadorn CA, Pruss CM, Nieswandt B, Lillicrap D. (2014) Analysis of the role of von Willebrand factor, platelet glycoprotein VI-, and alpha2beta1-mediated collagen binding in thrombus formation. *Blood*. 124(11): 1799-1807.

37. Zhang C, Zhang L, Zhang Y, Sun N, Jiang S, Fujihara TJ, Sun Y. (2016) Development of antithrombotic nanoconjugate blocking integrin alpha2beta1-collagen interactions. *Sci Rep.* 6: 26292.
38. Lassila R. (2016) Platelet Function Tests in Bleeding Disorders. *Semin Thromb Hemost.* 42(3): 185-190.
39. Favaloro EJ, Lippi G, Franchini M. (2010) Contemporary platelet function testing. *Clin Chem Lab Med.* 48(5): 579-598.
40. Sramek R, Sramek A, Koster T, Briet E, Rosendaal FR. (1992) A randomized and blinded comparison of three bleeding time techniques: the Ivy method, and the Simplate II method in two directions. *Thromb Haemost.* 67(5): 514-518.
41. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Davidson RM, Ostgaard RA. (1995) Description of an in vitro platelet function analyzer--PFA-100. *Semin Thromb Hemost.* 21 Suppl 2: 106-112.
42. Carcao MD, Blanchette VS, Stephens D, He LJ, Wakefield CD, Butchart S, Christie DJ, Rand ML. (2002) Assessment of thrombocytopenic disorders using the Platelet Function Analyzer (PFA-100((R))). *Brit J Haematol.* 117(4): 961-964.
43. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Ostgaard RA. (1996) Characterization of an In Vitro Platelet Function Analyzer, PFA-100™. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2(4): 241-249.
44. Favaloro EJ. (2009) Internal quality control and external quality assurance of platelet function tests. *Semin Thromb Hemost.* 35(2): 139-149.
45. Aradi D, Komocsi A, Price MJ, Cuisset T, Ari H, Hazarbasanov D, Trenk D, Sibbing D, Valgimigli M, Bonello L, Tailored Antiplatelet Treatment Study C. (2013) Efficacy and safety of intensified antiplatelet therapy on the basis of platelet reactivity testing in patients after percutaneous coronary intervention: systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol.* 167(5): 2140-2148.
46. Mylotte D, Foley D, Kenny D. (2011) Platelet function testing: methods of assessment and clinical utility. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 9(1): 14-24.

47. Aradi D, Magyarlaki T, Tokes-Fuzesi M, Rideg O, Vorobcsuk A, Komocsi A. (2010) Comparison of conventional aggregometry with VASP for monitoring P2Y12-specific platelet inhibition. *Platelets*. 21(7): 563-570.
48. Michelson AD. (1996) Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood*. 87(12): 4925-4936.
49. Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M, Machin S, British Committee for Standards in H. (2011) Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br J Haematol*. 155(1): 30-44.
50. Lee D, Fong KP, King MR, Brass LF, Hammer DA. (2012) Differential dynamics of platelet contact and spreading. *Biophys J*. 102(3): 472-482.
51. Hamaguchi M, Bunce LA, Sporn LA, Francis CW. (1993) Spreading of Platelets on Fibrin Is Mediated by the Amino Terminus of the Beta-Chain Including Peptide-Beta-15-42. *Blood*. 81(9): 2348-2356.
52. Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, Matsui H, Mizuno T, Miyata S, Yoshioka A. (2002) Platelet shape changes and adhesion under high shear flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 22(2): 329-334.
53. Varon D, Dardik R, Shenkman B, Kotev-Emeth S, Farzame N, Tamarin I, Savion N. (1997) A new method for quantitative analysis of whole blood platelet interaction with extracellular matrix under flow conditions. *Thromb Res*. 85(4): 283-294.
54. Michelson AD, Frelinger AL, 3rd, Furman MI. (2006) Current options in platelet function testing. *Am J Cardiol*. 98(10 Suppl 1): S4-10.
55. Nowak G, Wiesenburg A, Schumann A, Bucha E. (2005) Platelet adhesion assay-a new quantitative whole blood test to measure platelet function. *Semin Thromb Hemost*. 31(4): 470-475.
56. Krischek B, Morgenstern E, Mestres P, Klinkhardt U, Brannath W, Wieding U, Nemeh A, Heinrich W, Schenk J, Wenzel T, Wenzel E. (2005) Adhesion, spreading, and aggregation of platelets in flowing blood and the reliability of the retention test Homburg. *Semin Thromb Hemost*. 31(4): 449-457.

