

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Kissné Bogáti Réka**

**A XIII-as faktor vaszkuláris simaizomsejtek celluláris  
funkcióira és az  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor heterogenitás  
fibrinolízisre kifejtett hatásának vizsgálata**

**DEBRECENI EGYETEM**

**LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2026**

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**A XIII-as faktor vaszkuláris simaizomsejtek celluláris  
funkcióira és az  $\alpha 2$ -plazmin inhibitor heterogenitás  
fibrinolízisre kifejtett hatásának vizsgálata**

**Kissné Bogáti Réka**

**Témavezető: Dr. Katona Éva**



**DEBRECENI EGYETEM**

**LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2026**

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés.....	7
2. Irodalmi áttekintés.....	8
2.1 A XIII-as véralvadási faktor szerkezete és aktiválódása.....	8
2.2 A XIII-as faktor funkciói.....	10
2.2.1 FXIII szerepe a véralvadásban.....	10
2.2.2 A FXIII szerepe az angiogenezisben, sebgyógyulásban és az atheroszklerózisban.....	11
2.2.3 A FXIII szerepe egyéb élettani folyamatokban.....	13
2.3 A hemosztázis egyensúlya, a véralvadás és fibrinolízis.....	13
2.4 A fibrinolízis kulcsenzime, a plazmin.....	15
2.5 Az $\alpha$ 2-plazmin inhibitor ( $\alpha$ 2PI) szerkezete és tulajdonságai.....	15
2.6 Az $\alpha$ 2-plazmin inhibitor heterogenitása a plazmában.....	16
2.6.1 N-terminális módosulás.....	16
2.6.2 C-terminális módosulás.....	16
2.7 Az $\alpha$ 2-plazmin inhibitor funkciói a vérkeringésben.....	17
2.8 Fibrinháló kialakulása a véralvadás során.....	18
3. Célkitűzés.....	21
4. Anyagok és módszerek.....	22
4.1 A FXIII-A hatásának vizsgálata a HAoSMC-re.....	22
4.1.1 Anyagok.....	22
4.1.2 Sejtkultúra.....	22
4.1.3 Oszteoblasztos transzformáció hatása a HAoSMC-kre.....	22
4.1.4 A HAoSMC-k kezelése aktivált, illetve nem aktivált rXIII-as faktoral.....	25
4.1.5 Sejtproliferációs kísérlet kivitelezése.....	26
4.1.6 A sejtmigráció detektálása.....	26
4.1.7 Az extracelluláris mátrix kollagén tartalmának meghatározása.....	27
4.1.8 TSP-1 meghatározása a sejtfraióból és a sejtek felülúszójából.....	28
4.1.9 A HAoSMC-k TSP-1 termelésének vizsgálata Western blot segítségével.....	28

4.1.10	TSP-1 fehérje detektálása immunfluoreszcens festéssel .....	29
4.1.11	TSP-1 génexpresszió vizsgálata .....	30
4.1.12	Statisztikai analízis .....	32
4.2	Az $\alpha$ 2PI heterogenitás hatásának vizsgálata a fibrinolízisre és a fibrin alvadék szerkezetre .....	32
4.2.1	Humán minták .....	32
4.2.2	Anyagok.....	32
4.2.3	Az $\alpha$ 2PI koncentráció meghatározása plazma mintákban .....	33
4.2.4	Az $\alpha$ 2PI plazma alvadékba való beépülésének vizsgálata.....	33
4.2.5	Fibrin alvadéklízis vizsgálatok .....	34
4.2.6	Az alvadék szerkezetének vizsgálata konfokális lézer scanning mikroszkópiával .....	35
4.2.7	Egyéb laboratóriumi módszerek.....	36
4.2.8	Statisztikai analízis .....	36
5.	Eredmények.....	37
5.1	Az aktivált FXIII a VSMC-kre való hatása.....	37
5.1.1	A HAoSMC oszteoblasztos transzformációja nem jár FXIII-A expresszióval .....	37
5.1.2	A rFXIII-A hatása a HAoSMC-k proliferációjára.....	38
5.1.3	A rFXIIIa szerepe az <i>in vitro</i> sebgyógyulásban.....	39
5.1.4	A HAoSMC-k kollagén szekréciója .....	40
5.1.5	TSP-1 kimutatása a sejtenyészet médiumában és a sejtfrakcióban .....	41
5.1.6	A TSP-1 kifejeződése a sejtek citoplazmájában.....	43
5.1.7	A TSP-1 kimutatása Western blot technikával.....	43
5.1.8	TSP-1 mRNS expresszió vizsgálata .....	44
5.2	Eredmények az $\alpha$ 2PI heterogenitás hatásának vizsgálatában.....	45
5.2.1	Különböző paraméterek plazmakoncentrációi a vizsgált populációban.....	45
5.2.2	Az $\alpha$ 2PI formák beépülése a fibrin alvadékokba.....	46
5.2.3	A mért paraméterek összefüggése az alvadéklízissel .....	47
5.2.4	Az $\alpha$ 2PI fibrin alvadékba való beépülésének vizsgálata Western blot technikával.....	49
5.2.5	Mesterséges plazma mintákban történő fibrin alvadéklízis vizsgálata.....	50
5.2.6	Mesterséges plazma mintákban történő fibrinháló struktúra vizsgálata.....	52
6.	Megbeszélés .....	55

6.1	Az FXIIIa hatása a VSMC-k funkcióira.....	55
6.2	Az $\alpha$ 2PI heterogenitásának hatása az alvadéklízisre és az alvadékszerkezetre.....	57
7.	Új megállapítások.....	63
8.	Összefoglalás.....	65
9.	Summary .....	66
10.	Irodalomjegyzék.....	67
11.	Tárgyszavak .....	77
12.	Keywords .....	77
13.	Köszönetnyilvánítás .....	78
14.	Függelék.....	79

## Rövidítések jegyzéke

<b><math>\alpha</math>2PI</b>	alpha2-plazmin inhibitor, $\alpha$ 2-antiplazmin
<b>ALP</b>	alkalikus foszfatáz
<b>APCE</b>	antiplasmin cleaving enzyme, antiplazmint hasító enzim
<b>AP-FXIII</b>	XIII-as véralvadási faktor aktivációs peptid
<b>Asn-NPB-<math>\alpha</math>2PI</b>	N-terminálisan aszparaginnal kezdődő, plazminogént nem kötő $\alpha$ 2PI variáns
<b>Asn-PB-<math>\alpha</math>2PI</b>	N-terminálisan aszparaginnal kezdődő, plazminogént kötő $\alpha$ 2PI variáns
<b>Asn-<math>\alpha</math>2PI</b>	N-terminálisan aszparaginnal kezdődő $\alpha$ 2PI
<b>AUC</b>	görbe alatti területet
<b>BSA</b>	borjú szérum albumin
<b>cDNA</b>	komplementer dezoxiribonukleinsav
<b>cFXIII</b>	XIII-as véralvadási faktor celluláris formája
<b>CLT50</b>	50%-os alvadék lízis idő
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>EDTA</b>	etilén-diamin-tetraacetát
<b>ELISA</b>	enzyme-linked immunsorbent assay
<b>FBS</b>	fötális borjú savó
<b>FXIII</b>	XIII-as véralvadási faktor
<b>FXIIIa</b>	XIII-as véralvadási faktor aktivált formája
<b>FXIII-A<sub>2</sub></b>	XIII-as véralvadási faktor A-alegység homodimer
<b>FXIII-A<sub>2</sub>*</b>	thrombinnal és Ca <sup>2+</sup> -mal aktivált A alegység homodimer
<b>FXIII-A<sub>2</sub>'</b>	thrombin által proteolitikusan hasított XIII-as véralvadási faktor A alegység homodimer
<b>FXIII-A<sub>2</sub>'B<sub>2</sub></b>	thrombin által hasított XIII-as véralvadási faktor heterotetramer
<b>FXIII<sub>A<sub>2</sub>B<sub>2</sub></sub></b>	XIII-as véralvadási faktor heterotetramer
<b>FXIII-B<sub>2</sub></b>	XIII-as véralvadási faktor B-alegység homodimer
<b>GAPDH</b>	gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz
<b>HAoSMC</b>	human aorta smooth muscle cell, humán aortából származó simaizomsejt
<b>HRPO</b>	horseradish-peroxidase, tormaperoxidáz
<b>IAA</b>	jódacetamid

<b>IIa</b>	aktivált II-es véralvadási faktor, thrombin
<b>MaxAbsz</b>	maximális abszorbancia
<b>Met-NPB-<math>\alpha</math>2PI</b>	N-terminálisan metioninnal kezdődő, plazminogént nem kötő $\alpha$ 2PI variáns
<b>Met-PB-<math>\alpha</math>2PI</b>	N-terminálisan metioninnal kezdődő, plazminogént kötő $\alpha$ 2PI variáns
<b>Met-<math>\alpha</math>2PI</b>	N-terminálisan metioninnal kezdődő $\alpha$ 2PI
<b>MMP-3</b>	mátrix metalloproteináz-3
<b>NPB-<math>\alpha</math>2PI</b>	plazminogént nem kötő $\alpha$ 2PI variáns
<b>OCN</b>	oszteokalcin
<b>PAI-1</b>	plazminogén aktivátor inhibitor-1
<b>PAP-komplex</b>	plazmin- $\alpha$ 2PI komplex
<b>PB-<math>\alpha</math>2PI</b>	plazminogént kötő $\alpha$ 2PI variáns
<b>pFXIII</b>	XIII-as véralvadási faktor plazmatikus formája
<b>PVDF</b>	polivinilidén-difluorid
<b>qRT-PCR</b>	kvantitatív valós idejű polimeráz-lánreakció
<b>rFXIII</b>	rekombináns XIII-as véralvadási faktor
<b>sFAP</b>	szolubilis fibroblaszt aktiváló protein
<b>TF</b>	szöveti faktor
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine
<b>t-PA</b>	szöveti típusú plazminogén aktivátor
<b>TSP-1</b>	Thrombospondin-1
<b>tTBS</b>	Tween20-Tris pufferelt sóoldat
<b>u-PA</b>	urokináz típusú plazminogén aktivátor
<b>VEGFR-2</b>	vaszkuláris endotheliális növekedési faktor receptor 2
<b>VIIa</b>	VII-es véralvadási faktor aktivált formája
<b>VSMC</b>	vascular smooth muscle cell, vaszkuláris simaizomsejt
<b>Xa</b>	X-es véralvadási faktor aktivált formája
<b>XIIa</b>	XII-es véralvadási faktor aktivált formája
<b>XIIIa</b>	XIII-as véralvadási faktor aktivált formája

## 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  $\alpha$ 2-plazmin inhibitorát ( $\alpha$ 2PI) kovalens kötés révén a fibrin  $\alpha$ -láncához köti, megvédve azt a plazmin általi korai degradációtól. Az  $\alpha$ 2PI a plazmában, a szabadon keringő plazminall irreverzibilis komplexet (PAP-komplex) képez. Az  $\alpha$ 2PI, a molekula mindkét végét érintő proteolitikus hasítások következtében, több izoformában kering a plazmában. A módosulások befolyásolhatják az  $\alpha$ 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- $\alpha$ 2PI) elveszíti a plazminogén-kötő helyét, ezért jóval lassabban képes a plazmint gátolni, valamint az FXIIIa elsődlegesen a plazminogén-kötő, nem hasított formát (PB- $\alpha$ 2PI) képes a fibrinnel keresztkötni. Az NPB- $\alpha$ 2PI forma hatását a fibrinolízisre kevésbé vizsgálták.

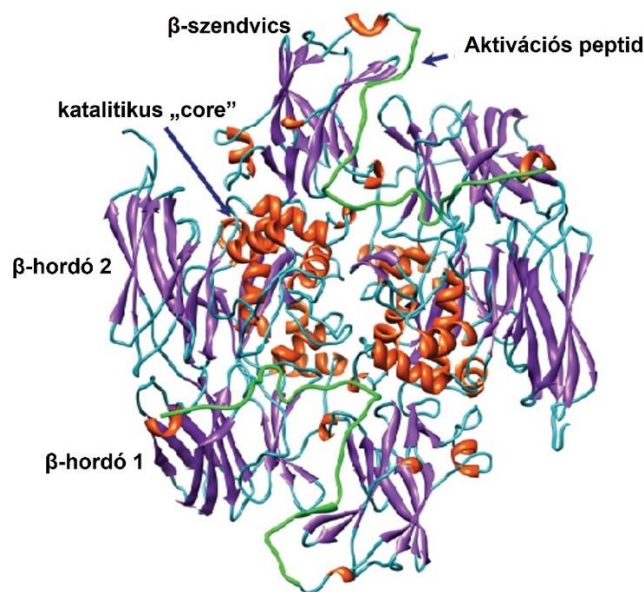
Jelen értekezésben összefoglaltuk eredményeinket a XIII-as faktor (FXIII) humán aortából származó simaizomsejtek (HAoSMC) funkcióira gyakorolt hatásairól. Továbbá, vizsgáltuk az  $\alpha$ 2PI heterogenitásának hatását az  $\alpha$ 2PI fibrinalvadékba való beépülésének mértékére, az alvadék szerkezetére 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) [1-3]. A plazmában heterotetramerként van jelen, mely két potenciálisan aktív A (FXIII-A) és két hordozó/gátló B (FXIII-B) alegységet tartalmaz (FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>), plazmakoncentrációja 14-28 mg/L [4].

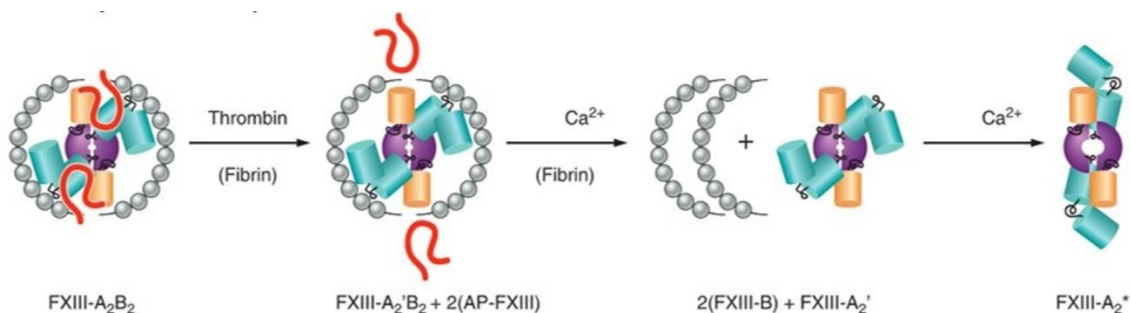
A FXIII-A 83 kDa molekulatömegű, 732 aminosavból épül fel. Négy strukturális domén alkotja:  $\beta$ -szendvics, katalitikus „core”,  $\beta$ -hordó 1 és  $\beta$ -hordó 2 (1. ábra). Az N-terminális végén a XIII-as faktor aktiválódásában részt vevő, 37 aminosavból álló aktivációs peptid (AP-FXIII), illetve Ca<sup>2+</sup> kötőhelyek találhatóak [5]. A két A alegységből felépülő (FXIII-A<sub>2</sub>) 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 keratociták [6-12]. A plazmába kerülő A alegység főként rezidens szöveti makrofágokból származik és 99%-a a B-alegységgel komplexet alkotva, a fibrinogén felszínéhez kötődve kering [13,14].



*1. ábra. A rekombináns homodimer FXIII-A<sub>2</sub> szerkezete. A négy strukturális domén:  $\beta$ -szendvics, katalitikus "core",  $\beta$ -hordó 1 és  $\beta$ -hordó 2. Az N-terminális szakaszon található az aktivációs peptid. A [2] szám alatt idézett közleményben szereplő ábra részlete.*

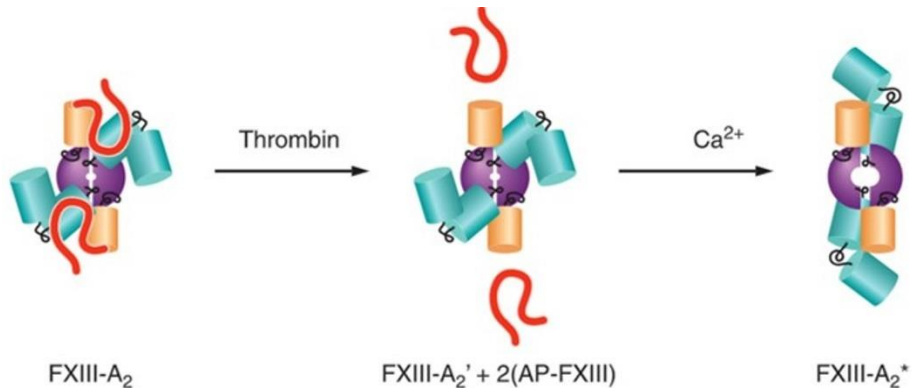
A FXIII-B ~80 kDa molekulatömegű, 641 aminosavból álló, a hepatociták által szintetizált glikoprotein, melynek körülbelül 50%-a a FXIII-A alegységgel alkotott komplex, másik 50%-a szabad formában kering a plazmában [14]. A tíz rövid tandem ismétlődő ún. "sushi" domén mindegyikét 2-2 diszulfid híd tartja egyben. Fő feladata a FXIII-A<sub>2</sub> élettartamának meghosszabbítása a keringésben, védve azt a spontán aktiválódástól és degradációtól. A plazmában mind a kialakult FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> komplex, mind a szabad FXIII-B fibrinogénhez kötődve kering [2]. A fibrinogénhez való kötődésnek nagy szerepe van a FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> aktiválásában. Casini és munkatársai leírták, hogy afibrinogémiában az egyébként normál mennyiségben jelenlévő FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> mellett csak kb 18% aktivitás detektálható [15].

A 326 kDa molekulatömegű zimogén, heterotetramer FXIII (FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) aktív transzglutaminázzá (FXIIIa) alakul thrombin és Ca<sup>2+</sup> jelenlétében a véralvadás utolsó fázisában. A 2. ábrán látható a folyamat, melynek 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<sup>2+</sup> jelenlétében a B alegységek disszociálnak, mely következtében kialakul a FXIII-A alegységek enzimatikusan aktív formája (FXIIIa) [2]. Az aktiválódás a polimerizálódó fibrin felszínén megy végbe, mely körülbelül százszorosára gyorsítja fel a thrombin általi AP-FXIII lehasítást és megkönnyíti a FXIII-B alegység disszociációját is [16,17].



**2. ábra. A plazmatikus FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> proteolitikus aktiválódása többlépcsős folyamatban.** Az aktivációs peptid (AP-FXIII) thrombin általi lehasítását követően az A és B alegységek közötti kötés meggyengül (FXIII-A<sub>2</sub>'B<sub>2</sub>), majd Ca<sup>2+</sup> hatására leválnak a B alegységek (FXIII-B) és végül kialakul a hasított A alegységek (FXIII-A<sub>2</sub>') aktív konfigurációja (FXIII-A<sub>2</sub>\*). A FXIII-A aktivációs peptidjét piros hurkok, a katalitikus „core” domént a lila félkörök és a β-hordó, illetve β-szendvics doménjeit zöld és narancssárga hengerek reprezentálják. A FXIII-B-t hajlított, 10 gyöngyszerű struktúrából álló alakzat ábrázolja. A [2] szám alatt idézett közleményben szereplő ábra részlete.

A celluláris FXIII aktiválásához nincs szükség proteolitikus hasításra, az intracellulárisan emelkedett, 2 mM feletti  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció is elegendő hozzá [18,19]. Egy 2014-es tanulmányban leírják, hogy a vérlemezkék citoplazmájából a sejtfelszínre kerülve a cFXIII megtartja aktivitását [20]. A plazmába kerülő szabad formában keringő FXIII- $\text{A}_2$  szintén aktiválódhat az aktivációs peptid lehasításával  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében (3. ábra) [2].



**3. ábra. A celluláris FXIII- $\text{A}_2$  proteolitikus aktiválódása.** Az aktivációs peptid (AP-FXIII) thrombin általi lehasítását követően az A alegységek (FXIII- $\text{A}_2$ ')  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében aktív konfigurációt vesznek fel (FXIII- $\text{A}_2^*$ ). A FXIII-A aktivációs peptidjét piros hurkok, a katalitikus „core” domént a lila félkörök és a  $\beta$ -hordó, illetve  $\beta$ -szendvics doménjeit zöld és narancssárga hengerek reprezentálják. A [2] szám alatt idézett közleményben szereplő ábra részlete.

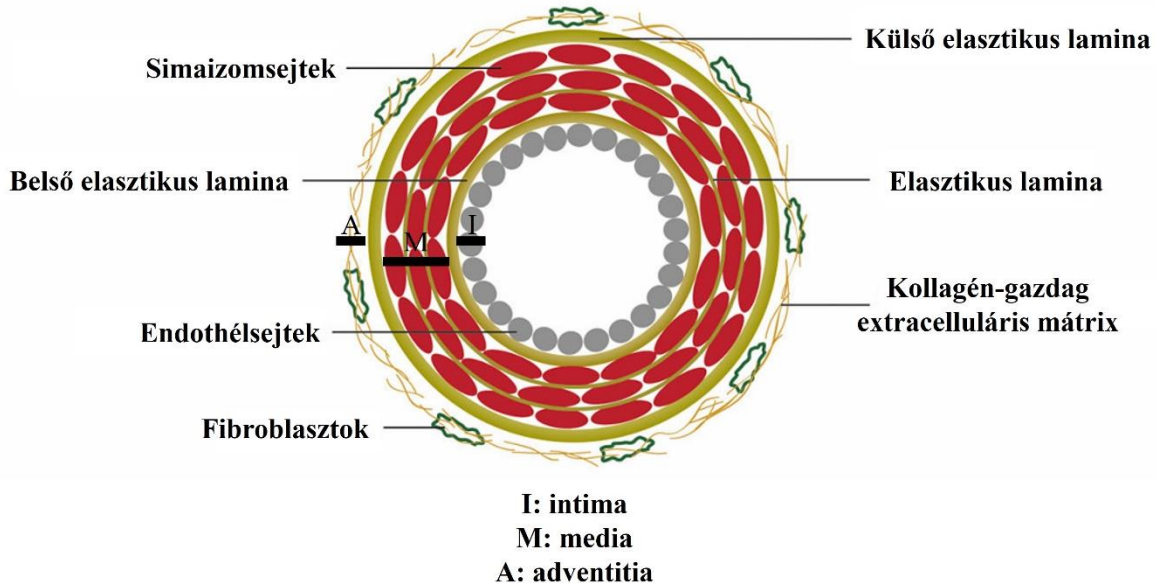
## 2.2 A XIII-as faktor funkciói

### 2.2.1 FXIII szerepe a véralvadásban

Az FXIIIa acil-traszfer reakciót katalizál, mely során az egyik (donor) fehérje glutamin oldallánc  $\alpha$ -karboxamid csoportja és a másik (akceptor) fehérje lizin oldallánc  $\epsilon$ -aminocsoportja között egy rendkívül erős, stabil, a proteolízissal szemben ellenálló izopeptid-kötés jön létre [21,22]. Az FXIIIa hozzájárul a hemosztázisban fontos szerepet játszó stabil fibrinalvadék kialakulásához, úgy, hogy a fibrin  $\alpha$ - és  $\gamma$ -láncait keresztkötve, fibrin  $\gamma$ - $\gamma$  dimereket,  $\gamma$ - $\alpha$  és  $\alpha$ - $\alpha$  polimereket hoz létre. Emellett a plazmin fő inhibitorát, az  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor (  $\alpha$ 2PI) a fibrin  $\alpha$ -láncához köti, megakadályozva a fibrinháló plazmin általi korai degradációját [2,22]. A FXIII-A hiányos betegek súlyos vérzéses tünetekben szenvednek [23-25].

