

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Az α_2 -plazmin inhibitor szerepének vizsgálata
trombotikus megbetegedésekben**

Baráth Barbara

Témavezető: Dr. Katona Éva



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2021.

AZ α_2 -PLAZMIN INHIBITOR SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA TROMBOTIKUS MEGBETEGEDÉSEKBEN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: **Baráth Barbara**, okleveles klinikai laboratóriumi kutató

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Katona Éva, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Csősz Éva, PhD
Dr. Bodó Imre, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus

tagok: Dr. Csősz Éva, PhD

Dr. Bodó Imre, PhD

Dr. Wohner Nikolett, PhD

Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2021. augusztus 30. 13:00 (online)

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a barath.barbi11@gmail.com e-mail címre a vitát megelőző nap (2021.08.29.) 16:00 óráig.

1. BEVEZETÉS

A trombotikus megbetegedések világszerte vezető szerepet töltenek be, mind a mortalitásban, mind a morbiditásban. A trombus általi érelzáródás érintheti az artériás és a vénás keringést egyaránt.

Az α_2 -plazmin inhibitor (α_2 -PI), mely a plazmin fő inhibitora, fontos szerepet játszhat a trombózis kialakulásában és a trombus fenntartásában. A fibrinháló képződésével párhuzamosan az aktivált XIII-as faktor (FXIIIa) az α_2 -PI-t keresztköti a fibrin α -láncával, így védi az alvadékot a plazmin általi degradációval szemben. Az α_2 -PI a keringésben N-, és C-terminálisan is hasítódik. Az FXIIIa elsősorban a C-terminálisan ép α_2 -PI-t köti kovalensen, a trunkált formát kevésbé, valamint az N-terminálisan hasított formát gyorsabban köti a fibrinhez.

Korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy az újonnan képződött trombus ellenálló képessége a korai fibrinolízissel szemben nagyrészt az α_2 -PI fibrin alvadékba történő beépülésétől függ. Annak ellenére, hogy ennek a szabályozási lépésnek nagy jelentősége van és potenciális hatása lehet a trombotikus klinikai események széles körére, meglepően keveset tudunk arról, hogy az α_2 -PI különböző körülmények között hogyan kötődik a fibrinhez. Különböző állatkísérletekből származó eredmények alapján megállapították, hogy összefüggés van a trombolízis kiemenetele és az akut iszkémiás stroke-ot (AIS) elszenvedő egyedek plazmájából nyert fibrin alvadékba beépült α_2 -PI mértéke között. Meglepő módon az α_2 -PI beépülésének mértékét a fibrin alvadékba és annak összefüggését a kimenettel trombolízisen átesett AIS betegcsoportban még nem vizsgálták.

Korábbi vizsgálatok, melyek az α_2 -PI és a vénás trombózis kialakulásának kockázatával foglalkoztak, ahol csak α_2 -PI aktivitás szinteket mértek, nem szolgáltatottak meggyőző eredményeket az α_2 -PI szerepéről. Az α_2 -PI C-terminálisan hasított formáinak és azok arányának meghatározásával trombotikus megbetegedésekben eddig csak egy tanulmány foglalkozott, melyben miokardiális infarktust (MI) elszenvedett férfiakban hasonlították össze a C-terminálisan ép és trunkált formák szintjét korban illesztett kontrollcsoporttal.

Csak kevés tanulmány vizsgálta az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus és az artériás trombózis közötti kapcsolatot. A p.Arg6Trp polimorfizmus biokémiai vizsgálatok alapján feltételezett védő hatását sem koronária-ateroszklerózis, sem AIS-ban szenvedő betegekben nem tudták igazolni. A polimorfizmus hatását vénás trombózisban eddig még nem vizsgálták.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A trombotikus megbetegedések világszerte vezető szerepet töltenek be, mind a mortalitásban, mind a morbiditásban. A trombózis előfordulhat az artériás és vénás keringésben egyaránt. Az artériát érintő elzáródás főleg miokardiális infarktust (MI), vagy akut iszkémiás stroke-ot (AIS) okozhat, míg a vénás keringés elzáródása mélyvénás trombózishoz (DVT) vezet.

2.1. A vénás tromboembólia (VTE)

A VTE-ről akkor beszélünk, ha a vénákban a vér fluiditása megváltozik és vérrög alakul ki, mely elzárhatja az ereket. Ha ez a vérrög a végtagok vénáiban keletkezik akkor beszélünk DVT-ről, viszont, ha a kialakult trombus leszakad és a tüdőbe vándorol, akkor tüdőembólia (PE) alakul ki. A VTE az európai populációban 1000 emberből évente 1-2 főt érint. Csak DVT az esetek 60%-ában alakul ki, a maradék 40%-ban PE fordul elő DVT-vel vagy anélkül.

A VTE kialakulását mind genetikai, mind környezeti tényezők befolyásolhatják. A környezeti tényezőkön belül megkülönböztetünk provokatív (műtét, törés, trauma, daganat, terhesség, terhesség utáni időszak, immobilizáció, hosszútávú utazás, katéter, akut infekció, hospitalizáció) és nem provokatív befolyásoló tényezőket (nem, életkor, BMI, túlsúly, hormon terápia, fogamzásgátló szedése, sztatinok használata, kortikoszteroidok használata, fizikai aktivitás, ülő munka, légszennyezettség). Nagyon valószínű, hogy a VTE kialakulásának kockázata akkor a legnagyobb, ha a genetikai és a környezeti tényezők együtt érvényesülnek.

Az előzőekben felsorolt rizikó tényezők mellett a VTE kialakulásának kockázatát növelheti a transzvéna pacemaker jelenléte, a DM, a magas vérnyomás, a VTE korábbi családi előfordulása, valamint az értágulatos vénák, korábbi felszíni vénás trombózis, vagy részleges végtagbénulással járó neurológiai kórképek. Az alacsony high-density lipoprotein (HDL) és a magas triglicerid (TG) szint növeli a VTE kockázatát, míg az emelkedett HDL szint véd a VTE kialakulásával szemben.

A kor a trombózis egyik legjelentősebb rizikófaktora. A VTE bármilyen korban kialakulhat, de főképp az idős korosztályt érinti. Incidenciája nagyon idős korban kb. 1000x-es a nagyon fiatalokhoz képest. Az DVT és a PE előfordulási gyakorisága a kor előrehaladtával nemtől függetlenül növekszik.

A nemek tekintetében elmondhatjuk, hogy a férfiakban gyakoribb a trombózis kialakulása (130 fő / 100.000 fő / év), mint a nőkben (110 fő / 100.000 fő / év). Viszont fiatal felnőtt nőkben mégis gyakoribb a VTE kialakulásának kockázata, ami a hormonális változásokhoz köthető, de 45 éves kor felett általánosan gyakoribb a VTE a férfiakban. Azt feltételezik, hogy ennek az oka a különböző életvitel, de ez még nem tisztázott.

A diéta és a testmozgás is befolyásolhatja a VTE kialakulását. Míg az artériás trombózis a rendszeres testmozgással megelőzhető, addig a vénás trombózisnál ez a folyamat bonyolultabb. A mérsékelt fizikai aktivitás hasznos, de az erős, kimerítő fizikai teljesítmény vagy a mozgásszegény életvitel magasabb kockázatot jelenthet a VTE kialakulására nézve.

A vénás trombózisra a multifaktoriális (nem Mendeli) öröklésment jellemző. Kiváltó okai között több, mint 20 genetikai rizikófaktor szerepel, melyeknek többsége a véralvadási rendszer fehérjéinek mutációit jelenti. A rizikófaktorok közül 7 az örökletes túlzott véralvadásért felelős, melyek közül 4 az általános populációban gyakoribb (gamma fibrinogén, V-ös véralvadási faktor (FV), protrombin (FII) 20210A, nem 0-ás vércsoport) és 1,5-3-szoros rizikót eredményezhetnek. A protein C (PC), protein S (PS) és az antitrombin heterozigóta mutációi pedig nagyobb, kb. 10-szeres rizikót jelentenek a VTE kialakulására nézve.

Tehát ezek alapján megállapítható, hogy ha a genetikai rizikótényezők mellett környezeti rizikófaktorok is jelen vannak, akkor ezek képesek egymás hatását felerősíteni, ami egy nagyobb kockázatot jelent a VTE kialakulására nézve.

2.2 Az akut iszkémiás stroke

A stroke az egyik vezető halált és rokkantságot okozó megbetegedés, ami évente 17 millió embert érinthet a világon. Kelet-Európában a legnagyobb a betegség incidenciája és a halálozások száma, de Magyarországon is a harmadik leggyakoribb a halálokok között. A stroke kb. 85%-a iszkémiás eredetű és az agy véráramlásának elzáródását okozza, ami visszafordíthatatlan agysérülésekhez és későbbi neurológiai deficithez vezethet. Az AIS az agyi katasztrófák kb. 80%-át adja, ezzel szemben a vérzéses stroke kialakulása csak 20%. Az AIS-ban szenvedő betegeknél elengedhetetlen a véráramlás gyors helyreállítása ezzel is csökkentve a rokkantság kialakulásának mértékét. A véráramlás elzáródásának megoldása a trombus feloldása, melynek ma egyetlen farmakológiai kezelése lehetséges: a rekombináns szöveti-típusú plazminogén aktivátor (rt-PA) intravénás adása, amit a tünetek megjelenésétől 3-4,5 órán belül be kell adni a betegnek (terápiás ablak). Sajnálatos módon a szűk időablak miatt nem minden stroke-on átesett beteg részesülhet megfelelő kezelésben. De a rt-PA

kezelés esetén is a betegek csak kb. 30-35%-ánál teljes a felépülés, míg a stroke-on átesettek legfeljebb 6-8%-ánál nem halálos kimenetelű terápiával összefüggő koponyaűri (intrakraniális) vérzés állhat fenn, mely potenciálisan a tünetek rosszabbodásához vagy a trombolízisen átesett betegek 1%-ánál halálhoz is vezethet.

Az AIS rizikófaktorai lehetnek a nem, az életkor, az etnikai hovatartozás, a családi halmozódás, a genetikai faktorok, a magas vérnyomás, a DM, a pitvarfibrilláció, a dohányzás, az iszkémiás szívbetegségek, a hiperlipidémia, a diszlipidémia, a túlzott alkoholfogyasztás, a hormon terápia vagy a droghasználat stb.

A stroke világszervezetek együttesen megalkottak egy skála rendszert, a National Institutes of Health Stroke Scale-t (NIHSS), mely alapján képesek lehetünk objektív módon meghatározni a stroke súlyosságát.

A trombolízis kimenetele és a biztonságossága valószínűleg a fibrinolízist befolyásoló és szabályozó tényezőktől függ, de a pontos patomechanizmusa még nem ismert.

2.3 A fibrinolízis

A fibrinolitikus rendszer fontos szerepet játszik az emlősök keringésében, a fibrin alvadék lebontásában, az érrendszer normál működésében, valamint megkönnyíti és elősegíti a szövet újraképződését, illetve megakadályozza a vérrögök kialakulását. A rendszer központi enzime a plazmin, melynek inaktív proenzime a plazminogén. Plazminogén aktivátorok hatására aktív plazminná alakul, mely képes a fibrin gyors hasítására és a fibrinből kisebb molekulatömegű polipeptideket, úgynevezett szolubilis fibrin degradációs termékeket hozva létre.