57. Strebhardt K, Ullrich A. (2008) Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer*. 8(6): 473-480.
58. Vhora I, Patil S, Bhatt P, Gandhi R, Baradia D, Misra A. (2014) Receptor-targeted drug delivery: current perspective and challenges. *Ther Deliv*. 5(9): 1007-1024.
59. de Herder WW. (2014) Heroes in endocrinology: Nobel Prizes. *Endocr Connect*. 3(3): R94-R104.
60. Rothman MS, Wierman ME. (2007) The role of gonadotropin releasing hormone in normal and pathologic endocrine processes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 14(4): 306-310.
61. Urbanski HF. (2012) Differential roles of GnRH-I and GnRH-ii neurons in the control of the primate reproductive axis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 3: 20.
62. Millar RP. (2003) GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends Endocrinol Metab*. 14(1): 35-43.
63. Sower SA, Chiang YC, Lovas S, Conlon JM. (1993) Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. *Endocrinology*. 132(3): 1125-1131.
64. Williams BL, Akazome Y, Oka Y, Eisthen HL. (2014) Dynamic evolution of the GnRH receptor gene family in vertebrates. *BMC Evol Biol*. 14: 215.
65. Cheng CK, Leung PC. (2005) Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocr Rev*. 26(2): 283-306.
66. Grundker C, Gunthert AR, Westphalen S, Emons G. (2002) Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers. *Eur J Endocrinol*. 146(1): 1-14.
67. Montagnani Marelli M, Moretti RM, Januszkiewicz-Caulier J, Motta M, Limonta P. (2006) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors in tumors: a new rationale for the therapeutical application of GnRH analogs in cancer patients? *Curr Cancer Drug Targets*. 6(3): 257-269.

68. Demirci A, Alkis N, Dane F, Durnali A, Yazici OK, Rzayev R, Kaya S, Yazilitas D, Inanc M, Ozcelik M, Akman T, Kaplan MA, Gunaydin Y, Ulas A, Sonmez O, Tokluoglu S, Gokoz Dogu G, Bal O, Gumus M. (2017) Retrospective evaluation of premenopausal hormone-sensitive breast cancer patients treated with adjuvant gonadotropin-releasing hormone analogue: Anatolian Society of Medical Oncology (ASMO) study. *Asia Pac J Clin Oncol.* 14(2): e145-e151
69. Mezo G, Czajlik A, Manea M, Jakab A, Farkas V, Majer Z, Vass E, Bodor A, Kapuvári B, Boldizsar M, Vincze B, Csuka O, Kovacs M, Przybylski M, Perczel A, Hudecz F. (2007) Structure, enzymatic stability and antitumor activity of sea lamprey GnRH-III and its dimer derivatives. *Peptides.* 28(4): 806-820.
70. Mezo I, Lovas S, Palyi I, Vincze B, Kalnay A, Turi G, Vadasz Z, Seprodi J, Idei M, Toth G, Gulyas E, Otvos F, Mak M, Horvath JE, Teplan I, Murphy RF. (1997) Synthesis of gonadotropin-releasing hormone III analogs. Structure-antitumor activity relationships. *J Med Chem.* 40(21): 3353-3358.
71. Heredi-Szabo K, Lubke J, Toth G, Murphy RF, Lovas S. (2005) Importance of the central region of lamprey gonadotropin-releasing hormone III in the inhibition of breast cancer cell growth. *Peptides.* 26(3): 419-422.
72. Heredi-Szabo K, Murphy RF, Lovas S. (2006) Is lGnRH-III the most potent GnRH analog containing only natural amino acids that specifically inhibits the growth of human breast cancer cells? *J Pept Sci.* 12(11): 714-720.
73. Kovacs M, Vincze B, Horvath JE, Seprodi J. (2007) Structure-activity study on the LH- and FSH-releasing and anticancer effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-III analogs. *Peptides.* 28(4): 821-829.
74. Lajko E, Szabo I, Andody K, Pungor A, Mezo G, Kohidai L. (2013) Investigation on chemotactic drug targeting (chemotaxis and adhesion) inducer effect of GnRH-III derivatives in *Tetrahymena* and human leukemia cell line. *J Pept Sci.* 19(1): 46-58.
75. Nagy A, Schally AV, Armatis P, Szepeshazi K, Halmos G, Kovacs M, Zarandi M, Groot K, Miyazaki M, Jungwirth A, Horvath J. (1996) Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone containing doxorubicin or 2-

pyrrolinodoxorubicin, a derivative 500-1000 times more potent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(14): 7269-7273.