### 2.2.2 A FXIII szerepe az angiogenezisben, sebgyógyulásban és az atheroszklerózisban

Az érújdonképződés során új kapillárisok alakulnak ki a már meglévő véredényekből, elősegítve a szövetképződést és a sebgyógyulást [26-28]. 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 (4. ábra) [29].



**4. ábra. Az érfal szerkezeti felépítése.** Az ér belső lumenét borítja az endothelisejt réteg (I: intima), mely a vérrel direkt módon érintkezik. Kifelé haladva következik a belső elasztikus lamina, mely az endothelisejteket és a VSMC-eket választja el egymástól (M: media). Az elasztikus lamina biztosítja a VSMC-k több rétegben való elhelyezkedését. A külső elasztikus lamina választja el a simaizomréteget a fibroblasztoktól (A: adventitia). A fibroblasztok felelősek az extracelluláris mátrix komponenseinek termelődéséért (pl. kollagén). A [29] szám alatt idézett közleményben szereplő ábra módosított változata.

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 [30-33]. 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 [28,34,35].

Korábbi közlemények szerint az aktivált FXIII 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 [36].

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 [29].

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 [2,37,38].

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 [26,39-41]. TSP-1 egy homotrimer szerkezetű glikoprotein, mely szintén szubsztrátja lehet az FXIIIa-nak, kovalens kötésű ún. homo-polimereket eredményezve [42,43]. A TSP-1-et számos, gyulladáshoz vagy érképződésben részt vevő sejt képes termelni. A környező sejtek sejtfelszíni receptorain (CD36, CD47), integrinjein és az extracelluláris mátrix fehérjéin keresztül képes kifejteni hatását [44,45].

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 [46]. 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.

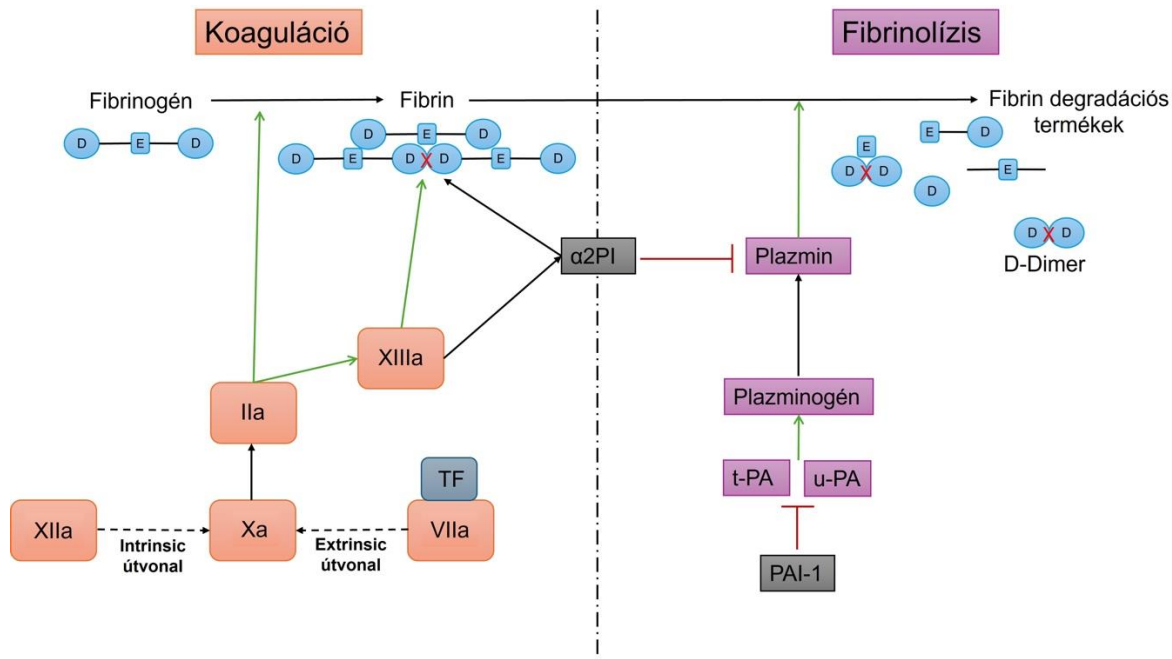
### **2.2.3 A FXIII szerepe egyéb élettani folyamatokban**

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, fibronectin és a kollagén jó szubsztrátjai a FXIII-nak. A terhesség során a Nitabuch-rétegben a pFXIII a fibrinogénnel és fibronectinnel kolokalizálódva a placenta kötőszövetének fibrinolízissel szembeni védelmét biztosítja [47]. 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 [48]. 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 [49,50]. Tumorsejtes környezetben a tumor-asszociált makrofágok által termelt cFXIII szintén a fibrinháló stabilitásának kialakulásáért felelős, mely a tumor sejteket védi és proliferációjukat segíti [51]. 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 [52]. A fehér zsírszövet által termelt fibronectin, mely a sejtproliferációban, differenciációban és a zsírszövet fejlődésében nélkülözhetetlen, fontos extracelluláris szubsztrátja az FXIIIa-nak [53].

### **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 (5. ábra). 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 [2]. Az aktivált XIII-as véralvadási faktor nemcsak a fibrinszálak keresztökötését végzi, hanem egy másik szubsztrátját, az  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor ( $\alpha$ 2PI) is kovalensen

a fibrin- $\alpha$ -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 [54]. A vérkeringésben megemelkedett fibrinogén koncentrációt és a csökkent fibrinolízis hatékonyságot, a vénás és artériás trombotikus események kockázati tényezőiként írták le különböző klinikai tanulmányokban [55-58].



**5. ábra.** A véralvadás és fibrinolízis sematikus ábrázolása a főbb komponensekkel. A koagulációs kaszkád során a keletkezett thrombin aktiválja a FXIII-at és elősegíti a fibrin szálak keletkezését. Az FXIIIa a fibrinszálak keresztkötésével stabilizálja a kialakult fibrinhálót. Szubsztrátját, az  $\alpha$ 2PI-t pedig a fibrin- $\alpha$ -láncához kötve, védelmet nyújt az alvadék proteolízisével szemben. Ezt a védelmet tovább erősíti az  $\alpha$ 2PI a szabad plazmin gátlásával is. TF: szöveti faktor; VIIa: aktivált VII-es faktor; Xa: aktivált X-es faktor; XIIa: aktivált XII-es faktor; IIa: thrombin; XIIIa: aktivált XIII-as faktor;  $\alpha$ 2PI: alpha2-plazmin inhibitor; t-PA: szöveti típusú plazminogén aktivátor; u-PA: urokináz típusú plazminogén aktivátor. (Saját ábra)

## 2.4 A fibrinolízis kulcsenzime, a plazmin

A plazminogén a plazmában kb. 180  $\mu\text{g/mL}$  koncentrációban keringő  $\sim 92$  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  $\sim 90$  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  $\alpha 2$ -plazmin inhibitorhoz [59,60].

## 2.5 Az $\alpha 2$ -plazmin inhibitor ( $\alpha 2\text{PI}$ ) szerkezete és tulajdonságai

Az  $\alpha 2\text{PI}$  (más néven  $\alpha 2$ -antiplazmin), a plazmin fő fiziológiás gátlószere és fontos szerepet játszik a fibrinolitikus rendszerben a plazmin aktivitásának szabályozásában [61]. Az  $\alpha 2\text{PI}$  veleszületett hiánya súlyos vérzési rendellenességet okoz a fibrinolízisre való fokozott hajlam miatt [62], az emelkedett plazma szintje trombózis rizikó fokozódáshoz vezet [57]. 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 [63,64]. Az  $\alpha 2\text{PI}$  körülbelül 67 kDa nagyságú egyláncú glikoprotein, 13% szénhidrátot tartalmaz [65,66]. 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 [62-65]. A humán  $\alpha 2\text{PI}$ -t kódoló, SERPINF2 gén 10 exont és 9 intront tartalmaz, kb. 16 kilobázisnyi nagyságú DNS-t ölelve fel [65,67]. 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 szerpinekkel ellentétben viszont az  $\alpha 2\text{PI}$  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  $\alpha 2\text{PI}$  plazmingátló hatékonyságát [68,69].

## 2.6 Az $\alpha$ 2-plazmin inhibitor heterogenitása a plazmában

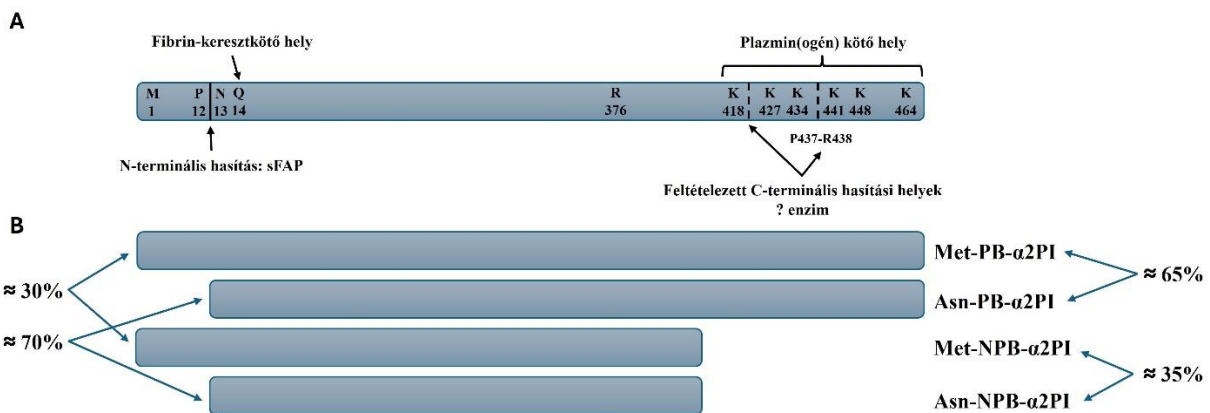
### 2.6.1 N-terminális módosulás

Az  $\alpha$ 2PI a plazmában proteolitikus hasításokon megy keresztül, négy plazmatikus izoformát eredményezve (6. ábra). A metionin aminosavval kezdődő teljes hosszúságú forma (Met- $\alpha$ 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- $\alpha$ 2PI) [70,71]. Ez a forma a normál humán plazmában az  $\alpha$ 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 [72-74]. A Met- $\alpha$ 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 Gln<sup>2</sup> (a teljes hosszánál Gln<sup>14</sup>) reziduumhoz, ezért az Asn- $\alpha$ 2PI variánst ~13-szor gyorsabban köti keresztbe a fibrinnel a Lys<sup>303</sup> pozícióban, mint a teljes hosszúságú formát [75]. A plazmin gátlást az Arg6Trp polimorfizmus nem befolyásolja [70,72,76].

### 2.6.2 C-terminális módosulás

A keringésben az  $\alpha$ 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 (K<sup>418</sup>, K<sup>427</sup>, K<sup>434</sup>, K<sup>441</sup>, K<sup>448</sup>, K<sup>464</sup>) melyek segítségével képes kötődni a plazmin(ogén)hez (PB- $\alpha$ 2PI, plazminogént kötő variáns) [67]. 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- $\alpha$ 2PI). Az elnevezés nem teljesen helyénvaló, mivel Clemmensen és munkatársai 1981-es közleményükben leírták, hogy az  $\alpha$ 2PI az utolsó 23 aminosav eltávolításával (amely a K<sup>448</sup> és K<sup>464</sup> aminosavakat tartalmazta) továbbra is komplexet tud alkotni a plazminnal, bár ebben az esetben a reakció 10-szer lassabban megy végbe [77]. Wang és munkatársai szerint a két aminosav közül a K<sup>448</sup>-as bizonyult a plazmin interakció létrejöttében legfontosabb szerepet játszó résztvevőnek [78]. Egy 2011-es közleményben különböző

rekombináns  $\alpha$ 2PI variánsok plazminhoz való kötődését vizsgálták és azt találták, hogy a kötődés elsősorban a K<sup>464</sup>-nek, majd azt követően a K<sup>448</sup>-nak köszönhető [79]. Abdul et al. eredményei szerint a C-terminális részen történő fő hasítási hely a Gln<sup>421</sup>-Asp<sup>422</sup> közé tehető, de ezen kívül más potenciális hasítási helyeket is azonosítottak [80]. Orosz et al. a Pro<sup>437</sup> és Arg<sup>438</sup> között azonosított egy potenciális hasítási helyet [81]. A módosításért felelős proteáz(oka)t azonban eddig még nem sikerült azonosítani [80]. Több közlemény számol be a PB- $\alpha$ 2PI különböző enzimekkel *in vitro* történő hasításáról, például a tripszin [68], az elasztáz vagy a mátrix metalloproteináz-3 (MMP-3) által, de az, hogy ezen proteázok *in vivo* is felelősek lennének-e a C-terminális hasításért, még nem bizonyított [82,83]. Az egészséges kontrollok plazmájában az NPB- $\alpha$ 2PI mennyisége körülbelül 35%-nak bizonyult [80]. A 6. ábra mutatja be az  $\alpha$ 2PI lehetséges izoformáit és mennyiségüket a plazmában.

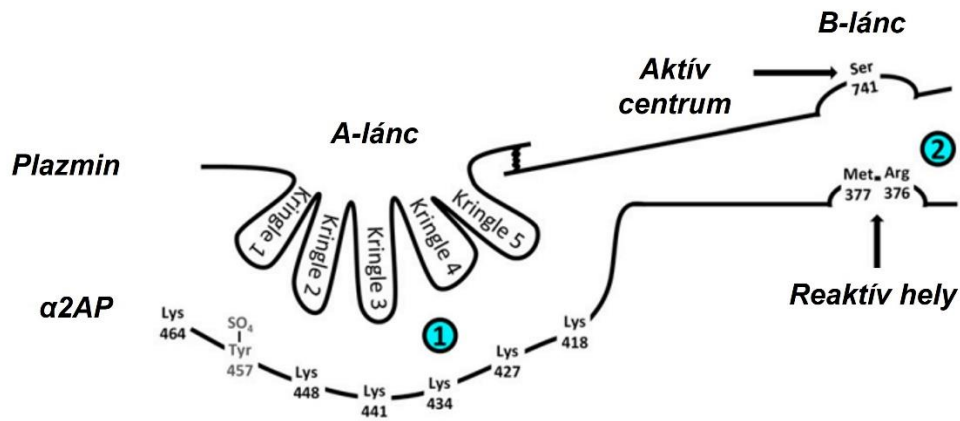


**6. ábra.** A humán  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor izoformái a keringésben. A natív  $\alpha$ 2PI fehérje, jelölve: aminosavak pozíciói; reakciókban részt vevő kötő helyek; izoformák kialakulásáért felelős enzim hasítási helyek (A); Az  $\alpha$ 2PI különböző izoformái és azok mennyisége a vérkeringésben (B). Met-PB- $\alpha$ 2PI: plazminogént kötő  $\alpha$ 2PI variáns; Asn-PB- $\alpha$ 2PI: plazminogént kötő  $\alpha$ 2PI variáns; Met-NPB- $\alpha$ 2PI: plazminogént nem kötő  $\alpha$ 2PI variáns; Asn-NPB- $\alpha$ 2PI: plazminogént nem kötő  $\alpha$ 2PI variáns. Az [67] szám alatt idézett közleményben szereplő ábra módosított változata.

## 2.7 Az $\alpha$ 2-plazmin inhibitor funkciói a vérkeringésben

Az  $\alpha$ 2PI fő funkciója az 1:1 arányú stabil komplex képzése a plazminnal (PAP-komplex) a keringésben vagy a fibrin felszínén [84]. A reakció kétlépéses mechanizmuson keresztül történik,

amit a 7. ábra szemléltet. Első lépésben az  $\alpha$ 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  $\alpha$ 2PI reaktív helye és a plazmin aktív centruma között. A folyamat végén kialakuló PAP-komplexben a plazmin elveszíti aktivitását. Az  $\alpha$ 2PI kompetitív módon gátolja a plazminogén fibrinhez való kötődését is. A plazmában keringő PAP-komplex féléletideje 12 óra [67,75].



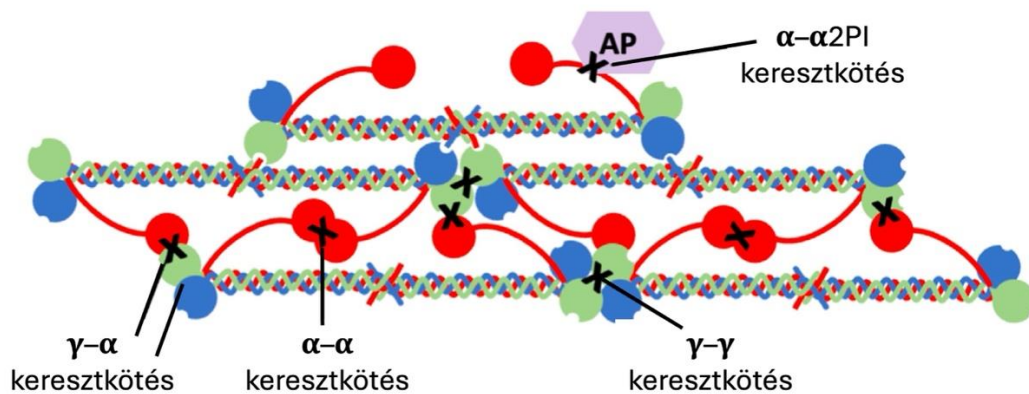
**7. ábra.** A plazmin gátlása, a PAP-komplex kialakulásának sematikus ábrázolása. A-lánc: nehézlánc, mely hordozza az 5 “kringle” domént; B-lánc: könnyűlánc: tartalmazza az aktív centrumot. (1): reverzibilis másodrendű reakció; (2): irreverzibilis elsőrendű reakció. A folyamat első lépéseként az  $\alpha$ 2PI C-terminálison lévő lizin aminosavak nem kovalens kötődés során kölcsönhatásba lépnek a plazmin fehérje „kringle” doménjeivel. Ezt követően egy irreverzibilis elsőrendű reakció során alakul ki a PAP-komplex. Ekkor a plazmin elveszti aktivitását.  $\alpha$ 2AP:  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor. Az [67] szám alatt idézett közleményben szereplő ábra módosított változata.

## 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 $\alpha$ -lánc, B $\beta$ -lánc és  $\gamma$ -lánc), melyeket diszulfid kötések tartanak össze [85].

A fibrinogén fontos szerepet játszik az elsődleges és a másodlagos hemosztázisban is. Az elsődleges hemosztázis során a  $\gamma$ -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  $\text{A}\alpha$  és  $\text{B}\beta$  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 az FXIIIa a fibrin  $\gamma$ -láncok, illetve  $\alpha$ -láncok között kovalens keresztkötéseket hoz létre (8. ábra) [86,87].



**8. ábra.** Az aktivált FXIII által létrehozott keresztkötések. A fibrin monomerek polimerizációját követően az FXIIIa kovalens keresztkötéseket hoz létre a  $\gamma$ - és  $\alpha$ -láncok között, valamint az  $\alpha$ 2PI-t is az  $\alpha$ -láncokhoz köti. AP:  $\alpha$ 2PI. A [87] szám alatt idézett közleményben szereplő ábra módosított változata.

A véralvadás során kialakult fibrinhálóba az  $\alpha$ 2PI-n kívül számos fehérje képes bekötődni, ezáltal befolyásolni annak szerkezetét és a fibrinolízissel szembeni ellenállóképességét. Wiesel közleményében összegzi ezen makromolekulákat, közéjük tartozik például a fibronectin, plazminogén, XIII-as véralvadási faktor, szöveti plazminogén aktivátor (t-PA), plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1), aktin, albumin,  $\alpha$ 1-antitripszin, karboxipeptidáz-N, lipoprotein(a), és a TSP-1 [85].

Egy 1981-es *in vitro* kísérletben kimutatták, hogy az  $\alpha$ 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 [88,89]. Az  $\alpha$ 2PI kovalens keresztkötéssel történő beépülése az alvadékba az FXIIIa-nak köszönhető (8. ábra). Több Gln reziduumot is azonosítottak ( $\text{Gln}^2$ ,  $\text{Gln}^{21}$ ,  $\text{Gln}^{419}$  és a  $\text{Gln}^{447}$ ), melyek potenciális szubsztrátjai lehetnek az enzimnek, mégis a fő reaktív hely az N-terminálisan elhelyezkedő  $\text{Gln}^2$  [90].

Jelenleg nagyon kevés megbízható ismeret áll rendelkezésre a C-terminális  $\alpha 2$ PI 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 PB- $\alpha 2$ PI és ezért az FXIIIa a felelős [91]. Mivel FXIIIa hiányában, azaz a kovalens keresztkötés hiányában, a fibrinolízis fokozódik, az  $\alpha 2$ PI fibrinszálakhoz való nem kovalens kötődésének nem tulajdonítottak nagy jelentőséget és ezért nem is vizsgálták intenzíven. Azonban Tsurupa és munkatársai kimutatták, hogy az  $\alpha 2$ PI 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 az FXIIIa általi keresztkötés létrejöttét [75].