A plazminogén egy szerin proteáz, mely termeléséért a máj felelős. Két immunológiailag különböző, fiziológiásan is jelenlévő aktivátor katalizálja a plazminogén-plazmin átalakulást: a szöveti-típusú plazminogén aktivátor (t-PA) és az urokináz-típusú plazminogén aktivátor (u-PA). A t-PA főleg a fibrin bontásában vesz részt, míg az u-PA feladata az extracelluláris mátrix lebontása, a szövet újraképződése, a sebgyógyulás folyamatában való részvétel és a sejtmigráció. A t-PA fibrin hiányában gyenge plazminogén aktivátor, viszont aktivitása két nagyságrenddel nagyobb fibrin jelenlétében. A plazmin (és minden szerin proteáz) C-terminális végén elhelyezkedő aktív centrumában szerin, hisztidin és aszparaginsav aminosavak találhatóak (katalitikus triád), valamint az N-terminális rész tartalmaz öt funkcionális homológ domént, melyet Kringle-doméneknek neveznek. Ezek a Kringle-domének több lizin-kötő helyet is tartalmaznak (LBS-lysine binding site), amin keresztül történik a plazminogén fibrinhez, illetve az α_2 -plazmin inhibitorhoz (α_2 -PI) való kötődése.

A fibrinolitikus rendszer gátlása a plazminogén aktivátorok valamint a plazmin gátlásán keresztül is megvalósulhat. A plazminogén aktiválás gátlása a plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1) és a plazminogén aktivátor inhibitor-2 (PAI-2) által valósul meg. A plazminogén aktiválását főleg a PAI-1 gátolja, mivel a PAI-2 szintje normál körülmények között a plazmában alacsony vagy egyáltalán ki sem mutatható (kivéve terhességben), de képes gátolni a t-PA-t és az u-PA kétláncú formáját is.

A véralvadás XIII-as faktora (FXIII) egy tetramer struktúrájú plazma fehérje, egy pro-transzglutamináz, mely két katalitikus A alegységből (FXIII-A) és két hordozó/védő funkciót ellátó B alegységből (FXIII-B) áll. A fibrinolitikus rendszer aktiválódása előtt, a véralvadási kaszkád utolsó szakaszában az inaktív FXIII trombin és Ca^{2+} hatására aktiválódik. Az aktív forma (FXIIIa) a szubsztrát fehérjében a peptid láncokat $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})\text{lizil}$ kötésekkel kovalensen köti össze. A hemosztázisban betöltött fontos feladata a fibrin α - és γ -láncok keresztbe kötése, mely során γ -lánc dimereket és nagy molekulatömegű α -lánc polimereket hoz létre. Egy másik fontos feladata a fibrinolízis inhibitorának, az α_2 -PI-nek a fibrin α -láncához való keresztkötése, mely során az α_2 -PI 14-es pozíciójában lévő glutamin (Gln14) és a fibrin α -láncán található 303-as pozícióban lévő lizin (Lys303) között hoz létre kovalens keresztkötetést.

2.4. Az α_2 -plazmin inhibitor

Az α_2 -PI fontos szerepet tölt be a fibrinolitikus rendszer szabályozásában, mint a plazmin legfőbb gátlószere. A humán α_2 -PI egyláncú glikoprotein, mely egy szerin proteáz inhibitor, a szerpin szupercsalád tagja. Más szerpinektől eltérően az α_2 -PI a C-terminális végén kb. 50-55 aminosavval többlet tartalmaz. Az ezen szakaszban található lizineken keresztül képes a plazmin(ogén) kötésére. A humán plazmában kb. 1 μM (≈ 70 mg/L) koncentrációban kering és az *in vivo* felezési ideje kb. 2,6 nap. Elsődlegesen a máj szintetizálja, majd szekretálja de a vese és az agy is előállíthatja kisebb mennyiségben. Molekulatömege ~ 67 kDa, szénhidrát tartalma kb. 11-14% és szulfatált tirozin reziduumokat tartalmaz a 457-es pozícióban. Az α_2 -PI legfőbb feladata a plazmin gátlása, mely során a szabad plazmával sztöchiometrikus 1:1 arányú plazmin-antiplazmin komplexet (PAP-komplex) képez. A plazmában a PAP-komplex féleletideje 12 óra. Az α_2 -PI nem csak a szabad plazmin gátlására képes, hanem a fibrinhez kötődve a fibrinháló felszínén is megtartja inhibitor aktivitását és így képes a plazmin megkötésére és gátlására, ezáltal védi a fibrint a plazmin általi azonnali degradációtól.

A SERPINF2 gén kódolja a humán α_2 -PI-t, ami a 17p13.3 kromoszómán található. Ez a gén 491 aminosavból álló fehérjét kódol, amely 27 aminosavnyi szignálpeptidből és egy 464 aminosavból álló egyláncú fehérjéből áll. A gén 10 exont és 9 intront tartalmaz, melyek közül a 4. exon kódolja a keresztköti, illetve a 10. exon kódolja a plazminogén-kötő helyet. Hosszúsága kb. 16 000 bázispár. A humán α_2 -PI DNS szekvenciája 23-28% homológiát mutat egyéb szerpinekkal, illetve 73-81% homológiát mutat más fajokkal (pl. tehén, egér, patkány, nyúl).

2.4.1. Az α_2 -PI N-terminális módosulása

A humán α_2 -PI prekursor formája metionnal kezdődik (Met- α_2 -PI), ilyen formában szekretálódik a májból. A plazmában azonban mindkét végén protolitikus hasításokat szenvedhet. Az N-terminális hasítást az antiplazmint hasító enzim (antiplasmin cleaving enzyme, APCE), vagy más néven a szolubilis fibroblaszt aktiváló protein (sFAP) végzi, mely lehasítja az első 12 aminosavat a fehérjéről. Az α_2 -PI N-terminálisan a 12-es pozícióban lévő prolin és a 13-as pozícióban lévő aszparagin között szenved hasítást, így kialakul a 452 aminosavból álló, aszparaginnal kezdődő forma (Asn- α_2 -PI). A keringő α_2 -PI 30%-a Met- α_2 -PI, míg 70%-a Asn- α_2 -PI formában van jelen. Mindkét forma egyaránt gátolja a szabad plazmint, de a hasított, nagyobb mennyiségben jelenlévő Asn- α_2 -PI-t a FXIIIa gyorsabban keresztköti a fibrinhez, így ez a forma hatékonyabban képes a fibrinolízis gátlására.

A Met- α_2 -PI N-terminális hasítását az α_2 -PI fehérje génjében található p.Arg6Trp polimorfizmus is befolyásolja. A Trp allél gyakorisága egy egészséges populációban 20,5%. A Met- α_2 -PI(Arg6) vagy a Met- α_2 -PI(Trp6) formákat a FXIIIa ugyanolyan hatékonysággal köti a fibrinhez, de az sFAP azt a Met- α_2 -PI-t, amelyben a 6. pozícióban arginin van 8-szor gyorsabban képes hasítani, mint amelyikben triptofán van. Az Asn- α_2 -PI-fibrin FXIII általi keresztköti azért lehet gyorsabb, mert ebben a hasított formában a Gln2 (eredetileg Gln14) a FXIIIa számára könnyebben hozzáférhető. A Met- α_2 -PI(Arg6) vagy a Met- α_2 -PI(Trp6) esetén az első 12 aminosav jelenléte kevésbé teszi lehetővé a Gln14 hozzáférhetőségét, így a keresztköti reakció sokkal lassabban megy végbe, mint az Asn- α_2 -PI esetében. Viszont, mindhárom N-terminális forma ugyanolyan mértékben képes a plazmin kötésére és annak gátlására.

Azért, mert csökkenti az α_2 -PI-nek az N-terminális hasítását és ennek révén a FXIIIa általi keresztköti a fibrinhez, azaz a fibrinolízis gátlását, a polimorfizmusnak védő hatása

feltételezhető a trombotikus megbetegedésekkel szemben. A biokémiai vizsgálatok alapján feltételezett védő hatást azonban klinikai tanulmányokban korábban még nem sikerült igazolni.

2.4.2. A szolubilis fibroblaszt aktiváló protein (sFAP)

Az sFAP a dipeptidil-peptidáz (DPP) 4 család tagjai közé tartozik. A DPP család tagjai közül a FAP egyedüli módon a dipeptidil-peptidáz aktivitáson kívül endopeptidáz aktivitással is rendelkezik.

A FAP két formában található meg a humán szervezetben, szolubilis és membránhoz kötött formában. A FAP egy II-es típusú integráns membránfehérje. A szolubilis formája mind intra-, mind extracellulárisan megtalálható.

Az sFAP képes hasítani endopeptidáz aktivitása révén az I-es típusú kollagén denaturált formáját és az α_2 -PI-t, ezért antiplazmint hasító enzimnek is nevezik (APCE). Ez az enzim hasítja le az α_2 -PI N-terminális részén lévő első 12 aminosavat.

A FAP-ot az aktivált fibroblasztok termelik a sebgyógyulás és az embriogenezis során, valamint epitheliális eredetű daganatos megbetegedésekben is kimutatták az expresszióját. Több kutatócsoport is vizsgálta, hogy milyen daganatos megbetegedésekben expresszálódik a FAP, és azt találták, hogy főleg a prosztatát, a mellet, a hasnyálmirigyét, a gyomort, a colont és a tüdőt érintő daganatok esetén termelődik.

Korábban már vizsgálták az sFAP antigén szinteket különböző betegcsoportokban. Erre a meghatározásra egy kereskedelemben kapható szendvics ELISA módszert használtak. Akut koronária szívbetegségben szenvedőkben szignifikánsan magasabb sFAP antigén koncentrációt találtak a kontrollcsoporthoz képest, illetve az akut koronária szívbetegségben szenvedőknél a férfiakban magasabb értékeket mértek, mint a nőkben.

Egy másik tanulmányban artériás trombózist elszenvedő betegek és kontrollok között az sFAP szintekben nem találtak szignifikáns különbséget. A kontroll csoportban a férfiakban magasabb volt az sFAP a szintje, mint nőkben. Az sFAP szintek a BMI-vel mutattak szignifikáns korrelációt.

Uitte de Willige és munkatársai egy másik tanulmányban megvizsgálták, hogy az sFAP szintek milyen összefüggést mutatnak a májcirrózis súlyosságával. A betegekben emelkedett sFAP koncentrációt találtak a kontrollokhoz képest és ez az emelkedés szignifikáns összefüggést mutatott a májcirrózis súlyosságával.

Az sFAP szinteket vénás trombózist elszenvedett betegek körében még nem vizsgálták.

2.4.3. Az α_2 -PI C-terminális módosulása

A plazmában az α_2 -PI a C-terminális végen is proteolitikus hasítást szenved. Az összes α_2 -PI kb. 35%-a trunkálódik ezen a végen. Az *in vivo* hasítási helyet, egy 2020-ban megjelent közleményben írták le, mely szerint a 421-es glutamin és a 422-es aszparaginsav közé tehető a fő hasítási hely, de más potenciális hasítási helyeket is azonosítottak. Az α_2 -PI a C-terminális részen található lizinek segítségével kötődik a plazminogén Kringle-doménjeihez, de ezen szakasz hiányában már nem képes a plazminogén kötésére és ezáltal a plazmin gátlása is lassabb. A hasítást végző enzimet még nem sikerült azonosítani.

Kimutatták, hogy a C-terminálisan trunkált α_2 -PI legalább 26 aminosavval rövidebb, mint a teljes hosszúságú α_2 -PI. Ebben a szakaszban 6 lizin található, amelyek közül 5 vesz részt a plazminogénhez való kötődésben.