76. Nagy A, Schally AV. (2005) Targeting of cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analogs to breast, ovarian, endometrial, and prostate cancers. *Biol Reprod*. 73(5): 851-859.

77. Schally AV, Nagy A. (2003) New approaches to treatment of various cancers based on cytotoxic analogs of LHRH, somatostatin and bombesin. *Life Sci*. 72(21): 2305-2320.

78. Schally AV, Nagy A. (2004) Chemotherapy targeted to cancers through tumoral hormone receptors. *Trends Endocrin Met*. 15(7): 300-310.

79. Gunthert AR, Grundker C, Bongertz T, Schlott T, Nagy A, Schally AV, Emons G. (2004) Internalization of cytotoxic analog AN-152 of luteinizing hormone-releasing hormone induces apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cell lines independent of multidrug resistance-1 (MDR-1) system. *Am J Obstet Gynecol*. 191(4): 1164-1172.

80. Yu SS, Athreya K, Liu SV, Schally AV, Tsao-Wei D, Groshen S, Quinn DI, Dorff TB, Xiong S, Engel J, Pinski J. (2017) A Phase II Trial of AEZS-108 in Castration- and Taxane-Resistant Prostate Cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 15(6): 742-749.

81. Escherich G, Zimmermann M, Janka-Schaub G, Co ALLsg. (2013) Doxorubicin or daunorubicin given upfront in a therapeutic window are equally effective in children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. A randomized comparison in trial CoALL 07-03. *Pediatr Blood Canc*. 60(2): 254-257.

82. Sun X, Liu J, Wang Y, Bai X, Chen Y, Qian J, Zhu H, Liu F, Qiu X, Sun S, Ji N, Liu Y. (2017) Methotrexate-cytarabine-dexamethasone combination chemotherapy with or without rituximab in patients with primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget*. 8(30): 49156-49164.

83. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. (2013) Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*. 65(2): 157-170.

84. Rajagopalan PT, Zhang Z, McCourt L, Dwyer M, Benkovic SJ, Hammes GG. (2002) Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: ensemble and single-molecule kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(21): 13481-13486.
85. Shi Y, Moon M, Dawood S, McManus B, Liu PP. (2011) Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity. *Herz*. 36(4): 296-305.
86. Zhang J, Cui X, Yan Y, Li M, Yang Y, Wang J, Zhang J. (2016) Research progress of cardioprotective agents for prevention of anthracycline cardiotoxicity. *Am J Transl Res*. 8(7): 2862-2875.
87. Leurs U, Mezo G, Orban E, Ohlschlager P, Marquardt A, Manea M. (2012) Design, synthesis, in vitro stability and cytostatic effect of multifunctional anticancer drug-bioconjugates containing GnRH-III as a targeting moiety. *Biopolymers*. 98(1): 1-10.
88. Manea M, Leurs U, Orban E, Baranyai Z, Ohlschlager P, Marquardt A, Schulcz A, Tejada M, Kapuvari B, Tovari J, Mezo G. (2011) Enhanced enzymatic stability and antitumor activity of daunorubicin-GnRH-III bioconjugates modified in position 4. *Bioconjug Chem*. 22(7): 1320-1329.
89. Leurs U, Lajko E, Mezo G, Orban E, Ohlschlager P, Marquardt A, Kohidai L, Manea M. (2012) GnRH-III based multifunctional drug delivery systems containing daunorubicin and methotrexate. *Eur J Med Chem*. 52: 173-183.
90. Schreier VN, Mezo G, Orban E, Durr C, Marquardt A, Manea M. (2013) Synthesis, enzymatic stability and in vitro cytostatic effect of Daunorubicin-GnRH-III derivative dimers. *Bioorg Med Chem Lett*. 23(7): 2145-2150.
91. Mezo G, Manea M, Szabo I, Vincze B, Kovacs M. (2008) New Derivatives of GnRH as Potential Anticancer Therapeutic Agents. *Curr Med Chem*. 15(23): 2366-2379.
92. Szabo I, Manea M, Orban E, Csampai A, Bosze S, Szabo R, Tejada M, Gaal D, Kapuvari B, Przybylski M, Hudecz F, Mezo G. (2009) Development of an oxime bond containing daunorubicin-gonadotropin-releasing hormone-III conjugate as a potential anticancer drug. *Bioconjug Chem*. 20(4): 656-665.