### 3. Célkitűzés

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 szekréciónak?
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  $\alpha$ 2PI C-terminális izoformáinak mennyiségével, illetve a fibrinalvadékba való épülésük mértékével?
5. Milyen összefüggés van a PB- és NPB- $\alpha$ 2PI formák alvadékba való beépülése és az alvadéklízis paraméterek között, egészséges humán plazma mintákban?
6. Rekombináns PB- és NPB- $\alpha$ 2PI formákkal kiegészített  $\alpha$ 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 A FXIII-A hatásának vizsgálata a HAoSMC-re**

#### **4.1.1 Anyagok**

A rekombináns FXIII-A<sub>2</sub> (rFXIII-A<sub>2</sub>) a Novo Nordisk (Malmö, Hollandia) cég felajánlásából származik. A humán thrombin a CoaChrom-tól (Maria Enzersdorf, Ausztria) vásárolt, míg a főtális borjú savót (FBS) a Life Technologies cégtől (Waltham, MA, USA) szereztük be. A kísérletekhez FXIII-A<sub>2</sub> mentesített borjú savót 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-A<sub>2</sub> mentesítési folyamathoz a borjú savóból immun-abszorpciós kromatográfias technika segítségével eltávolítottuk a FXIII-A<sub>2</sub> alegységet. Ehhez egér eredetű FXIII-A<sub>2</sub> ellenes (3B2H12) monoklonális antitestet használtunk. Az antitestet CNBr aktivált Sepharose 4B (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Svédország) gél felszínhez kovalensen kötöttük fel. A depléciós eljárást követően ELISA (enzyme-linked immunsorbent assay) technikával az FBS-ben FXIII-A<sub>2</sub> nem volt a detektálható.

#### **4.1.2 Sejtkultúra**

A kísérletekhez humán aortából származó simaizomsejteket (HAoSMC) használtunk (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 ki. A tápfolyadékot kétnaponta cseréltük a sejttenyészetben. A kísérletben használt sejtek 5-9-es passzálszámúak voltak.

#### **4.1.3 Oszteoblasztos transzformáció hatása a HAoSMC-kre**

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 Ca<sup>2+</sup>-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). 100  $\mu$ L foszfátpufferelt sóoldattal (PBS puffer) mostuk, majd 400  $\mu$ L/lyuk 0,6 N HCl oldatban 30 percig dekalifikáltuk a sejteket. Ezt követően 400  $\mu$ L/lyuk A és B reagensek 1:1 arányú keverékét pipettáztuk a lyukakba. Az abszorbancia mérése 612 nm-en történt spektrofotométer segítségével (Powerwave XS, BioTek). A kalcium tartalmat a minták összfehérjetartalmára normalizálva számoltuk ki.

2. Az extracelluláris mátrixban lerakódott kalciumot Alizarin Red festéssel is láthatóvá tettük. A sejteket 1 mL/lyuk PBS pufferrel mostuk, majd 1 mL/lyuk 4%-os paraformaldehid oldatban 10 percig fixáltuk őket. Ezt követte 1 mL/lyuk PBS pufferrel való mosás. Ezt követően 2 percig szobahőmérsékleten 1 mL/lyuk 2%-os Alizarin Red oldattal festettük a sejteket. Háromszor 1 mL/lyuk PBS pufferrel való mosást követően a sejtekről felvételeket készítettünk fénymikroszkóp segítségével. 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 oszteokalcin tartalmát ELISA technikával határoztuk meg. A sejteket először PBS pufferrel mostuk, majd 0,5 mol/L etilén-diamin-tetraacetát (EDTA) tartalmú oldattal oldottuk fel az extracelluláris mátrixot. 30 perc inkubációs idő elteltével a sejtfehérjéket összegyűjtöttük és ELISA kit (Human Osteocalcin Instant ELISA, Bender MedSystems 2020, Burlingame, CA, USA) segítségével mértük a minták oszteokalcin tartalmát a gyártó utasításait követve. A minták abszorbanciáját 450 nm-en DTX880 Beckman Coulter ELISA Reader segítségével határoztuk meg. Az oszteokalcin tartalmat a minták összfehérjetartalmára normalizálva számoltuk ki.

4. Sejtlyúzátumból az alkalikus foszfatáz (ALP) aktivitás mérését ALP Yellow Liquid Substrate (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) kit segítségével végeztük. A sejteket 100  $\mu$ L PBS pufferrel mostuk majd feltártuk azokat, és a 35  $\mu$ L sejtlyúzátumhoz 130  $\mu$ L ALP Yellow Liquid Szubsztrátot adtunk. Az enzimfelszabadulást a 4-nitrofenol mennyiség alapján határoztuk meg 405 nm

hullámhosszon 30 percen keresztül 37 °C-on. A minták ALP aktivitását az összfehérjére normalizálva számoltuk ki.

5. Kvantitatív valós idejű polimeráz-láncreakcióval (qRT-PCR) határoztuk meg a Runx2 génszinten való kifejeződését. A sejteket Trizol (RNA-STAT60, Tel-Test Inc., Friendswood, Texas, USA) reagenssel tártuk fel, majd a gyártó által javasolt protokoll alapján történt az RNS (ribonukleinsav) izolálás. Az RNS koncentrációjának meghatározását és tisztaság ellenőrzését NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) készülék segítségével végeztük. High Capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével 2 µg RNS mintát komplementer dezoxiribonukleinsavvá (cDNS) írtunk át, a reakció qPCR készülékben (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) történt. A Runx2 génszakasz amplifikációjához Hs535845 számú TaqMan primert (Life Technologies, Waltham, MA, USA) használtunk. Háztartási génként GAPDH 3'-at (gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz) alkalmaztunk. A relatív génextpressziós változásokat ún. delta-delta ( $\Delta\Delta$ ) Ct módszer segítségével határoztuk meg.

6. Az oszteokalcin és Runx2 intracelluláris fehérjék kimutatása Western Blot analízissel történt. Háztartási génként a GAPDH-t alkalmaztuk. A sejteket PBS pufferrel mostuk majd sejtfeltárást követően BCA kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével határoztuk meg az összfehérjét a gyártó utasításai szerint. 15 µg összfehérjét tartalmazó sejtlizátumot  $\beta$ -merkaptóetanolt tartalmazó Laemmli pufferben vettünk fel majd 95 °C-on denaturáltunk. 10%-os SDS-poliakrilamid gélen történt a fehérjék elválasztása. A blotolás nitrocellulóz membránra (Amersham, Buckinghamshire, Egyesült Királyság) történt, félszáraz blot készülékkel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 12V-on, 45 percen keresztül Tow-bin pufferrel (7,2 g glicin; 1,52 g TRIS; 100 mL metanol) nedvesített közegben. A minták blotolását követően a le nem kötött felszínt 6%-os tejporral blokkoltuk egy éjszakán át 4 °C-on. Elsődleges antitestként a következőket alkalmaztuk: poliklonális anti-oszteokalcin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) antitestet 1:200, míg a nyúl eredetű anti-Runx2 (Proteintech, Manchester, Egyesült Királyság) és egér eredetű anti-GAPDH (Novus Biologicals, Abingdon, Egyesült Királyság) 1:1000 hígításokban. Az elsődleges antitest jelölésére az Amersham cégtől rendelt tormaperoxidázzal jelzett, másodlagos antitestet használtuk. 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 cFXIII koncentrációját ELISA módszerrel határoztuk meg. Streptavidinnel fedett ELISA lemezen (Kaviogen, Turku, Finnország) dolgoztunk 70  $\mu\text{L}$ /lyuk térfogatot használva. A biotinált monoklonális anti-FXIII-A (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) és a HRPO-jelzett anti-FXIII-A antitesteket (1:2000 hígításban) a mintákhoz pipettáztuk. 1 óra szobahőmérsékleten való inkubálást követően, 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine (TMB, One Component HRP Mivrowell Substrate, Diarect Ag, Freiburg, Németország) szubsztrát oldatot (200  $\mu\text{L}$ /lyuk) vittünk fel a lemezre, majd 30 perc elteltével 2 M-os kénsavval (50  $\mu\text{L}$ /lyuk) állítottuk le a reakciót [92].

8. A cFXIII jelenlétét Western Blot technika segítségével határoztuk meg. 10%-os SDS-poliakrilamid gélt használtunk a fehérje tartalmú minták elválasztására. A rekombináns FXIII-A<sub>2</sub> standardból (Novo Nordisk) 10 ng-ot, a mintákból pedig 30 $\mu\text{g}$ /sáv összfehérjét vittünk fel a gél zsebeibe. A blottolás PVDF membránra (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) történt, blot készülékkel (Bio-Rad), 12V-on, 45 percen keresztül Tow-bin pufferrel nedvesített közegben. A le nem kötött helyeket 3% zselatint tartalmazó tTBS pufferrel blokkoltuk (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,05% Tween-20, pH: 7,5). Elfogó antitestként birka eredetű poliklonális FXIII-A ellenes antitestet (Affinity Biologicals, ON, Kanada, 1:5000 hígítás, 0,5% zselatint tartalmazó tTBS), jelölő antitestként biotinált anti-birka IgG antitestet (Vectastein ABC Kit, Vector Laboratories, Oxfordshire, Egyesült Királyság; 1:10000 hígítás 0,5% zselatint tartalmazó tTBS pufferben) használtunk. Az avidin-biotinált HRPO-komplex (Vectastein ABC Kit, 1:3200 hígítás 0,5% zselatint tartalmazó tTBS pufferben) felvitelét követően a detektálást kemiluminescens szubsztrát reagenssel (Covalab, Cambridge, Egyesült Királyság), az előhívást fényérzékeny film (Amersham Hyperfilm ECL, Buckinghamshire, Egyesült Királyság) segítségével végeztük.

Az 1.-7. pontban ismertetett vizsgálatok kivitelezésében Dr. Jeney Viktória és Dr. Balogh Enikő vettek részt.

#### **4.1.4 A HAoSMC-k kezelése aktivált, illetve nem aktivált rXIII-as faktorial**

Első lépésként 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rFXIII-A<sub>2</sub>-t tartalmazó törzsoldatot készítettünk 0,2% FXIII-A<sub>2</sub> mentes FBS tartalmú DMEM tápfolyadékban. A következő lépésben a FXIII-A<sub>2</sub>-t 5 U/mL humán thrombinnal és 1 mM CaCl<sub>2</sub>-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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rFXIIIa). A hígításokhoz szükséges hígító oldat 1 mM CaCl<sub>2</sub>-ot, 50 ATU/mL Refludannal gátolt 5

U/mL humán thrombint valamint 0,2% FXIII-A mentesített FBS-t tartalmazó. A nem aktivált rFXIII-A<sub>2</sub>-vel történő kezelés esetén a 20 µg/mL rFXIII-A<sub>2</sub> törzsoldatból 15, 10, 5 és 2,5 µg/mL végkoncentrációjú hígításokat készítettünk 0,2% FXIII-A<sub>2</sub> 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 CaCl<sub>2</sub>-ot tartalmazó médiumot használtunk. A kezelések 1 vagy 3 napon keresztül történtek.

#### **4.1.5 Sejtproliferációs kísérlet kivitelezése**

A HAoSMC-k kitapasztása 96-lyukú lemezre (TPP Techno Plastic Products AG, Svájc), 0,6x10<sup>4</sup>/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 kezeléseket 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, Ausztria) 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 enzimeit a sárga színű tetrazólium sók sötét 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.

#### **4.1.6 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. Az inzert eltávolítása után a sejtek bevándorolnak az üresen maradt területre. A HAoSMC-k kitapasztása az inzertet tartalmazó lyukakba 20x10<sup>4</sup>/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 aktivált rFXIII-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, Szöul, Dél- Korea) segítségével CO<sub>2</sub> termosztátban. A lyukakban három-három különböző, általunk kijelölt területről készültek a képek. A mikroszkóp szoftvere minden felvétel esetén a sejtenyészet konfluenciáját is meghatározta.

#### **4.1.7 Az extracelluláris mátrix kollagén tartalmának meghatározása**

A HAoSMC-k kitapasztása 12 lyukú szövettényesztő lemezre (TPP) 10x10<sup>4</sup>/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 aktivált rFXIII-mal. A kontroll sejteket Recludannal gátolt thrombint tartalmazó tápfolyadékban tenyésztettük. A kezelést követő 24. órában az extracelluláris mátrixból történő kollagén mérést a Sircol<sup>TM</sup> Soluble Collagen Assay Kit (Bicolor Life Science Assays, Carrickfergus, Anglia) segítségével végeztük a gyártó utasításai szerint. A sejtfelülűsöt és a sejteket eltávolítottuk, majd a felszínen maradt extracelluláris mátrixhoz 0,1 mg/mL pepszin tartalmú 0,5 M ecetsavat adtunk a lyukakba. Egy éjszakán át, 4°C-on történő inkubálást követően a mintákat alacsony fehérjekötőképességű csövekbe gyűjtöttük. A pH-t 100 µL/cső savneutralizáló reagenssel semlegesítettük, majd 200 µL/cső kollagén izoláló és koncentráló reagenst adtunk a mintákhoz. Az inkubálás 1 éjszakán át, 4°C-on történt. Ezután a csöveket 12000 rpm-en, 10 percig centrifugáltuk, majd a felülűszo eltávolítása után a cső alján maradt pellethez 1 mL/cső Picosirius-vörös festéket adtunk és 30 percig inkubáltunk 150 rpm rázatás mellett. A mintákat ezt követően 12000 rpm-en, 10 percig centrifugáltunk és a felülűszo eltávolítása után 750 µL/cső mósópufferben vettük fel. Újabb centrifugálási lépést követően 750 µL/cső alkáli reagenst adtunk a mintákhoz, a kollagén-festék komplex feloldódása érdekében. Öt perces inkubációt követően minden csőből 200 µL mintát vittünk fel ELISA lemezre. 500 µg/ml koncentrációjú standard törzsoldat hígításával különböző (100, 60, 30, 20,10 µg/mL) kollagén tartalmú oldatokat készítettünk 0,5 M ecetsav és savneutralizáló reagens elegye segítségével. Az abszorbanciát 450 nm-en (iEMSReader MF and Multiscan<sup>TM</sup>) spektrofotométer segítségével detektáltuk, majd az eredmények értékelését Ascent software segítségével végeztük.

#### **4.1.8 TSP-1 meghatározása a sejtfraakcióból és a sejtek felülúszójából**

A HAoSMC-k kitapasztása 96 lyukú szövettenyésztő lemezre (TPP)  $0,6 \times 10^4$ /lyuk sejtszámmal történt. A szétosztást követő 24. órában történt a kezelés, mely 24 órán át tartott.  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  aktivált rFXIII törzsoldatból 15, 10, 5 és  $2,5 \mu\text{g}/\text{mL}$  végkoncentrációjú hígításokat készítettünk. A kontroll sejteket Recludannal gátolt thrombint tartalmazó tápfolyadékban tenyésztettük. Másnap leszívtuk a sejtekről a felülúszót ( $200 \mu\text{L}/\text{lyuk}$ ), majd a sejteket PBS pufferrel mostuk ( $200 \mu\text{L}/\text{lyuk}$ ). 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 ( $200 \mu\text{L}/\text{lyuk}$ ) adva. Az inkubálás 5 percig enyhe rázatás mellett történt, amit a minták kevertetése, majd centrifugálás követett  $13400 \text{ rpm}$  fordulatszámra, 5 percig. A felülúszót alacsony fehérjekötőképességű csőbe 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  $450 \text{ nm}$ -en (iEMSReader MF and Multiscan™ fotométer) detektáltuk, majd az eredmények értékelését Ascent software segítségével végeztük.

#### **4.1.9 A HAoSMC-k TSP-1 termelésének vizsgálata Western blot segítségével**

A HAoSMC-k kitapasztása 6 lyukú szövettenyésztő lemezre (TPP)  $50 \times 10^4$ /lyuk sejtszámmal történt. A szétosztást követő 24. órában történt a sejtek kezelése  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  aktivált rFXIII-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,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on. A sejteket szuszpendálással összegyűjtöttük a lemez aljáról, majd  $13200 \text{ rpm}$ -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  $150 \text{ rpm}$  rázatás mellett, szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk. Az extracelluláris mátrix fehérjéket tartalmazó mintákat a puffer szuszpendálásával összegyűjtöttük és  $10 \text{ kDa}$  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 sejtpelletből, 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. A géltre 200 nanogramm TSP-1 standardot (Thrombospondin Human Platelet, Athens Research and Technologies, Athens, Georgia, USA), 54 µg összfehérjét a sejtlizátumokból, 2 µg összfehérjét a sejtek extracelluláris mátrix mintákból vittünk fel. A blottolás PVDF membránra (Bio-Rad) történt, félszáraz blot készülékkel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 12V-on, 45 percen keresztül Tow-bin pufferrel nedvesített közegben. 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 TSP-1 ellenes antitestet (Invitrogen, Waltham, MA, USA; 1:1000 hígítás, 0.5% BSA-t tartalmazó tTBS), jelölő antitestként HRPO-konjugált, poliklonális kecske eredetű anti-egér IgG antitestet (Bio-Rad, Hercules, CA, USA; 1:20000 hígítás 0.5% BSA-t tartalmazó tTBS pufferben) használtunk. A detektálást kemilumineszcens szubsztrát reagenssel (ECL, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), az előhívást fényérzékeny film (Amersham Hyperfilm ECL, Buckinghamshire, Anglia) segítségével végeztük.

#### **4.1.10 TSP-1 fehérje detektálása immunfluoreszcens festéssel**

A HAoSMC-eket Clipmax 10 cm<sup>2</sup> sejtenyésztő flaskában (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Svájc) 8x10<sup>4</sup>/ 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 aktivált rFXIII-mal, a kontroll sejteket Recludannal 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 (Invitrogen, 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's 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, amely Plan-Apochromat 63×/1,40 olajimmerziós objektívvel és

szilárdtest dióadalézerekkel (405 nm, 488 nm) volt felszerelve. A fluoreszcencia jelek detektálását szelektív lézer gerjesztéssel végeztük.

#### 4.1.11 TSP-1 génexpresszió vizsgálata

A HAoSMC-eket 24 lyukú sejtenyészítő lemezre (TPP)  $3 \times 10^4$  sejt/lyuk sejtszámmal tapasztottuk ki. A szétosztást követő 24. órában a sejteket aktivált 20, 15, 10, 5 és 2,5  $\mu\text{g/mL}$  végkoncentrációjú rFXIII-mal kezeltük, a kontroll sejteket Recludannal 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 tisztaságát 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, Anglia) használtuk. A reakció során 80 ng mennyiségű RNS íródott át cDNS-re. A cDNS szintézist a Veriti 96 well Thermal Cycler PCR készüléken végeztük az 1. táblázat szerint.

*1. táblázat. A cDNS szintézis program*

<b>Ciklus</b>	<b>T (°C)</b>	<b>t (perc)</b>
<b>1</b>	42	30
<b>1</b>	85	10
<b>1</b>	4	$\infty$

*A komplementer DNS szintézise 42 °C-on történt, a reverz transzkriptáz enzim lebomlásához 85 °C-ot alkalmaztunk. A 4 °C biztosította a cDNS molekula szerkezetének stabilitását.*

A cDNS-ről kvantitatív valós idejű PCR segítségével felszorzottuk a TSP-1 gént, háztartási géneként pedig a GAPDH génszakaszt alkalmaztuk. A primerek szekvenciája megegyezett a Dardik és munkatársai által közölt szekvenciával [40,41]. A PCR reakciókat a 2. és 3. táblázat alapján állítottuk össze, és LightCycler 480 (Roche, Budapest, Magyarország) készüléken, a LightCycler 480 SYBR Green I. Master Mix (Roche, Budapest, Magyarország) segítségével végeztük. A cDNS minták 100-szoros hígításával dolgoztunk.

**2. táblázat. A TSP-1 qPCR reakció összeállítása**

Reagens	1 mintára (µL)
<b>Primer Forward (10 µM)</b>	3
<b>Primer Reverse (10 µM)</b>	3
<b>SYBR Green I Master</b>	10
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	2,5
<b>cDNS</b>	1,5
<b>Összesen</b>	20

A táblázat a TSP-1 RNS meghatározáshoz szükséges reagensek bemérését mutatja, egy minta esetén.

**3. táblázat. A GAPDH qPCR reakció összeállítása**

Reagens	1 mintára (µL)
<b>Primer Forward (5 µM)</b>	0,8
<b>Primer Reverse (5 µM)</b>	0,8
<b>SYBR Green I Master</b>	10
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	3,4
<b>cDNS</b>	5
<b>Összesen</b>	20

A táblázat a GAPDH RNS meghatározáshoz szükséges reagensek bemérését mutatja, egy minta esetén.

A PCR reakciók (TSP-1 és GAPDH) kivitelezése a 4. táblázat alapján történt.

**4. táblázat. Az alkalmazott PCR program profilja**

Ciklus	T (°C)	t (perc)	Ismétlés
<b>1</b>	95	10:00	1
<b>2</b>	95	00:10	40
	60*	00:30	
	72	00:01	
<b>3</b>	95	00:05	1
	65	01:01	
	97	folyamatos	
<b>4</b>	40	00:10	1

Első ciklus: a reakció előinkubálása; második ciklus: az amplifikálni kívánt DNS szakasz sokszorozódása; harmadik ciklus: a SYBR Green I leválása az amplitkonról; negyedik ciklus: a reakcióközeg hűtése.

\*GAPDH primerek esetén az amplifikáció második szakasza 55 °C-on zajlott.

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

#### **4.1.12 Statisztikai analízis**

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

### **4.2 Az $\alpha 2PI$ heterogenitás hatásának vizsgálata a fibrinolízisre és a fibrin alvadék szerkezetre**

#### **4.2.1 Humán minták**

Munkacsoportunk korábbi tanulmányához gyűjtött, egészséges önkéntesektől származó, plazma minták közül nyolcvan mintát választottunk ki random módon [57]. 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, USA) történt. A plazmát 1500 g fordulatszámon, 20 percig történő centrifugálással választottuk el, majd  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ -on felhasználásig tároltuk. A résztvevők a részletes szóbeli tájékoztatást követően írásos beleegyezést adtak a mintájuk kutatási célú felhasználásához. A tanulmány megfelelt a Helsink Deklaráció etikai irányelveinek. A tanulmányok etikai jóváhagyását a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságától kaptuk meg (ETT TUKEB: 54005-3/2016/EKU).

#### **4.2.2 Anyagok**

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 Protein, 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 Actilyse-t (Boehringer Ingelheim International, Németország) használtunk a különböző kísérletekben. Az alvadék lízis idő vizsgálatát 96 lyukú, féltérfogatos lemezen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Ausztria) végeztük. A minták abszorbanciáját Tecan Infinite 200 spektrofotométer (TECAN Trading AG, Männedorf, Svájc) segítségével detektáltuk. Az alvadékszerkezet vizsgálat Ibidi  $\mu$ -Slide VI lemezekon történt (ibidi GmbH, Gräfelfing, Németország). 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.

