

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A XIII-as faktor vaszkuláris simaizomsejtek celluláris funkcióira és az α 2-plazmin inhibitor heterogenitás fibrinolízisre kifejtett hatásának vizsgálata

Kissné Bogáti Réka

Témavezető: Dr. Katona Éva



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2026

A XIII-as faktor vaszkuláris simaizomsejtek celluláris funkcióira és az α 2-plazmin inhibitor heterogenitás fibrinolízisre kifejtett hatásának vizsgálata

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

Írta: **Kissné Bogáti Réka**, okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében
Témavezető: **Dr. Katona Éva, PhD**

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus

tagok: Dr. Simon Ágnes, PhD

Dr. Király Róbert, PhD

A doktori szigorlat időpontja, helye: Debreceni Egyetem, ÁOK, Klinikai Laboratóriumi Kutató
Tanszék Könyvtára; 2026. május 11., 12:30.

Az értekezés bírálói: Dr. Töröcsik Dániel, az MTA doktora
Dr. Tanka-Salamon Anna, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus

tagok: Dr. Simon Ágnes, PhD

Dr. Töröcsik Dániel, az MTA doktora

Dr. Király Róbert, PhD

Dr. Tanka-Salamon Anna, PhD

Az értekezés védésének helyszíne, időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet
„A” épület tanterme, 2026. május 11., 14:00 óra.

1. BEVEZETÉS

A hemosztázis felelős az érpályán belül keringő vér folyékony állapotban tartásáért és érfal sérülés esetén a véralvadék képződéséért. Ez az összetett szabályozó rendszer normál állapotban rengeteg komponenssel együttműködve képes szimultán a koagulációt és a fibrinolízist is irányítani. Kulcsfontosságú alkotói a rendszernek a vér alakos elemei (thrombociták, vörösvérsejtek és fehérvérsejtek), a különböző funkciójú speciális fehérjék (koagulációs és fibrinolitikus) és az érfalat felépítő szöveti tényezők (sejtfelszíni receptorok, membránfehérjék, különböző típusú szöveti sejtek).

Az aktív XIII-as faktornak (FXIIIa) jelentős szerepe van a hemosztázisban, a sebgyógyulásban, az angiogenezisben és feltehetően az atheroszklerózis folyamatában is. A sejtfelszínen található különböző integrinek és növekedési receptorok közötti keresztkötések kialakításával jelátviteli útvonalakat képes aktiválni, fokozva az endothél sejtek, fibroblasztok és monociták migrációját, proliferációját és túlélését. Továbbá, az extracelluláris mátrixban létrehozott keresztkötések révén a mátrix stabilitásának fentartását is befolyásolja. Az FXIIIa a hemosztázisban fontos szerepet játszó stabil fibrinalvadék kialakításán kívül, melyet a fibrinláncok keresztkötésével biztosít, a fibrinolízis szabályozásában is részt vesz, a plazmin fő inhibitorát, az α 2-plazmin inhibitorát (α 2PI) kovalens kötés révén a fibrin α -láncához köti, megvédve azt a plazmin általi korai degradációtól. Az α 2PI a plazmában, a szabadon keringő plazmával irreverzibilis komplexet (PAP-komplex) képez. Az α 2PI, a molekula mindkét végét érintő proteolitikus hasítások következtében, több izoformában kering a plazmában. A módosulások befolyásolhatják az α 2PI a fibrinolízisben betöltött szerepét. Az N-terminálisan trunkált forma funkcióját több kutatócsoport is vizsgálta, viszont a C-terminus módosulásáról jelenleg kevés ismeret áll rendelkezésünkre. A C-terminális végén hasított forma (NPB- α 2PI) elveszíti a plazminogén-kötő helyét, ezért jóval lassabban képes a plazmint gátolni, valamint az FXIIIa elsődlegesen a plazminogén-kötő, nem hasított formát (PB- α 2PI) képes a fibrinnel keresztkötni. Az NPB- α 2PI forma hatását a fibrinolízisre kevésbé vizsgálták.

Jelen értekezésben összefoglaltuk eredményeinket a XIII-as faktor (FXIII) humán aortából származó simaizomsejtek (HAoSMC) funkcióira gyakorolt hatásairól. Továbbá, vizsgáltuk az α 2PI heterogenitásának hatását az α 2PI fibrinalvadékba való beépülésének mértékére, az alvadék szerkezetére és lízisére.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A XIII-as véralvadási faktor szerkezete és aktiválódása

A XIII-as véralvadási faktor (FXIII) egy protranszglutamináz, melynek két formája ismert a plazmatikus (pFXIII) és celluláris FXIII (cFXIII). A plazmában heterotetramerként van jelen, mely két potenciálisan aktív A (FXIII-A) és két hordozó/gátló B (FXIII-B) alegységet tartalmaz, plazmakoncentrációja 14-28 mg/L.

A FXIII-A 83 kDa molekulatömegű, 732 aminosavból épül fel. Négy strukturális domén alkotja: β -szendvics, katalitikus „core”, β -hordó 1 és β -hordó 2. Az N-terminális végén a XIII-as faktor aktiválódásában részt vevő, 37 aminosavból álló aktivációs peptid (AP-FXIII), illetve Ca^{2+} kötőhelyek találhatóak. A két A alegységből felépülő (FXIII-A₂) homodimer szerkezetű celluláris XIII-as faktor számos tanulmány szerint több sejttípusban is kimutatható, mint a vérlemezkékben, monocitákban/makrofágokban, oszteoblasztokban, oszteoklasztokban, oszteocitákban, khondrocitákban és a korneális keratocitákban. A plazmába kerülő A alegység főként rezidens szöveti makrofágokból származik és 99%-a a B-alegységgel komplexet alkotva, a fibrinogén felszínéhez kötődve kering.

A FXIII-B ~80 kDa molekulatömegű, 641 aminosavból álló, a hepatociták által szintetizált glikoprotein, melynek körülbelül 50%-a a FXIII-A alegységgel alkotott komplex, másik 50%-a szabad formában kering a plazmában. A tíz rövid tandem ismétlődő ún. "sushi" domén mindegyikét 2-2 diszulfid híd tartja egyben. Fő feladata a FXIII-A₂ élettartamának meghosszabbítása a keringésben, védve azt a spontán aktiválódástól és degradációtól. A plazmában mind a kialakult FXIII-A₂B₂ komplex mind a szabad FXIII-B fibrinogénhez kötődve kering. A fibrinogénhez való kötődésnek nagy szerepe van a FXIII aktiválódásában. Casini és munkatársai leírták, hogy afibrinogémiában az egyébként normál mennyiségben jelenlévő FXIII-A₂B₂ mellett csak kb 18% aktivitás detektálható.

A 326 kDa molekulatömegű zimogén, heterotetramer FXIII (FXIII-A₂B₂) aktív transzglutaminázzá (FXIIIa) alakul thrombin és Ca^{2+} jelenlétében a véralvadás utolsó fázisában. A folyamat első lépéseként a thrombin peptidkötés hidrolízisével hasítja le a FXIII-A alegység N-terminális részén található aktivációs peptidet, így a két FXIII alegység közötti kapcsolat meggyengül. Ezt követően Ca^{2+} jelenlétében a B alegységek disszociálnak, mely következtében kialakul a FXIII-A alegységek enzimatikusan aktív formája. Az aktiválódás a polimerizálódó fibrin felszínén megy végbe, mely

körülbelül százszorosára gyorsítja fel a thrombin általi AP-FXIII lehasítást és megkönnyíti FXIII-B alegység disszociációját is.

A celluláris FXIII aktiválásához nincs szükség proteolitikus hasításra, az intracellulárisan emelkedett, 2 mM feletti Ca^{2+} koncentráció is elegendő hozzá. Egy 2014-es tanulmányban leírják, hogy a vérlemezkék citoplazmájából a sejt felszínre kerülve a cFXIII megtartja aktivitását. A plazmába kerülő szabad formában keringő FXIII-A₂ szintén aktiválódhat az aktivációs peptid lehasításával Ca^{2+} jelenlétében.

2.2 A XIII-as faktor funkciói

2.2.1. A FXIII szerepe a véralvadásban

Az FXIIIa acil-traszfer reakciót katalizál, mely során az egyik (donor) fehérje glutamin oldallánc α -karboxamid csoportja és a másik (akceptor) fehérje lizin oldallánc ϵ -aminocsoportja között egy rendkívül erős, stabil, a proteolízissel szemben ellenálló izopeptid-kötés jön létre. Az FXIIIa hozzájárul a hemosztázisban fontos szerepet játszó stabil fibrinalvadék kialakulásához, úgy, hogy a fibrin α - és γ -láncait keresztkötve, fibrin γ - γ dimereket, γ - α és α - α polimereket hoz létre. Emellett a plazmin fő inhibitorát, az α 2-plazmin inhibitor (α2PI) a fibrin α -láncához köti, megakadályozva a fibrinháló plazmin általi korai degradációját. A FXIII-A hiányos betegek súlyos vérzéses tünetekben szenvednek.

2.2.2. A FXIII szerepe a az angiogenezisben, sebgyógyulásban és az atheroszklerózisban

Az érújdonképződés során új kapillárisok alakulnak ki a már meglévő véredényekből, elősegítve a szövetképződést és a sebgyógyulást. Az erek és kapillárisok falát három rétegben (intima, media, adventitia) különböző típusú és funkciójú sejtek alkotják: az endothél sejtek, vaszkuláris simaizomsejtek (VSMC) és a fibroblasztok.

A VSMC-k környezeti hatások révén az érfal media rétegéből az intima rétegbe képesek vándorolni. Ott különböző fenotípusos formát vehetnek fel, így differenciálódás révén akár osteoblaszt-, khondrocita-, adipocita- vagy habossejt szerű sejtekké is átalakulhatnak. Az atheroszklerotikus plakk kialakulására jellemző az azt alkotó sejtek, illetve főként a VSMC-k általi fokozott extracelluláris mátrix termelődés, multimolekuláris hálót alkotva. Ez leginkább a kollagén (I-es, II-es, és IV-es típus) megnövekedett szintézisében nyilvánul meg, mely lehetővé teszi mind

a plakk stabilitását, merevségét mind pedig a különböző sejtek könnyebb vándorlását és proliferációját.

Korábbi közlemények szerint az aktivált FXIII (FXIIIa) több módon is befolyásolja az érfal felépítésében résztvevő sejtek biokémiai folyamatait és különböző funkcióit. Apoe/FXIII-A1 ill. Apoe/FXIII-A1/TG2 KO egerekben végzett kísérletek alapján a FXIII aktivitás fontos az erek integritásának fenntartásában, a dupla és tripla KO egerekben fokozódott a vérzés miatti elhullás. Az ér falát felépítő sejtek az extracelluláris mátrix komponenseken kívül növekedési faktorokat, citokineket, proteázokat is expresszálnak, melyek pro-angiogén faktorokként funkcionálnak. Ezzel szemben számos anti-angiogén fehérjét is termelnek, melyek közül az egyik legfontosabb a thrombospondin-1 (TSP-1), az angiogenezis szabályozását befolyásoló glikoprotein.

Az alábbiakban a proangiogén hatását mutatjuk be részletesebben. Az FXIIIa fokozza a fibroblasztok migrációját, a monociták receptor mediált fagocitózisát, valamint részt vesz az extracelluláris mátrix fehérjék keresztkötésében is .

Inbal és munkatársai számos közleményben vizsgálták az FXIIIa szerepét az angiogenezisben. Azt találták, hogy az endothél sejtek felszínén lévő $\alpha_v\beta_3$ integrint és vaszkuláris endotheliális növekedési faktor receptort (VEGFR-2) az FXIIIa keresztköti. A kötés létrejöttét követően a receptor aktiválódik és jelátviteli útvonalakat kapcsol be, melynek eredményeképp a TSP-1 termelés csökken, az endothél sejtek proliferációja, migrációja és az apoptózis gátlása pedig fokozódik. TSP-1 egy homotrimer szerkezetű glikoprotein, mely szintén szubsztrátja lehet az FXIIIa-nak, kovalens kötésű ún. homo-polimereket eredményezve. A TSP-1-et számos, gyulladással vagy érképződésben részt vevő sejt képes termelni. A környező sejtek sejtfelszíni receptorain (CD36, CD47), integrinjein és az extracelluláris mátrix fehérjéin keresztül képes kifejteni hatását.

Továbbá Somodi és munkatársai leírták, hogy a plakkban jelenlévő makrofág eredetű habos sejtek tartalmaznak cFXIII-t és az a plakk extracelluláris térében is jelen van, aktív formában, mivel keresztkötések jelenlétét tudták detektálni a mátrixban. Így módon a cFXIII externalizálódhat és aktiválódhat, részt vehet az extracelluláris mátrix stabilitásának fenntartásában, ezzel fokozva a plakk stabilitását. A plakkba kerülő cFXIII hatással lehet a VSMC-kre is. Jelenleg kevés ismeret áll rendelkezésünkre a FXIII és a VSMC-k, az atheroszklerotikus plakk fő alkotójának kapcsolatáról.