93. Orban E, Mezo G, Schlage P, Csik G, Kulic Z, Ansorge P, Fellingner E, Moller HM, Manea M. (2011) In vitro degradation and antitumor activity of oxime bond-linked daunorubicin-GnRH-III bioconjugates and DNA-binding properties of daunorubicin-amino acid metabolites. *Amino acids*. 41(2): 469-483.
94. Manea M, Tovari J, Tejada M, Schulcz A, Kapuvári B, Vincze B, Mezo G. (2012) In-vivo antitumour effect of daunorubicin-GnRH-III derivative conjugates on colon carcinoma-bearing mice. *Anticancer drugs*. 23(1): 90-97.
95. Hegedus R, Manea M, Orban E, Szabo I, Kiss E, Sipos E, Halmos G, Mezo G. (2012) Enhanced cellular uptake and in vitro antitumor activity of short-chain fatty acid acylated daunorubicin-GnRH-III bioconjugates. *Eur J Med Chem*. 56: 155-165.
96. Schreier VN, Petho L, Orban E, Marquardt A, Petre BA, Mezo G, Manea M. (2014) Protein expression profile of HT-29 human colon cancer cells after treatment with a cytotoxic daunorubicin-GnRH-III derivative bioconjugate. *PLoS One*. 9(4): e94041.
97. Montagnani Marelli M, Manea M, Moretti RM, Marzagalli M, Limonta P. (2015) Oxime bond-linked daunorubicin-GnRH-III bioconjugates exert antitumor activity in castration-resistant prostate cancer cells via the type I GnRH receptor. *Int J Oncol*. 46(1): 243-253.
98. Schlage P, Mezo G, Orban E, Bosze S, Manea M. (2011) Anthracycline-GnRH derivative bioconjugates with different linkages: synthesis, in vitro drug release and cytostatic effect. *J Control Release*. 156(2): 170-178.
99. Hegedus R, Pauschert A, Orban E, Szabo I, Andreu D, Marquardt A, Mezo G, Manea M. (2015) Modification of daunorubicin-GnRH-III bioconjugates with oligoethylene glycol derivatives to improve solubility and bioavailability for targeted cancer chemotherapy. *Biopolymers*. 104(3): 167-177.
100. Engel JB, Schally AV, Buchholz S, Seitz S, Emons G, Ortmann O. (2012) Targeted chemotherapy of endometrial, ovarian and breast cancers with cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH). *Arch Gynecol Obstet*. 286(2): 437-442.

101. Engel J, Emons G, Pinski J, Schally AV. (2012) AEZS-108 : a targeted cytotoxic analog of LHRH for the treatment of cancers positive for LHRH receptors. *Expert Opin Investig Drugs*. 21(6): 891-899.
102. Metra M, Teerlink JR. (2017) Heart failure. *The Lancet*. 390(10106): 1981-1995.
103. Colvin-Adams M, Smith JM, Heubner BM, Skeans MA, Edwards LB, Waller C, Snyder JJ, Israni AK, Kasiske BL. (2013) OPTN/SRTR 2011 Annual Data Report: heart. *Am J Transplant*. 13 Suppl 1: 119-148.
104. Koch A, Tochtermann U, Remppis A, Dengler TJ, Schnabel PA, Hagl S, Sack FU. (2006) The Eurotransplant High-Urgency Heart Transplantation Program: an option for patients in acute heart failure? *Thorac Cardiovasc Surg*. 54(6): 414-417.
105. Smit FE, Dohmen PM. (2014) Bio-artificial heart as ultimate treatment of end-stage heart failure. *Med Sci Monit Basic Res*. 20: 161-163.
106. Tang XL, Rokosh G, Guo YR, Bolli R. (2010) Cardiac progenitor cells and bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells for cardiac repair after myocardial infarction. *Circ J*. 74(3): 390-404.
107. Fujita B, Zimmermann WH. (2017) Myocardial tissue engineering for regenerative applications. *Curr Card Rep*. 19(9): 78.
108. Smit FE, Dohmen PM. (2015) Cardiovascular tissue engineering: where we come from and where are we now? *Med Sci Monit Basic Res*. 21: 1-3.
109. Patra C, Talukdar S, Novoyatleva T, Velagala SR, Muhlfeld C, Kundu B, Kundu SC, Engel FB. (2012) Silk protein fibroin from *Antheraea mylitta* for cardiac tissue engineering. *Biomaterials*. 33(9): 2673-2680.
110. Taylor DA, Sampaio LC, Gobin A. (2014) Building new hearts: a review of trends in cardiac tissue engineering. *Am J Transplant*. 14(11): 2448-2459.
111. Silvestri A, Sartori S, Boffito M, Mattu C, Di Rienzo AM, Boccafoschi F, Ciardelli G. (2013) Biomimetic myocardial patches fabricated with poly(ϵ -caprolactone) and polyethylene glycol-based polyurethanes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 102(5): 1002-13.

112. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. (2011) An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 32(12): 3233-3243.
113. Lundberg MS. (2013) Cardiovascular Tissue Engineering Research Support at the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circ Res*. 112(8): 1097-1103.
114. Arshi A, Nakashima Y, Nakano H, Eaimkhong S, Evseenko D, Reed J, Stieg AZ, Gimzewski JK, Nakano A. (2013) Rigid microenvironments promote cardiac differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Sci Technol Adv Mater*. 14(2): 025003
115. Malischewski A, Moreira R, Hurtado L, Gesche V, Schmitz-Rode T, Jockenhoevel S, Mela P. (2017) Umbilical cord as human cell source for mitral valve tissue engineering - venous vs. arterial cells. *Biomed Tech (Berl)*. 62(5): 457-466.
116. Taylor DA, Parikh RB, Sampaio LC. (2017) Bioengineering Hearts: Simple yet Complex. *Curr Stem Cell Rep*. 3(1): 35-44.
117. Seif-Naraghi SB, Horn D, Schup-Magoffin PA, Madani MM, Christman KL. (2011) Patient-to-Patient Variability in Autologous Pericardial Matrix Scaffolds for Cardiac Repair. *J Cardiovasc Transl Res*. 4(5): 545-556.
118. Badylak SF. (2004) Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl Immunol*. 12(3-4): 367-377.
119. Schwarzbauer JE. (1991) Fibronectin: from gene to protein. *Curr Opin Cell Biol*. 3(5): 786-791.
120. Miyamoto S, Katz BZ, Lafrenie RM, Yamada KM. (1998) Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 857: 119-129.
121. Jonsson MK, Wang QD, Becker B. (2011) Impedance-based detection of beating rhythm and proarrhythmic effects of compounds on stem cell-derived cardiomyocytes. *Assay Drug Dev Technol*. 9(6): 589-599.
122. Drews JD, Miyachi H, Shinoka T. (2017) Tissue-engineered vascular grafts for congenital cardiac disease: Clinical experience and current status. *Trends Cardiovasc Med*. 27(8): 521-531.

123. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, Taylor DA. (2008) Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med.* 14(2): 213-221.
124. Wainwright JM, Czajka CA, Patel UB, Freytes DO, Tobita K, Gilbert TW, Badylak SF. (2010) Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Eng Part C Methods.* 16(3): 525-532.
125. Weymann A, Loganathan S, Takahashi H, Schies C, Claus B, Hirschberg K, Soos P, Korkmaz S, Schmack B, Karck M, Szabo G. (2011) Development and evaluation of a perfusion decellularization porcine heart model--generation of 3-dimensional myocardial neoscaffolds. *Circ J.* 75(4): 852-860.
126. Weymann A, Schmack B, Okada T, Soos P, Istok R, Radovits T, Straub B, Barnucz E, Loganathan S, Patzold I, Chaimow N, Schies C, Korkmaz S, Tochtermann U, Karck M, Szabo G. (2013) Reendothelialization of Human Heart Valve Neoscaffolds Using Umbilical Cord-Derived Endothelial Cells. *Circ J.* 77(1): 207-216.
127. Weymann A, Patil NP, Sabashnikov A, Jungebluth P, Korkmaz S, Li S, Veres G, Soos P, Istok R, Chaimow N, Patzold I, Czerny N, Schies C, Schmack B, Popov AF, Simon AR, Karck M, Szabo G. (2014) Bioartificial heart: a human-sized porcine model--the way ahead. *PLoS One.* 9(11): e111591.
128. Sanchez PL, Fernandez-Santos ME, Costanza S, Climent AM, Moscoso I, Gonzalez-Nicolas MA, Sanz-Ruiz R, Rodriguez H, Kren SM, Garrido G, Escalante JL, Bermejo J, Elizaga J, Menarguez J, Yotti R, Perez del Villar C, Espinosa MA, Guillem MS, Willerson JT, Bernad A, Matesanz R, Taylor DA, Fernandez-Aviles F. (2015) Acellular human heart matrix: A critical step toward whole heart grafts. *Biomaterials.* 61: 279-289.
129. Sanchez PL, Fernandez-Santos ME, Espinosa MA, Gonzalez-Nicolas MA, Acebes JR, Costanza S, Moscoso I, Rodriguez H, Garcia J, Romero J, Kren SM, Bermejo J, Yotti R, Del Villar CP, Sanz-Ruiz R, Elizaga J, Taylor DA, Fernandez-Aviles F. (2016) Data from acellular human heart matrix. *Data Brief.* 8: 211-219.
130. Giaever I, Keese CR. (1993) A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature.* 366(6455): 591-592.