#### **4.2.3 Az $\alpha$ 2PI koncentráció meghatározása plazma mintákban**

A totál- $\alpha$ 2PI antigén koncentrációt egy, a munkacsoportunk által korábban kifejlesztett szendvics ELISA technikával mértük [81], mellyel a plazma összes  $\alpha$ 2PI izoformája detektálható. A módszer előnye, hogy a plazmin–antiplazmin komplexek jelenléte nem befolyásolja a mérési eredményeket (a plazma  $\alpha$ 2PI referencia tartománya: 48-85 mg/L). A PB- $\alpha$ 2PI antigén koncentrációt szintén a munkacsoportunk által kifejlesztett szendvics ELISA-val detektáltuk [57]. Az NPB- $\alpha$ 2PI izoforma mennyiségét számítottuk, a totál- $\alpha$ 2PI mennyiségből kivontuk a PB- $\alpha$ 2PI forma mennyiségét.

#### **4.2.4 Az $\alpha$ 2PI plazma alvadékba való beépülésének vizsgálata**

A plazma mintákat 2 U/mL thrombin és 20 mM CaCl<sub>2</sub> 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- $\alpha$ 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  $\alpha$ 2PI izoformák mennyiségének különbségével határoztuk meg.

Az  $\alpha$ 2PI alvadékba való beépülését Western blot technikával is vizsgáltuk. Három, véletlenszerűen kiválasztott plazma mintát alvasztottunk a fent leírtak alapján, 2 mM jódcetamid (IAA)

jelenlétében vagy annak hiányában. Az alvadékokat mosópufferrel (PBS, 3 mg/mL IAA, pH 7,2) alaposan mostuk (20×500 µL), 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.  $\alpha$ 2PI standardként human plazmából tisztított  $\alpha$ 2PI preparátumot (Calbiochem, San Diego, CA, USA) használtunk. A fehérjék elektroblottolása PVDF membránra (Bio-Rad) 25V-on, 30 percen keresztül történt Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) készülék segítségével. Egy órán keresztül, szobahőmérsékleten, 3% zselatint tartalmazó TBS (50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,4) oldattal blokkoltuk a membrán szabadon maradt felszínét. Az inkubációs lépések között a membrán mosása 3x5 percig, tTBS (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 0,1% Tween20, pH 7,4) oldattal történt, majd 0,5% zselatint tartalmazó tTBS pufferben hígítottuk a fehérjék jelölésére alkalmazott antitesteket. Az összes izoforma detektálásához HRPO-jelzett anti-humán  $\alpha$ 2PI poliklonális antitestet (GA2AP-AP, Affinity Biologicals, ON, Kanada) 1:20000 hígításban, a PB- $\alpha$ 2PI forma detektálásához egér anti-humán PB- $\alpha$ 2PI monoklonális antitestet (Monoklonális-anti- $\alpha$ 2AP 3AP antitest, Technoclone, Bécs, Ausztria) (3 µg/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.

#### 4.2.5 Fibrin alvadéklízis vizsgálatok

Nyolevan egészséges egyéntől származó plazma mintán végeztünk *in vitro* fibrin alvadék lízis vizsgálatot Orbán-Kálmándi et al. módszere szerint [93]. A rekombináns teljes hosszúságú és C-terminálisan trunkált  $\alpha$ 2PI alvadék lízisre való hatásának vizsgálatához egy általunk módosított lízis-idő meghatározást végeztünk.  $\alpha$ 2PI hiányplazmát különböző rekombináns, teljes hosszúságú és C-terminálisan trunkált  $\alpha$ 2PI fehérjékkel egészítettünk ki úgy, hogy 100%-nak a 65 µg/mL plazma koncentráció felelt meg. A plazma mix 1,3-szorosan hígított plazmát és HEPES pufferben (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 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<sub>2</sub>-t tartalmazott HEPES pufferben. 50 µL/lyuk plazma keverékhez 25 µL/lyuk aktiváló keveréket pipettáztunk 96-lyukú lemezekbe, majd azonnal mértük a minták turbiditását Tecan Infinite 200 spektrofotométer (TECAN) segítségével, 340 nm-en, 1

percenként, összesen 72 percig, 37 °C-on. Az eredmények kiértékeléséhez Shiny App szoftvert (Simple clot lysis analysis app verzió 0.3.1) használtunk, mellyel a fibrin képződés és lízis folyamatát ábrázoló görbe különböző paramétereit, mint például a maximális abszorbanciát (MaxAbsz), az 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.

#### **4.2.6 Az alvadék szerkezetének vizsgálata konfokális lézer scanning mikroszkópiával**

$\alpha$ 2PI hiányplazmát egészítettünk ki különböző mennyiségű teljes hosszúságú és/vagy C-terminálisan trunkált rekombináns  $\alpha$ 2PI formákkal és 2% végkoncentrációban AF647-jelölt fibrinogénnel. Az így kapott 50  $\mu$ L plazmához 50  $\mu$ L, az alvadékképződést indukáló aktiváló mixet adtuk, amely TRIS/HCL pufferben (0,05M TRIS, 0,1 M NaCl, pH 7,5) hígított 0,5 U/mL thrombint és 10 mM CaCl<sub>2</sub>-t tartalmazott. Az Ibidi  $\mu$ -Slide VI lemez csatornáiba 40  $\mu$ 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 fecskendőt csatlakoztattunk, megtöltve azt TRIS/HCl pufferrel a fecskendő 2 mL-es jelzéséig. A puffert az alvadékon 2 órán át engedjük átfolyni. Ezt követően Olympus FluoView 3000 konfokális mikroszkóppal (Olympus, Tokió, Japán; objektív: UPLFLN 40x száraz (törésmutató=1,0; munkatávolság=0,51 mm; numerikus apertúra=0,75; a pinhole átmérője 280  $\mu$ m)) vizsgáltuk az alvadékokat.

A Z-stack teljes vastagsága 42  $\mu$ m volt, ami 2,0  $\mu$ m-es lépésenként összesen 22 Z-szeletet eredményezett. Az alvadékok konfokális képeinek elemzéséhez a nyílt forráskódú Fiji (Fiji Is Just ImageJ) szoftvert használtuk. A pórusméret meghatározásához kiszámítottuk azoknak a buborékoknak az átlagos sugarát, amelyek a 2D pórusokba illeszthetők és a teljes 2D képen maximális lefedettséget biztosítanak; az 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 [94,95]. Minden alvadékról ugyanabban 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 [96,97]. A konfokális mikroszkóppal történő vizsgálatokat a Debreceni Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetében, Dr. Szűcs Péter és Dr. Hegyi Zoltán segítségével végeztük.

#### **4.2.7 Egyéb laboratóriumi módszerek**

A FXIII aktivitását ammónia felszabadulás detektálásán alapuló módszerrel határoztuk meg [98], a Technochrom FXIII kromogén tesztjét (Technoclone, Bécs, Ausztria) használva. A FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigén szintet szendvics ELISA módszerrel a korábban leírtak szerint határoztuk meg [4]. 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).

#### **4.2.8 Statisztikai analízis**

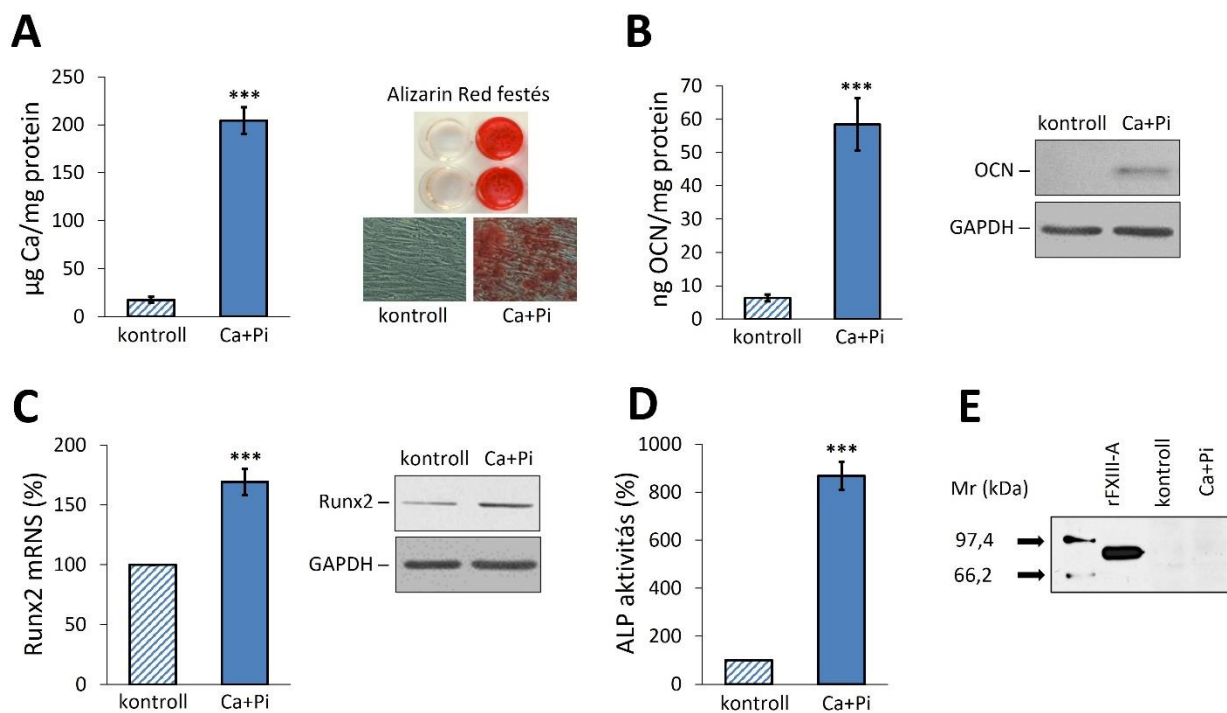
A szükséges mintanagyság meghatározásához korrelációs mintanagyság kalkulátort alkalmaztunk. A szükséges mintanagyság  $n=80$  volt ahhoz, hogy  $r>0,300$  és  $\alpha=0,05$ ,  $\beta=0,2$  értékek esetén statisztikailag szignifikáns korrelációt állapíthassunk meg. Az adatok eloszlásának meghatározására 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 [9,11,31], 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  $\text{Ca}^{2+}$ -t tartalmazott. Az oszteoblasztos differenciációt jelző markerek változása a 9. ábrán látható (9. A-D ábra). Az Alizarin Red S festéssel kimutatott kalcium tartalom a kontroll sejtekhez képest emelkedett a transzformált sejtek esetén ( $17,34 \pm 3,2$  vs.  $204,42 \pm 13,8$ ) (9. A ábra). Az oszteokalcin (OCN) szintézis a kontrollhoz képest 9-szeresére nőtt ( $6,34 \pm 1,0$  vs.  $58,42 \pm 7,8$ ) (9. B ábra), a Runx2 génexpresszió mértéke a kontrollhoz képest 1,69-szeresére emelkedett (9. C ábra). Az alkalikus foszfatáz aktivitás a transzformált sejtekben a 8,67-szeresére nőtt a kontroll sejtekhez képest (9. D ábra). Ezen markerek szintjének emelkedése igazolta, hogy az oszteoblasztos átalakulás megtörtént. Ennek ellenére a sejtizátumokban FXIII-A nem volt detektálható sem Western blot-tal (9. E ábra) sem ELISA technikával (az eredmény nem került bemutatásra).

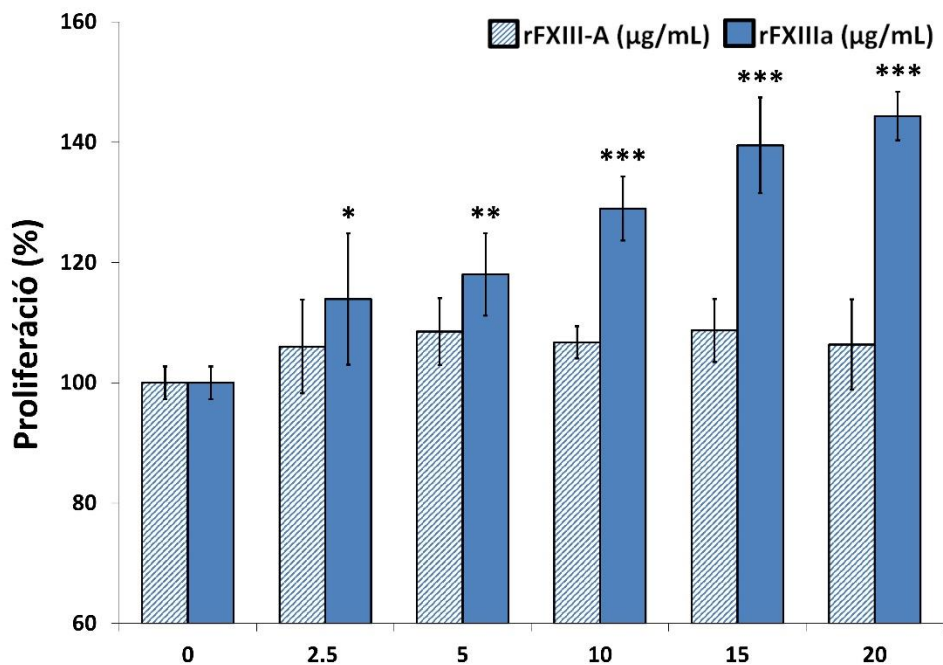


**9. ábra. Oszteoblasztos differenciáció markereinek vizsgálata HAoSMC sejteken.** Az oszteoblasztos átalakulást 2,5 mM inorganikus foszfáttal (Pi) és 1,2 mM  $Ca^{2+}$ -mal indukáltuk majd az oszteoblasztokra jellemző markereket vizsgáltuk. A kalciumlerakódás mennyiségi meghatározására spektrofotometriás módszert, a lerakódott kalcium vizualizálására Alizarin Red festést alkalmaztunk (A); Az oszteokalcin (OCN) beépülését az extracelluláris mátrixba ELISA-val és Western blot segítségével detektáltuk (B); A Runx2 mRNS és fehérje expressziót kvantitatív reverz PCR reakcióval és Western blot módszerekkel vizsgáltuk (C); Az alkalikus foszfatáz (ALP) aktivitás mérését enzimatikus elven történő teszttel végeztük (D); Az oszteoblasztos transzformáción áteső sejtekben nem volt kimutatható a FXIII-A jelenléte Western blot technikával. A pozitív kontrollként alkalmazott rekombináns FXIII-A mennyisége 10 ng (E). (\*\*\*) $p < 0,001$

### 5.1.2 A rFXIII-A hatása a HAoSMC-k proliferációjára

Következő lépésben a HAoSMC-khez kívülről adott rFXIII-A<sub>2</sub> hatását vizsgáltuk. A hemorrhágiás plakkokban az extracelluláris FXIII-A koncentráció nem ismert, de feltehetően a plazmakoncentráció (10 µg/mL) felett van. Ezért a kísérletek során 2,5-20 µg/mL tartományban alkalmaztuk a rFXIII-A<sub>2</sub>-t. A nem aktivált rFXIII-A<sub>2</sub> nem volt hatással a HAoSMC-k proliferációjára, még a legmagasabb koncentráció alkalmazása esetén sem. Ezzel szemben az 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 (10. ábra). A sejtproliferáció detektálását EZ4U és CCK-8 kitékkel is elvégeztük, melyek hasonló eredményeket adtak (az EZ4U teszt eredménye látható a 10. ábrán).

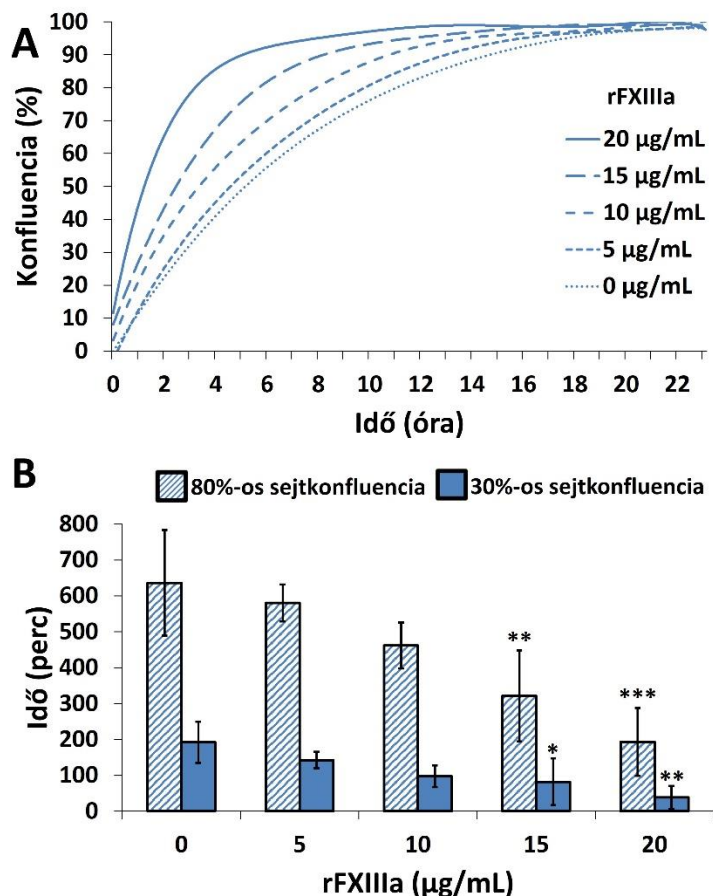


**10. ábra.** A rFXIII hatása a humán aorta simaizomsejtek (HAoSMC) proliferációjára. A sejtek proliferációját százalékos arányban fejeztük ki. A nem aktivált rFXIII nem befolyásolta, míg a rFXIIIa koncentráció-függő módon fokozta a HAoSMC-k proliferációját. Az ábra három párhuzamos kísérlet eredményét reprezentálja. HAoSMC: humán aorta eredetű simaizomsejt; rFXIII-A: rekombináns faktor XIII-A; rFXIIIa: aktivált rekombináns FXIII-A (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

### 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 rFXIII-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 (11. A ábra). A 30%-os és 80%-os konfluencia elérését az 5  $\mu\text{g/mL}$  rFXIIIa-val kezelt

sejtek esetén a 143. és 581. percnél, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  esetén a 98. és 462., 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  esetén a 82. és 321., a 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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) (11. B ábra).

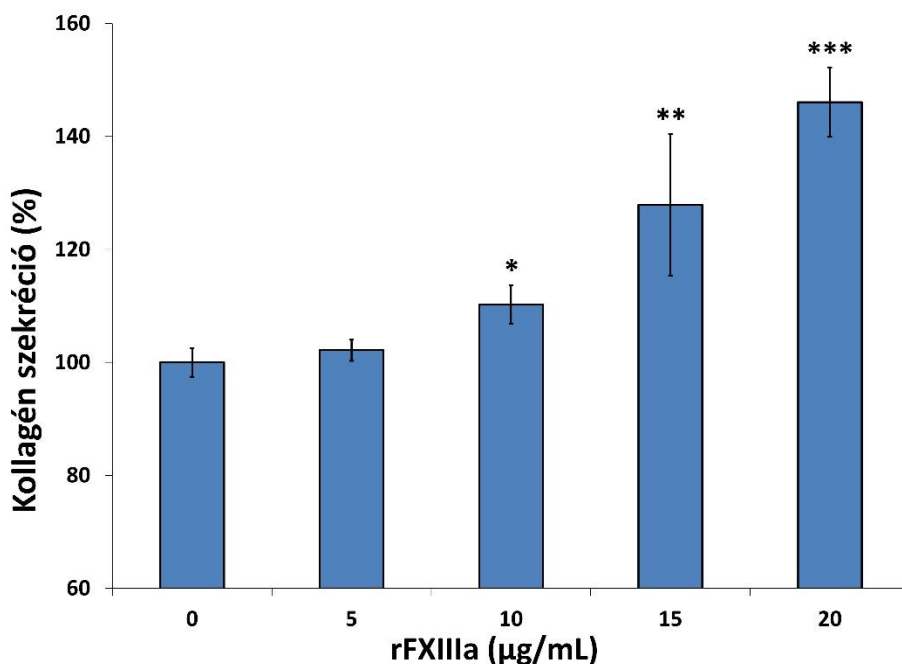


**11. ábra.** A rFXIIIa szerepe az *in vitro* sebzáródásban. A rFXIIIa felgyorsította az *in vitro* létrehozott seb záródását a humán aortából származó simaizom sejt kultúrában. Az insert eltávolítását követően valós idejű mikroszkóppal detektáltuk a sebzáródás folyamatát, különböző rFXIIIa koncentrációk hozzáadása mellett (A). A 30%-os és 80%-os sejtkonfluencia eléréséhez szükséges időt állapítottuk meg (B). Az ábra három párhuzamos kísérlet eredményét reprezentálja (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rFXIIIa esetén 10%-kal,

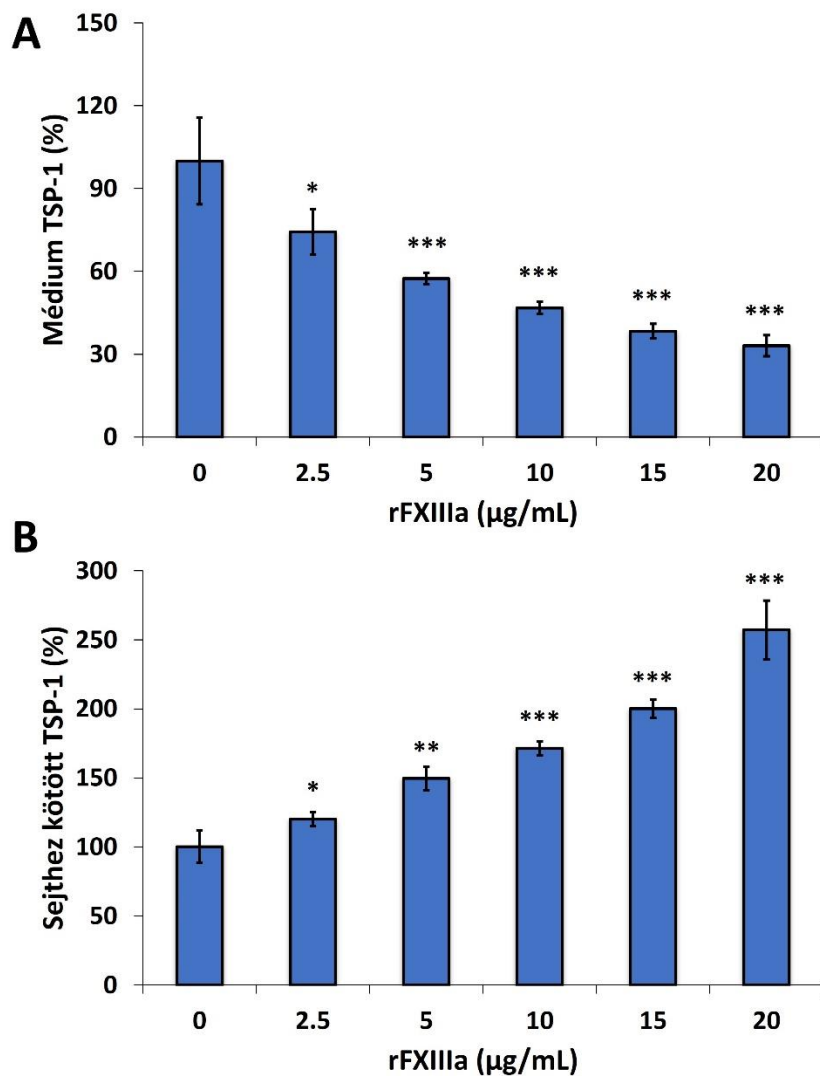
15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  esetén közel 30%-kal, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  esetén pedig 50%-kal a nem kezelt kultúrához képest (12. ábra).