A humán α_2 -PI C-terminális része a lizin mellett tartalmaz még egy arginin-glicin-aszparaginsav (RGD) szekvenciát, mely kulcsfontosságú szerepet tölt be az integrinekhez való kötődésben, illetve a sejtek felismerésében. Ennek a szerepét, viszont csak kis mértékben vizsgálták.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Annak ellenére, hogy az α_2 -PI a plazmin gátlásával fontos szerepet játszik a fibrinolízis szabályozásában és ezáltal a trombotikus megbetegedésekben is, illetve a korábbi tanulmányok alapján azt feltételezzük, hogy csak az FXIIIa által az alvadékhoz kötött α_2 -PI gátolja hatékonyan a fibrinolízist, az α_2 -PI fibrin alvadékba való beépülését befolyásoló faktorokról és azok klinikai következményeiről keveset tudunk. Ugyancsak kevés információ áll rendelkezésre a fehérje proteolitikus hasításával képződő formák mennyiségéről és szerepéről a különböző trombotikus megbetegedésekben.

Munkánk során célunk volt vizsgálni:

1. hogyan tudjuk viszonylag egyszerűen és reprodukálhatóan meghatározni az alvadékba beépülő α_2 -PI mennyiségét és hogyan befolyásolja ezt a FXIII plazma koncentrációja
2. az α_2 -PI plazma koncentrációját, valamint az N-terminális hasítást befolyásoló sFAP antigén szinteket és az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus előfordulását akut iszkémiás stroke-on átesett betegek és egészséges kontrollok csoportjában
3. az α_2 -PI beépülését a plazmából készített fibrin alvadékba és ennek összefüggését a trombolízis terápia kimenetelével akut iszkémiás stroke-on átesett betegekben
4. az α_2 -PI aktivitást, a totál α_2 -PI, a PB- α_2 -PI és az NPB- α_2 -PI antigén és az sFAP antigén szinteket, valamint az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmusát egészséges kontrollok és vénás trombózison átesett betegek csoportjában
5. az α_2 -PI antigén és aktivitás szintek egymással, valamint egyéb paraméterekkel való korrelációját
6. hogy a magas totál α_2 -PI, PB- α_2 -PI és NPB- α_2 -PI, valamint az sFAP koncentráció fokozza-e a vénás trombózis kialakulásának kockázatát
7. mivel az sFAP proteolitikus hatását az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus csökkenti, annak vizsgálatát, hogy kimutatható-e interakció a két paraméter között a trombózis rizikó befolyásolása során.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A trombin-koncentráció és az alvasztási idő hatása az α_2 -plazmin inhibitor alvadékba való beépülésére

A trombin koncentráció és az alvasztási idő hatását az α_2 -PI fibrin alvadékba való beépülésének mértékére különböző koncentrációjú humán trombinnal (CoaChrom, Maria Enzerdorf, Ausztria) (0,5; 1; 2; 5 U/mL) és különböző ideig történő alvasztással (10; 20; 30; 45; 60; 180 perc) vizsgáltuk két lépésben.

1. 10 egészséges személy plazmájához trombint (0,5; 1; 2; 5 U/mL) és 20 mM CaCl_2 -ot adtunk majd 1 órán át 37 °C-on történő inkubálást követően a keletkezett szérumot az alvadéktól centrifugálással elválasztottuk (16000 g, 5 perc).
2. 10 egészséges személy plazmájához 2 U/mL trombint és 20 mM CaCl_2 -ot adtunk majd különböző ideig tartó, 37 °C-on történő inkubálást követően a keletkezett szérumot az alvadéktól centrifugálással elválasztottuk (16100 g, 5 perc).

A totál α_2 -PI antigén szinteket a kiindulási plazma mintákból és az alvasztás után keletkezett szérumokból az intézetünkben kifejlesztett szendvics ELISA technikával határoztuk meg, amely az α_2 -PI minden formáját felismeri, de nem reagál a PAP-komplexszel (a plazma α_2 -PI referencia tartománya: 48-85 mg/L) (Teraz-Orosz, A., et al., J Immunol Methods, 2019. 471:27-33.).

Az ELISA technikával kapott antigén koncentrációk alapján az alvadékba beépült α_2 -PI mennyiségét az alábbi módon számítottuk:

$$\alpha_2\text{-PI beépülés(\%)} = (\text{plazma } \alpha_2\text{-PI (mg/L)} - \text{szérum } \alpha_2\text{-PI (mg/L)}) / \text{plazma } \alpha_2\text{-PI (mg/L)} \times 100$$

4.2. A FXIII koncentráció hatása az α_2 -plazmin inhibitor alvadékba való beépülésére

A FXIII koncentráció hatását az α_2 -PI beépülésének mértékére a fibrin alvadékba FXIII deficiens plazma minta alkalmazásával vizsgáltuk, amely normál α_2 -PI szinttel rendelkezett.

- A FXIII deficiens plazmát kiegészítettük plazmából tisztított FXIII preparátummal (FXIII-A₂B₂) különböző koncentrációban (2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 mg/L). A FXIII-t egészséges személyek kevert plazmájából tisztítottuk Loránd és munkatársai közleménye alapján.

- A FXIII-mal kiegészített plazmákhoz 2 U/mL trombint és 20 mM CaCl₂-ot adtunk és 30 percig, 37 °C-on inkubáltuk, majd a keletkezett szérumot az alvadéktól centrifugálással elválasztottuk (16100 g, 5 perc).
- A totál α_2 -PI antigén szinteket a plazma és a szérum mintákból a fent leírtak alapján határoztuk meg.
- Az alvadékot 3 mg/mL jódacetamidot (IAA) tartalmazó PBS (pH; 7,2) pufferrel alaposan (20x500 μ L) mostuk CRC oszlopokban (compact reaction columns; Affymetrix, Inc. Cleavland, OH, USA).
- A mosott alvadékot 8M ureát és 5% merkaptotetanolt (Bio-Rad, Hercules, CA USA) tartalmazó redukáló Laemmli mintapufferben szobahőmérsékleten, rázatás mellett 20 óra alatt feloldottuk.
- A feloldott alvadékokat (100x-os hígításban) 7,5%-os SDS-PAGE gélben megfuttattuk. Molekulasúly standardként biotinált molekulasúly markert (Bio-Rad), α_2 -PI standardként pedig humán plazmából tisztított α_2 -PI preparátumot (Calbiochem, San Diego, CA, USA) használtunk.
- A fehérjéket PVDF membránra (Bio-Rad) elektroblottoltuk 25 V-on 30 percig Trans-Blot Turbo Transfer System (Semi-Dry) segítségével.
- A membránok szabad felszínét 3% zselatint tartalmazó TBS (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 0,1% Tween20, pH 7,4) oldattal blokkoltuk folyamatos rázatás mellett, 1 óráig szobahőmérsékleten.
- A membránokat minden inkubációs lépés után 3x5 percig 25 mL tTBS oldattal mostuk.
- A VECTASTAIN ABC reagens (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) A (Avidin DH) és B (biotinált peroxidáz) komponenseit 1:50, 1:50 arányban hígítva használtuk a molekulasúly markerek detektálására. A komponenseket 1:1 arányban összemérve 30 percig inkubáltuk fénytől elzárva, szobahőmérsékleten. Ezt 80x-os hígításban alkalmaztuk a membránon.
- Az ABC komplexet a tormaperoxidázzal (HRPO) jelzett poliklonális totál α_2 -PI ellenes antitesttel (20 000x-es hígításban) együtt 0,5% zselatin-tTBS oldattal hígítva tettünk a membránra. Szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk.
- Az előhíváshoz Pierce ECL Western blot szubsztrátot (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk, melynek komponenseit 1:40 arányban mértük össze.
- A kemilumineszcens jel detektálását Azure c300 készülékben végeztük (425 nm).

4.3. Betegek és kontrollok

4.3.1. Akut iszkémiás stroke-ot elszenvedő betegek

A tanulmányba 57 AIS-ot elszenvedő beteget vontuk be, akik a tünetek megjelenésétől számítva 4,5 órán belül rt-PA (Alteplase, Boehringer Ingelheim, Germany) trombolízis terápiában részesültek. A betegek beválogatása 2016. szeptembere és 2017. júniusa között a Debreceni Egyetem Neurológiai Klinikáján történt a “European Stroke Organisation 2008. guideline for thrombolysis” ajánlás alapján. A stroke diagnózisának felállítása a neurológiai tünetek alapján radiológusok által kontrasztanyag nélküli, egyszerű CT és CT angiográfia (CTA) segítségével történt. A kizárási és a beválogatási kritériumok megegyeztek a standard kizárási és beválogatási kritériumokkal. Azok a betegek, akik mechanikus trombektómián estek át, kizárássra kerültek a tanulmányból. A betegeket a rövid-távú kimenet alapján csoportosítottuk a funkcionális neurológiai státusz (National Institutes of Health Stroke Scale score, NIHSS) változása alapján, a felvételtől számított trombolízis utáni 7. napra. Ha az NIHSS pontszám 4 ponttal csökken, vagy a 7. napra 0-ra változik, akkor jó kimenetelről beszélünk, míg a pontszám növekedése legalább 4 ponttal kedvezőtlen kimenetelt jósolhat. A vérzéses transzformációk jelenlétét (intrakraniális vérzés) az ECASS II kritérium szerint határoztuk meg a kontroll CT alapján az esemény után 24 órával. A perifériás vérvétel az AIS betegek esetén a felvételkor, a trombolízis terápia előtt történt. A rutin laboratóriumi meghatározások (ionok, glükóz, máj-, és vesefunkció tesztek) szérum mintákból standard protokollok alapján a központi laboratóriumban történtek.

4.3.2. Vénás tromboembólián átesett betegek

A tanulmányba 218 nem rokon vénás tromboembóliát elszenvedett beteget vontunk be, akik a Debreceni Egyetem Trombózis Központjában kerültek felvételre a 2014-es évben. A vérminták gyűjtése legalább 3 hónappal az akut esemény után történt. Azokat a betegeket, akiknek malignus betegségük volt, vagy antitrombin, PC vagy PS deficienciával rendelkeztek nem válogattuk be a tanulmányba. A DVT gyanúját color Doppler-ultrahang vagy venográfiás vizsgálattal erősítették meg, míg a PE-t az Európai Kardiológiai Társaság ajánlásai alapján diagnosztizálták.

4.3.3. Kontrollok

A 218 kontroll minta gyűjtése ugyanabban a földrajzi régióban történt mint a betegminták gyűjtése. Minden krónikus betegséget kivéve a mérsékelt, jól karban tartott magas vérnyomást (a vérnyomás 145/90 és 165/95 Hgmm között) és a vérvételt megelőző három hétben meglévő bármilyen akut betegséget kizárási kritériumnak tekintettünk a kontroll csoportban.

A vérvétel a VTE betegek és a kontrollok esetén reggel 8 és 11 óra között, az AIS betegeknél a trombolízis terápiát megelőzően történt a könyökhajlati vénából Na-citrát alvadásgátlót tartalmazó (1 rész 0,105 mol/L-es pufferolt trinátrium-citrát : 9 rész vér) Vacutainer® (Becton Dickinson, Plymouth, UK) csövekbe. A plazmát centrifugálással szeparáltuk 1500 g-n 20 percig és felhasználásig -70°C-on tároltuk. A nem antikoagulált teljes vérből szérumot készítettünk.

A tanulmányokat a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága és az Emberi Erőforrások Minisztériumának Egészségügyi Tudományos Tanácsának Etikai Testülete is jóváhagyta. A vizsgálat protokollja megfelel a Helsinki deklaráció (1975) etikai irányelveinek. Valamennyi beteg vagy hozzátartozója és az egészséges önkéntesek írásos hozzájárulásukat adták a tanulmányban való részvételhez.