131. Gorog DA, Fuster V. (2013) Platelet function tests in clinical cardiology: unfulfilled expectations. *J Am Coll Cardiol.* 61(21): 2115-2129.
132. Giaever I, Keese CR. (1984) Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(12): 3761-3764.
133. Pick H, Terrettaz S, Baud O, Laribi O, Brisken C, Vogel H. (2013) Monitoring proliferative activities of hormone-like odorants in human breast cancer cells by gene transcription profiling and electrical impedance spectroscopy. *Biosens Bioelectron.* 50: 431-436.
134. Lei KF, Wu MH, Hsu CW, Chen YD. (2014) Real-time and non-invasive impedimetric monitoring of cell proliferation and chemosensitivity in a perfusion 3D cell culture microfluidic chip. *Biosens Bioelectron.* 51: 16-21.
135. Sun SQ, Sursal T, Adibnia Y, Zhao C, Zheng Y, Li HP, Otterbein LE, Hauser CJ, Itagaki K. (2013) Mitochondrial DAMPs Increase Endothelial Permeability through Neutrophil Dependent and Independent Pathways. *PLoS One.* 8(3).
136. Kiss L, Walter FR, Bocsik A, Veszeka S, Ozsvari B, Puskas LG, Szabo-Revesz P, Deli MA. (2013) Kinetic analysis of the toxicity of pharmaceutical excipients Cremophor EL and RH40 on endothelial and epithelial cells. *J Pharm Sci.* 102(4): 1173-1181.
137. Opp D, Wafula B, Lim J, Huang E, Lo JC, Lo CM. (2009) Use of electric cell-substrate impedance sensing to assess in vitro cytotoxicity. *Biosens Bioelectron.* 24(8): 2625-2629.
138. Michaelis S, Wegener J, Robelek R. (2013) Label-free monitoring of cell-based assays: combining impedance analysis with SPR for multiparametric cell profiling. *Biosens Bioelectron.* 49: 63-70.
139. Liu F, Li F, Nordin AN, Voiculescu I. (2013) A novel cell-based hybrid acoustic wave biosensor with impedimetric sensing capabilities. *Sensors.* 13(3): 3039-3055.
140. Charwat V, Purtscher M, Tedde SF, Hayden O, Ertl P. (2013) Standardization of microfluidic cell cultures using integrated organic photodiodes and electrode arrays. *Lab Chip.* 13(5): 785-797.

141. Soós P, Schmack B, Istók R, Polgár L, Bagyura Z, Veres G, Merkely B, Szabó G, Weymann A. (2011) Szövetépítés egész szíven. *Card Hung.* 41(5): 373-378.
142. Sadler JE. (2009) Low von Willebrand factor: sometimes a risk factor and sometimes a disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 106-112.
143. Paul R, Banerjee AK, Guha S, Chaudhuri U, Ghosh S, Mondal J, Bandyopadhyay R. (2013) Study of platelet aggregation in acute coronary syndrome with special reference to metabolic syndrome. *Int J Appl Basic Med Res.* 3(2): 117-121.
144. Berlacher MD, Vieth JA, Heflin BC, Gay SR, Antczak AJ, Tasma BE, Boardman HJ, Singh N, Montel AH, Kahaleh MB, Worth RG. (2013) FcγRIIIa ligation induces platelet hypersensitivity to thrombotic stimuli. *Am J Pathol.* 182(1): 244-254.
145. Kasperska-Zajac A, Rogala B. (2007) Platelet activation during allergic inflammation. *Inflammation.* 30(5): 161-166.
146. Kasperska-Zajac A, Brzoza Z, Rogala B. (2008) Platelet function in cutaneous diseases. *Platelets.* 19(5): 317-321.
147. Nastalek M, Potaczek DP, Wojas-Pelc A, Undas A. (2011) Plasma platelet activation markers in patients with atopic dermatitis and concomitant allergic diseases. *J Dermatol Sci.* 64(1): 79-82.
148. Mylotte D, Kavanagh GF, Peace AJ, Tedesco AF, Carmody D, O'Reilly M, Foley DP, Thompson CJ, Agha A, Smith D, Kenny D. (2012) Platelet reactivity in type 2 diabetes mellitus: a comparative analysis with survivors of myocardial infarction and the role of glycaemic control. *Platelets.* 23(6): 439-446.
149. Koltai K, Feher G, Kesmarky G, Keszthelyi Z, Czopf L, Toth K. (2006) The effect of blood glucose levels on hemorheological parameters, platelet activation and aggregation in oral glucose tolerance tests. *Clin Hemorheol Microcirc.* 35(4): 517-525.
150. Ahuja KD, Adams MJ, Robertson IK, Ball MJ. (2009) Acute effect of a high-carbohydrate low-fat meal on platelet aggregation. *Platelets.* 20(8): 606-609.