2.2.3 A FXIII szerepe egyéb élettani folyamatokban

A FXIII nemcsak a véralvadásban, hanem számos egyéb élettani folyamatban is fontos szerepet játszik, ahol a különböző sejtek által termelt extracelluláris mátrix stabilizálásában illetve a sejt stimulációs folyamatokban is részt vesz. Az extracelluláris mátrix fehérjék közül a fibrin, fibronektin és a kollagén jó szubsztrátjai a FXIII-nak. A terhesség során a Nitabuch-rétegben a pFXIII a fibrinogénnel és fibronektinnel kolokalizálódva a placenta kötőszövetének fibrinolízissel szembeni védelmét biztosítja. A cFXIII jelenléte a bélrendszerben a fibrinháló keresztökötésével a baktériumokat csapdába ejtve, azok eltávolításában fontos. Fekélyes vastagbélgyulladásban szenvedő betegekben megfigyelték, hogy mind az alternatív útvonalon polarizált makrofágok száma, mind az általuk termelt cFXIII expresszió is lecsökkent, ami a kialakult gyulladásért lehet felelős. Krónikus gyulladásos tüdőbetegségben, a bronchoalveoláris gyulladásban illetve az asztma kialakulásában, a kötőszöveti fibrinlerakódás fokozottá válik. A bronchoalveoláris sejtek, alveoláris makrofágok és dendritikus sejtek által termelt cFXIII hozzájárulhat a stabil fibrinháló kialakulásához. Tumorsejtes környezetben a tumor-asszociált makrofágok által termelt cFXIII szintén a fibrinháló stabilitásának kialakulásáért felelős, mely a tumor sejteket védi és proliferációjukat segíti. Újabb vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy a cFXIII szerepet játszhat az energia metabolizmus folyamataiban is. Elhízott egyének fehér zsírszövetében emelkedett F13A1 gén expressziót mutattak ki. A fehér zsírszövet által termelt fibronektin, mely a sejtproliferációban, differenciációban és a zsírszövet fejlődésében nélkülözhetetlen, fontos extracelluláris szubsztrátja az FXIIIa-nak.

2.3 A hemosztázis egyensúlya, a véralvadás és fibrinolízis

A véralvadás célja az érfal sérülés lezárása, stabil fibrinháló kialakítása és annak megvédése az idő előtti degradációtól. Ezzel szemben a fibrinolízis a fibrinalvadék lebontásáért felelős, megakadályozva ezzel az erek elzáródását. A hemosztázis szabályozó rendszer biztosítja a kétirányú folyamat összehangolt működését. A koagulációs kaszkád során keletkezett nagy mennyiségű thrombin a fibrinopeptid A és B lehasításával a szolubilis fibrinogént fibrin monomerekké alakítja és ezzel párhuzamosan a fibrinogénhez kötött FXIII-at is aktiválja az aktivációs peptid lehasításával. Az FXIIIa nemcsak a fibrinszálak keresztökötését végzi, hanem egy másik szubsztrátját, az α 2-plazmin inhibitor (α 2PI) is kovalensen a fibrin- α -láncához köti, mely gátolja a plazmin általi azonnali feloldását az alvadéknak. A fibrinolízis fő szabályozó enzime, a

plazmin által a fibrinháló gyors hasításával ún. fibrin degradációs termékek keletkeznek. A vérkeringésben megemelkedett fibrinogén koncentrációt és a csökkent fibrinolízis hatékonyságot, a vénás és artériás trombotikus események kockázati tényezőiként írták le különböző klinikai tanulmányokban.

2.4 A fibrinolízis kulcsenzime, a plazmin

A plazminogén a plazmában kb. 180 $\mu\text{g/mL}$ koncentrációban keringő kb. 92 kDa nagyságú, 791 aminosavból álló glikoprotein, elsősorban a májban szintetizálódik. A plazminogén aktiválásáért két szerin proteáz felelős, a t-PA (szöveti típusú plazminogén aktivátor) és az u-PA (urokináz típusú plazminogén aktivátor), melyek a plazminogént az Arg561-Val562 aminosavak között hasítják. Az így keletkezett kb 90 kDa nagyságú immár aktív szerin proteáz enzim, a plazmin, elsősorban a fibrinalvadék lebontásáért felelős, de részt vesz más biológiai folyamatban is, úgy, mint a sebgyógyulás és az angiogenezis. A humán plazminogén nehéz láncában 5 hurokszerű ún. „kringle domén” található, amelyek körülbelül 80 aminosavból álló, hármas diszulfid kötéssel stabilizált fehérje szakaszok. Ezen domének lizinkötő helyeket tartalmaznak, melyek segítik a plazmin kötődését a fibrinhez, a sejtfelszíni receptorokhoz, illetve egyéb fehérjékhez, mint pl. az α_2 -plazmin inhibitorhoz.

2.5 Az α_2 -plazmin inhibitor ($\alpha_2\text{PI}$) szerkezete és tulajdonságai

Az $\alpha_2\text{PI}$ (más néven α_2 -antiplazmin), a plazmin fő fiziológiás gátlószere és fontos szerepet játszik a fibrinolitikus rendszerben a plazmin aktivitásának szabályozásában. Az $\alpha_2\text{PI}$ veleszületett hiánya súlyos vérzési rendellenességet okoz a fibrinolízisre való fokozott hajlam miatt, az emelkedett plazma szintje trombózis rizikó fokozódáshoz vezet. Moroi és munkatársai 1976-ban először tettek említést az $\alpha_2\text{PI}$ -ről, majd később 1977-ben Wiman és munkatársai sikeresen izolálták humán plazmából. Az $\alpha_2\text{PI}$ körülbelül 67 kDa nagyságú egyláncú glikoprotein, 13% szénhidrátot tartalmaz. A máj parenchima sejtjei termelik, onnan a plazmába kerülve $\sim 1 \mu\text{M}$ koncentrációban kering, de kis mennyiségben kimutatták már a vesében és az agyban is. A humán $\alpha_2\text{PI}$ -t kódoló, SERPINF2 gén 10 exont és 9 intront tartalmaz, kb. 16 kilobázisnyi nagyságú DNS-t ölelve fel. A 27 aminosavat tartalmazó szignálpeptidből és további 464 aminosavból álló $\alpha_2\text{PI}$ a szerin proteáz inhibitor (szerpin) szupercsalád tagja, a fibrinolízis kulcsenzimének, a plazminnak gyors gátlásáért felelős. A teljes komplementer DNS-szekvencia 23-28%-os homológiát mutat a szerpin család

többi tagjával. Más szerpinekkal ellentétben viszont az α 2PI C-terminális vége mintegy 50 aminosavval hosszabb és számos lizin aminosavat tartalmaz, melyekkel a plazmin(ogén)ben található Lys-kötő régióval lép kölcsönhatásba, növelve ezzel az α 2PI plazmingátló hatékonyságát.

2.6 Az α 2-plazmin inhibitor heterogenitása a plazmában

2.6.1 N-terminális módosulás

Az α 2-plazmin inhibitor a plazmában proteolitikus hasításokon megy keresztül, négy plazmatikus izoformát eredményezve. A metionin aminosavval kezdődő teljes hosszúságú forma (Met- α 2PI) N-terminális végén a Pro12 és Asn13 aminosavak közötti hasítást a szolubilis fibroblaszt aktiváló protein (sFAP) más néven az antiplazmint hasító enzim (APCE) végzi, melynek eredményeként egy 452 aminosavból álló variáns keletkezik (Asn- α 2PI). Ez a forma a normál humán plazmában az α 2PI teljes mennyiségének körülbelül 70%-át teszi ki. A 6. aminosav pozíciót polimorfizmus érintheti, melynek során a nukleotidcsere (C>T) aminosavcserét is eredményez. Ennek következménye az arginin (Arg) triptofánra (Trp) történő módosulása. A Met- α 2PI N-terminális hasítását az Arg6Trp polimorfizmus befolyásolja, Arg6 esetén az sFAP a 12 aminosavból álló peptidet nyolcszor gyorsabban képes lehasítani. A hasítás következtében az FXIIIa jobban hozzáfér az újonnan keletkező N-terminális végén található Gln2 (a teljes hossznál Gln14) reziduumhoz, ezért az Asn- α 2PI variánst ~13-szor gyorsabban köti keresztbe a fibrinnel a Lys303 pozícióban, mint a teljes hosszúságú formát. A plazmin gátlást az Arg6Trp polimorfizmus nem befolyásolja.

2.6.2 C-terminális módosulás

A keringésben az α 2PI a C-terminális végén is módosulhat, ami a plazmin(ogén)hoz való kötődésben, és ezáltal annak gátlásában játszik fontos szerepet. A C-terminálisan nem hasított, ép formában 6 lizin aminosav található (K⁴¹⁸, K⁴²⁷, K⁴³⁴, K⁴⁴¹, K⁴⁴⁸, K⁴⁶⁴) melyek segítségével képes kötődni a plazmin(ogén)hez (PB- α 2PI, plazminogént kötő variáns). Bár a pontos hasítási hely még nem ismert, a trunkált forma biztosan elveszíti a plazmin(ogén) kötésben legfontosabbnak talált utolsó 2 lizin aminosavat tartalmazó szakaszt, ezért nevezik ezt a formát plazminogént nem kötő variánsnak (NPB- α 2PI). Az elnevezés nem teljesen helyénvaló, mivel Clemmensen és munkatársai 1981-es közleményükben leírták, hogy az α 2PI az utolsó 23 aminosav eltávolításával (amely a K⁴⁴⁸ és K⁴⁶⁴ aminosavakat tartalmazta) továbbra is komplexet tud alkotni

a plazminnal, bár ebben az esetben a reakció 10-szer lassabban megy végbe. Wang és munkatársai szerint a két aminosav közül a K⁴⁴⁸-as bizonyult a plazmin interakció létrejöttében legfontosabb szerepet játszó résztvevőnek. Egy 2011-es közleményben különböző rekombináns α 2PI variánsok a plazminhoz való kötődését vizsgálták és azt találták, hogy a kötődés elsősorban a K⁴⁶⁴-nek, majd azt követően a K⁴⁴⁸-nak köszönhető. Abdul et al. eredményei szerint a C-terminális részen történő fő hasítási hely a Gln421-Asp422 közé tehető, de ezen kívül más potenciális hasítási helyeket is azonosítottak. Orosz et al. a Pro437 és Arg438 között azonosított egy potenciális hasítási helyet. A módosításért felelős proteáz(ok)at azonban eddig még nem sikerült azonosítani. Több közlemény számol be a PB- α 2PI különböző enzimekkel *in vitro* történő hasításáról, például a tripszin, az elasztáz vagy a mátrix metalloproteináz-3 (MMP-3) által, de azt, hogy ezen proteázok *in vivo* is felelősek lennének-e a C-terminális hasításért, még nem sikerült bizonyítani. Az egészséges kontrollok plazmájában az NPB- α 2PI mennyisége körülbelül 35%-nak bizonyult.

2.7 Az α 2-plazmin inhibitor funkciói a vérkeringésben

Az α 2PI fő funkciója az 1:1 arányú stabil komplex képzése a plazminnal (PAP-komplex) a keringésben vagy a fibrin felszínén. A reakció kétlépéses mechanizmuson keresztül történik, első lépésben az α 2PI a C-terminális végén lévő lizin aminosavak segítségével nem kovalens, reverzibilis kölcsönhatásba lép a plazmin „kringle” doménjeivel. Ezt követően egy irreverzibilis, elsőrendű reakcióban kovalens kötés alakul ki az α 2PI reaktív helye és a plazmin aktív helye között. A folyamat végén kialakuló PAP-komplexben a plazmin elveszíti aktivitását. Az α 2PI kompetitív módon gátolja a plazminogén fibrinhez való kötődését is. A plazmában keringő PAP-komplex félféletideje 12 óra.

2.8 Fibrinháló kialakulása a véralvadás során

A fibrinogén a hepatocitákban termelődő 340 kDa-os nagyságú glikoprotein, amely a humán plazmában 2–4 g/L koncentrációban található. Funkcióját tekintve elengedhetetlen a hemosztázisban, a sebgyógyulásban és az angiogenezisben. Akut fázis fehérjeként plazmaszintje gyulladási folyamatokban akár 2-4-szeresére is emelkedhet. Szerkezetét tekintve három polipeptid láncból áll (A α -lánc, B β -lánc és γ -lánc), melyeket diszulfid kötések tartanak össze.

A fibrinogén fontos szerepet játszik az elsődleges és a másodlagos hemosztázisban is. Az elsődleges hemosztázis során a γ -láncok C-terminális végei kötődnek az aktiválódott vérlemezkék

felszínéhez, mely hatására vérlemezke aggregáció és vérlemezke 'dugó' keletkezik. A másodlagos hemosztázis során a fibrinogén fibrinné alakul. Először a thrombin eltávolítja a két fibrinopeptidet (A és B) az $A\alpha$ és $B\beta$ láncok N-terminális végéről, ezáltal fibrin monomerek alakulnak ki, majd ezt követi a fibrin monomerek spontán polimerizációja, mely enzim-katalízist nem igényel. A következő fázis a fibrinstabilizáció, mely során a FXIIIa a fibrin γ -láncok, illetve α -láncok között kovalens keresztkötéseket hoz létre.

A véralvadás során kialakult fibrinhálóba számos fehérje képes bekötődni és ezáltal befolyásolni annak szerkezetét és fibrinolízissel szembeni ellenállóképességét. Wiesel közleményében összegzi ezen makromolekulákat, köztük tartozik például a fibronektin, plazminogén, XIII-as véralvadási faktor, szöveti plazminogén aktivátor (t-PA), plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1), aktin, albumin, α 1-antitripeptidáz, karboxipeptidáz-N, lipoprotein(a), és a TSP-1.

Egy 1981-es *in vitro* kísérletben kimutatták, hogy az α 2PI nem teljes mértékben, hanem csak ~30%-ban épül be az alvadékba, míg Katona és munkatársai 2021-es közleményükben a beépülést kb 45%-ra becsülték. Az α 2PI kovalens keresztkötéssel történő beépülése az alvadékba a FXIIIa-nak köszönhető. Több Gln reziduumot is azonosítottak (Gln², Gln²¹, Gln⁴¹⁹ és a Gln⁴⁴⁷), melyek potenciális szubsztátjai lehetnek az enzimnek, mégis a fő reaktív hely az N-terminálisan elhelyezkedő Gln2. Jelenleg nagyon kevés megbízható ismeret áll rendelkezésre a C-terminális α 2PI formák beépüléséről a fibrinhálóba. Ennek fő oka, hogy megfelelő módszerek hiányában a bekötődés mértéke nehezen kvantitálható és a kötődés természete nehezen azonosítható. Klufft és munkatársai a C-terminális variánsok beépülését vizsgálva azt találták, hogy az elsődleges forma, amely a fibrinalvadékba beépül a BP- α 2PI és ezért az FXIIIa a felelős. Mivel FXIII hiányában, azaz a kovalens keresztkötés hiányában, a fibrinolízis fokozódik, az α 2PI fibrinszálakhoz való nem kovalens kötődésének nem tulajdonítottak nagy jelentőséget és ezért nem is vizsgálták intenzíven. Azonban Tsurupa és munkatársai kimutatták, hogy az α 2PI képes nem kovalens módon kötődni a fibrinhez és az immobilizált fibrinogénhez, és a kötődés lizin analógokkal nem gátolható, tehát a C-terminális végen található lizin-kötő régió nem vesz részt ebben a folyamatban. Azt feltételezték, hogy a nem kovalens kölcsönhatás elősegíti a FXIIIa általi keresztkötés létrejöttét.