Etikai engedélyszámok: DE RKEB/IKEB: 4672-2016; ETT TUKEB: 54005-3/2016/EKU

4.4. Az alvadékba beépült totál α_2 -PI antigén meghatározása

- Az 57 AIS beteg és a hozzájuk korban illesztett 26 kontroll Na-citrátos plazmáját 2 U/mL trombinnal és 20 mM CaCl₂-dal megalvasztottuk 37 °C-os vízfürdőben, 30 percig.
- A szérumot és az alvadékot centrifugálással elválasztottuk (16 100 g, 5 perc).
- Az eredeti plazmából és a keletkezett szérumból szendvics ELISA technikával meghatároztuk a totál α_2 -PI antigén szinteket.
- Az alvadékba beépült totál α_2 -PI mennyiségét a plazma és a szérum szintekből kalkuláltuk a 4.1. pontban leírtak alapján.

4.5. PB- α_2 -PI antigén meghatározás

A PB- α_2 -PI antigén szintjét egy általunk fejlesztett új ELISA technikával határoztuk meg a VTE és a kontroll csoportban.

A PB- α_2 -PI antigén ELISA meghatározás lépései:

- 96 lyukú lemez (EB, Thermo Fischer Scientific) felszínét poliklonális kecske totál α_2 -PI ellenes antitesttel (GA2AP-AP) (3 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{L/luk}$, 0,2 M NaHCO_3 -ban, pH 9,6) fedtük és inkubáltuk egy éjszakán át +4°C-on.
- A lemezt 150 $\mu\text{L/luk}$ hígító pufferrel (1% BSA, 0,1% Tween20-TBS (50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,4)) blokkoltuk 1 óráig, szobahőmérsékleten.
- A blokkolás után 100 $\mu\text{L/luk}$ hígított standardot, plazmát vagy szérum mintát vittünk fel a lemezre és 1 óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk.
- Majd 100 μL 0,5 $\mu\text{g/mL}$ egér monoklonális anti-humán PB- α_2 -PI antitestet (3AP, Technoclone) vittünk fel a lemez lukjaiba és 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten.
- 100 μL biotinált kecske anti-egér IgG-t (Southern Biotech) adtunk a lemez minden lukjába 5000x-es hígításban és szintén 1 óráig, szobahőmérsékleten inkubáltuk.
- Ezután 100 μL streptavidin-HRPO konjugátumot (Southern Biotech) mértünk a lukakba 3000x-es hígításban és 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten.
- A lemez lukjaiba 100 μL 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine (TMB, One Component HRP Microwell Substrate, Diarect Ag, Freiburg, Németország) oldatot mértünk és sötétben 10 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk.
- A reakciót 50 μL 2M H_2SO_4 oldattal állítottuk le.
- Az abszorbanciát 450 nm-en detektáltuk iEMS MF ELISA olvasóban (Labsystems Oy, Helsinki, Finnország).
- A lépések között a lemezt háromszor mostuk 300 $\mu\text{L/luk}$ 0,05% Tween20-at tartalmazó TBS mosó oldattal.
- A módszert standard humán plazmára (Siemens) kalibráltuk. Mivel a normál humán plazmában a PB- α_2 -PI a totál α_2 -PI-nek 65%-a, így a standard humán plazma PB- α_2 -PI tartalmát 0,65 U/L-nek tekintettük. A koncentrációt úgy kaptunk, hogy az ELISA-val meghatározott totál α_2 -PI koncentrációt szoroztuk 0,65-tel. Így az ismert koncentrációjú PB- α_2 -PI-t tartalmazó standard humán plazmából hígítottuk a standard görbe pontjait 10 - 500 $\mu\text{g/L}$ koncentráció tartományban.

- Kereskedelmi forgalomban kapható normál és patológiás kontrollt (Siemens) és kevert humán plazmát (20 egészséges egyén 1:1 arányban kevert plazmája) használtuk minőségi kontrollként 1000x-es hígításban.
- A mintákat minden esetben párhuzamosokban mértük és az eredményt a két mérés átlaga alapján kalkuláltuk.

Az NPB- α_2 -PI antigén szintjét a mért totál és a PB- α_2 -PI antigén szintek különbségeként kalkuláltuk.

4.6. Egyéb laboratóriumi vizsgálatok

- A minták fibrinogén koncentrációját Clauss-módszerrel Siemens BCS-XP koagulométeren (Siemens Healthineers, Erlangen, Németország) határoztuk meg.
- A C-reaktív protein (CRP), koleszterin szinteket rutin laboratóriumi módszerrel Roche/Hitachi Modular P800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) készüléken határoztuk meg.
- A FXIII-A₂B₂ antigén szinteket laboratóriumunkban kidolgozott szendvics ELISA technika segítségével mértük.
- A DNS-t a citráttal alvadásgátolt teljes vérből izoláltuk QIAamp DNA Blood Mini Kit segítségével (Qiagen, Hilden, Németország).
- Az α_2 -PI Arg6Trp (rs2070863) polimorfizmust valós idejű PCR-rel (RT-PCR) LightCycler® 480 készülékkel (Roche Diagnostic) határoztuk meg.
- Az FV Leiden és a FII 20210 G>A mutációkat intézetünkben már korábban meghatározták.
- Az α_2 -PI aktivitást Berichrom α_2 -PI aktivitás assay segítségével határoztuk meg BCS-XP koagulométeren.
- Az sFAP antigén koncentráció meghatározását humán FAP DuoSet® ELISA (R&D System, Abingdon, UK) kit segítségével a gyártó leírása alapján végeztük. A méréshez a kalibrációs görbe pontjait rekombináns humán FAP-ból hígítottuk.

4.7. Statisztikai analízis

Az adatok eloszlásának meghatározására a Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztuk. A normál eloszlású adatokat átlag \pm SD, a nem normál eloszlást mutató adatokat medián (IQR)

értékekkel prezentáltuk. Normál eloszlású minták esetén, független mintás T-próbával határoztuk meg a csoportok átlagai közti különbséget, míg Mann-Whitney U teszt segítségével a rangszámok közötti különbségeket adtuk meg, nem normál eloszlású csoportok esetén. A csoportok közötti kategorikus változóknál való különbséget a χ^2 -próbával vizsgáltuk. Az α_2 -PI aktivitás és a totál α_2 -PI, PB- α_2 -PI és a NPB- α_2 -PI közötti korrelációt kétváltozós korrelációs analízissel számoltuk (Pearson korrelációt használtunk azoknak a paramétereknek az összevetésére, melyek normál eloszlást mutattak; Spearman korrelációt használtunk azoknál a paramétereknél, melyek nem mutattak normál eloszlást.) Többváltozós lineáris regressziós analízist használtunk annak érdekében, hogy meghatározzuk milyen paraméterekkel mutatnak független összefüggést az α_2 -PI formák és az sFAP szintek. A nem normál eloszlású változókat (BMI, CRP, koleszterin és a kor) az analízishez természetes logaritmusos transzformációval alakítottuk át normál eloszlásúvá. A különböző α_2 -PI és az sFAP szintekkel független összefüggést mutató paramétereket ko-variánsként alkalmaztuk, amikor a korrigált szinteket hasonlítottuk össze ANOVA módszerrel. Több csoport összehasonlítása során a statisztikai szignifikancia meghatározására a Bonferroni korrekciót használtuk. A totál α_2 -PI, a PB- α_2 -PI és NPB- α_2 -PI, valamint az sFAP szintek hatását a VTE rizikójára úgy vizsgáltuk, hogy ezen paraméterek szintjeit három csoportba osztottuk a kontroll csoport megfelelő paraméter szintjeinek 33. és 67. percentilise alapján. Az esélyhányadosokat (OR) és a 95%-os konfidencia intervallumokat adtuk meg. A korrigált OR-ek meghatározására olyan logisztikus regressziós modelleket használtunk, melyek tartalmazták azokat az egyéb paramétereket, melyek függetlenül hozzájárulhatnak a VTE rizikójához. A BMI-t, a koleszterint és a CRP-t folyamatos változóként tettük a modellbe a logaritmusos transzformáció után. A szignifikancia szintje 95% volt ($p < 0,05$). A statisztikai analízist SPSS szoftver segítségével végeztük (SPSS 26.0, Chicago, IL, USA).

5. EREDMÉNYEK

5.1. A trombin koncentráció és az alvasztási idő hatása a totál α_2 -PI beépülésére a fibrin alvadékba

Annak vizsgálatára, hogy a totál α_2 -PI milyen mértékben épül be a fibrin alvadékba, azt a módszert választottuk, hogy citráttal alvadésgátolt plazma mintát trombin és kalcium hozzáadásával megalvasztunk, majd a keletkező szérumból és az eredeti plazmából meghatározzuk ELISA módszerrel az α_2 -PI koncentrációt. A plazma és szérum α_2 -PI koncentrációk különbsége adja az alvadékba bekötődött α_2 -PI mennyiségét.

A módszer alkalmazása előtt megvizsgáltuk a trombin koncentrációjának és az alvasztási időnek a hatását az α_2 -PI beépülésének mértékére. A totál α_2 -PI maximális beépülése az alvadékba megközelítőleg 45%. A beépülésnek ezt a szintjét már relatíve alacsony trombin koncentráció mellett el tudjuk érni (0,5-2 U/mL), magasabb trombin koncentrációnak már nincs további hatása. Az α_2 -PI beépülése a fibrin alvadékba viszonylag gyorsan megtörténik 2 U/mL trombin koncentráció mellett.

Az α_2 -PI beépülés mértéke az alvadékba már 10 perc után eléri a ~40% -ot, de a maximális beépülés 30 perc után történik meg. A további kísérletekhez a 2 U/mL trombin koncentrációt és a 30 perces alvasztási időt választottuk ki. Ezen paraméterek mellett az egészséges kontroll mintákban az α_2 -PI beépülésének mértéke $44.0 \pm 4.6\%$ volt (n=10).

5.2. A FXIII koncentráció hatása az α_2 -PI beépülésére a fibrin alvadékba

A FXIII koncentráció hatását az α_2 -PI beépülésére, úgy vizsgáltuk, hogy FXIII deficiens plazmát kiegészítettünk különböző koncentrációjú FXIII-A₂B₂ preparátummal. Korábbi tanulmányokkal szemben, ahol a FXIII koncentráció hatását a beépülés mértékére, csak a normál átlag FXIII koncentráció 8%-áig vizsgálták, mi a FXIII szint folyamatos növelésével a magasabb (200%-ig) FXIII koncentráció hatását is megvizsgáltuk. A normál plazma FXIII koncentráció (21 mg/L) eléréséig a beépülés mértéke a FXIII emelésével párhuzamosan, gyorsan nőtt, ~40% beépülést eredményezve. Ez után a görbe már kissé ellaposodik, de a FXIII koncentrációt tovább emelve még 5-10%-kal nő a beépült α_2 -PI mennyisége.

A FXIII koncentráció hatását az α_2 -PI alvadékba való beépülésének mértékére Western blottal is megvizsgáltuk. Az alvadékokat alapos mosás után 8M ureát tartalmazó Laemmli-féle mintapufferben feloldottuk, majd redukáló SDS-PAGE-t követően a fehérjéket PVDF membránra blottoltuk, ahol az α_2 -PI-t az összes formát felismerő poliklonális anti- α_2 -PI

antitesttel jelöltük meg. A FXIII koncentráció emelkedésével fokozatosan nő a fibrin α -lánc polimerekhez kötött α_2 -PI és csökken a kisebb molekulatömegű termékek mennyisége. 30 mg/L feletti FXIII szintnél már olyan erős a fibrin α -láncok keresztkötése, hogy nem sikerült az alvadékot oly mértékben feloldani, hogy az a gélbe be tudjon diffundálni. Ezért ezzel a módszerrel a normál FXIII koncentráció feletti hatás biztonságosan már nem vizsgálható az extrém fibrin keresztkötés miatt. Az ábrán az α_2 -PI monomernek megfelelő sávban az is látható, hogy az intenzív mosás ellenére jelentős mennyiségű nem kovalensen kötött α_2 -PI is található az alvadékban, melynek mennyisége nem függ a FXIII koncentrációtól.