*12. ábra. A rFXIIIa hatása a HAoSMC sejtek kollagén termelésére. A három napos kezelést követően a rFXIIIa az extracelluláris mátrixba történő kollagén szekréciót koncentráció-függő módon emelte. Az ábra három párhuzamos kísérlet eredményét reprezentálja (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).*

### 5.1.5 TSP-1 kimutatása a sejtenyészet médiumában és a sejtfraakcióban

A rFXIIIa-mal történő kezelés hatását a TSP-1 szintre ELISA módszerrel határoztuk meg. 24 órás kezelést követően a sejtek tápfolyadékában szignifikánsan lecsökkent a TSP-1 koncentráció a kontroll sejtekéhez képest. A 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  esetén 78%-ra, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  esetén 54%-ra, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  esetén 43%-ra, 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  esetén 39%-ra, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  esetén pedig 34%-ra csökkent a TSP-1 szint (13. A ábra). Ezzel szemben a kezelt sejtek lizátumában a TSP-1 koncentráció emelkedését tapasztaltunk: 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  esetén 20%-os, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  esetén 50%-os, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  esetén 71%-os, 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  esetén 100%-os, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  esetén pedig 157%-os emelkedést (13. B ábra).

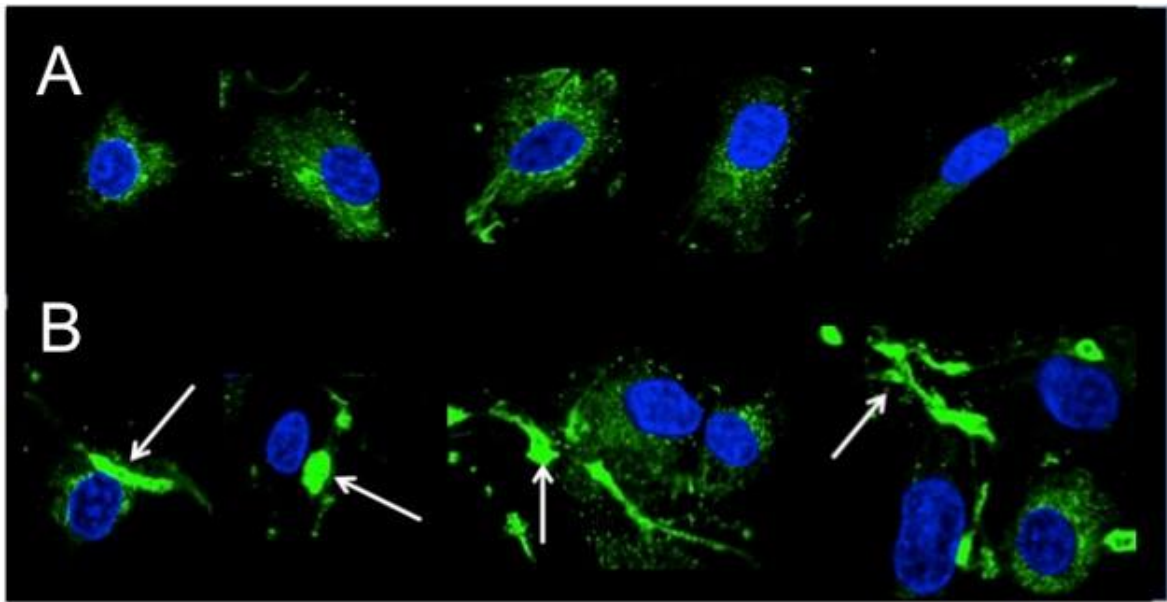


13. ábra. A rFXIIIa hatása a TSP-1 fehérje megoszlására a tápfolyadék és a sejtfrakció között. A rFXIIIa kezelés hatására a TSP-1 koncentráció csökkent a médiumban (A), míg a sejtlizátumban emelkedést tapasztaltunk (B). A sejtlizátum magába foglalja az intracelluláris és a sejtfelszínhez kötött, a sejtek mosásával sem szeparálható TSP-1 fehérjét is. Az ábra az ELISA mérés három párhuzamos eredményét reprezentálja (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

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 aktivált rFXIIIa-mal történő kezelés esetén is csak minimális, nem szignifikáns csökkenés volt detektálható a kezelt kultúrákban a nem kezelt kultúrákhoz képest ( $135,4 \pm 11,4$  ng/lyuk vs  $153,1 \pm 13,1$  ng/lyuk).

### 5.1.6 A TSP-1 kifejeződése a sejtek citoplazmájában

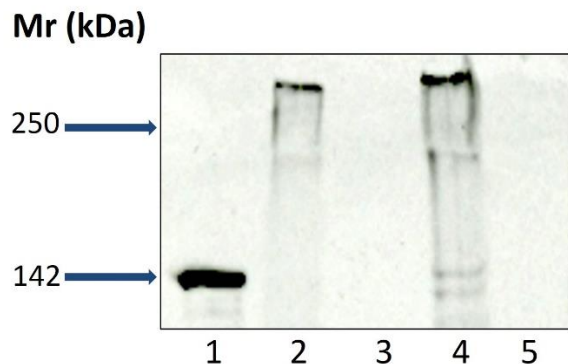
Immunfluoreszcens vizsgálat során míg a kontroll sejtekben csak a citoplazmában detektáltunk TSP-1 fehérjét (14. A ábra), addig a rFXIIIa jelenlétében számos apró, TSP-1-re intenzíven festődő granulum volt látható, melyek többsége a HAoSMC-kkel asszociálódott (14. B ábra).



**14. ábra.** A TSP-1 kimutatása a sejtek citoplazmájában. A TSP-1 immunofluoreszcens festődése a kontroll sejtekben (A); Intracelluláris és sejthez kötött TSP-1 a 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rFXIIIa-mal kezelt HAoSMC sejt-kultúrában (B). A fehér nyilak a TSP-1 specifikus antitesttel intenzíven festetődött, granulátumszerű képződményeket jelzik. A granulátumok leginkább szorosán a sejtekhez kapcsolódva fordultak elő, de alkalmanként azoktól függetlenül is megjelentek.

### 5.1.7 A TSP-1 kimutatása Western blot technikával

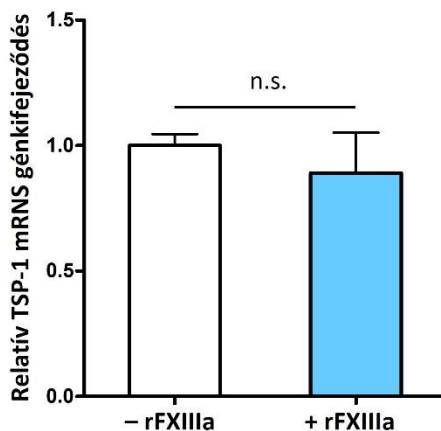
A celluláris és sejthez kötött TSP-1 fehérjék magas molekulásúllyal, erős diszulfid-kötéssel rendelkező homotrimer formában jelentek meg a redukáló SDS-PAGE-t követő Western blot vizsgálat során, összehasonlítva a 150 kDa nagyságú, monomer TSP-1 standarddal (15. ábra). Denzitometriás méréssel a sejt-asszociált 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.



**15. ábra.** Az intracellularis és sejthez kapcsolódó TSP-1 tartalom vizsgálata 24 órás rFXIIIa-kezelést követően. 1. sáv: 200 ng TSPI-1 standard; 2. sáv: kontroll sejtek sejtlizátuma (54 µg fehérje); 3. sáv: kontroll sejtek extracelluláris mátrixa (2 µg fehérje); 4. sáv: 20 µg/mL rFXIIIa-val kezelt sejtek sejtlizátuma (54 µg fehérje); 5. sáv: 20 µg/mL rFXIIIa-val kezelt sejtek extracelluláris mátrixa (2 µg fehérje). A diszulfid kötéssel kapcsolt TSP-1 monomerek együtt maradnak, magas molekulatömegű homotrimer formában. A TSP-1 monomerek halvány sávként láthatóak 150 kD molekulatömeg alatt.

### 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 (16. ábra).



**16. ábra.** A rFXIIIa kezelés hatása a HAoSMC-k TSP-1 mRNS expressziójára. A rFXIIIa-mal kezelt sejtek és a kontroll sejtek TSP-1 mRNS tartalmában nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. Az ábra három párhuzamos kísérlet eredményét reprezentálja. n.s.: nem szignifikáns.

## 5.2 Eredmények az $\alpha$ 2PI heterogenitás hatásának vizsgálatában

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

### 5.2.1 Különböző paraméterek plazmakoncentrációi a vizsgált populációban

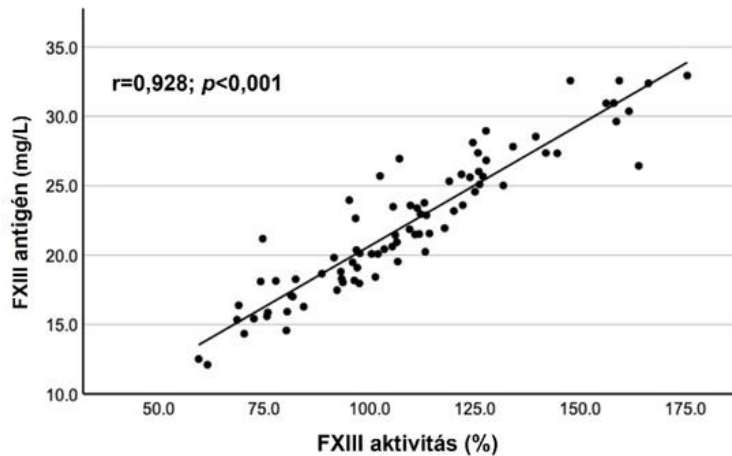
Egy korábbi tanulmányunkhoz gyűjtött, egészséges egyének mintagyűjteményéből random módon választottuk ki 80 egyén plazma mintáját [57]. Az 5. táblázat mutatja a vizsgált csoport jellemzőit. A vizsgált paraméterek minden esetben a referencia tartományban voltak.

A FXIII aktivitás és az antigén koncentráció között erős korrelációt ( $r=0,928$ ;  $p<0,001$ ) találtunk (17. ábra). Az  $\alpha$ 2PI aktivitás mind a totál- $\alpha$ 2PI antigén koncentrációval ( $r=0,691$ ;  $p<0,001$ ), mind a PB- $\alpha$ 2PI antigén koncentrációval ( $r=0,750$ ;  $p<0,001$ ) jó korrelációt mutatott. Az  $\alpha$ 2PI aktivitás és az NPB- $\alpha$ 2PI antigén koncentrációk közötti korreláció azonban mérsékelt volt ( $r=0,325$ ;  $p=0,005$ ) (18. ábra).

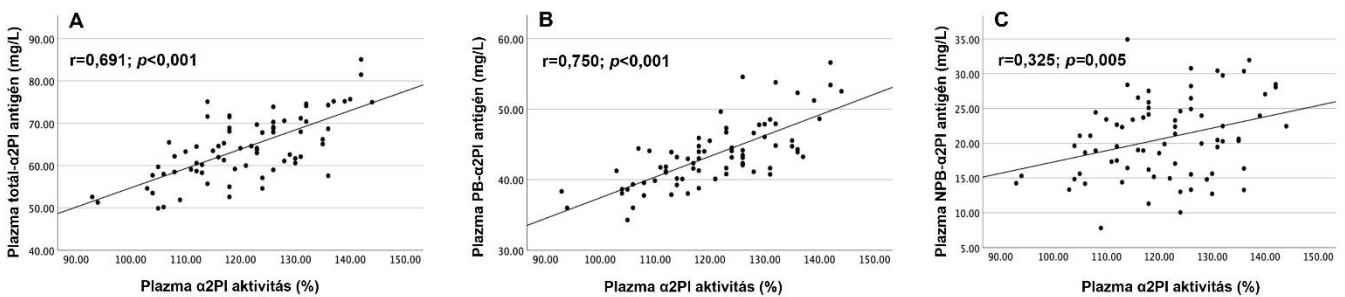
5. táblázat. A vizsgálati csoport jellemzői (n=80)

Paraméterek	Értékek	Referencia tartomány
Kor (év)	33,2 $\pm$ 13,4	-
Nem (férfi %)	36,3	-
<b>Plazma koncentrációk</b>		
FXIII aktivitás (%)	109,70 $\pm$ 26,77	69-143
FXIII-A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> antigén (mg/L)	22,36 $\pm$ 5,07	14-28
Fibrinogén (g/L)	3,42 $\pm$ 0,55	1.5-4.0
Plazminogén (%)	105,0 (95,5-118,5)	75-150
Totál- $\alpha$ 2PI antigén (mg/L)	64,49 $\pm$ 7,56	48-85
PB- $\alpha$ 2PI antigén (mg/L)	43,12 (40,46-45,99)	-
PB- $\alpha$ 2PI % (a totál- $\alpha$ 2PI %-a)	68,03 $\pm$ 6,14	-
NPB- $\alpha$ 2PI antigén (mg/L)	20,83 $\pm$ 5,53	-
PB- $\alpha$ 2PI/NPB- $\alpha$ 2PI arány	2,1 (1,75-2,57)	-

A normál eloszlást mutató értékeket átlag $\pm$ SD, a nem normál eloszlást mutató értékeket pedig medián (IQR) formában adtuk meg.



17. ábra. A FXIII aktivitás és FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigén koncentráció korrelációja. 80 egészséges önkéntes plazma mintájának vizsgálatával kapott eredmények.



18. ábra. Az  $\alpha$ 2PI aktivitás értékek korrelációja a totál- $\alpha$ 2PI (A); PB- $\alpha$ 2PI (B) és NPB- $\alpha$ 2PI (C) antigén koncentrációkkal. 80 egészséges önkéntes plazma minta vizsgálatával kapott eredmények.

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

A plazma minták alvasztását követően meghatároztuk a fibrin alvadékokba bekötődött totál-, PB- és NPB- $\alpha$ 2PI formák mennyiségét. Az eredmények a 6. táblázatban kerültek bemutatásra. A szérum és a fibrin alvadék elválasztását követően a totál- $\alpha$ 2PI-nak a  $44,33 \pm 6,3\%$ -a épült be az alvadékba, melynek  $57,8\%$ -a a PB- $\alpha$ 2PI forma volt. Az eredeti plazmakoncentrációjához képest az alvadékba több NPB- $\alpha$ 2PI épült be, mint PB- $\alpha$ 2PI ( $58,07\%$  és  $37,62\%$ ). A PB- $\alpha$ 2PI 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- $\alpha$ 2PI 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 ( $r=0,322$ ;  $p=0,004$ ).

6. táblázat. A fibrin alvadék  $\alpha 2PI$  tartalma és az alvadéklízis paraméterek ( $n=80$ )

Paraméterek	Átlag $\pm$ SD/Medián (IQR)
<i><math>\alpha 2PI</math> beépülés</i>	
Beépült totál- $\alpha 2PI$ antigén (mg/L)	28.58 $\pm$ 5.6
Beépült totál- $\alpha 2PI$ antigén (plazma totál- $\alpha 2PI$ %-a)	44.33 $\pm$ 6.3
Beépült PB- $\alpha 2PI$ antigén (mg/L)	16.51 $\pm$ 3.8
Beépült PB- $\alpha 2PI$ (plazma PB- $\alpha 2PI$ %-a)	37.62 $\pm$ 6.5
Beépült NPB- $\alpha 2PI$ antigén (mg/L)	12.07 $\pm$ 4.2
Beépült NPB- $\alpha 2PI$ (plazma NPB- $\alpha 2PI$ %-a)	58.07 $\pm$ 13.5
Paraméterek	Átlag $\pm$ SD/Medián (IQR)
<i>Alvadék lízis</i>	
CLT50 (perc)	28.0 (18.0-38.5)
MaxAbsz (OD)	1.26 $\pm$ 0.16
AUC (mODxperc)	22.60 $\pm$ 8.15

A normál eloszlást mutató paraméterek esetén átlag $\pm$ SD, a nem normál eloszlást mutató paramétereket pedig medián (IQR) formában adtuk meg.

### 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. Az alvadéklízist potenciálisan befolyásoló paraméterek (FXIII antigén és aktivitás, fibrinogén, plazminogén, különböző plazma  $\alpha 2PI$  formák, alvadékba beépült  $\alpha 2PI$  formák mennyisége) és az alvadéklízis paraméterek közötti korrelációk a 7. táblázatban találhatóak.

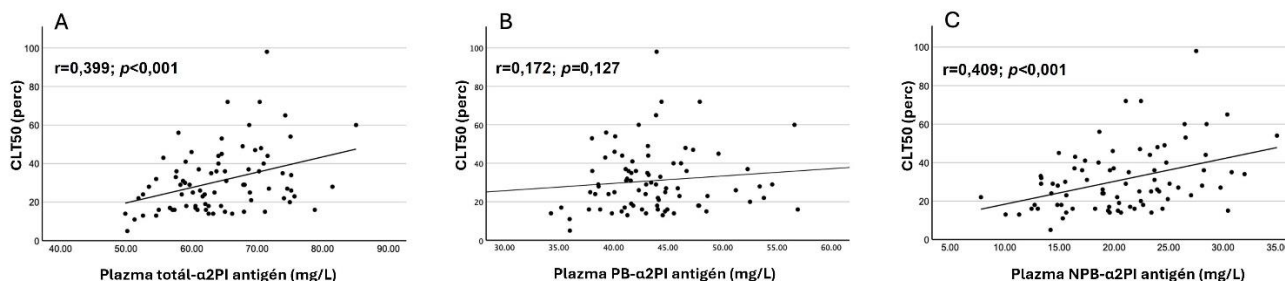
A FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigén és aktivitás emelkedése pozitív hatással volt a MaxAbsz-ra és az AUC-re, míg a CLT50-re nem volt hatással. A fibrinogén szint csak a MaxAbsz-val mutatott korrelációt. A totál- $\alpha 2PI$  plazma koncentráció statisztikailag szignifikáns, pozitív korrelációt mutatott mindhárom lízis görbe paraméterrel, azonban az  $\alpha 2PI$  C-terminális formák plazma koncentrációja esetén ez az összefüggés csak az NPB- $\alpha 2PI$  esetében volt megfigyelhető. A plazma PB- $\alpha 2PI$ /NPB- $\alpha 2PI$  arány szignifikáns negatív korrelációt mutatott a CLT50-nel és az AUC-vel.

Meglepő módon míg a plazma NPB- $\alpha$ 2PI és a beépült NPB- $\alpha$ 2PI antigén koncentrációk statisztikailag szignifikáns, pozitív korrelációt mutattak mind a CLT50, MaxAbsz és AUC értékekkel, addig a PB- $\alpha$ 2PI esetében csak a beépült forma korrelált és csak a MaxAbsz-val (19. ábra, 20. ábra).

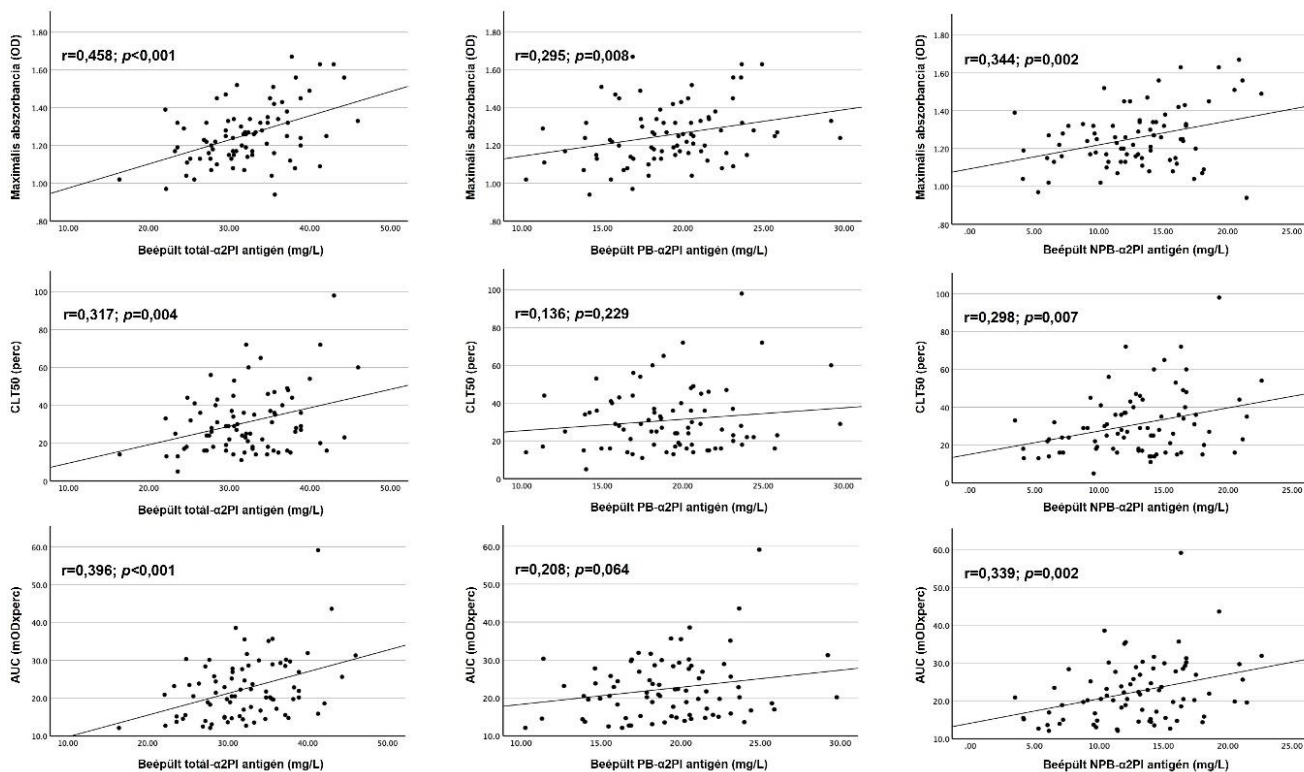
7. táblázat. A FXIII aktivitás és antigén, fibrinogén, plazminogén és a különböző  $\alpha$ 2PI formák plazma szintjének és alvadékba épült mennyiségének korrelációja az alvadéklízis paraméterekkel

Parameter	CLT50	MaxAbsz	AUC
<b>FXIII aktivitás (%)</b>	0,127 (0,261)	<b>0,438</b> (<0,001)	<b>0,332</b> (0,003)
<b>FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigén (mg/L)</b>	0,050 (0,662)	<b>0,374</b> (<0,001)	<b>0,270</b> (0,015)
<b>Fibrinogén (g/L)</b>	0,039 (0,733)	<b>0,518</b> (<0,001)	0,120 (0,291)
<b>Plazminogén aktivitás (%)</b>	0,087 (0,451)	<b>0,434</b> (<0,001)	0,183 (0,112)
<b>Plazma totál-<math>\alpha</math>2PI antigén (mg/L)</b>	<b>0,399</b> (<0,001)	<b>0,249</b> (0,026)	<b>0,349</b> (0,002)
<b>Plazma PB-<math>\alpha</math>2PI antigén (mg/L)</b>	0,172 (0,127)	0,125 (0,270)	0,151 (0,182)
<b>Plazma NPB-<math>\alpha</math>2PI antigén (mg/L)</b>	<b>0,409</b> (<0,001)	<b>0,231</b> (0,040)	<b>0,353</b> (0,001)
<b>Plazma PB-<math>\alpha</math>2PI/NPB-<math>\alpha</math>2PI arány</b>	<b>-0,327</b> (0,003)	-0,172 (0,127)	<b>-0,294</b> (0,008)
<b>Beépült totál-<math>\alpha</math>2PI antigén (mg/L)</b>	<b>0,317</b> (0,004)	<b>0,458</b> (<0,001)	<b>0,396</b> (<0,001)
<b>Beépült PB-<math>\alpha</math>2PI antigén (mg/L)</b>	0,136 (0,229)	<b>0,295</b> (0,008)	0,208 (0,064)
<b>Beépült NPB-<math>\alpha</math>2PI antigén (mg/L)</b>	<b>0,298</b> (0,007)	<b>0,344</b> (0,002)	<b>0,339</b> (0,002)

A táblázatban a Pearson féle korrelációs együtthatót adtuk meg ( $r$  ( $p$ )) formában, az összefüggést  $p < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak, a szignifikáns értékeket félkövér betűvel kiemeltük.