3. CÉLKITÚZÉS

Jelen munkánkban a következő kérdésekre kerestünk választ:

1. A HAoSMC-k oszteoblasztos transzformációja jár-e cFXIII expresszióval?
2. Befolyásolja-e az FXIIIa a HAoSMC-k proliferációját, migrációját és kollagén szekrécióját?
3. Hatással van-e az FXIIIa a HAoSMC-k TSP-1 szintézisére, illetve annak intracelluláris és sejthezkötött TSP-1 tartalmára?
4. Milyen paraméterek állnak összefüggésben a plazmában mért α 2PI C-terminális izoformáinak mennyiségével, illetve a fibrinalvadékba való épülésük mértékével?
5. Milyen összefüggés van a PB- és NPB- α 2PI formák alvadékba való beépülése és az alvadéklízis paraméterek között, egészséges humán plazma mintákban?
6. Rekombináns PB- és NPB- α 2PI formákkal kiegészített α 2PI hiányplazma alkalmazásával meg tudjuk-e erősíteni a normál plazmákkal kapott eredményeket? Hogyan befolyásolják az egyes formák az alvadék lízisét illetve szerkezetét?

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Anyagok I.

A rekombináns FXIII-A₂ (rFXIII-A₂) a Novo Nordisk (Malmö, Hollandia) cég felajánlásából származik. A kísérletekhez FXIII-A₂ mentesített főtális borjú savót (FBS) használtunk, melyben csak igen alacsony koncentrációban volt kimutatható a FXIII-A alegység, 5%-os FBS-t tartalmazó médiumban 19,75 ng/mL-nek adódott. Ez 0,2%-os plazma FXIII-A koncentrációnak felel meg. A FXIII-A₂ mentesítési folyamathoz a borjú savóból immun-abszorpciós kromatográfiás technika segítségével eltávolítottuk a FXIII-A₂ alegységet. Ehhez egér eredetű FXIII-A₂ ellenes (3B2H12) monoklonális antitestet használtunk. Az antitestet CNBr aktivált Sepharose 4B (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Svédország) gél felszínhez kovalensen kötöttük fel.

4.2 Sejtkultúra

A kísérletekhez humán aortából származó simaizomsejteket használtunk (HAoSMC, Cell Applications, San Diego, CA, USA), melyek magas glükóztartalmú Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) tápfolyadékban voltak tenyésztve. A médiumot 1 mM nátrium-piruváttal (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), 4 mM L-glutaminnal (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), 116 µg/mL gentamicinnel (Sandoz Hungária Kft., Budapest, Magyarország), és 5% FBS-sel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) egészítettük. A tápfolyadékot kétnaponta cseréltük a sejttenyészetben. A kísérletben használt sejtek 5-9-es passzálszámúak voltak.

4.3 Oszteoblasztos transzformáció hatása a HAoSMC-re

Oszteoblasztos transzformációt indukálva, a HAoSMC-k 6 lyukú sejttenyésztő lemezen kalcifikációs médiumban voltak tenyésztve. A tápfolyadékot 2,5 mM inorganikus foszfáttal (Pi), 1,2 mM Ca²⁺-mal és 3%-os FBS-sel egészítettük ki. A tenyésztő médiumban lévő sejteket kontrollként használtuk. A 80%-os konfluenciaszint elérését követő 24. órában a tenyésztő médiumot kalcifikációs médiumra lecseréltük. Két nappal később a cserét megismételtük, majd 48 óra elteltével a sejtekből oszteoblasztos differenciációs markerek expresszióját határoztuk meg, a gyártók utasításait követve.

1. A kalcium lerakódást QuantiChrome Calcium Assay Kit-tel quantifikáltuk (Gentaur, DICA:500, Brüsszel, Belgium). Az abszorbancia mérése 612 nm-en történt spektrofotométer segítségével (Powerwave XS, Bio-Tek).

2. Az extracelluláris mátrixban lerakódott kalciumot Alizarin Red festéssel is láthatóvá tettük. A festék feloldása érdekében 1 órán át szobahőmérsékleten 1 mL/lyuk 100mM-os cetilpiridinium oldattal inkubáltuk a sejteket, majd az abszorbanciát 595 nm-en spektrofotométer segítségével (Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector) mértük.

3. Az extracelluláris mátrix oszteokalin tartalmát ELISA technikával határoztuk meg (Human Osteocalcin Instant ELISA, Bender MedSystems 2020, Burlingame, CA, USA). A minták abszorbanciáját 450 nm-en DTX880 Beckman Coulter ELISA Reader segítségével határoztuk meg.

4. Sejtlizátumból az alkalikus foszfatáz (ALP) aktivitás mérését ALP Yellow Liquid Substrate (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) kit segítségével végeztük. Az enzimfelszabadulást a 4-nitrofenol mennyiség alapján határoztuk meg 405 nm hullámhosszon 30 percen keresztül 37 °C-on.

5. Kvantitatív valós idejű polimeráz-lánreakcióval (qRT-PCR) határoztuk meg a Runx2 génszinten való kifejeződését. A gyártó (RNA-STAT60, Tel-Test Inc., Friendswood, Texas, USA) által javasolt protokoll alapján történt az RNS izolálás. High Capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével 2 µg RNS mintát cDNS-sé írtunk át. A Runx2 génszakasz amplifikációjához Hs535845 számú TaqMan primert (Life Technologies, Waltham, MA, USA) használtunk. Háztartási génként GAPDH 3'-at (gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz) alkalmaztunk. A relatív génexpressziós változásokat ún. delta-delta ($\Delta\Delta$) Ct módszer segítségével határoztuk meg.

6. Az oszteocalcin és Runx2 intracelluláris fehérjék kimutatása Western Blot analízissel történt. Háztartási génként a GAPDH-t alkalmaztuk. 15 µg összfehérjét tartalmazó sejtlizátumot β-merkaptóetanolt tartalmazó Laemmli pufferben vettünk fel majd 95 °C-on denaturáltunk. 10%-os SDS-poliakrilamid gélen történt a fehérjék elválasztása. A blottolás nitrocellulóz membránra (Amersham, Buckinghamshire, UK) történt, félszáraz blott készülékkel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A minták blottolását követően 6%-os tejporral blokkoltunk, majd elsődleges antitestként poliklonális anti-oszteocalcin antitestet (1:200 hígítás, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) és nyúl eredetű anti-Runx2 (1:1000 hígítás, Proteintech, Manchester, Egyesült Királyság) illetve

egér eredetű anti-GAPDH (1:1000 hígítás, Novus Biologicals, Abingdon, Egyesült Királyság) antitesteket, míg másodlagos antitestként tormaperoxidázzal jelzett (Amersham, Buckinghamshire, Egyesült Királyság) antitestet használtunk. A detektálást kemiluminescens szubsztrát reagenssel (ECL, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), az előhívást fényérzékeny film (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, Egyesült Királyság) segítségével végeztük.

7. A celluláris cFXIII koncentrációját ELISA módszerrel határoztuk meg. Streptavidinnel fedett ELISA lemezen (Kaviogen, Turku, Finnország) dolgoztunk. Biotinált monoklonális anti-FXIII-A (1µg/mL) és a HRPO-jelzett anti-FXIII-A antitesteket (1:2000 hígításban) alkalmaztunk. A detektálás során TMB (One Component HRP Mivrowell Substrate, Diarect Ag, Freiburg, Németország) szubsztrát oldatot vittünk fel a lemezre és 2 M-os kénsavval állítottuk le a reakciót.

8. A celluláris cFXIII jelenlétét Western Blot technika segítségével határoztuk meg, melyhez 10%-os SDS-poliakrilamid gélt használtunk. A rekombináns FXIII-A₂ standard-ből (Novo Nordisk) 10 ng-ot, a mintákból pedig 30µg/sáv összfehérjét vittünk fel a gél zsebeibe. A Blottolás PVDF membránra (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) történt, félszáraz blott készülékkel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). 3% zselatint tartalmazó tTBS pufferrel blokkoltuk (pH: 7,5). Elfogó antitestként birka eredetű poliklonális FXIII-A ellenes antitestet (Affinity Biologicals, ON, Canada, 1:5000 hígítás), jelölő antitestként biotinált anti-birka IgG antitestet (Vectastein ABC Kit, Vector Laboratories, Oxfordshire, UK; 1:10000 hígítás) használtunk. Az avidin-biotinált HRPO-komplex (Vectastein ABC Kit, PK6106; 1:3200 hígítás) felvitelét követően a detektálást kemiluminescens szubsztrát reagenssel (Covalab, Cambridge, Egyesült Királyság), az előhívást fényérzékeny film (Amersham Hyperfilm ECL, Buckinghamshire, Egyesült Királyság) segítségével végeztük.

4.4 A HAoSMC-k kezelése aktivált, illetve nem aktivált rXIII-as faktoral

Első lépésként 20 µg/mL rFXIII-A₂-t tartalmazó törzsoldatot készítettünk 0,2% FXIII-A₂ mentes FBS tartalmú DMEM tápfolyadékban. A következő lépésben a FXIII-A₂-t 5 U/mL humán thrombinnal és 1 mM CaCl₂-dal aktiváltuk 10 percig 37 °C-on. Ezt követően, a thrombint 50 ATU/mL lepirudin származékkal (Refludan; Pharmion, Windsor, Egyesült Királyság) legátoltuk, 10 percig 37 °C-on. A törzsoldatból további hígításokat készítettünk (15, 10, 5 és 2,5 µg/mL rFXIIIa). A hígításokhoz szükséges hígító oldat 1 mM CaCl₂-ot, 50 ATU/mL Refludannal gátolt 5

U/mL humán thrombint valamint 0,2% FXIII-A mentesített FBS-t tartalmazó. A nem aktivált rFXIII-A₂-vel történő kezelés esetén a 20 µg/mL rFXIII-A₂ törzsoldatból 15, 10, 5 és 2,5 µg/mL végkoncentrációjú hígításokat készítettünk 0,2% FXIII-A₂ mentesített FBS-t tartalmazó tápfolyadékban.

A szétosztást követő 24. órában a tápfolyadékokat aktivált, illetve nem aktivált FXIII-A-t tartalmazó médiumra cseréltük. Mivel a thrombin önmagában képes növelni a sejtproliferáció mértékét, kontrollként 50 ATU/mL Recludannal gátolt 5 U/mL humán thrombint és 1 mM CaCl₂-ot tartalmazó médiumot használtunk. A kezelések 1 vagy 3 napon keresztül történtek.

4.5 Sejtproliferációs kísérlet kivitelezése

A HAoSMC-k kitapasztása 96-lyukú lemezre (TPP Techno Plastic Products AG, Svájc), 0,6x10⁴/lyuk sejtszámmal történt. A kitapasztáshoz 5% FBS tartalmú DMEM tápfolyadékot használtunk. A szétosztást követő 24. órában indítottuk a kezeléseket. Aktivált és nem aktivált 20 µg/mL rFXIII törzsoldatból 15, 10, 5 és 2,5 µg/mL végkoncentrációjú hígításokat készítettünk. A kontroll sejteket Recludannal gátolt thrombint tartalmazó tápfolyadékban tenyésztettük. A kezelések 24 óránként ismételtük három napon keresztül. Az utolsó kezelést követő 24. órában határoztuk meg a sejtproliferáció mértékét. Ehhez az EZ4U Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay (Biomedica, Bécs, Austria) és a CCK-8 Cell Counting kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) reagenseket használtuk a gyártók utasításai szerint. A két teszt mérési elve hasonló, az élő sejtek mitokondriális eredetű dehidrogenáz enzimek a sárga színű tetrazólium só tötét színű formazánná redukálják. A színváltozást 450 nm-en, 37 °C-on 4 óra inkubációt követően spektrofotométerrel (iEMSReader MF and Multiscan™) detektáltuk. Az abszorbancia értéke egyenesen arányos az élő sejtek számával.

4.6 A sejtmigráció detektálása

A CytoSelect 24-Well Wound Healing Assay (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) kitéhez tartozó 24 lyukú szövettenyésztő lemez speciális inzertet tartalmaz, mely adott nagyságú területen akadályozza meg a sejtek letapadását. A HAoSMC-k kitapasztása az inzertet tartalmazó lyukakba 20x10⁴/lyuk sejtszámmal, 5%-os FBS tartalmú DMEM tápfolyadékban történt. A szétosztást követő 24. órában történt a kezelés, melyet két-két párhuzamos lyukban végeztünk 20, 15, 10, 5 és 2,5 µg/mL végkoncentrációjú rFXIIIa-mal. A kontroll sejteket Recludannal gátolt thrombint

tartalmazó tápfolyadékban tenyésztettük. A kezelést követő 24. órában távolítottuk el az inzerteket a lyukakból és indítottuk el a felvételek készítését a Juli Stage Real Time Cell History Recorder Microscope (NanoEnTek, Söul, Dél- Korea) segítségével CO₂ termosztátban. A lyukakban három-három különböző, általunk kijelölt területről készültek a képek. A mikroszkóp szoftvere minden felvétel esetén a sejtenyészet konfluenciáját is meghatározta.