5.3. Az α_2 -PI fibrin alvadékba történő beépülésének mértéke akut iszkémiás stroke-on átesett betegekben és ennek kapcsolata a trombolízis kimenetelével

A fentiekben ismertetett alvasztásos módszert alkalmaztuk annak vizsgálatára, hogy az α_2 -PI plazma alvadékba történő beépülésének mértéke összefügg-e a trombolízis kimenetelével AIS-on átesett betegekben. Meghatároztuk az α_2 -PI beépülésének mértékét, valamint a fibrinogén és a FXIII-A₂B₂ szinteket 57 AIS beteg (akik intravénás trombolízisen estek át a tünetek megjelenésétől 4,5 órán belül) trombolízis előtti, valamint 26 korban illesztett egészséges kontroll citrátos plazma mintájából A betegeket a rövid-távú kimenetel szerint csoportosítottuk. A terápiával összefüggő intrakraniális (intracerebrális) vérzésben szenvedő betegek szignifikánsan idősebbek voltak (72,2±10,0 vs 61,4±13,6; p<0,01) és szignifikánsan súlyosabb stroke-ot szenvedtek el a felvételtkor NIHSS pontok alapján (10 (6,5-11,0) vs 1,0 (0,0-2,0); p<0,01), szemben azokkal, akik jó kimenetellel rendelkeztek. A FXIII szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak minden betegcsoportban, mint a kontrollokban (23,4±5,5; 22,9±7,6; 21,3±6,7 vs 28,2±4,3 mg/L; p<0,01; jó kimenetel, stagnáló/rossz kimenetel; terápiával összefüggő intrakraniális vérzés vs kontroll). A fibrinogén szintek jelentősen magasabbak voltak azokban a betegekben, akiknél sikertelen volt a trombolízis terápia és stagnáló/rossz kimenetellel rendelkeztek, összehasonlítva a kontrollokkal (4,3±1,5 vs 3,6±0,5 g/L; p<0,05). Meg kell említeni, hogy a felvételtkor CRP szint szignifikánsan emelkedett volt azoknál a betegeknél, akik stagnáló/rossz kimenetellel rendelkeztek, illetve akik terápiával-összefüggő intrakraniális vérzésben szenvedtek, az egészséges kontrollokhöz viszonyítva (4,9 (2,8-7,1); 5,3 (2,5-11,9) vs 1,7 (0,8-3,4) mg/L; p<0,01). A lízis utáni intrakraniális vérzésben szenvedők csoportjában a plazma α_2 -PI szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a kontrollokhöz képest (52,8±19,7 vs 66,9±8,7 mg/L; p<0,05). Az α_2 -PI beépülésének mértéke a fibrin alvadékba jelentősen alacsonyabb volt a teljes betegpopulációban mint a kontrollokban (41,6±11,3 vs 49,4±4,6 mg/L; p<0,001).

Amikor a betegeket csoportosítottuk a terápia kimenetele alapján, a beépülés mértéke szignifikánsan alacsonyabb volt a stagnált/rossz kimenetellel rendelkező és lízis utáni intrakraniális vérzésben szenvedő betegeknél ($41,5 \pm 11,8\%$ és $37,3 \pm 14,0\%$) összehasonlítva az egészséges kontrollokkal ($49,4 \pm 4,6\%$). Az α_2 -PI beépülésének mértéke a jó kimenetellel rendelkező betegeknél ($47,4 \pm 6,7\%$) nem különbözött szignifikánsan az egészségesektől. Másrészt, az α_2 -PI beépülése lényegesen alacsonyabb volt azokban a betegeknél, akik terápiával összefüggő intrakraniális vérzésben szenvedtek ($37 \pm 14,5\%$), összehasonlítva a jó kimenetellel rendelkező betegekkel ($47,4 \pm 6,7\%$).

Megvizsgáltuk, hogy az α_2 -PI beépülés mértéke a fibrin alvadékba milyen korrelációt mutat egyéb paraméterekkel. A kontroll csoportban a fibrinogén statisztikailag szignifikáns korrelációt mutatott az α_2 -PI beépülésének mértékével ($r=0,453$, $p=0,039$). A betegcsoportban pozitív, szignifikáns korrelációt találtunk a plazma α_2 -PI ($r=0,544$, $p<0,001$), a FXIII szintek ($r=0,303$, $p=0,022$) és az α_2 -PI fibrin alvadékba történő beépülése között. Továbbá, erős, negatív összefüggést találtunk a betegeknél a felvételi NIHSS ($r=-0,449$, $p=0,001$) és az α_2 -PI beépülés mértéke között. Ebből arra lehet következtetni, hogy súlyosabb stroke esetén *in vitro* kevesebb α_2 -PI épül be az alvadékba. Mivel az α_2 -PI beépülése a fibrin alvadékba limitált (45-50%), ennek az összefüggésnek a legvalószínűbb oka az lehet, hogy az akut esemény során bekövetkező jelentős *in vivo* fogyás miatt az α_2 -PI forma, mely képes a fibrinhez kötődni és beépül az alvadékba, kisebb mennyiségben van jelen azon betegek plazma mintáiban, akik súlyosabb stroke-ot szenvedtek el. Az NIHSS és az α_2 -PI beépülésének mértéke közötti negatív összefüggés különösen erős volt a lízis utáni intrakraniális vérzésben szenvedő betegek alcsoportjában ($r=-0,627$, $p=0,039$).

Az sFAP szintje és a α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus befolyásolja az α_2 -PI N-terminális hasítását és ezáltal az α_2 -PI FXIII általi keresztkötését a fibrinhez. Ezért meghatároztuk ezen paramétereket is a vizsgált csoportokban. Az sFAP szint szignifikánsan alacsonyabb volt a betegeknél, mint az egészséges kontrolloknál ($73,2 \pm 16,6$ vs $90,5 \pm 21,2$ $\mu\text{g/L}$; $p<0,001$). Az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus nem befolyásolta a kimenetelt, az allél frekvencia gyakorlatilag azonos volt a beteg és a kontroll csoportokban.

5.4. Az α_2 -PI hatása a vénás tromboembólia kialakulására

Ebbe a tanulmányba 218 vénás tromboembóliát elszenvedett, illetve korban és nemből illesztett 218 egészséges kontroll személyt vontunk be. A csoportok medián életkora 40 év volt és a férfiak és nők eloszlása is azonos volt a két csoportban (105 és 113). A 218 VTE beteg között 44 esetben fordult elő mind DVT, mind PE, 9 esetben csak PE volt kimutatható.

A vaszkuláris megbetegedések rizikófaktorai közül a betegek magasabb BMI-vel rendelkeztek, mint a kontrollok (29,0 (25,9-32,9) vs 25,2 (21,8-28,7) $p<0,001$; beteg vs kontroll), valamint a magas vérnyomásnak (48% vs 21%, $p<0,001$), a hiperkoleszterinémiának (28,4% vs 9,3%; $p<0,001$), a FV Leiden mutációnak volt nagyobb prevalenciája a betegekben, mint a kontrollokban (allél frekvencia: 19,7% vs 5,7%; $p<0,001$). Jelenleg is dohányzók a VTE csoportban nem várt módon kevesebben voltak (32 vs 48; $p=0,002$), feltehetőleg azért, mert a betegek az első VTE esemény után megváltoztatták dohányzási szokásaikat. A CRP (3,8 (2,3-6,7) vs 1,6 (0,9-3,5) mg/L; $p<0,001$; beteg vs kontroll), a fibrinogén ($3,7\pm 0,66$ vs $3,4\pm 0,58$ g/L; $p<0,001$) és a plazma FXIII aktivitás ($119,6\pm 27,4$ vs $109,5\pm 24,8$ %; $p<0,001$) és antigén (FXIII-A₂B₂) szintek ($117,8\pm 27,4$ vs $107,2\pm 23,6$ %; $p<0,001$) szignifikánsan magasabbak voltak a betegekben, mint a kontrollokban. A szerzett rizikó faktorok közül fogamzásgátló szedése vagy hormon terápia 19, trauma 13, hosszú távú utazás 8, műtét 7, szülés utáni időszak 5, lupus antikoaguláns 3, kortikoszteroid kezelés 2, tumor 2, terhesség 2, visszértágulat 2 esetben fordult elő a betegcsoportban.

5.5. Az α_2 -PI aktivitás korrelációja az α_2 -PI antigén szintekkel

A kontroll csoportban megvizsgáltuk, hogy az α_2 -PI aktivitás meghatározás eredményei hogyan korrelálnak a totál és a C-terminálisan ép és trunkált α_2 -PI antigén koncentráció értékekkel. A legnagyobb korrelációt az α_2 -PI aktivitás és a totál α_2 -PI antigén szintek között találtuk ($r=0,690$, $p<0,001$). A PB- α_2 -PI antigén szint szintén erős korrelációt mutatott az aktivitás értékekkel ($r=0,562$, $p<0,001$), ugyanakkor az NPB- α_2 -PI antigén és az α_2 -PI aktivitás szintek között jóval gyengébb korrelációt találtunk ($r=0,394$, $p<0,001$). A betegcsoportban hasonló korrelációkat találtunk: a totál α_2 -PI antigén esetén: $r=0,782$; PB- α_2 -PI esetén: $r=0,610$; és NPB- α_2 -PI esetén: $r=0,477$; ($p<0,001$). A betegcsoportban mutatott nagyobb korrelációs értékek feltehetőleg annak a szélesebb tartománynak köszönhetőek, amelyet az emelkedett α_2 -PI szint okoz ebben a csoportban. Nem találtunk szignifikáns korrelációt az α_2 -PI aktivitás és a NPB- α_2 -PI százalékos aránya között ($r=0,121$, $p=0,107$).

5.6. A kontroll csoportban mért α_2 -PI aktivitás és antigén szintek korrelációja egyéb paraméterekkel

Az α_2 -PI aktivitás és antigén szintek egyéb paraméterekkel való korreláció analízise azt mutatta, hogy az α_2 -PI aktivitás, a totál α_2 -PI és a PB- α_2 -PI antigén szintek mérsékelt, de szignifikáns korrelációt mutattak a fibrinogén ($r=0,289$, $p<0,001$; $r=0,295$, $p<0,001$; $r=0,242$,

p=0,002) és a koleszterin értékekkel (r=0,238, p=0,002; r=0,233, p=0,003; r=0,253, p=0,001). Gyenge korrelációt találtunk a BMI-vel, de ez az összefüggés csak a totál α_2 -PI szintekkel volt statisztikailag szignifikáns (r=0,190, p=0,014). Az α_2 -PI aktivitás (r=-0,226, p=0,004), a totál α_2 -PI (r=-0,157, p=0,043) és a PB- α_2 -PI (r=-0,199, p=0,010) mérsékelt negatív összefüggést mutattak a korrallal. A PB- α_2 -PI és a nemek (r=-0,156, p=0,045) között találtunk negatív összefüggést, ami azt jelenti, hogy a férfiak alacsonyabb PB- α_2 -PI szinttel rendelkeztek, mint a nők. Meglepő volt viszont, hogy az NPB- α_2 -PI antigén szint nem mutatott korrelációt a fentebb említett paraméterekkel. Csak a CRP-vel (r=0,187, p=0,015) és a magas vérnyomással előfordulásával (r=0,193, p=0,012) mutatott gyenge összefüggést.