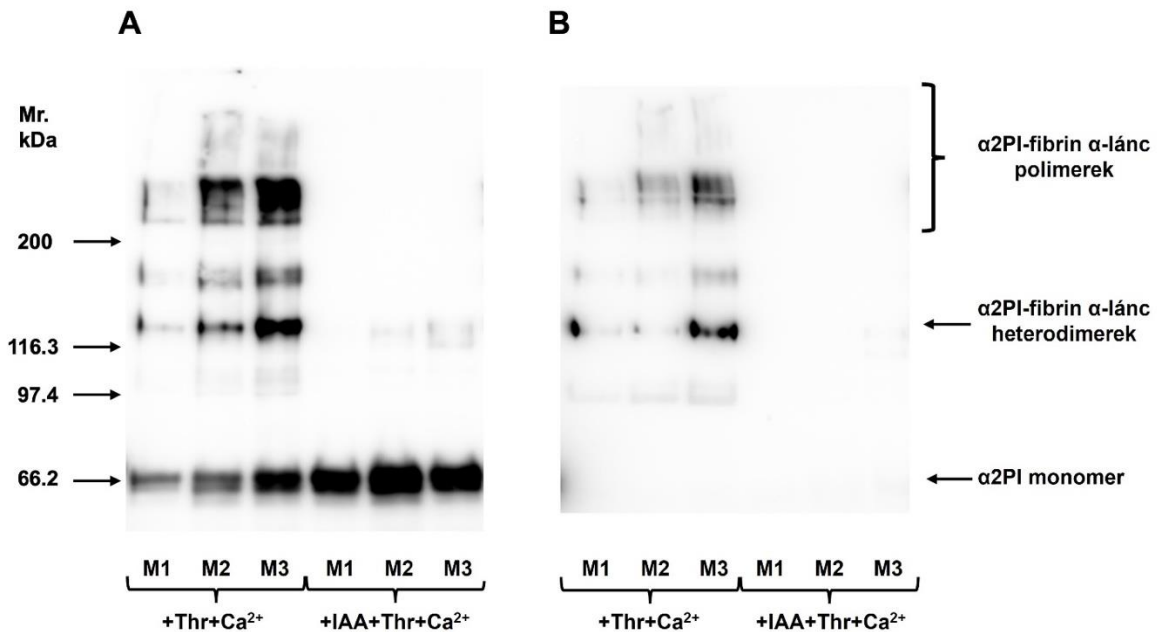
19. ábra. Az  $\alpha$ 2PI formák plazma antigén koncentrációjának korrelációja a CLT50 paraméterrel. Totál- $\alpha$ 2PI (A); PB- $\alpha$ 2PI (B); NPB- $\alpha$ 2PI (C);  $n=80$ .



20. ábra. Korreláció a fibrin alvadékba beépült  $\alpha 2PI$  antigén mennyisége és az alvadéklízis paraméterek között.  $n=80$

#### 5.2.4 Az $\alpha 2PI$ fibrin alvadékba való beépülésének vizsgálata Western blot technikával

Annak vizsgálatára, hogy az  $\alpha 2PI$  formák miként épülnek be a fibrin alvadékba 3 random kiválasztott normál humán plazmát megalvasztottunk thrombin és  $Ca^{2+}$  hozzáadásával, a FXIII inhibitor jóacetamid (IAA) jelenlétében vagy annak hiányában. Az alvadékokat intenzíven mostuk, majd feloldottuk és Western blottal analizáltuk. Poliklonális anti- $\alpha 2PI$  antitestet használtunk a fibrin alvadékba beépült összes  $\alpha 2PI$  forma kimutatására (21. A ábra). A PB- $\alpha 2PI$  forma lokalizációjának meghatározásához arra specifikus monoklonális antitestet alkalmaztunk (21. B ábra). A fibrin  $\alpha$ -láncához és  $\alpha$ -polimerekhez keresztkötött  $\alpha 2PI$  mindkét jelölés esetén, míg a monomer  $\alpha 2PI$  (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  $\alpha 2PI$  jelenléte volt detektálható. Ez a nem kovalensen kötött  $\alpha 2PI$  feltehetően az NPB- $\alpha 2PI$  forma, mivel a PB- $\alpha 2PI$ -ra specifikus antitest nem adott reakciót ebben a sávban.

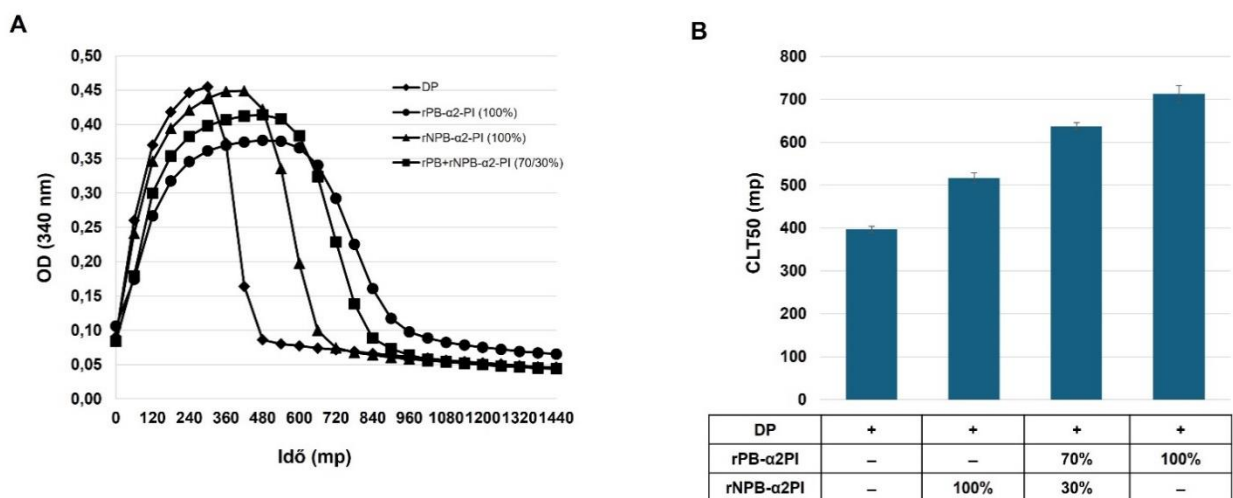


**21. ábra.  $\alpha 2PI$  formák fibrin alvadékba való beépülésének vizsgálata Western blot technikával.** Thrombin (*Thr*) és  $Ca^{2+}$  hozzáadásával, FXIII inhibitor jódetamid (*IAA*) jelenlétében vagy annak hiányában megvalasztott három random kiválasztott normál humán plazma minta. A fibrin alvadékba beépült  $\alpha 2PI$  formák kimutatása: poliklonális anti- $\alpha 2PI$  antitesttel az össz- $\alpha 2PI$  forma (A); PB- $\alpha 2PI$ -re specifikus monoklonális antitesttel a PB- $\alpha 2PI$  forma (B). Az  $\alpha 2PI$  fibrin  $\alpha$ -lánchoz és  $\alpha$ -polimerekhez kereszt kötődve mindkét jelölés esetén, míg a monomer  $\alpha 2PI$  (nem kovalensen kötődő) reakciója csak a poliklonális antitest jelölése mellett volt látható. *IAA* jelenlétében a FXIII gátolt volt, ezért kovalens kötés hiányában csak a monomer  $\alpha 2PI$  jelenléte volt detektálható. Ez a nem kovalensen kötött  $\alpha 2PI$  feltehetően az NPB- $\alpha 2PI$  forma, mivel a PB- $\alpha 2PI$ -ra specifikus antitesttel nem reagált.

### 5.2.5 Mesterséges plazma mintákban történő fibrin alvadéklízis vizsgálata

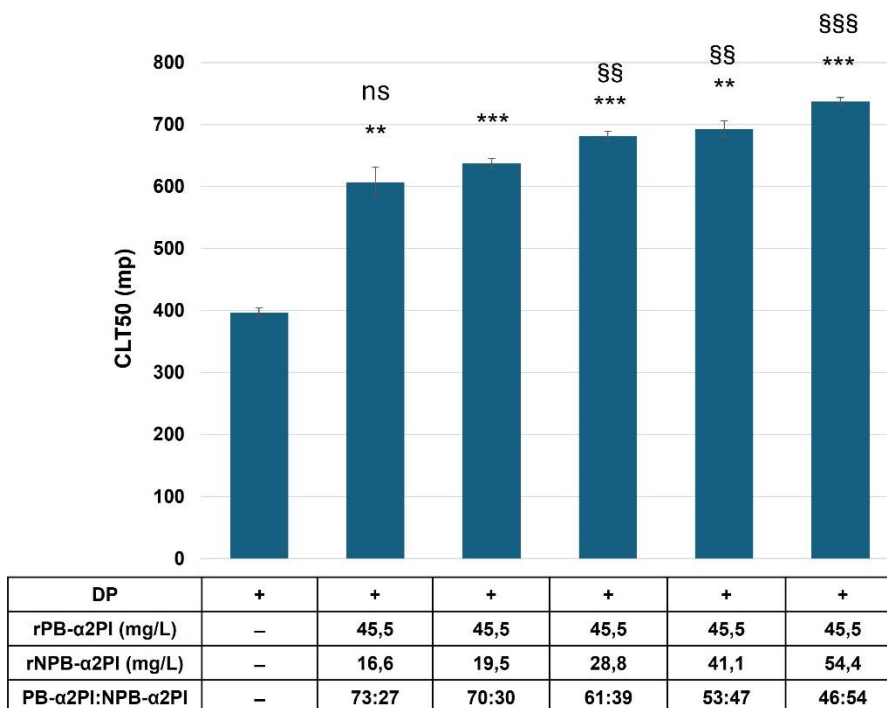
Eredményeink tehát azt mutatták, hogy a PB- $\alpha 2PI$  és NPB- $\alpha 2PI$  formák plazma koncentrációja az alvadéklízis paramétereivel összefüggést mutat, valamint eltérő módon, de mindkét forma beépül a fibrin alvadékba. Ugyanakkor az  $\alpha 2PI$  N-terminális heterogenitása és a plazma mintákban fellépő más befolyásoló tényezők eltérései igencsak megnehezítik a C-terminus hasításából adódó valódi különbségek vizsgálatát. Ennek kiküszöbölésére olyan plazma mintákat készítettünk, amelyek csak az  $\alpha 2PI$  C-terminus formáinak mennyiségében, illetve arányaiban tértek el egymástól.  $\alpha 2PI$ -hiányplazmát rekombináns Met-PB- és/vagy Met-NPB- $\alpha 2PI$ -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  $\alpha$ 2PI formák jelenlétében megnyúlt lízisidőt tapasztaltunk. Az alvadéklízis görbéket a 22. A ábra szemlélteti. 100%-os PB forma (65 mg/L) jelenlétében a CLT50 80%-kal nőtt az  $\alpha$ 2PI-hiányplazmához képest, míg a 100%-os NPB- $\alpha$ 2PI forma (65 mg/L) jelenlétében a lízisidő 30%-kal nőtt (22. B ábra).



**22. ábra. Rekombináns Met-PB- és/vagy Met-NPB- $\alpha$ 2PI hatása az alvadéklízis időre. Lízis görbe (A); 50%-os lízisidő (B). Az ábrán három mérési eredmény átlag $\pm$ SD formában van megadva; 65 mg/L=100%  $\alpha$ 2PI.**

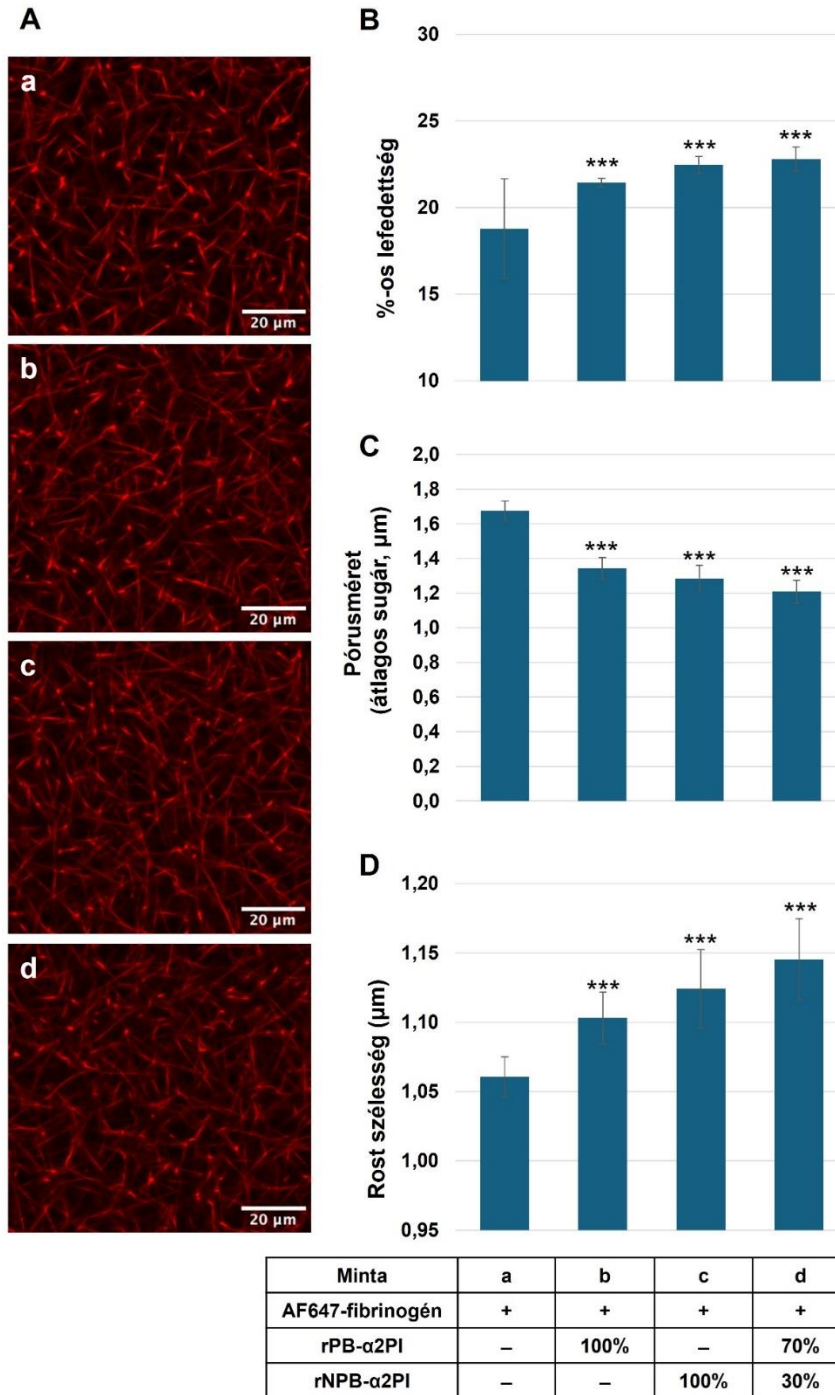
Megvizsgáltuk az NPB- $\alpha$ 2PI mennyiség növelésének hatását a lízisidőre a PB- $\alpha$ 2PI állandó mennyisége mellett is (23. ábra). Az NPB- $\alpha$ 2PI forma arányának növelésével párhuzamosan a lízisidő is növekedett, enyhén, de statisztikailag szignifikáns módon. A legmagasabb mennyiségű NPB- $\alpha$ 2PI mellett 21%-os növekedést tapasztaltunk a 73:27%-os PB- $\alpha$ 2PI: NPB- $\alpha$ 2PI arányhoz képest (23. ábra).



23. ábra. NPB- $\alpha$ 2PI mennyiség növelésének hatása a lízisidőre a PB- $\alpha$ 2PI forma állandó mennyisége mellett. A CLT50 értékek három mérési eredménye átlag $\pm$ SD formában megadva; 65 mg/L=100%  $\alpha$ 2PI; \*\*  $p<0,01$  és \*\*\*  $p<0,001$  az  $\alpha$ 2PI hiányos plazmához képest; *ns* nem szignifikáns, §§  $p<0,01$  és §§§  $p<0,001$  a 70:30 PB- $\alpha$ 2PI:NPB- $\alpha$ 2PI arányhoz képest.

### 5.2.6 Mesterséges plazma mintákban történő fibrinháló struktúra vizsgálata

A következő lépésben az  $\alpha$ 2PI-hiányplazmát AF647-jelölt fibrinogénnel egészítettük ki, valamint rekombináns Met-PB- és/vagy Met-NPB- $\alpha$ 2PI-t különböző mennyiségben adtunk hozzá. A plazmák alvasztását követően, az alvadék szerkezetét konfokális lézer scanning mikroszkópiával elemeztük. A 24. ábra mutatja be az  $\alpha$ 2PI formák különböző arányainak hatását a keletkezett fibrin alvadék szerkezetére. A mennyiségi elemzéshez meghatároztuk a terület %-os lefedettségét, a pórusméretet és a fibrin szálak vastagságát.



**24. ábra.** Rekombináns Met-PB- és/vagy Met-NPB- $\alpha$ 2PI hatása a fibrin alvadék szerkezetére. Felvételek konfokális lézer scanning mikroszkóppal a fibrin alvadékokról (minták a-d) (A). Az oszlopdiagrammok a %-os területi lefedettséget (B), a pórusméretet (C), és a fibrinszál vastagságot (D) reprezentálják. Az eredmények megadása 22 felvétel/csatorna kiértékelésével számított átlag $\pm$ SD formában történt; 100%=65 mg/L  $\alpha$ 2PI, mindkét forma esetében; \*\*\* $p$ <0,001 az  $\alpha$ 2PI-hiányplazmához képest.

Összehasonlítva az  $\alpha 2$ PI-nélkül készült fibrin alvadékkal, a %-os lefedettség jelentősen megnövekedett a PB- és/vagy NPB formák jelenlétében (24. B ábra), míg a pórusméret csökkent (24. C ábra), és vastagabb fibrin szálak (24. D ábra) 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 FXIIIa hatása a VSMC-k funkcióira

A VSMC-k normál esetben az érfal középső, media rétegében helyezkednek el, nyugvó állapotban (kontraktilis fenotípus). Ám valamilyen fiziológiai és/vagy patológiai hatás, környezeti ingerek hatására fenotípusváltásra is képesek [30-33,99]. Sérülés, gyulladás vagy különböző növekedési faktorok más és más funkciójú fenotípus felvételére készítik a s VSMC-keket. A szintetikus fenotípus leginkább érfalsérülés vagy atheroszklerózis folyamataiban aktiválódik, ily 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-keket. Az érlelmeszesedésre jellemző patológiás, kalcifikációs környezet során a VSMC-keket oszteoblaszt-szerű sejtekké differenciálódnak. Mivel a cFXIII-ot kimutatták az oszteoblasztokban is, először azt vizsgáltuk, hogy a VSMC-keket oszteoblasztos differenciációja társul-e a FXIII-A expressziójával. Azonban a VSMC-keket oszteoblasztos transzformációja, amit az oszteoblasztokra jellemző differenciációs markerek expressziója igazolt, a celluláris FXIII expressziójával nem járt együtt. Mivel a VSMC-keket nem termelnek cFXIII-ot, a további kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy a sejtekhez kívülről hozzáadott XIII-as faktor befolyásolja-e a funkciójukat. Az érfalban található extracelluláris FXIII-A 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 [1,100-104]. A plakkokban keletkező thrombin könnyen aktiválhatja a FXIII-ot, mely hatással lehet a VSMC-keket funkcióira is [2,105]. Munkánk további részében az aktivált FXIII hatását vizsgáltuk a VSMC-kekre, 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 kollagénnak a szekréciójára és a TSP-1 expresszióra való hatást vizsgáltuk.