4.7 Az extracelluláris mátrix kollagén tartalmának meghatározása

A HAoSMC-k kitapasztása 12 lyukú szövettenyésztő lemezre (TPP) 10x10⁴/lyuk sejtszámmal történt. A szétosztást követő 24. órában történt a kezelés, mely 3 napig tartott 20, 15, 10, 5 és 2,5 µg/mL végkoncentrációjú rFXIIIa-mal. A kontroll sejteket Recludannal gátolt thrombint tartalmazó tápfolyadékban tenyésztettük. A kezelést követő 24. órában az extracelluláris mátrixból történő kollagén mérést a Sircol™ Soluble Collagen Assay Kit (Biocolor Life Science Assays, Carrickfergus, Egyesült Királyság) segítségével végeztük a gyártó utasításai szerint. A kollagén-festék komplex feloldódását követően az abszorbanciát 450 nm-en (iEMSReader MF and Multiscan™) spektrofotométer segítségével detektáltuk, majd az eredmények értékelését Ascent software segítségével végeztük.

4.8 TSP-1 meghatározása a sejtfraekcióból és a sejtek felülúszójából

A HAoSMC-k kitapasztása 96 lyukú szövettenyésztő lemezre (TPP) 0,6x10⁴/lyuk sejtszámmal történt. A szétosztást követő 24. órában történt a kezelés, mely 24 órán át tartott. 20 µg/mL rFXIIIa törzsoldatból 15, 10, 5 és 2,5 µg/mL végkoncentrációjú hígításokat készítettünk. A kontroll sejteket Recludannal gátolt thrombint tartalmazó tápfolyadékban tenyésztettük. Másnap leszívtuk a sejtekről a felülúszót (200 µL/lyuk), majd a sejteket PBS pufferrel mostuk (200 µL/lyuk). Sejtlyázatot készítettünk, a sejtekhez 1% Triton X-100, 1 mM EDTA és 10% proteáz inhibitor koktél (SigmaFast, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) tartalmú PBS puffert (200 µL/lyuk) adva. Az inkubálás 5 percig enyhe rázatás mellett történt, amit a minták kevertetése, majd centrifugálás követett 13400 rpm fordulatszámom, 5 percig. A felülúszót alacsony fehérjekötőképességű csöbe pipettáztuk át. A TSP-1 fehérje mennyiségének meghatározását Human Thrombospondin 1 ELISA kittel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) végeztük a gyártó utasításai szerint. Az abszorbanciát 450 nm-en (iEMSReader MF and Multiscan™ fotométer) detektáltuk, majd az eredmények értékelését Ascent software segítségével végeztük.

4.9 A HAoSMC-k TSP-1 fehérje termelésének vizsgálata Western blot segítségével

A HAoSMC-k kitapasztása 6 lyukú szövettenyésztő lemezre (TPP) 50×10^4 /lyuk sejtszámmal történt. A szétosztást követő 24. órában történt a sejtek kezelése $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ rFXIIIa-mal, mely 24 órán át tartott. A kontroll sejteket Recludannal gátolt thrombint tartalmazó tápfolyadékban tenyésztettük. A sejteket 2 mM EDTA és 10% proteáz gátló tartalmú (Biotool, Houston, USA) PBS pufferrel mostuk ($1500 \mu\text{L}/\text{lyuk}$) 30 percen keresztül, 37°C -on. A sejteket szuszpendálással összegyűjtöttük a lemez aljáról, majd 13200 rpm -en lecentrifugáltuk. RIPA pufferrel (0,1% SDS, 0,5% deoxycholate, 1% Tritonx 100) lizáltuk a sejteket. A sejtenyésztő lemezen maradt extracelluláris mátrixot 2 mM EDTA és 10% proteáz gátló koktél tartalmú PBS pufferrel mostuk újra. A lyukakba $500 \mu\text{L}$ Laemmli puffert pipettáztunk, majd 150 rpm rázatás mellett, szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk. Az extracelluláris mátrix fehérjéket tartalmazó mintákat a puffer szuszpendálásával összegyűjtöttük és 10 kDa szelektivitású Microcon szűrő (Centrifugal Filter Units for Concentration and Purification of Biological Solutions, YM-10, Millipore, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) segítségével töményítettük be. Mind a sejt pelletből, mind a mátrixot tartalmazó mintákból, összfehérje meghatározást végeztünk BCA kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével. 7,5%-os SDS-poliakrilamid gélt használtunk a fehérje tartalmú minták elválasztására. Kétszáz nanogram TSP-1 standardot (Thrombospondin Human Platelet, Athens Research and Technologies, Athens, Georgia, USA), $54 \mu\text{g}$ összfehérjét a sejtlizátumokból, $2 \mu\text{g}$ összfehérjét a sejtek extracelluláris mátrix mintákból. A blottolás PVDF membránra (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) történt, félszáraz blot készüléssel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A membránon üresen maradt helyeket 3% BSA-t (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) tartalmazó tTBS pufferrel blokkoltuk (150 mM NaCl , 50 mM Tris , 0,05% Tween-20, pH: 7,5) 2 órán keresztül. Primer antitestként egér eredetű biotinált monoklonális thrombospondin-1 ellenes antitestet (Life Technologies; 1:1000 hígítás), jelölő antitestként HRPO-konjugált, poliklonális kecske eredetű anti-egér IgG antitestet (Bio-Rad, Hercules, CA, USA; 1:20000 hígítás) használtunk. A detektálást kemiluminescens szubsztrát reagenssel (ECL, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), az előhívást fényérzékeny film (Amersham Hyperfilm ECL, Buckinghamshire, Egyesült Királyság) segítségével végeztük.

4.10 TSP-1 fehérje detektálása immunfluoreszcens festéssel

A HAoSMC-eket Clipmax 10 cm² sejtenyésző flaskában (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Svájc) 8x10⁴/ flaska sejtszámmal tapasztottuk ki. A későbbiekben a flaska oldala eltávolítható, az alja pedig tárgylemezként funkcionál. A szétosztást követő 24. órában történt a sejtek kezelése 20 µg/mL rFXIIIa-mal, a kontroll sejteket Refludánnal gátolt thrombint tartalmazó tápfolyadékban tenyésztettük. 24 óra elteltével PBS pufferrel mostuk, majd 3% ecetsavat tartalmazó 96%-os ethanollal fixáltuk a sejteket 10 percig. Újabb PBS mosást követően, a blokkolás 5% normál humán szérummal történt 15 percen keresztül. Az immunfluoreszcens festéshez biotinált egér monoklonális anti-TSP-1 antitestet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 1:200 hígításban, 60 percig majd DyLight 488 jelzett ló eredetű anti-egér IgG (Vector Laboratories, Oxfordshire, Egyesült Királyság) antitestet 1:100 hígításban, 45 percig használtunk. A sejtmagokat 4',6-diamidino-2-phenylindol festékkel (DAPI) jelöltük (Vectashiel Antifade Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories, Oxfordshire, Egyesült Királyság). A tárgylemezeket AxioImage.M2 fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss Oberkochen, Németország) vizsgáltuk, és reprezentatív képeket konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (LSM 700, Zeiss Oberkochen, Németország) készítettünk.

3.11 TSP-1 génexpresszió vizsgálata

A HAoSMC-eket 24 lyukú sejtenyésző lemezre (TPP) 3x10⁴ sejt/lyuk sejtszámmal tapasztottuk ki. A szétosztást követő 24. órában a sejteket 20, 15, 10, 5 és 2,5 µg/mL végkoncentrációjú rFXIIIa-mal kezeltük. A kontroll sejteket Refludánnal gátolt thrombint tartalmazó tápfolyadékban tenyésztettük. A kezelést követő 24. órában a sejt kultúrából történő totál RNS tisztításhoz a QIAamp RNA Blood Mini Kitet (Qiagen, Hilden, Németország) használtuk, és annak leírása szerint dolgoztunk. Az RNS koncentrációt és tisztaságot NanoDrop2000 készülékkel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) határoztuk meg. Ezt követte a cDNS szintézis, melyhez a qPCR BIO cDNA Synthesis Kitet (PCR Biosystems simplifying research, London, Egyesült Királyság) használtuk. A reakció során 80 ng mennyiségű RNS íródott át cDNS-re. A cDNS szintézist a Veriti 96 well Thermal Cycler PCR készüléken végeztük. A cDNS-ről kvantitatív valós idejű PCR segítségével felszorzottuk a TSP-1 gént, háztartási génként pedig a GAPDH génszakaszt alkalmaztuk. A primerek szekvenciája megegyezett a Dardik és munkatársai által közölt szekvenciával. A PCR reakciókat LightCycler 480 (Roche, Budapest, Magyarország) készüléken, a LightCycler 480 SYBR Green I. Master Mix (Roche, Budapest, Magyarország)

segítségével végeztük. Az amplifikációs ciklusok alapján az génextpresszió mértékének számítását a $\Delta\Delta Ct$ matematikai módszer segítségével végeztük, a GAPDH-ra történő normalizálással.

4.12 Humán minták

Munkacsoportunk korábbi tanulmányához gyűjtött, egészséges önkéntesektől származó, plazma minták közül nyolevan mintát választottunk ki random módon. Az egészséges kontrollok beválogatásánál kizárási kritériumnak tekintettünk minden krónikus betegséget, kivéve a mérsékelt magas vérnyomást (145/90 és 165/95 Hgmm között), valamint bármely olyan akut betegséget, mely az előző 3 hétben fennállt. A vérvétel reggel 8 és 11 óra között, könyökhajlati vénából 0,109 M Na-citrátot tartalmazó vérvételi csövekbe (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) történt. A plazmát 1500 g fordulatszám, 20 percig történő centrifugálással választottuk el, majd -70 °C-on felhasználásig tároltuk. A résztvevők a részletes szóbeli tájékoztatást követően írásos beleegyezést adtak a mintájuk kutatási célú felhasználásához. A tanulmány megfelelt a Helsinki Deklaráció etikai irányelveinek. A tanulmányok etikai jóváhagyását a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságától kaptuk meg (ETT TUKEB: 54005-3/2016/EKU).

4.13 Anyagok II.

A humán plazma mintából affinitás kromatográfia technikával történt az $\alpha 2PI$ összes formájának kinyerése, melyhez ugyanazt a monoklonális anti- $\alpha 2PI$ antitestet használtuk, mint a totál- $\alpha 2PI$ ELISA mérés során. Az így kinyert $\alpha 2PI$ preparátumból újabb affinitás kromatográfiás lépéssel kivontuk a PB- $\alpha 2PI$ formát plazminogén Sepharose oszlop segítségével. Ily módon a preparátumban a plazminogént nem kötő, NPB- $\alpha 2PI$ forma maradt vissza. A rekombináns $\alpha 2PI$ fehérjéket a Sino Biological cégtől (Beijing, Kína) vásároltuk: teljes hosszúságú $\alpha 2PI$ (Human Serpin F2 Proteint, Met-PB- $\alpha 2PI$, 1-464 aa) és C-terminálisan hasított (Human Serpin F2 Protein, Met-NPB- $\alpha 2PI$, 1-437 aa) $\alpha 2PI$ formákat. Az $\alpha 2PI$ deficiens plazmát az Affinity Biologicals (Affinity Biologicals, ON, Canada) cégtől szereztük be. A humán plazmából származó thrombin a Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől származik. Humán szöveti faktorként Innovint (Siemens, Marburg, Németország), rekombináns t-PA-ként pedig Actyllyse-t (Boehringer Ingelheim International, Németország) használtunk a különböző kísérletekben. A humán plazmából származó fibrinogént (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) Alexa-Fluor647 festékkel (Life Technologies, Waltham, MA, USA) jelöltük a reagenshez mellékelt protokoll szerint.

4.14 α 2-plazmin inhibitor koncentráció meghatározása plazma mintákban

A totál- α 2PI antigén koncentrációt egy, a munkacsoportunk által korábban kifejlesztett szendvics ELISA technikával mértük, mellyel a plazma összes α 2PI izoformája detektálható. A módszer előnye, hogy a plazmin-antiplazmin komplexek jelenléte nem befolyásolja a mérési eredményeket (a plazma α 2PI referencia tartománya: 48-85 mg/L). A PB- α 2PI antigén koncentrációt szintén a munkacsoportunk által kifejlesztett szendvics ELISA-val detektáltuk. Az NPB- α 2PI izoforma mennyiségét számítottuk, a totál- α 2PI mennyiségből kivontuk a PB- α 2PI forma mennyiségét.