5.7. Az α_2 -PI aktivitás és antigén szintek változása a kontroll és a betegcsoportban

Az α_2 -PI aktivitás (130±15,6 vs 117±14,5%; p<0,001; beteg vs kontroll) és antigén szintek (72,7±9,2 vs 65,1±7,7 mg/L; p<0,001) szignifikáns emelkedést mutattak a VTE csoportban. A fibrinogénre, BMI-re, koleszterinre és a korra való korrigálás nem módosította jelentősen az eredményeket. A C-terminálisan ép PB- α_2 -PI (41,8±5,6 vs 42,3±4,9 mg/L; p=0,295) átlagos értékeiben nem volt szignifikáns különbség a beteg és a kontroll csoportban, azonban a független befolyásoló tényezőkre korrigálva az eredményeket a két csoport közötti különbség statisztikailag szignifikáns eltérést mutatott (41,2 (40,5-41,9) vs 42,6 (41,9-43,4) mg/L; p=0,013).

Mivel a totál α_2 -PI magasabb volt a betegekben, a PB- α_2 -PI antigén szint nem tért el így nem volt meglepetés, hogy az NPB- α_2 -PI (30,8 (26,3-35,5) vs 21,9 (18,0-26,9) mg/L; p<0,001) szintén szignifikáns emelkedést mutatott a betegcsoportban és az eredmény a fenti paraméterekre való korrekció után sem változott. A nők magasabb PB- α_2 -PI antigén (nők vs férfiak; 43,4±5,5 vs 40,0±5,2 mg/L; p<0,001; 43,3±4,6 vs 41,3±4,7 mg/L; p=0,02, a beteg és a kontroll csoportban) és alacsonyabb NPB- α_2 -PI antigén (nők vs férfiak; 29,5 (25,8-35,3) vs 31,5 (26,9-35,6) mg/L; p=0,205; 21,2 (17,5-26,2) vs 23,6 (18,7-28,0) mg/L; p=0,061, a beteg és a kontroll csoportban) szinttel rendelkeztek mindkét csoportban, de a különbség csak a PB- α_2 -PI szint esetén volt statisztikailag szignifikáns. Az NPB- α_2 -PI százalékos aránya (nők vs férfiak; 41,1±5,7 vs 43,6±7,1%; p=0,003; 33,5±7,4 vs 35,8±6,3%; p=0,012, a beteg és a kontroll csoportban) szignifikánsan magasabb volt a férfiakban mindkét csoportban. Az α_2 -PI aktivitás (nők vs férfiak; 134±14,1 vs 125±15,5%; p<0,001), a totál α_2 -PI antigén (nők vs férfiak; 73,9±8,9 vs 71,5±9,1 mg/L; p<0,001) és a PB- α_2 -PI antigén szintek (nők vs férfiak; 43,4±5,5 vs 40,0±5,2 mg/L; p<0,001) emelkedése kiemelkedőbb volt a nőkben a VTE csoportban.

5.8. sFAP antigén szintek

Az sFAP antigén szintek gyenge pozitív korrelációt a BMI-vel ($r=0,219$; $p=0,004$), a FXIII aktivitás szintekkel ($r=0,202$; $p=0,009$) és gyenge negatív összefüggést a fibrinogén szintekkel mutattak a kontroll csoportban ($r=-0,160$; $p=0,039$). Az sFAP medián értékei szignifikánsan emelkedettebbek voltak a VTE csoportban (80,5 (67,0-99,8) vs 76,3 (65,3-90,1) $\mu\text{g/L}$; $p=0,044$), habár a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns a BMI, a fibrinogén és FXIII aktivitás szintekre való korrigálás után (83,4 (80,3-86,6) vs 79,8 (76,6-82,9) $\mu\text{g/L}$; $p=0,123$). A beteg csoportban a férfiak magasabb medián sFAP értékekkel rendelkeztek, mint a nők (nők vs férfiak; 77,4 (64,8-94,4) vs 83,6 (69,3-103,1) $\mu\text{g/L}$; $p=0,019$), míg a kontroll csoportban a férfiak és a nők között a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns (74,3 (63,3-87,6) vs 78,6 (69,1-92,4) $\mu\text{g/L}$; $p=0,073$).

5.9. Az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus és az sFAP antigén szintek közötti összefüggés a betegcsoportban

Az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus és az sFAP antigén szint hatását vizsgáltuk a VTE kialakulására. A polimorfizmus genotípusának eloszlása megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúlynak a vizsgált populációban ($\chi^2 = 0,2284$, $p = 0,6327$). A Trp6 hordozó és a Trp allél frekvencia nem tért el szignifikánsan egymástól a kontroll és a betegcsoportban. Nem volt szignifikáns összefüggés a Trp allél hordozása és a VTE előfordulása között a teljes vizsgálati populációban (OR: 0,912, 95% CI: 0,617-1,348, $p=0,645$). Azoknak az egyéneknek, akiknek az sFAP értéke a felső harmadban volt ($n=90/72$ a beteg/kontroll csoportban) nem volt szignifikánsan magasabb rizikójuk a VTE előfordulására nézve (OR: 1,246, 95% CI: 0,793-1,959, $p=0,340$), összehasonlítva azokkal az esetekkel, akiknek a legalsó harmadban volt az sFAP szintjük ($n=71/70$ a beteg/kontroll csoportban). Azonban, ha a polimorfizmus hatását csak azon személyek csoportjában vizsgáltuk, akiknek az sFAP szintje a felső harmadban volt (R6/W6=62/28 és 41/31 a beteg és a kontroll csoportban), kimutatható volt egy szignifikáns védőhatás a VTE kialakulására nézve. A FV Leiden mutáció, a magas vérnyomás, a BMI, a CRP, a fibrinogén és a koleszterin szintekre való korrigálás után az OR: 0,425, 95% CI: 0,199-0,911, $p=0,028$.

5.10. Az α_2 -PI aktivitás, a totál α_2 -PI antigén, a PB- α_2 -PI antigén és az NPB- α_2 -PI antigén szintek összefüggése a VTE kialakulásának kockázatával

A felső harmadban található α_2 -PI aktivitás (OR: 5,89, 95% CI: 2,714-12,806, $p < 0,001$) a totál α_2 -PI antigén (OR: 7,64, 95% CI: 3,459-16,896, $p < 0,001$) és az NPB- α_2 -PI antigén (OR: 9,87, 95% CI: 4,095-23,783, $p < 0,001$) szintek erős, független összefüggést mutattak a VTE kialakulásának rizikójával. A felső harmadban lévő PB- α_2 -PI antigén szintek egy alacsonyabb VTE rizikóval társultak (OR: 0,77, 95% CI: 0,487-1,234, $p = 0,283$) de ez az összefüggés csak az egyéb befolyásoló tényezőkre való korrigálás után lett statisztikailag szignifikáns (OR: 0,37, 95% CI: 0,173-0,762, $p = 0,007$). Az emelkedett antigén koncentráció hatásán kívül, a magas NPB- α_2 -PI %-os aránya is szignifikánsan emelkedett független VTE rizikót eredményezett (OR: 8,37, 95% CI: 3,635-19,259, $p < 0,001$).

6. MEGBESZÉLÉS

Korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy az újonnan képződött trombus ellenálló képessége a korai fibrinolízissel szemben nagyrészt az α_2 -PI fibrin alvadékba történő beépülésétől függ. Annak ellenére, hogy ennek a szabályozási lépésnek nagy jelentősége van és potenciális hatása lehet a trombotikus klinikai események széles körére, meglepően keveset tudunk arról, hogy az α_2 -PI különböző körülmények között hogyan kötődik a fibrinhez. Jelen munkám során kifejlesztettünk egy olyan módszert, mellyel meg tudjuk határozni az α_2 -PI beépülésének mértékét a fibrin alvadékba, még pedig úgy, hogy a plazmából és a plazma alvasztása után készült szérumból mért α_2 -PI antigén szintek különbségeként megadható a beépült α_2 -PI mennyisége és %-os aránya is egyaránt. Ezt a módszert használva az első (akut iszkémiás stroke-ot elszenvedő betegek vs. egészséges kontrollok) tanulmányban az α_2 -PI beépülésének mértéke az egészséges kontrollokban $44,0 \pm 4,6\%$ volt. Korábbi tanulmányokban, tisztított fehérjékből létrehozott alvadékban SDS-PAGE és Western blot technikák segítségével vizsgálták az α_2 -PI és a fibrin α -lánc keresztkötést és az eredmények alapján az α_2 -PI bekötődését a fibrinhez csupán csak 30% körülire becsülték. Ezeknek a kísérleteknek a limitációja lehetett, hogy tisztított α_2 -PI-t használtak a kísérletekhez, ami csak a plazminogén-kötő formát tartalmazta, illetve a Western blot technika nem alkalmas a nagy molekulatömegű α_2 -PI-fibrin α -lánc polimerek mennyiségi analízisére. Az α_2 -PI fibrin alvadékba történő beépülésének mértéke a plazmából és az alvasztás után keletkezett szérumból ELISA technikával meghatározott α_2 -PI szintek különbségeként megadható. Egy a közelmúltban megjelent közleményben hasonló módszert használtak a Chandler hurokban készített plazma trombusba beépült α_2 -PI kvantitálására, amelyben a beépülést kb. 30-50%-ra becsülték. Eredményeink azt mutatják, hogy nem csak a FXIIIa által keresztkötött α_2 -PI épül be az alvadékba, hanem kisebb mennyiségben nem kovalensen módon is kötődik az α_2 -PI a fibrinhez, amit Tsurupa és munkatársai vizsgálatai is alátámasztanak. Ez utóbbi nem kovalens kölcsönhatás feltételezhetően hozzájárul az α_2 -PI megfelelő elhelyezkedéséhez, ezáltal megkönnyíti a keresztkötési folyamatot. Korábbi megállapításokkal ellentétben, kimutattuk, hogy 8% FXIII koncentráció esetén az α_2 -PI fibrin alvadékba való beépülése még nem éri el a maximumát. A beépült α_2 -PI kb. 100% plazma FXIII koncentrációig meredeken emelkedik és a FXIII koncentráció további emelkedése bár kisebb mértékben, de tovább fokozza a beépülést, ami hozzájárulhat a stabilabb alvadék kialakulásához. Ez a hiányzó biokémiai kapcsolat részben magyarázhatja az emelkedett FXIII szint akut trombotikus eseményekben betöltött szerepét. A csökkent fibrinolitikus kapacitást fiatalokban a MI és a stroke

rizikófaktoraként határozták meg, de a pontos mechanizmust egyelőre nem sikerült meghatározni. Feltételezhető, hogy az emelkedett FXIII szint általi α_2 -PI nagymértékű beépülése a fibrin alvadékba és a fibrinolízis hatékony gátlása szerepet játszhat az oklúziós trombus fenntartásában olyan körülmények között, ahol az ateroszklerózis nem túl kiterjedt.