151. Ahuja KD, Thomas GA, Adams MJ, Ball MJ. (2012) Postprandial platelet aggregation: effects of different meals and glycemic index. *Eur J Clin Nutr.* 66(6): 722-726.
152. Marcucci R, Cenci C, Cioni G, Lombardi A, Giusti B, Gensini GF. (2012) Antiplatelets in acute coronary syndrome: personal perspectives. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 10(12): 1487-1496.
153. Silvain J, Cayla G, Hulot JS, Finzi J, Kerneis M, O'Connor SA, Bellemain-Appaix A, Barthelemy O, Beygui F, Collet JP, Montalescot G. (2012) High on-thienopyridine platelet reactivity in elderly coronary patients: the SENIOR-PLATELET study. *Eur Heart J.* 33(10): 1241-1249.
154. Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Kopp CW. (2010) Adenosine diphosphate-inducible platelet reactivity shows a pronounced age dependency in the initial phase of antiplatelet therapy with clopidogrel. *J Thromb Haemost.* 8(1): 37-42.
155. Cuisset T, Quilici J, Grosdidier C, Fourcade L, Gaborit B, Pankert M, Molines L, Morange PE, Bonnet JL, Alessi MC. (2011) Comparison of platelet reactivity and clopidogrel response in patients ≤ 75 Years Versus > 75 years undergoing percutaneous coronary intervention for non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Am J Cardiol.* 108(10): 1411-1416.
156. Lages B, Weiss HJ. (1981) Dependence of human platelet functional responses on divalent cations: aggregation and secretion in heparin- and hirudin-anticoagulated platelet-rich plasma and the effects of chelating agents. *Thromb Haemost.* 45(2): 173-179.
157. Hu H, Forslund M, Li NL. (2005) Influence of extracellular calcium on single platelet activation as measured by whole blood flow cytometry. *Thromb Res.* 116(3): 241-247.
158. Saito K, Sano H, Kawahara J, Yokoyama M. (1995) Calcium supplementation attenuates an enhanced platelet function in salt-loaded mildly hypertensive patients. *Hypertension.* 26(1): 156-163.

159. van Lier M, Lee F, Farndale RW, Gorter G, Verhoef S, Ohno-Iwashita Y, Akkerman JW, Heijnen HF. (2005) Adhesive surface determines raft composition in platelets adhered under flow. *J Thromb Haemost.* 3(11): 2514-2525.
160. van Lier M, Verhoef S, Cauwenberghs S, Heemskerk JW, Akkerman JW, Heijnen HF. (2008) Role of membrane cholesterol in platelet calcium signalling in response to VWF and collagen under stasis and flow. *Thromb Haemost.* 99(6): 1068-1078.
161. Liu SV, Tsao-Wei DD, Xiong S, Groshen S, Dorff TB, Quinn DI, Tai YC, Engel J, Hawes D, Schally AV, Pinski JK. (2014) Phase I, dose-escalation study of the targeted cytotoxic LHRH analog AEZS-108 in patients with castration- and taxane-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 20(24): 6277-6283.
162. Ikada Y. (2006) Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface.* 3(10): 589-601.
163. Wang B, Borazjani A, Tahai M, Curry AL, Simionescu DT, Guan J, To F, Elder SH, Liao J. (2010) Fabrication of cardiac patch with decellularized porcine myocardial scaffold and bone marrow mononuclear cells. *J Biomed Mater Res A.* 94(4): 1100-1110.
164. Lucena SE, Jia Y, Soto JG, Parral J, Cantu E, Brannon J, Lardner K, Ramos CJ, Seoane AI, Sanchez EE. (2012) Anti-invasive and anti-adhesive activities of a recombinant disintegrin, r-viridistatin 2, derived from the Prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Toxicon.* 60(1): 31-39.
165. Assmann A, Delfs C, Munakata H, Schiffer F, Horstkotter K, Huynh K, Barth M, Stoldt VR, Kamiya H, Boeken U, Lichtenberg A, Akhyari P. (2013) Acceleration of autologous in vivo recellularization of decellularized aortic conduits by fibronectin surface coating. *Biomaterials.* 34(25): 6015-6026.

9. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

1. **Polgár L**, Lajkó E, Soós P, Láng O, Manea M, Merkely B, Mező G, Kőhidai L. (2018) Drug targeting to decrease cardiotoxicity – determination of the cytotoxic effect of GnRH-based conjugates containing doxorubicin, daunorubicin and methotrexate on human cardiomyocytes and endothelial cells. *Beilstein J Org Chem*. 14: 1583-1594.

IF 2,330

2. **Polgár L**, Soós P, Lajkó E, Láng O, Merkely B, Kőhidai L. (2018) Platelet impedance adhesiometry: A novel technique for the measurement of platelet adhesion and spreading. *Int J Lab Hematol*. 40(3): 372-381.

IF 1,919

3. Bäcker H*, **Polgár L***, Soós P, Lajkó E, Láng O, Merkely B, Szabó G, Dohmen PM, Weymann A, Kőhidai L. (2017) Impedimetric Analysis of the Effect of Decellularized Porcine Heart Scaffold on Human Fibrosarcoma, Endothelial, and Cardiomyocyte Cell Lines. *Med Sci Monit*. 23: 2232-2240

IF 1,894 – *Megosztott elsőszerzőség

4. Soós P, Schmack B, Istók R, **Polgár L**, Bagyura Zs, Veres G, Merkely B, Szabó G, Weymann A. (2011) Szövetépítés egész szíven. *Card Hung*. 41(5): 373-378.

Egyéb közlemények:

1. Varjú I, Farkas VJ, Kőhidai L, Szabó L, Farkas ÁZ, **Polgár L**, Chinopoulos C, Kolev K. (2018) Functional cyclophilin D moderates platelet adhesion, but enhances the lytic resistance of fibrin. *Sci Rep*. 8(1): 5366.

IF 4,122

2. Kiss LZ, Bagyura Z, Vadas R, **Polgár L**, Lux Á, Édes E, Szenczi O, Soós P, Szelid Z, Becker D, Jermendy G, Merkely B. (2017) Signs of subclinical atherosclerosis

in asymptomatic patients at increased risk of type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. 31(8): 1293-1298.

IF 2,792

3. Bagyura Z, Kiss L, Édes E, Lux A, **Polgár L**, Soós P, Szenczi O, Szelid Z, Vadas R, Józán P, Bagdy G, Merkely B. (2014) Cardiovascularis szűrőprogram a közép-magyarországi régióban – Budakalász Vizsgálat. *Orv Hetil*, 155(34): 1344-1352.
4. Kosztin A, Soós P, **Polgár L**, Kutyifa V, Becker D, Kovács A, Merkely B. (2014) EORP szívelégtelenség regiszter a Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinikán. *Card Hung*. 44(4): 218-223.
5. Kőhidai L, Lajkó E, Szabó I, **Polgár L**, Manea M, Mező G. GnRH-based drug targeting: Cell adhesion and migration modulator effects of GnRH derivatives in tumor cells. In: Sills ES (szerk.), *Gonadotropin-releasing hormone (GnRH): Production, structure and functions*. Ed. Sills ES; Nova Publ. 2013: 251-272

Könyvfejezet

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

IF 3,052 – *Megosztott elsőszereplőség

10. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt hálásan köszönöm témavezetőimnek, Dr. Kőhidai Lászlónak és Dr. Soós Pálnak a rengeteg szakmai segítséget, vezetést és támogatást, amelyet munkám során kaptam Tőlük.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Láng Orsolyának és Dr. Lajkó Eszternek a kísérletes munkában nyújtott segítségükért és baráti támogatásukért.

Köszönöm Dr. Merkely Béla Professzor Úrnak, a Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika igazgatójának, valamint Dr. Falus András Professzor Úrnak és Dr. Buzás Edit Professzorasszonynak, a Genetikai-, Sejt- és Immunbiológiai Intézet igazgatóinak, hogy a kutatásomhoz szükséges intézményi feltételeket lehetővé tették.

Köszönöm a Kemotaxis Munkacsoport tagjainak a munkámhoz nyújtott segítségüket.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Budakalász Epidemiológiai Vizsgálat tagjainak kutatásomhoz nyújtott segítségükért.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika és a Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet munkatársainak a munkámhoz nyújtott segítségüket.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm családomnak és barátaimnak szeretetüket és támogatásukat, amely nélkül ezt a munkát nem tudtam volna elvégezni.