4.15 Az α 2PI plazma alvadékba való beépülésének vizsgálata

A plazma mintákat 2 U/mL thrombin és 20 mM CaCl_2 hozzáadásával alvasztottuk (aktiváló mix) 30 percig 37 °C-on, majd a szérumot az alvadéktól centrifugálási lépéssel (16100 g, 5 perc) választottuk el. A totál-, PB- és NPB- α 2PI antigénszinteket az eredeti plazma mintákból és az azokból nyert szérumokból mértük a korábban említett ELISA technikák segítségével. A szérum mintákból kapott eredményeket megszoroztuk a hígulás mértékével (1,11), amit az alvasztás során az aktiváló mix hozzáadása okozott. Az alvadékba való beépülés mértékét az eredeti plazmában, és az ugyanabból a mintából származó szérumban mért α 2PI izoformák mennyiségének különbségével határoztuk meg. Az α 2PI alvadékba való beépülését Western blot technikával is vizsgáltuk. Három, véletlenszerűen kiválasztott plazma mintát alvasztottunk a fent leírtak alapján, 2 mM jódacetamid (IAA) jelenlétében vagy annak hiányában. Az alvadékokat mosópufferrel (PBS, 3 mg/mL IAA, pH 7,2) alaposan mostuk, majd 150 rpm rázatás mellett, 20 óra alatt, szobahőmérsékleten, 5% merkaptóethanolt és 8 M ureát tartalmazó redukáló Laemmli pufferben feloldottuk. A feloldott alvadékokat 7,5%-os poliakrilamid gélen futtattuk meg. α 2PI standardként human plazmából tisztított α 2PI preparátumot (Calbiochem, San Diego, CA, USA) használtunk. A fehérjék elektroblottolása PVDF membránra (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) történt Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) készülék segítségével. Egy órán keresztül, szobahőmérsékleten, 3% zselatint tartalmazó TBS (pH 7,4) oldattal blokkoltuk a membrán szabadon maradt felszínét. Az inkubációs lépések között a membrán mosása 3x5 percig, tTBS (pH

7,4) oldattal történt. Az összes izoforma detektálásához HRPO-jelzett anti-humán α 2PI poliklonális antitestet (GA2AP-AP, Affinity Biologicals, ON, Kanada) 1:20000 hígításban, a PB- α 2PI forma detektálásához egér anti-humán PB- α 2PI monoklonális antitestet (Monoklonális-anti- α 2AP 3AP antitest, Technoclone, Bécs, Ausztria) (3 μ g/mL) és anti-egér HRPO-jelzett IgG antitestet (1:3000, Southern Biotech, Birmingham AL, USA) alkalmaztunk. Az előhívás Pierce ECL kemilumineszcens szubsztrát reagenssel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) és Azure Biosystem c300 készülék (Azure Biosystems, Dublin, CA, USA) segítségével történt.

4.16 Fibrin alvadéklízis vizsgálatok

Nyolcvan egészséges egyéntől származó plazma mintán végeztünk *in vitro* fibrin alvadék lízis vizsgálatot Orbán-Kálmándi et al. módszere szerint. A rekombináns teljes hosszúságú és C-terminálisan trunkált α 2PI alvadék lízisre való hatásának vizsgálatához egy általunk módosított lízis-idő meghatározást végeztünk. α 2PI hiányplazmát különböző rekombináns, teljes hosszúságú és C-terminálisan trunkált α 2PI fehérjékkel egészítettünk ki úgy, hogy 100%-nak a 65 μ g/mL plazma koncentráció felelt meg. A plazma mix 1,3-szorosan hígított plazmát és HEPES pufferben (pH 7,4) 1:100 hígított Innovint és 130 ng/mL rt-PA-t tartalmazott. A plazmákhoz az alvadás beindításához szükséges aktiváló keveréket adtunk, mely 1 U/mL thrombint és 1 mM CaCl_2 -t tartalmazott HEPES pufferben. 50 μ L/lyuk plazma keverékhez 25 μ L/lyuk aktiváló keveréket pipettáztunk 96-lyukú lemezekbe (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Ausztria), majd azonnal mértük a minták turbiditását Tecan Infinite 200 spektrofotométer (TECAN Trading AG, Männedorf, Svájc) segítségével, 340 nm-en, 1 percenként, összesen 72 percig, 37 °C-on. Az eredmények kiértékeléséhez Shiny App szoftvert (0.3.1 verzió) használtunk, mellyel a fibrin képződés és lízis folyamatát ábrázoló görbe különböző paramétereit, mint például a maximális abszorbanciát (MaxAbsz), a 50%-os alvadék lízis időt (CLT50, az alvadéklízis görbe felszálló ágán az 50%-os maximális abszorbancia eléréséhez szükséges idő és az 50%-os lízis eléréséig eltelt idő különbsége) és a görbe alatti területet (AUC) számítottuk ki.

4.17 Az alvadék szerkezetének vizsgálata konfokális lézer scanning mikroszkópiával

α 2PI hiányplazmát egészítettünk ki különböző mennyiségű teljes hosszúságú és/vagy C-terminálisan trunkált rekombináns α 2PI formákkal és 2% végkoncentrációban AF647-jelölt fibrinogénnel. Az így kapott 50 μ L plazmához 50 μ L, az alvadékképződést indukáló aktiváló mixet

adtuk, amely TRIS/HCL pufferben (pH 7,5) hígított 0,5 U/mL thrombint és 10 mM CaCl₂-t tartalmazott. Az Ibidi μ -Slide VI lemez (ibidi GmbH, Gräfelfing, Németország) csatornáiba 40 μ L mintát injektáltunk, majd két óráig, sötétben, szobahőmérsékleten, nedves kamrában inkubáltunk. Az inkubációs idő lejaratát követően a képződő alvadékokat mostuk oly módon, hogy a csatornák mindkét oldalán lévő bemenetet TRIS/HCL pufferrel feltöltöttünk, majd a csatorna egyik oldalához egy 2,5 mL-es fecskendővel csatlakoztattunk, megtöltötve azt TRIS/HCL pufferrel a fecskendő 2 mL-es jelzéséig. A puffert az alvadékon 2 órán át engedték átfolyani. Ezt követően Olympus FluoView 3000 konfokális mikroszkóppal (Olympus, Tokió, Japán) vizsgáltuk az alvadékokat.

Az alvadékok konfokális képeinek elemzéséhez a nyílt forráskódú Fiji (Fiji Is Just ImageJ) szoftvert használtuk. A pórusméret meghatározásához alkalmazott eljárás a Münster és mtsai által fejlesztett forráskódon alapult. A fibrinszál-átmérőt MATLAB (R2019a) környezetben futó, CT-FIRE v3.0 beta (Curvelet Transform—Fiber Extraction) nevű grafikus felhasználói felület (GUI) használatával számítottuk ki. Minden alvadékról ugyabban a Z-stack pozícióban 22 kép (1024x1024 pixel) került rögzítésre. Különböző paramétereket (%-os lefedettség, pórusméret (pórusok átlagos sugara), rost szélesség) számoltunk a 22 kiértékelt képből, majd átlag \pm SD formában fejeztük ki azokat.

4.18 Egyéb laboratóriumi módszerek

A FXIII aktivitását ammónia felszabadulás detektálásán alapuló módszerrel határoztuk meg, a Technochrom FXIII kromogén tesztetjét (Technoclone, Bécs, Ausztria) használva. A FXIII-A₂B₂ antigén szintet szendvics ELISA módszerrel a korábban leírtak szerint határoztuk meg. A minták fibrinogén koncentrációját Clauss-módszerrel, a plazminogén szintet pedig a Berichrom Plasminogen teszttel (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Németország) mértük BCS XP koagulométeren (Siemens Heathineers, Erlangen, Németország).

4.19 Statisztikai analízis

A HAoSMC-kel végzett kísérletek során kapott eredményeket kétmintás Student-t teszttel elemeztük, az eredményeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

Az α 2PI heterogenitásával kapcsolatos vizsgálatok esetén, a szükséges mintanagyság meghatározásához korrelációs mintanagyság kalkulátort alkalmaztunk. A szükséges mintanagyság

$n=80$ volt ahhoz, hogy $r>0,300$ és $\alpha=0,05$, $\beta=0,2$ értékek esetén statisztikailag szignifikáns korrelációt állapíthassunk meg. Az adatok eloszlásának meghatározására Kolmogorov-Smirnov tesztet használtunk. A normál eloszlást mutató adatok $\text{átlag}\pm\text{SD}$, a nem normál eloszlású adatok medián (interkvartilis tartomány, IQR) formában kerültek bemutatásra. Az $\alpha 2\text{PI}$ szintek és a különböző $\alpha 2\text{PI}$ formák alvdékba történő beépülése, valamint a különböző alvadék lízis paraméterek közötti korrelációt kétváltozós korrelációs analízissel végeztük (Pearson). Ezen analízis során a nem normál eloszlást mutató változók esetén az adatok természetes alapú logaritmusát vettük, annak érdekében, hogy az adatok normál eloszlását megkapjuk. A rekombináns $\alpha 2\text{PI}$ -vel kiegészített plazmaminták és a különböző alvadéklízis, illetve alvadékszerkezeti paramétereinek átlagai közötti különbségek vizsgálatához a független mintás t-próbát alkalmaztuk. A szignifikancia szintje 95% volt ($p<0,05$). A statisztikai elemzéseket az SPSS szoftver segítségével végeztük (SPSS 28.0, Chicago, IL, USA).

5. Eredmények

5.1 Az aktivált FXIII a VSMC-kre való hatása

5.1.1 A HAoSMC oszteoblasztos transzformációja nem jár FXIII-A expresszióval

Mivel a FXIII-A megtalálható a humán oszteoblaszt sejtekben is, először vizsgálni kívántuk, hogy a HAoSMC-k oszteoblasztos transzformációja együtt jár-e a FXIII-A expressziójával is. Az oszteoblasztos differenciáció eléréséhez a sejteket kalcifikációs médiumban tenyésztettük, mely 2,5 mM inorganikus foszfátot (Pi) és 1,2 mM Ca^{2+} -t tartalmazott. Az Alizarin Red S festéssel kimutatott kalcium tartalom a kontroll sejtekhez képest emelkedett a transzformált sejtek esetén ($17,34 \pm 3,2$ vs. $204,42 \pm 13,8$). Az oszteokalcin (OCN) szintézis a kontrollhoz képest 9-szeresére nőtt ($6,34 \pm 1,0$ vs. $58,42 \pm 7,8$), a Runx2 génexpresszió mértéke a kontrollhoz képest 1,69-szeresére emelkedett. Az alkalikus foszfatáz aktivitás a transzformált sejtekben a 8,67-szeresére nőtt a kontroll sejtekhez képest. Ezen markerek szintjének emelkedése igazolta, hogy az oszteoblasztos átalakulás megtörtént. Ennek ellenére a sejtlyázumokban FXIII-A nem volt detektálható sem Western blot-tal sem ELISA technikával.

5.1.2 A rFXIII-A hatása a HAoSMC-k proliferációjára

Következő lépésben a HAoSMC-khez kívülről adott rFXIII-A hatását vizsgáltuk. A hemorrhágiás plakkokban az extracelluláris FXIII-A koncentráció nem ismert, de feltehetően a plazmakoncentráció ($10 \mu\text{g/mL}$) felett van. Ezért a kísérletek során $2,5$ - $20 \mu\text{g/mL}$ tartományban alkalmaztuk a rekombináns FXIII-A-t. A nem aktivált rFXIII-A nem volt hatással a HAoSMC-k proliferációjára, még a legmagasabb koncentráció alkalmazása esetén sem. Ezzel szemben a rekombináns aktivált FXIII-A (rFXIIIa) koncentráció függő módon, jelentősen fokozta a sejtproliferáció mértékét a kontrollhoz képest. Az emelkedés már a plazma koncentráció alatt is szignifikáns volt, a legmagasabb alkalmazott koncentráció ($20 \mu\text{g/mL}$) 44% proliferáció fokozódást eredményezett. A sejtproliferáció detektálását EZ4U és CCK-8 kitekkel is elvégeztük, melyek hasonló eredményeket adtak.

5.1.3 A rFXIIIa szerepe az *in vitro* sebgyógyulásban

Ezt követően a rFXIIIa hatását vizsgáltuk egy *in vitro* sebzáródás esszében. A kísérlet során a sejtek proliferációja és migrációja szimultán történik, mely során a sejtek benövik a rendelkezésre álló üres területet. A sebzáródás kinetikailag is követhető, monitorozható. Mivel a sejtproliferáció vizsgálata során azt kaptuk, hogy a nem aktivált FXIII-A nem befolyásolta a HAoSMC-k proliferációját, ezért a következő kísérletekben csak annak aktivált formájával dolgoztunk. Eredményeink azt mutatták, hogy a rFXIIIa koncentráció-függő módon fokozta a sebzáródás mértékét. A 30%-os és 80%-os konfluencia elérését az 5 µg/mL rFXIIIa-val kezelt sejtek esetén a 143. és 581. percnél, 10 µg/mL esetén a 98. és 462., 15 µg/mL esetén a 82. és 321., a 20 µg/mL esetén pedig a 38. és 193. percnél érték el. Ezzel szemben a kontroll sejteknek ezen konfluenciaszintek eléréséhez több időre volt szükségük (192 és 636 percre).

5.1.4 A HAoSMC-k kollagén szekréciója

Az extracelluláris mátrix egyik kulcsfontosságú komponense a kollagén, melynek termelt mennyiségét három napos kezelést követően vizsgáltuk. Az utolsó kezeléstől számított 24. órára a kollagén mennyisége az extracelluláris mátrixban emelkedett, a 10 µg/mL rFXIIIa esetén 10%-kal, 15 µg/mL esetén közel 30%-kal, 20 µg/mL esetén pedig 50%-kal a nem kezelt kultúrához képest.

5.1.5 TSP-1 kimutatása a sejtenyészet médiumában és a sejtfrakciókban

A rFXIIIa-mal történő 24 órás kezelést követően a sejtek tápfolyadékában szignifikánsan lecsökkent a TSP-1 koncentráció a kontroll sejtekéhez képest. A 2,5 µg/mL esetén 78%-ra, 5 µg/mL esetén 54%-ra, 10 µg/mL esetén 43%-ra, 15 µg/mL esetén 39%-ra, 20 µg/mL esetén pedig 34%-ra csökkent a TSP-1 szint. Ezzel szemben a kezelt sejtek lizátumában a TSP-1 koncentráció emelkedését tapasztaltunk: 2,5 µg/mL esetén 20%-os, 5 µg/mL esetén 50%-os, 10 µg/mL esetén 71%-os, 15 µg/mL esetén 100%-os, 20 µg/mL esetén pedig 157%-os emelkedést.

Ezt követően kiszámítottuk az egyes kultúrák totál TSP-1 tartalmát, mely a médiumban mért és a sejtekben/sejtekhez kötötten detektált TSP-1 összege. A legmagasabb rFXIIIa-mal történő kezelés esetén is csak minimális, nem szignifikáns csökkenés volt detektálható a kezelt kultúrákban a nem kezelt kultúrákhoz képest (135,4±11,4 ng/lyuk vs 153,1±13,1 ng/lyuk).