A sejtproliferációs kísérletek eredményei azt mutatták, hogy az aktivált FXIII, a plazma koncentráció alatti tartományban is fokozta a HAoSMC-keket sejtosztódását. 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 VSMC-keket 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 aktivált plazma FXIII fokozza az endothél sejtek migrációját és proliferációját, valamint csökkenti az apoptózist. Hasonló hatást írtak le monocitákkal végzett kísérletekben is [39,41]. A fibroblasztokra kifejtett hatása a FXIII-nak kevésbé volt egyértelmű. Míg a bőr eredetű fibroblasztok migrációját jelentősen fokozta az 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 aktivált FXIII az endothél sejtek, monociták és a bőr eredetű fibroblasztok sejtfelületén lévő vitronektin receptor ( $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  integrin) és VEGFR-2 növekedési faktor receptor között keresztkötés kialakítására képes [41]. 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-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> 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, mindamellett csökkent a fibronektin és az I. típusú kollagén szekréciója és a sejtfelületről való leválása is [106]. A saját kísérleteinkben a VSMC-k általi kollagén termelés fokozódását és az extracelluláris mátrixba való beépülését az aktivált FXIII-nak a plazmakoncentráció és az a fölötti mennyiségben való adása esetén figyeltük meg. A proliferáció és migráció fokozásához alacsonyabb FXIIIa jelenlétére volt szükség. Mindazonáltal, az FXIIIa szerepet játszhat a VSMC-k fenotípusváltásában, mely során azok kontraktilis, nyugvó állapotból szintetikusvá válnak, és a fokozott kollagéntermeléssel, a kollagén extracelluláris mátrixba való beépítésével stabilizálhatják az érfalban kialakult plakkokat [31].

Számos *in vitro* és *in vivo* tanulmány leírta az FXIIIa az angiogenezisre gyakorolt hatását, a TSP-1 szintézissel összefüggésben [26,39,40,107]. 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 angiogenesis során, a TSP-1 hiányát az aktivált XIII-as faktorról hozták összefüggésbe. Egy másik állatmodelben, *in vivo* egerekben végzett heterotópiás szívatültetés során az FXIIIa-mal történő kezelés angiogenesis vizsgálat céljából történt. A kísérletek során a kezelés hatására jelentősen csökkentett a TSP-1 mRNS szintje is [21].

Az aktivált XIII-as faktor az atheroszklerotikus 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 funkcióit 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 sejt típusok esetében, hanem a szekretált TSP-1 egy része a sejtekhez kötött maradt. Annak megállapítására, hogy milyen szerepe lehet a sejtekhez kötött TSP-1-nek, további kísérletek szükségesek.

## **6.2 Az $\alpha$ 2PI heterogenitásának hatása az alvadéklízisre és az alvadékszerkezetre**

Az  $\alpha$ 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 aktivált FXIII 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  $\alpha$ 2PI formák plazmaszintjének és relatív arányának hatását azok fibrinalvadékba való beépülésére, az alvadék szerkezetére és lízisére. Az  $\alpha$ 2PI aktivitás és antigén koncentráció párhuzamos mérésével megerősítettük azt a korábbi feltételezést, miszerint az aktivitás meghatározására kifejlesztett tesztek eredménye csak a PB- $\alpha$ 2PI koncentrációjával mutat erős

korrelációt, az NPB forma mennyisége csak enyhén befolyásolja, illetve a két forma relatív aránya a plazmában nem befolyásolja a mért  $\alpha$ 2PI aktivitást [57,108].

A korábbi közleményekben leírt eredményeket az  $\alpha$ 2PI fibrinalvadékba való beépüléséről az alkalmazott módszerek nagymértékben befolyásolták. Egy Laurell immunoelektroforézis technikát alkalmazó vizsgálat során a totál- $\alpha$ 2PI antigén szint a szérumban a plazmához képest  $18\pm 9\%$ -kal ( $n=12$ ) csökkent, míg az azonnali plazmin gátlási teszttel  $35\pm 6\%$  gátlást mutattak ki [91]. Hatvanöt véradó esetében az  $\alpha$ 2PI aktivitásban  $32,3\%$ -os különbséget mértek a plazma és szérum szintek között [109]. 6M ureában feloldott alvadékokban mért totál- $\alpha$ 2PI-ből csak egy kis mennyiségű fibrinalvadékhoz kötött  $\alpha$ 2PI-t, számszerűen  $83,2\pm 15,4$  mg/L-ből  $1,35\pm 0,18$  mg/L-t sikerült kimutatni ELISA technikával [110]. Az Uitte de Willige és munkatársai által kifejlesztett módszer segítségével, a fluoreszcens módon jelzett  $\alpha$ 2PI-specifikus antitesttel jelölt, alvadékba beépült  $\alpha$ 2PI arányát határozták meg. Öt egészséges véradótól származó Na-citráttal alvadéggátolt plazmából készült alvadékban  $39\pm 4,9\%$  kötött  $\alpha$ 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 [111]. 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  $\alpha$ 2PI mennyiségét, valamint ezek arányát.

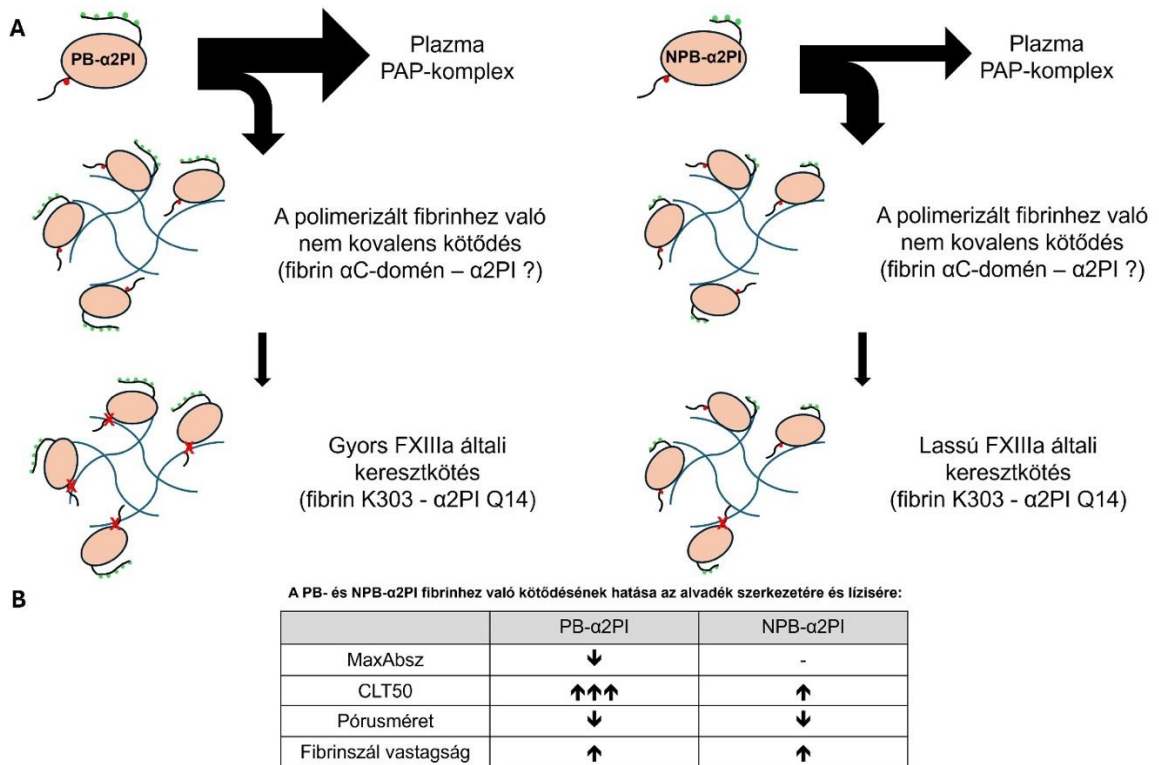
Tanulmányunk során 80 egészséges önkéntes mintájában (plazma- és az azokból készített szérumminták) párhuzamosan meghatároztuk a totál-, PB- és NPB- $\alpha$ 2PI antigén koncentrációkat. Az alvadékba beépült mennyiségeket a plazmában és a hozzá tartozó szérummintában mért koncentrációk különbsége alapján 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 [112]. Eredményeink azt mutatták, hogy a totál- $\alpha$ 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 ( $45\%$ ) [88,89]. 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 az FXIIIa a fibrin  $\alpha$ -láncokhoz, viszont

nem kovalens módon a fibrinhez kötődve nem detektálható. Ez megerősíti Klufft és munkatársai korábbi eredményeit [91]. A poliklonális antitesttel történő jelölés során nem keresztkött  $\alpha 2\text{PI}$  monomer abban az esetben is látható volt a blot-on, 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-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> szintek szignifikáns korrelációt mutattak a PB forma beépülésével, viszont az NPB forma beépülésével nem. Korábbi kísérletek azt bizonyítják, hogy a PB- $\alpha 2\text{PI}$  forma FXIIIa általi keresztköttése a fibrinháléhoz elengedhetetlen az idő előtti alvadéklízis megakadályozásához. Ezért meglepő volt az az eredmény, mely szerint sem a FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> plazmaszintek, sem a PB- $\alpha 2\text{PI}$  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  $\alpha 2\text{PI}$ -hiányplazmát egészítettünk ki teljes hosszúságú és/vagy C-terminálisan trunkált rekombináns  $\alpha 2\text{PI}$ -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- $\alpha 2\text{PI}$ , 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  $\alpha 2\text{PI}$  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 vastagabb fibrinszálak kialakulásáról számoltak be, melyeket megnyúlt lízisidő és csökkent áteresztőképesség kísért [113]. Ezen utóbbi megállapításokkal állnak összhangban az általunk kapott eredmények. Azonban, kísérleteinkben az  $\alpha 2\text{PI}$  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 25. ábra összegzi az irodalmi adatok és a saját eredményeink alapján feltételezett mechanizmusokat, amelyek révén az  $\alpha 2PI$  C-terminális változatai befolyásolhatják a fibrinszálak tulajdonságait és az alvadék lízisét.



**25. ábra. A PB- és NPB- $\alpha 2PI$  fibrinalvadék tulajdonságaira és az alvadék lebontására gyakorolt hatását leíró feltételezett mechanizmusok.** A PB- és NPB- $\alpha 2PI$  kötődése a fibrinhez: a PB- $\alpha 2PI$  nagyobb mennyiségben kötődik az alvadékba, mint az NPB- $\alpha 2PI$ ; azonban a fibrinhez kötődő frakció mennyisége az eredeti plazmakoncentrációhoz viszonyítva alacsonyabb a PB forma esetén. (A nyílak vastagsága tükrözi a kísérleteink során észlelt koncentrációs arányokat.) A fibrinnel való nem kovalens kölcsönhatás helye az  $\alpha 2PI$  molekulában ismeretlen, viszont mivel a kölcsönhatás Lys-független, valószínűleg nem a C-terminális részen található [75]. Amikor megfelelő mennyiségben van jelen az aktivált FXIII (FXIIIa), a PB- $\alpha 2PI$  gyorsan keresztkötődik a fibrinhez, és nem kovalens módon kötött monomerként nem detektálható az alvadékban. A maradék kovalens, inaktív komplexet (PAP-komplex) képez a keringő plazmával. Ezzel szemben az NPB- $\alpha 2PI$  a FXIIIa számára kevésbé jó szubsztrát, így nagyobb mennyiségben van az alvadékban nem kovalensen kötött formában. A zöld pontok az  $\alpha 2PI$  C-terminális részen található Lys aminosavakat jelölik, amelyek fontosak a plazmin(ogén)hez való kötődés

*szempontjából. A piros ponttal a FXIIIa általi keresztkötési helye (Q14) jelölt, míg a piros 'X' a kovalens keresztkötést jelzi. Az NPB- $\alpha$ 2PI variáns esetében az utolsó két Lys aminosav biztosan hiányzik, ami jelentősen befolyásolja a plazmin(ogén)nel való interakcióját, ennek következtében ez a variáns 10-szer gyengébben gátolja a plazmin(ogén)t [114] (A). A PB- és NPB- $\alpha$ 2PI fibrinhez való kötődésének hatása a fibrinalvadék szerkezetére és annak lebontására: a PB- $\alpha$ 2PI koncentrációfüggő módon csökkenti az alvadék maximális abszorbanciáját és jelentősen megnyújtja az alvadék lízis idejét. Ezzel szemben az NPB- $\alpha$ 2PI-nak nincs jelentős hatása a maximális abszorbanciára, és csak mérsékelt hatása van a lízisidőre. Mindkét variáns csökkenti a pórusméretet és növeli a fibrin szálak vastagságát (B).*

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- $\alpha$ 2PI szint mellett változatlan C-terminális hasítási arányt mutattak ki [115]. Baráth B vénás tromboembóliát követően emelkedett totál- $\alpha$ 2PI plazma szintet detektált, mely emelkedés az NPB forma emelkedésének volt köszönhető [57]. 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  $\alpha$ 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- $\alpha$ 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%-kal [116]. 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- $\alpha 2$ PI-specifikus antitesttel való reakció hiánya a monomer  $\alpha 2$ PI-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  $\alpha 2$ PI C-terminális végét ismeri fel és nem reagál a nem plazminogénkötő formával.

## 7. Új megállapítások

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 sejtmigráció 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  $\alpha$ 2PI formák (NPB- $\alpha$ 2PI: plazminogént nem kötő, trunkált forma; PB- $\alpha$ 2PI: 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- $\alpha$ 2PI is jelentős mértékben kötődik a fibrinhez. Az eredeti plazmakoncentrációjukhoz képest az alvadékba nagyobb arányban épül be az NPB- $\alpha$ 2PI, mint a PB- $\alpha$ 2PI. Az NPB- $\alpha$ 2PI forma kötődése a fibrinhez nem kovalens kölcsönhatás, szemben a PB- $\alpha$ 2PI forma FXIIIa által mediált kovalens keresztkötésével.
4. A fibrinnel keresztkötött PB- $\alpha$ 2PI hatásán kívül az NPB- $\alpha$ 2PI beépülésének mértéke is befolyásolja az alvadék plazmin általi feloldását. Vizsgálataink során mind a plazma, mind a fibrin alvadékba beépült NPB- $\alpha$ 2PI szint szignifikáns, pozitív korrelációt mutatott az

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

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

## 8. 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.

## 9. Summary

Factor XIII exists in two forms: plasma (pFXIII) and cellular (cFXIII). The activated form (FXIIIa) ensures clot stability by cross-linking fibrin strands and binding  $\alpha$ 2-plasmin inhibitor ( $\alpha$ 2PI) to fibrin. It also plays a role in angiogenesis, wound healing, and maintenance of pregnancy. cFXIII can be detected in thrombocytes, monocytes/macrophages, and osteoblasts, among other cells. The direct effect of FXIII-A on endothelial cells and fibroblasts, which play a role in the formation of atherosclerotic plaques, has been demonstrated previously. Depending on environmental factors, vascular smooth muscle cells can differentiate into osteoblast-like cells in plaques, so we investigated whether this differentiation is associated with FXIII-A expression and whether extracellular FXIII-A has an effect on the functions of smooth muscle cells. Osteoblast transformation was not associated with cFXIII expression. Nonactivated FXIII-A had no effect on the various functions of smooth muscle cells. FXIIIa enhanced the proliferation of smooth muscle cells even at concentrations lower than plasma concentrations. *In vitro* wound closure experiments confirmed the combined effect of FXIIIa on proliferation and migration. FXIIIa enhanced collagen synthesis and incorporation into the extracellular matrix. FXIIIa treatment did not alter the expression level of thrombospondin-1 (TSP-1), but the amount released into the medium decreased, with part of the TSP-1 formed remaining bound to the cells. These effects of FXIIIa may play a role in the pathogenesis of atherosclerotic plaques.

$\alpha$ 2PI undergoes proteolytic cleavages in plasma, resulting in a heterogeneous structure with functional consequences. The form cleaved at the C-terminal end loses its plasminogen-binding site and is therefore much slower to inhibit plasmin (NPB- $\alpha$ 2PI), while FXIIIa is primarily able to cross-link fibrin with the plasminogen-binding, uncleaved form (PB- $\alpha$ 2PI). The effect of the NPB- $\alpha$ 2PI form on fibrinolysis has been less studied. In our present work, we investigated the relationship between the amount of  $\alpha$ 2PI C-terminal isoforms and various plasma parameters, their incorporation into the fibrin clot, and their effect on the structure and lysis of the clot. The total  $\alpha$ 2PI incorporated into the clot was  $44.3 \pm 6.3\%$ , and the PB- $\alpha$ 2PI:NPB- $\alpha$ 2PI ratio was 1.37, indicating that a significant amount of NPB- $\alpha$ 2PI also binds to the clot in a non-covalent manner. The plasma level of NPB- $\alpha$ 2PI and the amount incorporated into the clot showed a significant correlation with clot lysis parameters (CLT50, MaxAbs, AUC). In *in vitro* experiments, the NPB form also prolonged clot lysis time, albeit to a lesser extent than PB- $\alpha$ 2PI. Both C-terminal variants of  $\alpha$ 2PI affected the structure of fibrin clots, increasing the thickness of fibrin strands and reducing the pore size. According to our results, in addition to FXIIIa-crosslinked PB- $\alpha$ 2PI, NPB- $\alpha$ 2PI, which binds noncovalently to the clot, also affects the structure and dissolution of the clot; therefore, it would be worthwhile to further investigate the effect of heterogeneity in different pathological conditions.

## 10. Irodalomjegyzék

1. Mitchell, J.L.; Mutch, N.J. Let's cross-link: Diverse functions of the promiscuous cellular transglutaminase factor XIII-A.J. *Thromb. Haemost.* **2019**; 17, 19–30.
2. Muszbek, L.; Bereczky, Z.; Bagoly, Z.; Komáromi, I.; Katona, É. Factor XIII: A Coagulation Factor With Multiple Plasmatic and Cellular Functions. *Physiol. Rev.* **2011**; 91, 931–972.
3. Balogh, E.; Tóth, A.; Tolnai, E.; Bodó, T.; Bányai, E.; Szabó, D.J.; Petrovski, G.; Jeney, V.: Osteogenic differentiation of human lens epithelial cells might contribute to lens calcification. *Biochim. Biophys. Acta BBA.* **2016**; 1862, 1724–1731.
4. Katona E, Haramura G, Karpati L, Facht J, Muszbek L: A simple, quick one-step ELISA assay for the determination of complex plasma factor XIII (A2B2). *Thromb Haemost.* **2000**; 83(2):268-273.
5. Muszbek L., Yee V. C., Hevessy Z.: Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res.* **1999**; 94 (5):271-305.
6. Mitchell, J.L.; Mutch, N.J.: Novel aspects of platelet factor XIII function. *Thromb. Res.* **2016**; 141, S17–S21.
7. Muszbek, L.; Adány, R.; Szegedi, G.; Polgár, J.; Kávai, M.: Factor XIII of blood coagulation in human monocytes. *Thromb. Res.* **1985**; 37, 401–410.
8. Adány, R.; Belkin, A.; Vasilevskaya, T.; Muszbek, L.: Identification of blood coagulation factor XIII in human peritoneal macrophages. *Eur. J. Cell Biol.* **1985**; 38, 171–173.
9. Al-Jallad, H.F.; Nakano, Y.; Chen, J.L.; McMillan, E.; Lefebvre, C.; Kaartinen, M.T. Transglutaminase activity regulates osteoblast differentiation and matrix mineralization in MC3T3-E1 osteoblast cultures. *Matrix Biol.* **2006**; 25, 135–148.
10. Nurminskaya, M.; Kaartinen, M.T.: Transglutaminases in mineralized tissues. *Front. Biosci.* **2006**; 11, 1591–1606.
11. Nurminskaya, M.; Magee, C.; Nurminsky, D.; Linsenmayer, T.F.: Plasma Transglutaminase in Hypertrophic Chondrocytes: Expression and Cell-specific Intracellular Activation Produce Cell Death and Externalization. *J. Cell Biol.* **1998**; 142, 1135–1144.
12. Orosz, Z.Z.; Bárdos, H.; Shemirani, A.H.; Debreceni, I.B.; Lassila, R.; Riikonen, A.S.; Hovinga, J.A.K.; Seiler, T.G.; van Dorland, H.A.; Schroeder, V.; et al.: Cellular Factor XIII, a Transglutaminase in Human Corneal Keratocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**; 20, 5963.

13. Cora M L Beckers; Kingsley R Simpson; Kathryn J Griffin; Jane M Brown; Lih T Cheah; Kerrie A Smith; Jean Vacher; Paul A Cordell; Mark T Kearney; Peter J Grant; Richard J Pease: Cre/lox Studies Identify Resident Macrophages as the Major Source of Circulating Coagulation Factor XIII-A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2017**; 37(8):1494-1502.
14. Katona E, Penzes K, Csapo A, Fazakas F, Udvardy ML, Bagoly Z, Orosz ZZ, Muszbek L: Interaction of factor XIII subunits. *Blood.* **2014**; 123(11):1757-1763.
15. Françoise Bridey, Claude Négrier, Cedric Duval, Robert Ariëns, Philippe de Moerloose, Alessandro Casini: Impaired factor XIII activation in patients with congenital afibrinogenemia. *Haematologica.* **2019**; Mar;104(3):e111–e113.
16. Sourì M., Osaki T., Ichinose A.: The Non-catalytic B Subunit of Coagulation Factor XIII Accelerates Fibrin Cross-linking. *The Journal of Biological Chemistry.* **2015**; 290(19):12027–12039.
17. Ichinose A., McMullen B. A., Fujikawa K., Davie E. W.: Amino acid sequence of the b subunit of human factor XIII, a protein composed of ten repetitive segments. *Biochemistry.* **1986**; 25(16):4633-8
18. Muszbek L., Polgar J., Boda Z.: Platelet factor XIII becomes active without the release of activation peptide during platelet activation. *Thromb Haemost.* **1993**; 69 (3):282-285.
19. Richardson V. R., Cordell P., Standeven K. F., Carter A. M.: Substrates of Factor XIII-A: roles in thrombosis and wound healing. *Clinical Science.* **2013**; 124:123-127.
20. Mitchell JL; Lionikiene AS; Fraser SR; Whyte CS; Booth NA; Mutch NJ.: Functional factor XIII-A is exposed on the stimulated platelet surface. *Blood.* **2014**; 124: 3982–90.
21. Bagoly Z, Koncz Zs, Hársfalvi J, Muszbek L: Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thrombosis Research.* **2012**; 129 382-387.
22. Komaromi, I.; Bagoly, Z.; Muszbek, L.: Factor XIII: novel structural and functional aspects. *J Thromb Haemost.* **2011**; 9, (1), 9-20.
23. Karimi, M.; Bereczky, Z.; Cohan, N.; Muszbek, L.: Factor XIII Deficiency. *Semin Thromb Hemost* **2009**; 35, (4), 426-38.
24. Muszbek, L.; Katona, E.: Diagnosis and Management of Congenital and Acquired FXIII Deficiencies. *Semin Thromb Hemost.* **2016**; 42, (4), 429-39.
25. Duckert, F.: The fibrin-stabilizing factor, factor XIII. *Blut.* **1973**; 26, (3), 177-9.