A trombolitikus kezelés során a fibrinolízist gátló szabályozási lépéseket le kell győzni a trombus hatékony feloldásának érdekében. Állatmodellben már bemutatták, hogy a trombus t-PA által kiváltott trombolízissel szembeni ellenállását nagymértékben befolyásolja az újonnan képződött trombusokban lévő aktív α_2 -PI mennyisége. Az állatmodellekből származó eredmények alapján lehetséges összefüggés van a trombolízis kimenetele és az akut iszkémiás stroke-ot elszenvedő betegek plazmájából nyert fibrin alvadékba való α_2 -PI beépülés mértéke között. Meglepő módon az α_2 -PI beépülésének mértékét a fibrin alvadékba AIS-ot elszenvedő, trombolízisen átesett betegcsoportban és a kimenetellel való összefüggésben még nem vizsgálták. Jelen munkánkban bemutattuk, hogy AIS betegekben a tünetek megjelenésétől számítva 4,5 órán belül alacsonyabb mértékű az *in vitro* α_2 -PI beépülés a fibrin alvadékba a súlyosabb stroke-ban szenvedőknél. Az eredményeink azt szemléltetik, hogy szignifikáns negatív összefüggés van a felvételi NIHSS és az α_2 -PI beépülés mértéke között. Ezeket az eredményeket az α_2 -PI jelentős fogyásával magyarázhatjuk a plazmában az akut esemény során. Mivel az α_2 -PI beépülés mértéke limitált (45-50%), így feltételezhetjük, hogy az α_2 -PI azon része, mely beépülhet az alvadékba kevésbé elérhető a súlyosabb stroke-ot elszenvedő betegek plazma mintájában a jelentős *in vivo* fogyás miatt. Régóta ismert, hogy a súlyosabb stroke kevésbé kedvező trombolízis kimenetellel és lízissel szembeni ellenállással társul és ugyanakkor nagyobb esély van a vérzéses komplikációra, de ennek az összefüggésnek a pontos oka még nem tisztázott. Jelen tanulmányban az α_2 -PI *in vitro* beépülése a fibrin alvadékba szignifikánsan alacsonyabb volt azokban a betegekben, akik trombolízis utáni intrakraniális vérzésben szenvedtek, szemben azokkal, akik kedvezőbb kimenettel rendelkeztek. Összhangban az irodalomban leírtakkal, azok a betegek, akik terápiával összefüggő koponyaűri vérzésben szenvedtek a felvételi szignifikánsan súlyosabb stroke-ot diagnosztizáltak (magasabb NIHSS pontszám). A súlyosabb stroke egy nagyobb méretű trombussal társulhat, több α_2 -PI épül be és így kevésbé lesz fogékony a trombolízisre, de magasabb lesz a vérzéses rizikó. Ezekben az esetekben az α_2 -PI *in vitro* beépülésének kisebb mértéke azt mutathatja, hogy *in vivo* a fibrinolízis egyensúlya a vérzés felé tolódik el a trombus közvetlen környezetében. Az alvadékhoz kötött α_2 -PI kevésbé hozzáférhető és emiatt ezekben az esetekben a t-PA által kiváltott hemosztatikus hatás elleni védelem csökkenhet. A lízis utáni intrakraniális vérzés az rt-PA

indukálta trombolízis sajnálatos mellékhatása, illetve a klinikai eredményekre gyakorolt káros hatása ellenére a pontos patomechanizmus kevésbé ismert. A betegek felvételi mintáiból származó kísérleti eredmények, melyek összefüggést mutatnak a későbbi intrakraniális vérzéses eseményekkel hasznosak lehetnek ezen események hátterének megértése érdekében, illetve segíthetnek egy megelőzési stratégiát is kidolgozni, hogy a jövőben elkerülhetőek legyenek a trombolízis terápiával összefüggő koponyaűri vérzések.

Ebben a tanulmányban vizsgáltuk az α_2 -PI heterogenitását befolyásoló sFAP szint és az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus hatását is, de nem tudtunk összefüggést kimutatni ezen tényezők és a klinikai kimenetel között. A jövőben jól megtervezett, prospektív tanulmányokra van szükség annak vizsgálatára, hogy ezek a paraméterek hogyan befolyásolják az α_2 -PI heterogenitását és ennek milyen összefüggése van az artériás trombotikus események kialakulásának kockázatára nézve.

Korábbi vizsgálatok, melyek az α_2 -PI és a vénás trombólízis kialakulásának kockázatával foglalkoztak, ahol csak α_2 -PI aktivitás szinteket mértek, nem szolgáltatottak meggyőző eredményeket. Vannak tanulmányok, melyek nem mutattak összefüggést az α_2 -PI szintek és a vénás trombólízis kialakulása között, de ez valószínűleg az alacsony esetszámoknak köszönhető. Egy nagyobb tanulmányban (MEGA tanulmány), Meltzer és munkatársai azt találták, hogy az α_2 -PI pozitív összefüggést mutatott az alvadék lízis idővel, de nem találtak összefüggést az α_2 -PI és a VTE rizikó között, miután BMI-re korrigáltak. Az α_2 -PI C-terminálisan módosított formáit csak egy tanulmányban vizsgálták MI-t elszenvedett férfiakban. Jelen tanulmányban, mi mind az α_2 -PI aktivitás és az α_2 -PI antigén szinteket meghatároztuk. Az NPB- α_2 -PI szinteket a totál és a PB- α_2 -PI antigén eredményekből kalkuláltuk. Ebben a tanulmányban a VTE betegek 13%-kal magasabb átlag α_2 -PI aktivitással, 11,8%-kal magasabb átlag totál α_2 -PI antigén és 41%-kal magasabb átlag NPB- α_2 -PI antigén szintekkel rendelkeztek, mint a kontrollok, míg a PB- α_2 -PI szintek nem tértek el szignifikánsan a két csoportban. A kontroll csoportban mért NPB- α_2 -PI antigén százalékos aránya ($34,6 \pm 7,0\%$) megegyezik a korábban publikált 35%-kal és szignifikánsan emelkedett ($43,3 \pm 6,5\%$) a VTE csoportban. Mindkét csoportban jó korreláció volt megfigyelhető a mért aktivitás és a totál antigén szintek között és a PB- α_2 -PI antigén szintek között egyaránt. Az aktivitás eredmények korrelációja az NPB- α_2 -PI antigén értékekkel mérsékelt volt, ami megerősíti azt a feltételezést, hogy az α_2 -PI aktivitás meghatározására szolgáló módszer elsősorban a PB- α_2 -PI szintjét méri, mely az aktívabb, kinetikusan gyorsabb plazmin inhibitor.

A vaszkuláris megbetegedések kockázati tényezői és az α_2 -PI szintek közötti összefüggés vizsgálatára többszörös lineáris regressziós analízist végeztünk. Az α_2 -PI aktivitás, a totál α_2 -PI és a PB- α_2 -PI antigén szintek független, pozitív összefüggést mutattak a BMI-vel, a koleszterin szintekkel, valamint negatív összefüggést mutattak az életkorral. Ezzel szemben az NPB- α_2 -PI antigén szint nem korrelált a fent említett paraméterekkel, de gyenge összefüggést mutatott a magas vérnyomással és a CRP szintekkel. A gyenge kapcsolat a gyulladás hiányának/alacsony szintjének, vagy a magas vérnyomás ritka előfordulásának köszönhető a kontrollcsoportban. Ez az eredmény felveti annak a lehetőségét, hogy a gyulladással/endothél aktivációval kapcsolatos proteolitikus enzimek lehetnek felelősek az α_2 -PI C-terminális hasításáért.

Az α_2 -PI szintekkel független összefüggést mutató paraméterekre való korrigálást követően az α_2 -PI aktivitás, totál és NPB- α_2 -PI antigén szintek átlagában a szignifikáns különbség megmaradt a VTE betegek és a kontrollok között, valamint a PB- α_2 -PI antigén szint enyhe csökkenése a VTE betegekben statisztikailag szignifikáns eltérést mutatott a kontrollcsoporthoz képest. A betegpopulációban emelkedett α_2 -PI aktivitás, totál α_2 -PI, NPB- α_2 -PI antigén szintek és az emelkedett C-terminális hasítás százalékos aránya (felső harmad vs alsó harmad) függetlenül társul a VTE rizikóval; míg az emelkedett PB- α_2 -PI szintek alacsonyabb VTE rizikót mutattak. A molekula C-terminális vége fontos az α_2 -PI plazminnal való kötődés kezdeti reakciójában, ezért a plazminogén-kötő szekvenciák eltávolítása erősen befolyásolja az α_2 -PI aktivitását. Az NPB- α_2 -PI fehérjét nem tudták még nagy mennyiségben kitisztítani a plazmából így a fibrinolízisben betöltött szerepét még nem tudták alaposan megvizsgálni. Jelenlegi ismereteink alapján nem tudunk egyértelmű választ adni arra a kérdésre, hogy az NPB- α_2 -PI szint emelkedésének a PB- α_2 -PI szint csökkenése nélkül van-e valamilyen funkcionális következménye, vagy csupán a éppen zajló kóros folyamatok mellékhatása lehet. További vizsgálatok szükségesek a C-terminálisan trunkált α_2 -PI emelkedett koncentrációjának funkcionális következményeinek tisztázására.

Az α_2 -PI N-terminális heterogenitását befolyásolhatja az sFAP szintje és a p.Arg6Trp polimorfizmus jelenléte a SERPINF2 génben. A biokémiai vizsgálatok eredményei alapján feltételezték, hogy az FXIIIa által hatékonyan keresztkötött N-terminálisan hasított Asn- α_2 -PI növelésével megemelkedett sFAP szint növelheti a trombotikus megbetegedések kockázatát. Ezzel szemben, mivel a Met- α_2 -PI(Arg6)-t az sFAP 8x gyorsabban hasítja, mint a Met- α_2 -PI(Trp6)-t, így a Trp6 variáns jelenléte az N-terminális hasítás csökkentésével illetve a fibrinolízis gátlásának csökkentésével jár, ezért védőhatású lehet.

Csak kevés tanulmány vizsgálta az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus és az artériás trombólízis közötti kapcsolatot. Előző tanulmányainkban az p.Arg6Trp polimorfizmusnak nem volt szignifikáns hatása koronária-ateroszklerózisos betegekben és AIS betegekben sem, de a polimorfizmus jelenléte befolyásolta a trombólízis terápia kimenetelét; a Trp6 allél jelenléte védő hatású volt az iszkémiás elváltozások kialakulása ellen. Egy tanulmány a polimorfizmus és hasi aorta aneurizma (abdominal aortic aneurysm (AAA)) kialakulása közötti összefüggést vizsgálta. Megállapították, hogy a Trp6 hordozók kismértékű, de statisztikailag szignifikáns csökkenést mutattak az AAA kialakulásának kockázatában. A mi tanulmányunk az első, ami vizsgálta az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus hatását vénás tromboembóliát elszenvedett betegekben. Jó egyezést mutatva korábbi vizsgálatok eredményeivel a p.Arg6Trp allél frekvenciája 0,795 / 0,205 volt a teljes vizsgált populációban. A Trp6 allél hordozása és az allél frekvencia nem mutatott különbséget a beteg és a kontroll csoportban és nem találtunk összefüggést a Trp6 allél jelenléte és a VTE kialakulásának kockázata között (OR: 0,912, 95% CI: 0,617-1,348, p=0,645).

Jelen tanulmányunkban a kontroll csoportban az sFAP antigén szintek gyenge, pozitív korrelációt mutattak a BMI-vel, a FXIII aktivitással és gyenge, negatív összefüggést a fibrinogén szintekkel. Korábban arról is beszámoltak, hogy a hiperlipidémiában szenvedő egyéneknél szignifikánsan emelkedettebb az sFAP koncentráció, illetve a férfiakban is szignifikánsan magasabb, mint a nőkben, azonban mi nem találtunk összefüggést a koleszterin szintekkel és nem találtunk szignifikáns különbséget az sFAP szintekben a férfiak és nők között a kontrollcsoportban, de a VTE csoportban a férfiakban magasabb átlag sFAP szinteket mértünk, mint a nőkben. Az sFAP antigén szint medián értéke szignifikánsan megemelkedett a VTE csoportban, azonban a korrigálást követően ez a különbség már nem volt statisztikailag szignifikáns. A magas sFAP szinttel rendelkező egyéneknél nem volt szignifikánsan magasabb a VTE kialakulásának kockázata (OR: 1,246, 95% CI: 0,793-1,959, p=0,340).