5.1.6 A TSP-1 kifejeződése a sejtek citoplazmájában

Immunfluoreszcens vizsgálat során míg a kontroll sejtekben csak a citoplazmában detektáltunk TSP-1 fehérjét, addig a rFXIIIa jelenlétében számos apró, TSP-1-re intenzíven festődő granulum volt látható, melyek többsége a HAoSMC-vel asszociálódott.

5.1.7 A TSP-1 kimutatása Western Blot technikával

A celluláris és sejthez kötött TSP-1 fehérjék magas molekulásúllyal, erős diszulfid-kötéssel rendelkező homotrimer formában jelentek meg a redukáló SDS-PAGE-et követő Western blot vizsgálat során, összehasonlítva a 150 kDa nagyságú, monomer TSP-1 standarddal. Denzitometriás méréssel a sejt-asszociált TSP-1 mennyiség 2,5-szeres emelkedését kalkuláltuk a rFXIIIa-mal kezelt mintákban a kontrollhoz képest. Az extracelluláris mátrixban nem volt kimutatható TSP-1. Ez azt sugallja, hogy a rFXIIIa-mal történő kezelés nem a *de-novo* TSP-1 szintézist indukálja, hanem inkább elősegíti annak sejtekhez kötött formában történő megtartását.

5.1.8 TSP-1 mRNS expresszió vizsgálata

A 24 órán át rFXIIIa-mal történő kezelés nem volt szignifikáns hatással a HAoSMC-k TSP-1 gén kifejeződésére a kontroll sejtekhez képest.

5.2 Eredmények az α 2PI heterogenitás hatásának vizsgálatában

Az α 2PI C-terminális hasításának következményeit a fibrinolízis szabályozásában kevésbé tanulmányozták korábban. Munkánk során azt kívántuk vizsgálni, hogy a különböző α 2PI formák és egymáshoz viszonyított arányuk miként befolyásolják a plazma alvadék struktúráját és lízisét.

5.2.1 Különböző paraméterek plazmakoncentrációi a vizsgált populációban

Egy korábbi tanulmányunkhoz gyűjtött, egészséges egyének mintagyűjteményéből random módon választottuk ki 80 egyén plazma mintáját. A vizsgált paraméterek minden esetben a referencia tartományban voltak.

A FXIII aktivitás és az antigén koncentráció között erős korrelációt ($r=0,928$; $p<0,001$) találtunk. Az α 2PI aktivitás mind a totál- α 2PI antigén koncentrációval ($r=0,691$; $p<0,001$), mind a PB- α 2PI

antigén koncentrációval ($r=0,750$; $p<0,001$) jó korrelációt mutatott. Az $\alpha 2$ PI aktivitás és az NPB- $\alpha 2$ PI antigén koncentrációk közötti korreláció azonban mérsékelt volt ($r=0,325$; $p=0,005$).

5.2.2 Az $\alpha 2$ PI formák beépülése a fibrin alvadékokba

A plazma minták alvasztását követően meghatároztuk a fibrin alvadékokba bekötődött totál-, PB- és NPB- $\alpha 2$ PI formák mennyiségét. A szérum és a fibrin alvadék elválasztását követően a totál- $\alpha 2$ PI-nak a $44,33\pm 6,3\%$ -a épült be az alvadékba, melynek $57,8\%$ -a a PB- $\alpha 2$ PI forma volt. Az eredeti plazmakoncentrációjához képest az alvadékba több NPB- $\alpha 2$ PI épült be, mint PB- $\alpha 2$ PI ($58,07\%$ és $37,62\%$). A PB- $\alpha 2$ PI beépülése szignifikáns korrelációt mutatott a FXIII aktivitással ($r=0,540$; $p<0,001$), a fibrinogén ($r=0,387$; $p<0,001$) és a plazminogén koncentrációval ($r=0,407$; $p<0,001$) is. Az NPB- $\alpha 2$ PI beépülése viszont nem mutatott szignifikáns összefüggést a FXIII aktivitással ($r=0,110$; $p=0,331$) és a fibrinogén koncentrációval ($r=0,086$; $p=0,446$), de korrelált a plazminogén mennyiséggel ($r=0,322$; $p=0,004$).

5.2.3 A mért paraméterek összefüggése az alvadéklízissel

Ugyanazon plazmamintákon ($n=80$) alvadéklízis vizsgálatot is végeztünk és megvizsgáltuk az egyes paraméterek összefüggését az alvadéklízis során kapott turbidimetriás görbék jellemzőivel, mint a CLT50, MaxAbsz és az AUC értékek. A FXIII antigén és aktivitás emelkedése pozitív hatással volt a MaxAbsz-ra és az AUC-re, míg a CLT50-re nem volt hatással. A fibrinogén szint csak a MaxAbsz-val mutatott korrelációt. A totál- $\alpha 2$ PI plazma koncentráció statisztikailag szignifikáns, pozitív korrelációt mutatott mindhárom lízis görbe paraméterrel, azonban az $\alpha 2$ PI C-terminális formák plazma koncentrációja esetén ez az összefüggés csak az NPB- $\alpha 2$ PI esetében volt megfigyelhető. A plazma PB- $\alpha 2$ PI/NPB- $\alpha 2$ PI arány szignifikáns negatív korrelációt mutatott a CLT50-nel és az AUC-vel.

Meglepő módon míg a plazma NPB- $\alpha 2$ PI és a beépült NPB- $\alpha 2$ PI antigén koncentrációk statisztikailag szignifikáns, pozitív korrelációt mutattak mind a CLT50, MaxAbsz és AUC értékekkel, addig a PB- $\alpha 2$ PI esetében csak a beépült forma korrelált és csak a MaxAbsz-val.

5.2.4 Az α 2PI fibrin alvadékba való beépülésének vizsgálata Western blot technikával

Annak vizsgálatára, hogy az α 2PI formák miként épülnek be a fibrin alvadékba 3 random kiválasztott normál humán plazmát megalvasztottunk thrombin és Ca^{2+} hozzáadásával, a FXIII inhibitor jódcetamid (IAA) jelenlétében vagy annak hiányában. Az alvadékokat intenzíven mostuk, majd feloldottuk és Western blottal analizáltuk. Poliklonális anti- α 2PI antitestet használtunk a fibrin alvadékba beépült összes α 2PI forma kimutatására, míg a PB- α 2PI forma lokalizációjának meghatározásához arra specifikus monoklonális antitestet alkalmaztunk. A fibrin α -lánchoz és α -polimerekhez keresztkötött α 2PI mindkét jelölés esetén, míg a monomer α 2PI (nem kovalensen kötődő) reakciója csak a poliklonális antitest jelölés mellett volt látható. IAA jelenlétében a FXIII gátolt volt, ezért kovalens kötés hiányában csak a monomer α 2PI jelenléte volt detektálható. Ez a nem kovalensen kötött α 2PI feltehetően az NPB- α 2PI forma, mivel a PB- α 2PI-ra specifikus antitest nem adott reakciót ebben a sávban.

5.2.5 Mesterséges plazma mintákban történő fibrin alvadéklízis vizsgálata

Eredményeink tehát azt mutatták, hogy a PB- α 2PI és NPB- α 2PI formák plazma koncentrációja az alvadéklízis paramétereivel összefüggést mutat, valamint eltérő módon, de mindkét forma beépül a fibrin alvadékba. Ugyanakkor az α 2PI N-terminális heterogenitása és a plazma mintákban fellépő más befolyásoló tényezők eltérései igencsak megnehezíti a C-terminus hasításából adódó valódi különbségek vizsgálatát. Ennek kiküszöbölésére olyan plazma mintákat készítettünk, amelyek csak az α 2PI C-terminus formáinak mennyiségében, illetve arányaiban tértek el egymástól. α 2PI-hiányplazmát rekombináns Met-PB- és/vagy Met-NPB- α 2PI-val egészítettünk ki különböző arányokban, és vizsgáltuk az ily módon elkészített plazmából képződő alvadék lebontási folyamatát. A hiányplazmához képest mind a plazminogénkötő mind a nem kötő α 2PI formák jelenlétében megnyúlt lízisidőt tapasztaltunk. 100%-os PB forma (65 mg/L) jelenlétében a CLT50 80%-kal nőtt az α 2PI-hiányplazmához képest, míg a 100%-os NPB- α 2PI forma (65 mg/L) jelenlétében a lízisidő 30%-kal nőtt.

Megvizsgáltuk az NPB- α 2PI mennyiség növelésének hatását a lízisidőre a PB- α 2PI állandó mennyisége mellett is. Az NPB- α 2PI forma arányának növelésével párhuzamosan a lízisidő is növekedett, enyhén, de statisztikailag szignifikáns módon. A legmagasabb mennyiségű NPB- α 2PI mellett 21%-os növekedést tapasztaltunk a 73:27%-os PB- α 2PI: NPB- α 2PI arányhoz képest.

5.2.6 Mesterséges plazma mintákban történő fibrinháló struktúra vizsgálata

A következő lépésben az $\alpha 2$ PI-hiányplazmát AF647-jelölt fibrinogénnel egészítettük ki, valamint rekombináns Met-PB- és/vagy Met-NPB- $\alpha 2$ PI-t különböző mennyiségben adtunk hozzá. A plazmák alvasztását követően, az alvadék szerkezetét konfokális lézer scanning mikroszkópiával elemeztük, megvizsgálva az $\alpha 2$ PI formák különböző arányainak hatását a keletkezett fibrin alvadék szerkezetére. A mennyiségi elemzéshez meghatároztuk a terület %-os lefedettségét, a pórusméretet és a fibrin szálak vastagságát. Összehasonlítva az $\alpha 2$ PI-nélkül készült fibrin alvadékkal, a %-os lefedettség jelentősen megnövekedett a PB-és/vagy NPB formák jelenlétében, míg a pórusméret csökkent, és vastagabb fibrin szálak alakultak ki a rekombináns $\alpha 2$ PI-vel kiegészített alvadékokban. A legnagyobb változást az $\alpha 2$ PI-hiányplazmához képest abban az esetben tapasztaltunk, amikor mindkét forma jelen volt a normál plazmában mért aránynak megfelelően.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1 Az aktivált FXIII hatása a simaizomsejtek funkcióira

A vaszkuláris simaizomsejtek (VSMC-k) normál esetben az érfal középső, média rétegében helyezkednek el, nyugvó állapotban (kontraktilis fenotípus). Ám valamilyen fiziológiai és/vagy patológiai hatás, környezeti ingerek hatására fenotípusváltásra is képesek. Sérülés, gyulladás vagy különböző növekedési faktorok más és más funkciójú fenotípus felvételére készítetik a VSMC-eket. A szintetikus fenotípus leginkább érfalsérülés vagy atheroszklerózis folyamataiban aktiválódik, így módon fontos a szöveti regenerációban, elősegítve a sejtek proliferációját, migrációját és a kollagén szintézist. Oszteogén fenotípusúvá atheroszklerózisban illetve egyéb gyulladásos folyamatokban alakulnak át a VSMC-k. Az érlelmeszesedésre jellemző patológiás, kalcifikációs környezet során a VSMC-k oszteoblaszt-szerű sejtekké differenciálódnak. Mivel a cFXIII-at kimutatták az oszteoblasztokban is, először azt vizsgáltuk, hogy a VSMC-k oszteoblasztos differenciációja társul-e a FXIII-A expressziójával. Azonban a VSMC-k oszteoblasztos transzformációja, amit az oszteoblasztokra jellemző differenciációs markerek expressziója igazolt, a celluláris FXIII expressziójával nem járt együtt. Mivel a VSMC-k nem termelnek cFXIII-at, a további kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy a sejtekhez kívülről hozzáadott XIII-as faktor befolyásolja-e a funkciójukat. Az érfalban található extracelluláris FXIII származhat a plazmából, érfalsérülés vagy atheroszklerotikus plakk ruptúra következtében. Ezen kívül felszabadulhat az aktivált vérlemezkékből, a plakkban felhalmozódott makrofágokból, és a sejtfelszínről is származhat a cFXIII. A plakkokban keletkező thrombin könnyen aktiválhatja a FXIII-at, mely hatással lehet a VSMC-k funkcióira is. Munkánk további részében az FXIIIa hatását vizsgáltuk a HAoSMC-re, megfigyelve milyen funkciókat indít be, mellyekkel az érlelmeszesedésben vagy az atheroszklerotikus plakk kialakulásban és fenntartásában játszhat szerepet. Kísérleteinkben a sejtproliferációra, *in vitro* sebzáródásra, az extracelluláris mátrix fő komponensének, a kollagénnek a szekréciójára és a TSP-1 expresszióra való hatást vizsgáltuk.