26. Dardik R, Loscalzo J, Inbal A.: Factor XIII (FXIII) and angiogenesis. *J Thromb Haemost.* **2006**; 4:19–25.
27. Soendergaard C., Kvist P. H., Seidelin J. B., Nielsen O. H.: Tissue-regenerating functions of coagulation factor XIII. *J Thromb Haemost.* **2013**; 11:806–16.
28. Raines E. W.: The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease. Blackwell Science Ltd. *Int. J. Exp. Path.* **2000**; 81:173-182
29. Renata Mazurek, Jui M. Dave<sup>1</sup>, Rachana R. Chandran, Ashish Misra, Abdul Q. Sheikh, and Daniel M. Greif.: Vascular cells in blood vessel wall development and disease. *Adv Pharmacol.* **2017**; 78: 323–350.
30. Basatemur, G.L.; Jørgensen, H.F.; Clarke, M.; Bennett, M.; Mallat, Z.: Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* **2019**; 16, 727–744.
31. Miano, J.M.; Fisher, E.A.; Majesky, M.W.: Fate and State of Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation* **2021**; 143, 2110–2116.
32. Durham, A.L.; Speer, M.Y.; Scatena, M.; Giachelli, C.M.; Shanahan, C.M.: Role of smooth muscle cells in vascular calcification: Implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc. Res.* **2018**; 114, 590–600.
33. Bennett, M.R.; Sinha, S.; Owens, G.K.: Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ. Res.* **2016**; 118, 692–702.
34. Turoverova L. V., Khotin M. G., Yudintseva N. M., Magnusson K. -E., Blinova M. I., Pinaev G. P., Tentler D. G.: Analysis of extracellular matrix proteins produced by cultured cells. *Cell Tiss. Biol.* **2009**; 3(5):497-502.
35. Gerthoffer W. T.: Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Cell Migration. *Circ Res.* **2000**; 100:607-621.
36. Kathryn J. Griffina, Laura M. Newellb, Kingsley R. Simpsona, Cora M.L. Beckersa, Mark J. Drinkhilla, Kristina F. Standevena, Lih T. Cheaha, Siiri E. Iismaac, Peter J. Granta, Christopher L. Jacksonb, Richard J. Peasea: Transglutaminase 2 limits the extravasation and the resultant myocardial fibrosis associated with factor XIII-A deficiency. *Atherosclerosis.* **2020**; Feb:294:1-9.
37. Nishida N., Yano H., Nishida T., Toshiharu Kamura T., Kojiro M.: Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management.* **2006**; 2(3):213–219.

38. Sárváry A., Szűcs S., Balogh I., Becsky Á., Bárdos H., Kávai M., Seligsohn U., Egbring R., Lopaciuk S., Muszbek L., Ádány R.: Possible role of factor XIII subunit A in Fc and complement receptor-mediated phagocytosis. *Cellular Immunology*. **2004**; 228:81–90
39. Dardik, R.; Solomon, A.; Loscalzo, J.; Eskaraev, R.; Bialik, A.; Goldberg, I.; Schiby, G.; Inbal, A.: Novel proangiogenic effect of factor XIII associated with suppression of thrombospondin 1 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2003**; 23, (8), 1472-7.
40. Dardik, R.; Loscalzo, J.; Eskaraev, R.; Inbal, A.: Molecular mechanisms underlying the proangiogenic effect of factor XIII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2005**; 25, (3), 526-32.
41. Dardik, R.; Krapp, T.; Rosenthal, E.; Loscalzo, J.; Inbal, A., Effect of FXIII on monocyte and fibroblast function. *Cell Physiol Biochem*. **2007**; 19, (1-4), 113-20.
42. Camaréa, C.; Pucellea, M.; Nègre-Salvayrea, A.; Salvayrea, R.: Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. *Redox Biol*. **2017**; 12,18-34.
43. Chistiakov, D. A.; Melnichenko, A. A.; Myasoedova, V.A.; Grechko, A.; Orekhov, A. N.: Thrombospondins: A Role in Cardiovascular Disease. *Int.J. Mol. Sci*. **2017**;18,1540
44. Streit, M.; Riccardi, L.; Velasco, P.; Brown, L.F.; Hawighorst, T.; Bornstein, P.; Detmar, M.: Thrombospondin-2: A potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**; 96, 14888–14893.
45. Lawler, J.: Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J. Cell. Mol. Med*. **2002**; 6, 1–12.
46. Somodi L, Horváth E, Bárdos H, Baráth B, Pethő D, Katona É, Balla Mutch NJ and Muszbek L.: Cellular FXIII in Human Macrophage-Derived Foam Cells. *Int. J. Mol. Sci*. **2023**; 24, 4802.
47. T Asahina, T Kobayashi, Y Okada, J Goto, T. Terao.: Maternal Blood Coagulation Factor XIII is Associated with the Development of Cytotrophoblastic Shell Placenta. **2000**; 21(4):388-93.
48. Christoffer Soendergaard, Peter Holding Kvist, Jakob Benedict Seidelin, Hermann Pelzer, Ole Haagen Nielsen: Systemic and intestinal levels of factor XIII-A: the impact of inflammation on expression in macrophage subtypes. *J Gastroenterol*. **2016**; 51(8):796-807.
49. E Katona, B Nagy, J Kappelmayer, G Baktai, L Kovács, T Márialigeti, B Dezsó, L Muszbek: Factor XIII in bronchoalveolar lavage fluid from children with chronic bronchoalveolar inflammation. *J Thromb Haemost*. **2005**; 3(7):1407-13.

50. Stephane Esnault, Elizabeth A Kelly, Ronald L Sorkness, Michael D Evans, William W Busse, Nizar N Jarjour : Airway factor XIII associates with type 2 inflammation and airway obstruction in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol.* **2016**; 137(3):767-73.e6.
51. R Adány: Janus-faced tumor-associated macrophages. *Immunol Today.* **1993**; 14(3):142-3
52. Jussi Naukkarinen, Ida Surakka, Kirsi H Pietiläinen, Aila Rissanen, Veikko Salomaa, Samuli Ripatti, Hannele Yki-Järvinen, Cornelia M van Duijn, H-Erich Wichmann, Jaakko Kaprio, Marja-Riitta Taskinen, Leena Peltonen; ENGAGE Consortium Use of genome-wide expression data to mine the "Gray Zone" of GWA studies leads to novel candidate obesity genes. *PLoS Genet.* **2010**; Jun 3;6(6):e1000976.
53. D F Mosher, P E Schad: Cross-linking of fibronectin to collagen by blood coagulation Factor XIIIa. *J Clin Invest.* **1979**; 64(3):781–787.
54. John C. Chapina and Katherine A. Hajjara: Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.* **2015**; January; 29(1): 17–24.
55. Meltzer ME, Doggen CJ, de Groot PG, Rosendaal FR, Lisman T.: Plasma levels of fibrinolytic proteins and the risk of myocardial infarction in men. *Blood.* **2010**; 116(4):529-36.
56. Meltzer ME, Doggen CJ, de Groot PG, Rosendaal FR, Lisman T.: The impact of the fibrinolytic system on the risk of venous and arterial thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* **2009**; 35(5):468-77.
57. Barath B, Bogati R, Miklos T, Kallai J, Mezei ZA, Bereczky Z, et al.: Effect of alpha2-plasmin inhibitor heterogeneity on the risk of venous thromboembolism. *Thromb Res.* **2021**; 203:110-6.
58. Jansen, J.W., Haverkate, F., Koopman, J., Nieuwenhuis, H.K., Kluft, C. & Boschman, T.A.: Influence of factor XIIIa activity on human whole blood clot lysis in vitro. *Thrombosis and Haemostasis.* **1987**; 57, 171-175.
59. RaumDD, et al.: Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science.* **1980**; 208:1036–37.
60. Francis J. Castellino, Victoria A. Ploplis.: Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost.* **2005**; 93: 647-54.
61. Wiman B, Hamsten A.: The fibrinolytic enzyme system and its role in the etiology of thromboembolic disease. *Semin Thromb Hemost.* **1990**; 16(3):207-16.

62. Aoki N, Saito H, Kamiya T, Koie K, Sakata Y, Kobakura M.: Congenital deficiency of alpha 2-plasmin inhibitor associated with severe hemorrhagic tendency. *J Clin Invest.* **1979**; 63(5):877-84.
63. Moroi, M. and Aoki, N.: Isolation and characterization of alpha 2-plasmin inhibitor from human plasma. A novel proteinase inhibitor which inhibits activator-induced clot lysis. *Journal of Biological Chemistry.* **1976**; 251, 5956-5965.
64. Wiman, B. and Collen, D.: Purification and characterization of human antiplasmin, the fast-acting plasmin inhibitor in plasma. *European Journal of Biochemistry,* **1977**; 78, 19-26.
65. Collen, D.: Identification and some properties of a new fast reacting plasmin inhibitor in human plasma. *European Journal of Biochemistry.* **1976**; 69, 209-216.
66. Aoki, N., Moroi, M., Matsuda, M. & Tachiya, K.: The behaviour of alpha 2-plasmin inhibitor in fibrinolytic states. *Journal of Clinical Investigation.* **1977**; 60, 361-369.
67. Abdul S, Leebeek FWG, Rijken DC, Uitte de Willige S.: Natural heterogeneity of  $\alpha$ 2-antiplasmin: Functional and clinical consequences. *Blood.* **2016**; 127(5):538-545.
68. Sasaki T, Morita T, Iwanaga S.: Identification of the plasminogen-binding site of human alpha 2-plasmin inhibitor. *J Biochem.* **1986**; 99(6):1699-705.
69. Frank PS, Douglas JT, Locher M, Llinas M, Schaller J.: Structural/functional characterization of the alpha 2-plasmin inhibitor C-terminal peptide. *Biochemistry.* **2003**; 42(4):1078-85.
70. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Chung KH, McKee PA.: A novel plasma proteinase potentiates alpha2-antiplasmin inhibition of fibrin digestion. *Blood.* **2004**; 103(10):3783-8.
71. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Lee CS, Chun JG, McKee PA.: Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. *Blood.* **2006**; 107(4):1397-404.
72. Bangert K, Johnsen AH, Christensen U, Thorsen S.: Different N-terminal forms of alpha 2-plasmin inhibitor in human plasma. *Biochem J.* **1993**; 291 ( Pt 2)(Pt 2):623-5.
73. Sumi Y, Ichikawa Y, Nakamura Y, Miura O, Aoki N.: Expression and characterization of pro alpha 2 plasmin inhibitor. *J Biochem.* **1989**; 106(4): 703-707.
74. Tone, M.; et al.: Structure of human alpha 2-plasmin inhibitor deduced from the cDNA sequence. *J Biochem.* **1987**; 102(5):p. 1033-41.
75. Tsurupa G, Yakovlev S, McKee P, Medved L.: Noncovalent interaction of alpha(2)-antiplasmin with fibrin(ogen): localization of alpha(2)-antiplasmin-binding sites. *Biochemistry.* **2010**; 49(35):7643-51.

76. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Lee CS, Chun JG, McKee PA.: Why alpha-antiplasmin must be converted to a derivative form for optimal function. *J Thromb Haemost.* **2007**; Oct;5(10):2095-104.
77. Clemmensen I, Thorsen S, Müllertz S, Petersen LC.: Properties of three different molecular forms of the alpha 2 plasmin inhibitor. *Eur J Biochem.* **1981**; Nov.120:105-112
78. Wang H, Yu A, Wiman B, Pap S.: Identification of amino acids in antiplasmin involved in its noncovalent 'lysine-binding-site'-dependent interaction with plasmin. *Eur J Biochem.* **2003**; May;270(9):2023-9.
79. Bernadine G. C. Lu, Trifina Sofian, Ruby H. P. Law, Paul B.: Coughlin, and Anita J. Horvath. Contribution of Conserved Lysine Residues in the 2-Antiplasmin C Terminus to Plasmin Binding and Inhibition. *JBC Papers in Press.* **2011**; May 4.
80. Abdul S, Dekkers DHW, Ariens RAS, Leebeek FWG, Rijken DC, Uitte de Willige S.: On the localization of the cleavage site in human alpha-2-antiplasmin, involved in the generation of the non-plasminogen binding form. *J Thromb Haemost.* **2020**; 18(5):1162-70.
81. Orosz, A.; Csapo, A.; Bagoly, Z.; Szekely, E.G.; Toth, E.; Kovacs, B.; Bereczky, Z.; Muszbek, L.; Katona, E.: A new ELISA method for the measurement of total alpha(2)-plasmin inhibitor level in human body fluids. *J. Immunol. Methods.* **2019**; 471, 27–33.
82. Klingemann HG, Egbring R, Holst F, Gramse M, Havemann K.: Digestion of alpha 2-plasmin inhibitor by natural proteases from human leucocytes. *Thromb Res.* **1981**; 24 (5-6):479-483.
83. Lijnen HR, Van Hoef B, Collen D.: Inactivation of the serpin alpha(2)-antiplasmin by stromelysin-1. *Biochim Biophys Acta.* **2001**; 1547(2):206-213.
84. Wiman B, Collen D.: On the mechanism of the reaction between human alpha 2-antiplasmin and plasmin. *JBiolChem.* **1979**; 254(18): 9291-9297.
85. Weisel JW, Litvinov RI.: Fibrin Formation, Structure and Properties. *Subcell Biochem.* **2017**; 82:405-56.
86. Jori E. May, Alisa S. Wolberg, Ming Yeong Lim, M.B.B.Chir.: Disorders of fibrinogen and fibrinolysis. *Hematol Oncol Clin North Am.* **2021**; 35(6): 1197–1217.
87. Alisa S.Wolberg: Fibrinogen and fibrin: synthesis, structure, and function in health and disease. *JThrombHaemost.* **2023**; 21:3005–3015.

88. Tamaki, T.; Aoki, N.: Cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor and fibronectin to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**; 661, 280–286.
89. Zsuzsa Bagoly, Barbara Baráth, Rita Orbán-Kálmándi, István Szegedi, Ferenc Sarkady, László Csiba, and Éva Katona: Incorporation of 2-Plasmin Inhibitor into Fibrin Clots and Its Association with the Clinical Outcome of Acute Ischemic Stroke Patients. *Biomolecules*. **2021**; 11, 347.
90. Kyung N. Lee, Chung S. Lee, Weon-Chan Tae, Kenneth W. Jackson, Victoria J. Christiansen, and Patrick A. McKeckie.: Crosslinking of  $\alpha$ 2-Antiplasmin to Fibrin. *Ann N Y Acad Sci*. **2001**; 936:335-9.
91. C. Kluft, P. Los, A.F.H. Jie.: The molecular form of  $\alpha$ 2-antiplasmin with affinity for plasminogen is selectively bound to fibrin by factor XIII. *Thromb Res*. **1984**; Feb 15;33(4):419-25.
92. Katona, E.; Ajzner, E.; Toth, K.; Karpati, L.; Muszbek, L.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J. Immunol. Methods*. **2001**; 258, 127–135.
93. Orban-Kalmandi, R.; Szegedi, I.; Sarkady, F.; Fekete, I.; Fekete, K.; Vasas, N.; Berenyi, E.; Csiba, L.; Zsuzsa, B.: A modified in vitro clot lysis assay predicts outcomes and safety in acute ischemic stroke patients undergoing intravenous thrombolysis. *Sci. Rep*. **2021**; 11, 12713.
94. Munster, S.; Fabry, B.: A simplified implementation of the bubble analysis of biopolymer network pores. *Biophys. J*. **2013**; 104, 2774–2775.
95. Bredfeldt, J.S.; Liu, Y.; Pehlke, C.A.; Conklin, M.W.; Szulczewski, J.M.; Inman, D.R.; Keely, P.J.; Nowak, R.D.; Mackie, T.R.; Eliceiri, K.W.: Computational segmentation of collagen fibers from second-harmonic generation images of breast cancer. *J. Biomed. Opt*. **2014**; 19, 16007.
96. De Vries, J.J.; Laan, D.M.; Frey, F.; Koenderink, G.H.; de Maat, M.P.M.: A systematic review and comparison of automated tools for quantification of fibrous networks. *Acta Biomater*. **2023**; 157, 263–274.
97. Risman, R.A.; Belcher, H.A.; Ramanujam, R.K.; Weisel, J.W.; Hudson, N.E.; Tutwiler, V.: Comprehensive Analysis of the Role of Fibrinogen and Thrombin in Clot Formation and Structure for Plasma and Purified Fibrinogen. *Biomolecules*. **2024**; 14, 230.

98. Karpati, L.; Penke, B.; Katona, E.; Balogh, I.; Vamosi, G.; Muszbek, L.: A modified, optimized kinetic photometric assay for the determination of blood coagulation factor XIII activity in plasma. *Clin. Chem.* **2000**; 46, 1946–1955.
99. Wirka, R.C.; Wagh, D.; Paik, D.T.; Pjanic, M.; Nguyen, T.; Miller, C.L.; Kundu, R.; Nagao, M.; Collier, J.; Koyano, T.K.; et al.: Atheroprotective roles of smooth muscle cell phenotypic modulation and the TCF21 disease gene as revealed by single-cell analysis. *Nat. Med.* **2019**; 25, 1280–1289.
100. Coppinger, J.A.; Cagney, G.; Toomey, S.; Kislinger, T.; Belton, O.; McRedmond, J.P.; Cahill, D.J.; Emili, A.; Fitzgerald, D.J.; Maguire, P.B.: Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood.* **2004**; 103, 2096–2104.
101. Kapusta, P.; Wypasek, E.; Natorska, J.; Grudzien, G.; Sobczyk, D.; Sadowski, J.; Undas, A.: Factor XIII expression within aortic valves and its plasma activity in patients with aortic stenosis: Association with severity of disease. *Thromb. Haemost.* **2012**; 108, 1172–1179.
102. Mitchell, J.L.; Lionikiene, A.S.; Fraser, S.R.; Whyte, C.S.; Booth, N.A.; Mutch, N.J.: Functional factor XIII-A is exposed on the stimulated platelet surface. *Blood.* **2014**; 124, 3982–3990.
103. Somodi, L.; Debreceni, I.B.; Kis, G.; Cozzolino, M.; Kappelmayer, J.; Antal, M.; Panyi, G.; Bárdos, H.; Mutch, N.J.; Muszbek, L.: Activation mechanism dependent surface exposure of cellular factor XIII on activated platelets and platelet microparticles. *J. Thromb. Haemost.* **2022**; 20, 1223–1235.
104. Alshehri, F.S.M.; Whyte, C.S.; Tuncay, A.; Williams, M.L.; Wilson, H.M.; Mutch, N.J.: Monocytes Expose Factor XIII-A and Stabilize Thrombi against Fibrinolytic Degradation. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**; 22, 6591.
105. Jaber, N.; Soleimani, A.; Pashirzad, M.; Abdehad, H.; Mohammadi, F.; Khoshakhlagh, M.; Khazaei, M.; Ferns, G.A.; Avan, A.; Hassanian, S.M.: Role of thrombin in the pathogenesis of atherosclerosis. *J. Cell. Biochem.* **2019**; 120, 4757–4765.
106. Al-Jallad, H.F.; Myneni, V.D.; Piercy-Kotb, S.A.; Chabot, N.; Mulani, A.; Keillor, J.W.; Kaartinen, M.T.: Plasma Membrane Factor XIIIa Transglutaminase Activity Regulates Osteoblast Matrix Secretion and Deposition by Affecting Microtubule Dynamics. *PLoS ONE.* **2011**; 6, e15893.

107. Dardik, R.; Leor, J.; Skutelsky, E.; Castel, D.; Holbova, R.; Schiby, G.; Shaish, A.; Dickneite, G.; Loscalzo, J.; Inbal, A.: Evaluation of the pro-angiogenic effect of factor XIII in heterotopic mouse heart allografts and FXIII-deficient mice. *Thromb. Haemost.* **2006**; 95, 546–550.
108. Wiman B, Nilsson T, Cedergren B.: Studies on a form of alpha 2-antiplasmin in plasma which does not interact with the lysine-binding sites in plasminogen. *Thromb Res.* **1982**; 28(2):193-9.
109. Cederholm-Williams SA.: Concentration of plasminogen and antiplasmin in plasma and serum. *J Clin Pathol.* **1981**; 34(9):979-81.
110. Agren A, Jorneskog G, Elgue G, Henriksson P, Wallen H, Wiman B.: Increased incorporation of antiplasmin into the fibrin network in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* **2014**; 37(7):2007-14.
111. Uitte de Willige S, Malfliet J, Abdul S, Leebeek FWG, Rijken DC.: The level of circulating fibroblast activation protein correlates with incorporation of alpha-2-antiplasmin into the fibrin clot. *Thromb Res.* **2018**; 166:19-21.
112. Leebeek, F.W.G.; Los, P.; Kluft, C.: A monoclonal antibody against the COOH-terminal site of alpha2-antiplasmin reveals heterogeneity in the nonplasminogen binding form of alpha2-antiplasmin. *Fibrinolysis.* **1996**, 10, 67–70.
113. Undas A, Ariens RA.: Fibrin clot structure and function: a role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2011**; 31(12):e88-99.
114. Wiman B, Almqvist A, Ranby M.: The Non-Covalent Interaction between Plasmin and Alpha-2-Antiplasmin. *Fibrinolysis.* **1989**; 3(4):231-5.
115. Uitte de Willige S, Miedzak M, Carter AM, Lisman T, Rosendaal FR, Grant PJ, et al.: Proteolytic and genetic variation of the alpha-2-antiplasmin C-terminus in myocardial infarction. *Blood.* **2011**; 117(24):6694-701.
116. Leebeek FW, Kluft C, Knot EA, Los P, Cohen AF, Six AJ.: Plasmin inhibitors in the prevention of systemic effects during thrombolytic therapy: specific role of the plasminogen-binding form of alpha 2-antiplasmin. *J Am Coll Cardiol.* **1990**;15(6):1212-20.

## **11. Tárgyszavak**

Faktor XIII

Vaszkuláris simaizomsejt

Sejtproliferáció

Sejtmigráció

Kollagén szekréció

Thrombospondin-1

Alpha2-plazmin inhibitor

Plazmin

Fibrinolízis

Fibrin alvadék szerkezet

## **12. Keywords**

Factor XIII

Vascular smooth muscle cell

Cell proliferation

Cell migration

Collagen secretion

Thrombospondin-1

Alpha2-plasmin inhibitor

Plasmin

Fibrinolysis

Fibrin clot structure

### 13. 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 Professzor 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 céloom 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).

## **14. Függelék**

A függelék a hivatalos publikációs listát és az értekezés témájában megjelent közlemények különnyomatát tartalmazza.



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 értekezés alapján 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.



## **Az értekezés témájában megjelent közlemények különnyomata**