Figyelembe véve, hogy az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmusa jelentősen befolyásolja az α_2 -PI sFAP általi N-terminális hasítását, megvizsgáltuk, hogy kimutatható-e a két paraméter interakciója. Miután a betegséghez társuló egyéb rizikó tényezőkre korrigáltunk, elsőként tudtuk kimutatni a Trp6 allél védő hatását a vénás trombólízis előfordulásával szemben magasabb sFAP szintekkel rendelkező egyéneknél. Az a tény, hogy ki tudtuk mutatni a polimorfizmus védő hatását magas sFAP szint esetén indirekt módon bizonyítja, hogy az sFAP szintje befolyásolja a VTE rizikót. Azonban, a VTE rizikót befolyásoló hatásának igazolásához jóval nagyobb esetszámra és a vizsgált csoportokba történő beválogatás során az egyéb befolyásoló paraméterekre való megfelelő illesztésre lenne szükség.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az α_2 -plazmin inhibitor (α_2 -PI) a plazmin fő fiziológiai inhibitora; a fibrinolízis hatékony gátlásáért elsősorban a XIII-as faktor (FXIII) által fibrinhez kötött forma felelős. Az α_2 -PI a plazmában heterogén szerkezetű, N-, és C-terminálisan is hasítódik, ami funkcionális következményekkel jár. A plazminogén-kötő forma (PB- α_2 -PI) C-terminális hasítás által alakul át nem-plazminogén-kötő formává (NPB- α_2 -PI). A szolubilis fibroblaszt aktiváló protein (sFAP) lehasítja az első 12 aminosavat az N-terminális részről. Ennek eredményeként létrejövő rövidebb inhibitor jobb szubsztrátja a FXIII-nak. Az N-terminális hasítás aránya csökken az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus jelenléte által.

Ebben a tanulmányban megvizsgáltuk az α_2 -PI fibrin alvadékba való beépülésének befolyásoló tényezőit, illetve, hogy a beépülés mértékének van-e klinikai következménye. Szintén megvizsgáltuk az α_2 -PI heterogenitását vénás tromboembóliában (VTE), valamint a heterogenitás hatását a VTE rizikóra. A korábban közölt eredményekkel ellentétben, a FXIII a normál szint felett is fokozta az α_2 -PI beépülését a fibrin alvadékba.

Meghatároztuk a fibrinogén, a FXIII és az sFAP szinteket, az α_2 -PI beépülés mértékét és az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus jelenlétét 57 akut iszkémiás stroke-ot (AIS) elszenvedett beteg trombolízis előtti és 26 egészséges kontroll mintájában. Nem volt szignifikáns különbség a kontrollok és a jó kimenettel rendelkező betegcsoportban az α_2 -PI beépülés mértékében ($49,4 \pm 4,6\%$ vs. $47,4 \pm 6,7\%$ $p=1,000$), de azokban a betegekben akik terápiával összefüggő intrakraniális vérzésben szenvedtek az α_2 -PI beépülés mértéke a fibrin alvadékba szignifikánsan alacsonyabb volt ($37,3 \pm 14,0\%$, $p=0,004$). Úgy tűnik, hogy az AIS-ban szenvedő betegekben az α_2 -PI beépülés mértéke összefügg az intravénás trombolízis terápia kimenetelével, különösen a terápiával összefüggő intrakraniális vérzéssel.

Megvizsgáltuk a totál, a PB-, és az NPB- α_2 -PI antigén, az α_2 -PI aktivitás, az sFAP antigén szinteket és a p.Arg6Trp polimorfizmus jelenlétét 218 VTE beteg és 218 egészséges kontroll mintájában. A totál és az NPB- α_2 -PI szintek szignifikánsan emelkedettebbek voltak a betegcsoportban, szemben a kontrollokkal, míg a PB- α_2 -PI szintek nem különböztek. A magas totál- és NPB- α_2 -PI szintek független emelkedett rizikót mutattak a VTE kialakulásának kockázatára nézve (korrigált OR: 7.645; CI: 3.459–16.896 ill. 9,868; CI: 4,095-23,783). Az sFAP szintek szignifikánsan magasabbak voltak a betegcsoportban. Sem az emelkedett sFAP, sem az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus önmagában nem volt hatással a VTE rizikóra, de mi ki tudtuk mutatni az emelkedett sFAP szint és a p.Arg6Trp polimorfizmus közötti interakciót, azaz a magas sFAP szint mellett a Trp6 allél hordozása alacsonyabb VTE rizikóval társult.

Az értekezés új eredményei, megállapításai

1. Kifejlesztettünk egy módszert, mellyel meghatározható az α_2 -PI fibrin alvadékba való beépülésének mértéke.
2. A korábbi megállapításokkal szemben kimutattuk, hogy 8% FXIII koncentráció esetén az α_2 -PI fibrin alvadékba való beépülése még nem éri el a maximumát, hanem tovább fokozódik, még 100% plazma koncentráció fölött is.
3. AIS betegekben a tünetek megjelenésétől számítva 4,5 órán belül alacsonyabb mértékű *in vitro* α_2 -PI beépülést találtunk a fibrin alvadékba a súlyosabb stroke-ban szenvedőknél, különösen azoknál, akik trombolízis utáni intrakraniális vérzésben szenvedtek.
4. Az α_2 -PI aktivitás, a totál α_2 -PI és a PB- α_2 -PI antigén szintek független, pozitív összefüggést mutattak a BMI-vel, a koleszterin szintekkel, valamint negatív összefüggést mutattak az életkorral egészséges kontroll személyekben.
5. Az NPB- α_2 -PI antigén szint nem korrelált a fent említett paraméterekkel, de gyenge összefüggést mutatott a magas vérnyomással és a CRP szintekkel.
6. Az α_2 -PI aktivitás, a totál α_2 -PI és az NPB- α_2 -PI antigén szintek szignifikánsan magasabbak voltak a VTE betegekben, mint az egészséges kontrollokban, mely különbség az α_2 -PI szintekkel független összefüggést mutató paraméterekre való korrigálást követően is megmaradt. A PB- α_2 -PI antigén szintje a korrigálást követően a VTE betegekben alacsonyabb volt a kontroll csoporthoz képest.
7. Kimutattuk, hogy az emelkedett α_2 -PI aktivitás, totál α_2 -PI, NPB- α_2 -PI antigén szintek és az emelkedett C-terminális hasítás százalékos aránya a VTE független rizikó tényezői; míg az emelkedett PB- α_2 -PI szint alacsonyabb VTE rizikót eredményez.
8. A Trp6 allél hordozása és az allél frekvencia nem mutatott különbséget a beteg és a kontroll csoport között és nem találtunk összefüggést a Trp6 allél jelenléte és a VTE kialakulásának kockázata között.
9. Az sFAP antigén szint medián értéke szignifikánsan megemelkedett a VTE csoportban, azonban a magas sFAP szint VTE rizikót fokozó hatását a teljes csoportban nem tudtuk igazolni.
10. Magasabb sFAP szintekkel rendelkező egyéneknél azonban elsőként tudtuk kimutatni a Trp6 allél védő hatását a vénás trombózis előfordulásával szemben.



Nyilvántartási szám: DEENK/406/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Baráth Barbara
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Baráth, B.**, Kissné Bogáti, R., Miklós, T., Kállai, J., Mezei, Z. A., Bereczky, Z., Muszbek, L., Katona, É.: Effect of [alfa]2-plasmin inhibitor heterogeneity on the risk of venous thromboembolism.
Thromb. Res. 203, 110-116, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2021.05.003>
IF: 3.944 (2020)
2. Bagoly, Z., **Baráth, B.**, Orbán-Kálmándi, R. A., Szegedi, I., Kissné Bogáti, R., Sarkady, F., Csiba, L., Katona, É.: Incorporation of [alfa]2-Plasmin Inhibitor into Fibrin Clots and Its Association with the Clinical Outcome of Acute Ischemic Stroke Patients.
Biomolecules. 11 (3), 1-13, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biom11030347>
IF: 4.879 (2020)





További közlemények

3. Zabczyk, M., Natorska, J., Bagoly, Z., Sarkady, F., **Baráth, B.**, Katona, É., Bryk, A. H., Zetl, K., Wisniewski, J. R., Undas, A.: Plasma fibrin clots of pulmonary embolism patients present increased amounts of factor XIII and alpha2-antiplasmin at 3 months' anticoagulation since the acute phase.
J. Physiol. Pharmacol. 71 (4), 519-524, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.26402/jpp.2020.4.07>
IF: 3.011
4. Bryk, A. H., Siudut, J., Broniatowska, E., Bagoly, Z., **Baráth, B.**, Katona, É., Undas, A.: Sex-specific alteration to α 2-antiplasmin incorporation in patients with type 2 diabetes.
Thromb. Res. 185, 88-92, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.09.032>
IF: 3.944

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,778

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,823**

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.08.12.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Katona Évának, aki öt éven át irányította és támogatta tudományos munkámat. Köszönettel tartozom a folyamatos ösztönzésért és támogatásért, illetve, hogy a kutatásaink során megtanított az eredményes kutatómunkához nélkülözhetetlen gondolkodásmódra. Amit tőle tanultam soha nem felejttem el, illetve hasznosítom további munkáim során. Köszönöm a kísérletes munkámban, a prezentációk és publikációk, valamint a disszertációm elkészítésében nyújtott segítségét.

Hálás köszönet illeti Muszbek László professzor urat, aki az alap-, és a mesterképzés alatt témavezetőként irányította munkámat. Bevezetett a hemosztázis világába és a kutatómunka rejtelmeibe, valamint a PhD tanulmányaim során is sok hasznos tanácsokkal látott el.

Köszönettel tartozom Dr. Bereczky Zsuzsannának, aki lehetővé tette számomra, hogy PhD munkámat a Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszéken végezhessem.

Köszönöm, Dr. Bagoly Zsuzsának, aki szakértelmével és tanácsaival segítette munkámat.

Köszönettel tartozom Haramura Gizella, vezető laboratóriumi analitikusnak, aki megtanított a laboratóriumi munka alapjaira, illetve számos olyan módszerre, mely segítette a kísérletes munkámat PhD tanulmányaim során.

Köszönöm Tóthné Fedoriska Viktória, laboratóriumi analitikusnak, a beteg és kontrollminták különböző paramétereinek meghatározásában nyújtott segítségét.

Köszönöm valamennyi társszerző gondos munkáját, melynek eredményeképpen megszülethettek a disszertációm alapjául szolgáló közlemények.

Hálás köszönet Orbán-Kálmánda Rita, PhD hallgatónak, aki mind szakmailag, mind emberileg támogatott céljaim elérésében és akiben igaz barátira leltem.

Köszönettel tartozom TDK hallgatóimnak a közös munkáért és a támogatásért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom szüleimnek, húgomnak és férjének, valamint nagyszüleimnek, hogy a tanulmányaim során kitartottak mellettem, és szeretetükkel és biztatásukkal mindvégig támogattak. Nélkülük ez a munka nem valósulhatott volna meg.

Munkámat szeretett Szüleimnek ajánlom!

A kutatómunkát támogató pályázatok:

NKFIH (K120633, FK128582, K120042, GINOP-2.3.2-15-2016-00043, GINOP2.3.2-15-2016-00050, ÚNKP-20-4, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009)