A sejtproliferációs kísérletek eredményei azt mutatták, hogy az FXIIIa, a plazma koncentráció alatti tartományban is fokozta a HAoSMC-k sejtszétódását. Ezen eredményeket az *in vitro* sebzáródási vizsgálat is alátámasztotta, amelyben az FXIIIa sejtproliferációra és sejtmigrációra gyakorolt kombinált hatását mutattuk ki. Mindenezen sejtfunkciók kiváltásához a XIII-as faktor transzglutamináz aktivitással rendelkező formájára volt szükség, a nem aktivált FXIII nem

befolyásolta sem a HAoSMC-k migrációját, sem a proliferációját. A FXIII sejt-specifikus hatását Inbal és munkacsoportja korábban már vizsgálta néhány egyéb sejttípuson. Kimutatták, hogy a jelen kísérleteinkben alkalmazottnál magasabb koncentrációban (50 µg/mL) az FXIIIa fokozza az endothél sejtek migrációját és proliferációját, valamint csökkenti az apoptózist. Hasonló hatást írtak le a monocitákkal végzett kísérletekben is. A fibroblasztokra kifejtett hatása a FXIII-nak kevésbé volt egyértelmű. Míg a bőr eredetű fibroblasztok migrációját jelentősen fokozta a FXIIIa, a proliferáció esetén nem tapasztaltak változást. A tüdő eredetű fibroblasztokra gyakorolt FXIIIa hatás, a jódoacetamiddal gátolt FXIIIa-hoz viszonyítva is, csak mérsékelt volt. Az FXIIIa az endothél sejtek, monocyták és a bőr eredetű fibroblasztok sejtfelületén lévő vitronektin receptor ($\alpha\beta3$ integrin) és VEGFR-2 növekedési faktor receptor között keresztkötés kialakítására képes. A keresztkötés kialakulását követően a VEGFR-2 növekedési faktor receptor aktiválódik, melynek hatására az angiogenezisben fontos szerepet játszó, különböző jelátviteli útvonalak indulnak be (pl. sejtproliferáció, migráció). Mivel a VSMC-k is rendelkeznek vitronektin receptorokkal, valószínű, hogy az FXIIIa hatása ezekre a sejtekre hasonló mintázatot követ. Megjegyzendő, hogy a FXIII aktiválásra használt thrombin önmaga is képes a VSMC funkciókat befolyásolni, ezért a kísérleteink során az aktiválási lépés után a thrombin aktivitást legátoltuk, valamint az eredményeket a gátolt thrombint is tartalmazó tápfolyadékban tenyésztett sejtek eredményeivel vetettük össze. Az FXIIIa hatását a kollagén szekrécióra korábban oszteoblaszt sejtekben vizsgálták. Az eredmények azt mutatták, hogy a FXIIIa irreverzibilis gátlása (de a transzglutamináz 2 gátlása nem) az oszteoblasztok differenciálódását és mineralizációját is nagy hatékonysággal gátolta, mindamelllett csökkent a fibronectin és az I. típusú kollagén szekréciója és a sejtfelületről való leválása is. A saját kísérleteinkben a VSMC-k általi kollagén termelés fokozódását és az extracelluláris mátrixba való beépülését az FXIIIa-nak a plazmakoncentráció és az a fölötti mennyiségben való adása esetén figyeltük meg. A proliferáció és migráció fokozásához alacsonyabb FXIIIa jelenlétére volt szükség. Mindazonáltal, a FXIIIa szerepet játszhat a VSMC-k fenotípusváltásában, mely során azok kontraktilis, nyugvó állapotból szintetikussá válnak, és a fokozott kollagéntermeléssel, a kollagén extracelluláris mátrixba való beépítésével stabilizálhatják az érfalban kialakult plakkokat. Számos *in vitro* és *in vivo* tanulmány leírta az FXIIIa az angiogenezisre gyakorolt hatását, a TSP-1 szintézissel összefüggésben. A humán érendothél sejtek FXIIIa-mal történő kezelése során a TSP-1 mRNS szintű expressziója gyakorlatilag megszűnt, fehérje szinten pedig csökkent szintézist és szekréciót eredményezett. *In vivo* nyúl szaruhártyában,

az FXIIIa indukált angiogenezis során, a TSP-1 hiányát az FXIIIa-val hozták összefüggésbe. Egy másik állatmodelben, *in vivo* egerekben végzett heterotópiás szívatültetés során az FXIIIa-mal történő kezelés angiogenezis vizsgálat céljából történt. A kísérletek során a kezelés hatására jelentősen csökkentett a TSP-1 mRNS szintje is. Az FXIIIa az atheroszkerotikus plakkok fontos alkotóelemeire az endothelsejtekre, fibroblasztokra és makrofágokra is hatással van. Kísérleteink megerősítették azt a tényt, miszerint a FXIIIa nemcsak ezen sejtek, hanem a VSMC-k funkciót is jelentősen képes befolyásolni. Fokozza a VSMC-k proliferációját, migrációját és kollagénszekrécióját. Ezen tulajdonságok jelentős szerepet játszanak a plakk stabilitásának kialakulásában és talán a plakk méretének növekedéséhez is hozzájárulhatnak. Az FXIIIa hatása a VSMC-k TSP-1 expressziójára kissé bonyolultabb. A TSP-1 mennyisége a sejtek tápfolyadékában jelentősen csökkent, ami hozzájárulhat a FXIIIa proangiogén hatásához. Azonban ez a csökkenés nem állt összefüggésben a szintézis csökkenésével, mint más sejtípusok esetében, hanem a szekretált TSP-1 egy része a sejtekhez kötöten maradt. Annak megállapítására, hogy milyen szerepe lehet a sejthez kötött TSP-1-nek, további kísérletek szükségesek.

6.2 Az α 2PI inhibitor heterogenitásának hatása az alvadéklízisre és az alvadékszerkezetre

Az α 2-plazmin inhibitor a keringésben N- és C-terminális proteolitikus hasításokon megy keresztül, mely funkcionális következményekkel jár. Az N-terminális trunkációt az sFAP végzi, mely következtében keletkezett izoformát az FXIIIa gyorsabban képes keresztkötni a fibrinhez. Ezt a mechanizmust több kutatócsoport is tanulmányozta, azonban a C-terminális hasítás mértékéről és annak hatásáról jelenleg kevés információ áll rendelkezésünkre. A C-terminális módosulás befolyásolhatja a plazmin(ogén) gátlás hatékonyságát, a fibrinalvadékba való beépülésének mértékét és annak típusát, valamint az alvadék szerkezetét. Jelen munkánk eredményeként új információkkal bővült ismeretünk, hiszen megvizsgáltuk a C-terminálisan ép és hasított α 2PI formák plazmaszintjének és relatív arányának hatását azok fibrinalvadékba való beépülésére az alvadék szerkezetére és lízisére. Az α 2PI aktivitás és antigén koncentráció párhuzamos mérésével megerősítettük azt a korábbi feltételezést, miszerint az aktivitás meghatározására kifejlesztett tesztek eredménye csak a PB- α 2PI koncentrációjával mutat erős korrelációt, az NPB forma mennyisége csak enyhén befolyásolja, illetve a két forma relatív aránya

a plazmában nem befolyásolja a mért α 2PI aktivitást. A korábbi közleményekben leírt eredményeket az α 2PI fibrinalvadékba való beépüléséről az alkalmazott módszerek nagymértékben befolyásolták. Egy Laurell immunoelektroforézis technikát alkalmazó vizsgálat során a totál- α 2PI antigén szint a szérumban a plazmához képest $18\pm 9\%$ ($n=12$) csökkent, míg az azonnali plazmin gátlási teszttel $35\pm 6\%$ gátlást mutattak ki. Hatvanöt véradó esetében az α 2PI aktivitásban $32,3\%$ -os különbséget mértek a plazma és szérum szintek között. 6M ureában feloldott alvadékokban mért totál- α 2PI-ből csak egy kis mennyiségű fibrinalvadékhoz kötött α 2PI-t, számszerűen $83,2\pm 15,4$ mg/L-ből $1,35\pm 0,18$ mg/L-t sikerült kimutatni ELISA technikával. Az Uitte de Willige és munkatársai által kifejlesztett módszer segítségével, a fluoreszcens módon jelzett α 2PI-specifikus antitesttel jelölt, alvadékba beépült α 2PI arányát határozták meg. Öt egészséges véradótól származó Na-citráttal alvadégtöltött plazmából készült alvadékban $39\pm 4,9\%$ kötött α 2PI-t mutattak ki. Azt feltételezték, hogy ennek a mennyiségnek 90% -a keresztkötött formában van jelen, mivel FXIII inhibitor jelenlétében csak $3,9\pm 0,5\%$ -ot detektáltak. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy jelenleg nem áll rendelkezésünkre olyan módszer, amellyel megbízhatóan meg lehetne határozni az alvadékhoz asszociálódó, keresztkötött és nem kovalens módon kötött α 2PI mennyiségét, valamint ezek arányát.

Tanulmányunk során 80 egészséges önkéntes mintájában (plazma- és az azokból készített szérumminták) párhuzamosan meghatároztuk a totál-, PB- és NPB- α 2PI antigén koncentrációkat. Az alvadékba beépült mennyiségeket a plazmában és a hozzá tartozó szérummintában mért koncentrációk különbsége alapján adtuk meg. A plazmában a PB:NPB arány medián (IQR) értéke 2,1-nek (1,75-2,57) adódott, ami jó egyezést mutat a kereszt-immunoelektroforézis technikával meghatározott, 2,2 (1,8-2,7) aránnyal, mely során az első dimenzióban a gél Lys-plazminogént tartalmazott. Eredményeink azt mutatták, hogy a totál- α 2PI $44,3\pm 6,3\%$ -a az alvadékban maradt a szérum eltávolítása után. Ez az érték magasabb, mint az általában idézett körülbelül 30% , de jó egyezést mutat a munkacsoportunk által korábban meghatározott értékkel (45%). A PB:NPB arány az alvadékban 1,37-nek adódott, ami azt mutatja, hogy a NPB jelentős mennyisége kötődik az alvadékba és a PB formához képest magasabb arányban, ha az eredeti plazma koncentrációjukhoz viszonyítunk. Western blot technikával analizált, intenzíven mosott alvadékokban azt találtuk, hogy a PB formát keresztköti a FXIIIa a fibrin α -láncokhoz, viszont nem kovalens módon a fibrinhez kötődve nem detektálható. Ez megerősíti Klufft és munkatársai korábbi eredményeit. A poliklonális antitesttel történő jelölés során nem keresztkötött α 2PI monomer abban az esetben is

látható volt a blotton, amikor a FXIII gátolva volt. Ez a forma feltehetően az NPB forma, mivel a PB-specifikus antitest ezzel nem adott reakciót. Ezen eredménnyel összhangban a plazma FXIII szintek szignifikáns korrelációt mutattak a PB forma beépülésével, viszont az NPB forma beépülésével nem. Korábbi kísérletek azt bizonyítják, hogy a PB- α 2PI forma FXIII általi keresztköteése a fibrinhálóhoz elengedhetetlen az idő előtti alvadéklízis megakadályozásához. Ezért meglepő volt az az eredmény, mely szerint sem a FXIII plazmaszintek, sem a PB- α 2PI szintje nem mutatott jelentős korrelációt a lízisidővel, de a maximális abszorbanciával igen. Az NPB formának, mely egy lassú plazmin inhibitor, mind a plazmaszintje, mind az alvadékba beépült mennyisége szignifikáns összefüggést mutatott a három alvadéklízis paraméterrel. Ezen hatás további vizsgálata érdekében *in vitro* kísérletekben α 2PI-hiányplazmát egészítettünk ki teljes hosszúságú és/vagy C-terminálisan trunkált rekombináns α 2PI-ral és vizsgáltuk a kiegészítés hatását az alvadék szerkezetére és lízis idejére. Eredményeink szerint az NPB forma is, bár sokkal kisebb mértékben mint a PB- α 2PI, megnyújtotta az alvadék lízisidőt. Abban az esetben, amikor állandó mennyiségű PB forma mellett, amely körülbelül a normál plazma koncentrációnak felelt meg, növekvő mennyiségben NPB formát adtunk, további megnyúlást tapasztaltunk. Az α 2PI mindkét formája hatással volt a fibrinalvadék szerkezetére, növelve a fibrinszálak vastagságát és csökkentve a pórusméretet. A legnagyobb változást abban az esetben figyeltük meg, amikor mindkét forma, a normál plazmára jellemző mennyiségben és arányban volt jelen, ami szintén azt támasztja alá, hogy a két forma különböző mechanizmussal kötődik a fibrinhez, a hatásuk additív. A fibrinháló szerkezetét meghatározó mechanizmusok még nem teljesen ismertek. Számos tanulmány számolt be a fibrin szerkezetében bekövetkező változásokról, különböző thrombotikus állapotokkal összefüggésben. Több kutatás szerint a vékonyabb fibrinszálak kialakulása, a csökkent pórusméret és a csökkent permeabilitás a fibrinolitikus kapacitás csökkenésével és a thrombózis fokozott kockázatával hozható összefüggésbe. Ezzel szemben más tanulmányok a vastagabb fibrinszálak kialakulásáról számoltak be, melyeket megnyúlt lízisidő és csökkent áteresztőképesség kísért. Ezen utóbbi megállapításokkal állnak összhangban az általunk kapott eredmények. Azonban, kísérleteinkben az α 2PI fibrinhez való kötődése által kiváltott alvadék szerkezeti változás hatását nem vizsgáltuk függetlenül a direkt plazmin gátlástól. Azt feltételezzük, hogy mindkét folyamat hozzájárul a teljes fibrinolitikus kapacitás csökkenéséhez.

A C-terminális formák mennyiségét és azok arányát patológiás körülmények között csak két tanulmányban vizsgálták. Uitte de Willige és munkatársai miokardiális infarktust túlélő férfiak

plazmájában csökkent totál- α 2PI szint mellett változatlan C-terminális hasítási arányt mutattak ki. Baráth B vénás tromboembóliát követően emelkedett totál- α 2PI plazma szintet detektált, mely emelkedés az NPB forma emelkedésének volt köszönhető. Ezen eredmények alapján az is elképzelhető, hogy eltérő hatása van a C-terminális hasításnak a vénás és az artériás trombózisok patomechanizmusában. Azonban, a két említett tanulmányban a trombótikus eseményt követően csak egy alkalommal történt az α 2PI formák meghatározása, feltételezeten nem az akut fázisban, ami nem mutatja az akut eseménynek megfelelő ill. az ahhoz vezető folyamatoknak megfelelő viszonyokat. Egy korábbi tanulmányban akut miokardiális infarktust követő rTPA vagy streptokináz trombolitikus terápia hatására bekövetkező változásokat vizsgálták a PB- és NPB- α 2PI formák plazma szintjében módosított kétdimenziós immunoelektroforézis módszerrel és azt találták, hogy alacsony szintű plazminogén aktiváció hatására a PB forma mennyisége csökkent először a plazmában, nagyobb fokú plazminogén aktiváció hatására az NPB forma mennyisége is lecsökkent 30%-al. Ez a tanulmány az alvadékba kötődött formák mennyiségét és hatását nem vizsgálta, de felhívja a figyelmet arra, hogy a C-terminális formák hatását a plasmin képződés kinetikája és mértéke is befolyásolhatja. További vizsgálatokra, lehetőség szerint prospektív tanulmányokra lenne szükség a C-terminális hasítás patológiás hatásának tisztázásához és ezek ismeretében az esetleges terápiás lehetőségek kidolgozásához. Saját eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy a C-terminális módosulás befolyásolja a plazmin gátlás hatékonyságát, a fibrinalvadékba való beépülés típusát, valamint az alvadék szerkezetét. Szükség lenne megbízható módszerek kidolgozására, mellyel az alvadékba beépült formák közvetlenül meghatározhatóak lennének.

A tanulmány limitációi közül érdemes megemlíteni, hogy a vizsgálati csoport meglehetősen fiatal volt (átlagéletkor $33,2 \pm 13,4$ év), ami az eredmények általánosíthatóságát befolyásolhatja. A PB- α 2PI-specifikus antitesttel való reakció hiánya a monomer α 2PI-nek megfelelő sávban a Western blot képen csak közvetett bizonyíték arra, hogy a PB variáns nincs jelen a fibrinalvadékban nem kovalensen kötött formában. Nem zárható ki annak a lehetősége, hogy a fibrinhez való nem kovalens kötődés az alkalmazott antitest epitópját elfedi. Azonban jelenleg ez az egyetlen rendelkezésre álló antitest, amely az α 2PI C-terminális végét ismeri fel és nem reagál a nem plazminogénkötő formával.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A XIII-as véralvadási faktornak plazmatikus (pFXIII) és celluláris (cFXIII) formája ismert. Az aktivált forma (FXIIIa) a fibrinszálak keresztkötésével és az $\alpha 2$ -plazmin inhibitor ($\alpha 2$ PI) fibrinhez való kötésével biztosítja az alvadék stabilitását, ezen kívül szerepet játszik az angiogenezisben, sebgyógyulásban a terhesség megtartásában. A cFXIII a trombocyta, monocyta/makrofág sejteken kívül kimutatható, pl. az oszteoblasztokban is. A FXIIIa direkt hatását az atheroszklerotikus plakk kialakulásában szerepet játszó endotheliális sejtekre és fibroblasztokra már korábban kimutatták. A vaszkuláris simaizomsejtek (VSMC) a környezeti faktoroktól függően oszteoblaszt-szerű sejtekké képesek differenciálódni a plakkokban, ezért megvizsgáltuk, hogy a differenciáció társul-e FXIII-A expresszióval, ill. az extracelluláris FXIII-A milyen hatással van a VSMC-k funkcióira. Az oszteoblasztos transzformáció nem járt együtt cFXIII expresszióval. A nem aktivált FXIII-A nem volt hatással a VSMC-k különböző funkcióira. Az FXIIIa a VSMC-k proliferációját már a plazmakoncentrációnál alacsonyabb mennyiség esetén is fokozta. *In vitro* sebzáródási kísérletekben igazoltuk az FXIIIa proliferációra és migrációra gyakorolt kombinált hatását. Az FXIIIa fokozta a kollagén szintézisét és az extracelluláris mátrixba való beépülését. Az FXIIIa kezelés hatására a thrombospondin-1 (TSP-1) expresszió mértéke nem változott, azonban a médiumba leadott mennyiség csökkent, a képződő TSP-1 egy része a sejtekhez kötötten maradt. Az FXIIIa ezen hatásai szerepet játszhatnak az atheroszklerotikus plakkok patogenezisében.

Az $\alpha 2$ PI a plazmában heterogén szerkezetű, funkcionális következményekkel járó proteolitikus hasításokat szenved. A C-terminális végén hasított forma elveszíti a plazminogén-kötő helyét, ezért jóval lassabban képes a plazmint gátolni (NPB- $\alpha 2$ PI), valamint az FXIIIa elsődlegesen a plazminogén-kötő, nem hasított formát (PB- $\alpha 2$ PI) képes a fibrinnel keresztkötni. Az NPB- $\alpha 2$ PI forma hatását a fibrinolízisre kevésbé vizsgálták. Jelen munkánkban vizsgáltuk az $\alpha 2$ PI C-terminális izoformák mennyiségének összefüggését különböző plazma paraméterekkel, beépülésük mértékét a fibrinalvadékba, továbbá az alvadék szerkezetére és lízisére gyakorolt hatásukat. Az alvadékba beépült totál- $\alpha 2$ PI $44,3 \pm 6,3\%$ -nak, a PB- $\alpha 2$ PI:NPB- $\alpha 2$ PI arány 1,37-nak adódott, azaz jelentős mennyiségű NPB- $\alpha 2$ PI is kötődik az alvadékhoz, nem kovalens módon. Az NPB- $\alpha 2$ PI plazma szintje és az alvadékba beépült mennyisége szignifikáns pozitív összefüggést mutatott az alvadéklízis paraméterekkel (CLT50, MaxAbsz, AUC). *In vitro* kísérletekben az NPB forma is, bár kisebb mértékben, mint a PB- $\alpha 2$ PI, de nyújtotta az alvadék lízisidőt. Az $\alpha 2$ PI mindkét C-terminális variánsa hatással volt a fibrinalvadék szerkezetére, növelve a fibrinszálak vastagságát és csökkentve a pórusméretet. Eredményeink szerint az FXIIIa által keresztkötött PB- $\alpha 2$ PI mellett a nem kovalensen az alvadékhoz kötődő NPB- $\alpha 2$ PI is hatással van az alvadék szerkezetére és feloldására, ezért érdemes lenne tovább vizsgálni a heterogenitás hatását különböző patológias körülmények között.

8. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ EREDMÉNYEI, MEGÁLLAPÍTÁSAI

1. A humán aortából származó simaizomsejtek (HAoSMC) oszteoblasztos transzformációja nem jár együtt FXIII-A expresszióval, annak ellenére, hogy a FXIII-A humán oszteoblaszt sejtekben kimutatható.
2. Kimutattuk, hogy az extracelluláris FXIII-A, az aktiválódását követően, koncentrációfüggő módon, a HAoSMC-k számos funkcióját befolyásolja:
 - Sejtproliferációs kísérletekben igazoltuk, hogy a rFXIII-A aktivált formája (rFXIIIa) már a normál plazma szintnek megfelelő koncentráció alatt is szignifikáns módon fokozza a sejtek proliferációját.
 - *In vitro* sebzáródási kísérleteinkben a rFXIIIa koncentrációfüggő módon fokozta a sejt migráció mértékét.
 - A rFXIIIa jelentősen fokozta a HAoSMC -k kollagén szekrécióját.
 - A rFXIIIa kezelés hatására a HAoSMC-kben a TSP-1 gén expressziója nem fokozódott a kétszeres plazmakoncentráció mellett sem. Ennek ellenére a TSP-1 fehérje szint emelkedését detektáltuk intracellulárisan. Az intracelluláris szint emelkedésével párhuzamosan a TSP-1 csökkent a tápfolyadékban. Ezen eredmények azt sugallják, hogy a rFXIIIa nem a TSP-1 *de-novo* szintézisét indukálja a HAoSMC-kben, hanem inkább segít a citoplazmában és sejthez asszociálva megtartani azt.
3. Vizsgáltuk a C-terminális $\alpha 2$ PI formák (NPB- $\alpha 2$ PI: plazminogént nem kötő, trunkált forma; PB- $\alpha 2$ PI: plazminogént kötő, teljes hosszúságú forma) fibrin alvadékba való beépülésének mértékét normál humán plazmákból készített alvadékok analízisével. A korábbi feltételezéssel szemben azt találtuk, hogy az NPB- $\alpha 2$ PI is jelentős mértékben kötődik a fibrinhez. Az eredeti plazmakoncentrációjukhoz képest az alvadékba nagyobb arányban épül be az NPB- $\alpha 2$ PI, mint a PB- $\alpha 2$ PI. Az NPB- $\alpha 2$ PI forma kötődése a fibrinhez nem kovalens kölcsönhatás, szemben a PB- $\alpha 2$ PI forma FXIIIa által mediált kovalens keresztkötésével.
4. A fibrinnel keresztkötött PB- $\alpha 2$ PI hatásán kívül az NPB- $\alpha 2$ PI beépülésének mértéke is befolyásolja az alvadék plazmin általi feloldását. Vizsgálataink során mind a plazma, mind a fibrin alvadékba beépült NPB- $\alpha 2$ PI szint szignifikáns, pozitív korrelációt mutatott az

alvadéklízis vizsgálatok során kapott turbidimetriás görbék jellemzőivel (CLT50, MaxAbsz, AUC).

5. Az α 2PI C-terminális variánsainak hatását az alvadék lízisére rekombináns α 2PI fehérjékkel kiegészített α 2PI-deficiens plazma mintákkal is megerősítettük.
6. A fibrinháló struktúra konfokális mikroszkópiával történő vizsgálata során kimutattuk, hogy a PB- és/vagy NPB- α 2PI formák alvadékhoz való kötődése vastagabb fibrin szálak kialakulását és a fibrinháló pórusméretének csökkenését eredményezi.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálámat elsősorban **Dr. Katona Éva** témavezetőmnek szeretném kifejezni, aki értékes tanácsaival, szakmai iránymutatásával végig segítette munkámat ezen a hosszú úton. Tapasztalataival és maximális igényességre való törekvésével gazdagította kutatói szemléletem. Nagyra értékelem a sok biztatást, türelmet és nem utolsósorban az értekezés elkészítésében nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom **Dr. Muszbek László Professor Úrnak**, amiért lehetőséget biztosított arra, hogy részt vehettem a kutatói projektjében, melynek eredményeit számos külföldi és belföldi konferencián is bemutathattam. Támogatása nélkül az értekezés alapjául szolgáló FXIII hatásairól szóló közlemény nem születhetett volna meg.

Köszönetet szeretnék mondani **Dr. Bereczky Zsuzsannának**, a Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék vezetőjének, aki mindvégig mellettem állt, lehetővé téve a PhD munkám végzését is.

Köszönöm **Prof. Dr. Góth Lászlónak** és **Nyesténé Dr. Nagy Teréznek**, első tudományos munkám mentorainak, akik a kutatói pályán elindítottak és azóta is végig kísérik munkámat.

Ezúton szeretném megköszönni **valamennyi társszerzőmnek** és **munkatársamnak** értékes és odaadó munkáját, mellyel hozzájárultak a közlemények elkészítéséhez. Külön köszönettel tartozom **Dr. Baráth Barbarának**, az eredményes közös munkáért.

Köszönöm a **kollégáknak**, akikre barátként is tekinthetek. Hálás vagyok, hogy egy ösztönző, támogató, jókedvű munkaközösség tagja lehetek.

Végül hálával tartozom a **barátoknak** és a **családomnak**, akik biztatása sok erőt adott ezen időszak alatt. A **Férjemnek** és **két huncut gyermekemnek**, akik hittek a céлом megvalósításában. Mégis az életben a legnagyobb támogatóim a **Szüleim**, akik végtelen türelmükkel és odaadó szeretetükkel mindig mellettem állnak. Remélem most is büszkék rám!

A PhD értekezés megvalósítását az alábbi pályázatok tették lehetővé: NKFIH (K129287, K120633, K139293); GINOP 2.3.2-15-2016-00050 az Európai Unió és az Európai Regionális Fejlesztési Alap, valamint a Magyar Tudományos Akadémia által társfinanszírozott projekt (11014); DE Tudományos Kutatási Alap (DETKA), MTA-DE Lendület (LP2024-1/2024).

10. PUBLIKÁCIÓK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/530/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kissné Bogáti Réka
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kissné Bogáti, R.**, Baráth, B., Pituk, D., Orbán-Kálmándi, R. A., Szűcs, P., Hegyi, Z., Bereczky, Z., Bagoly, Z., Katona, É.: Effect of Alpha2-Plasmin Inhibitor C-Terminal Heterogeneity on Clot Lysis and Clot Structure.
Biomolecules. 15 (8), 1-16, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biom15081127>
IF: 4.8 (2024)
2. **Kissné Bogáti, R.**, Katona, É., Shemirani, A. H., Balogh, E., Bárdos, H., Jeney, V., Muszbek, L.: The Effect of Activated FXIII, a Transglutaminase, on Vascular Smooth Muscle Cells.
Int. J. Mol. Sci. 23 (10), 1-15, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23105845>
IF: 5.6

További közlemények

3. Kállai, J., Gindele, R., Péntes-Daku, K., Balogh, G., **Kissné Bogáti, R.**, Bécsi, B., Katona, É., Oláh, Z., Ilonczai, P., Boda, Z., Róna-Tas, Á., Nemes, L., Marton, I., Bereczky, Z.: Clinical and Molecular Characterization of Nine Novel Antithrombin Mutations.
Int. J. Mol. Sci. 25 (5), 1-19, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25052893>
IF: 4.9
4. Pituk, D., Balogh, L., Horváth, E., Hegyi, Z., Baráth, B., **Kissné Bogáti, R.**, Szűcs, P., Papp, Z., Katona, É., Bereczky, Z.: Localization of Hemostasis Elements in Aspirated Coronary Thrombi at Different Stages of Evolution.
Int. J. Mol. Sci. 25 (21), 1-19, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms252111746>
IF: 4.9





5. 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: 10.407
6. 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: 6.064
7. Gindele, R., Péntes-Daku, K., Balogh, G., Kállai, J., **Kissné Bogáti, R.**, Bécsi, B., Erdődi, F., Katona, É., Bereczky, Z.: Investigation of the Differences in Antithrombin to Heparin Binding among Antithrombin Budapest 3, Basel, and Padua Mutations by Biochemical and In Silico Methods.
Biomolecules. 11 (4), 1-18, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biom11040544>
IF: 6.064

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 42,735

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az érkekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,4**

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

Debrecen, 2025.09.19.

