

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Az anti- $\beta_2$ -glikoprotein-I ellenanyag véralvadásban  
betöltött szerepe és kölcsönhatása ligandumával**

**Dr. Szabó Gábor**

**Témavezető: Prof. Dr. Kappelmayer János**



**DEBRECENI EGYETEM**

**LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2021**

## TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	4
<b>1. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Történeti áttekintés – A szifilisztől az antifoszfolid szindrómáig.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2. Az antifoszfolid szindróma meghatározása .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3. Az antifoszfolid szindróma klinikai tünetei .....</b>	<b>9</b>
1.3.1. <i>Trombózis .....</i>	9
1.3.2. <i>Terhességi szövődmények.....</i>	11
<b>1.4. Laboratóriumi eltérések az antifoszfolid szindrómában.....</b>	<b>12</b>
1.4.1. <i>A klasszikus antifoszfolid ellenanyagok és a kimutatásukra szolgáló tesztek... 13</i>	13
1.4.2. <i>A lupusz antikoaguláns fogalmi meghatározása és laboratóriumi vizsgálata..... 15</i>	15
1.4.3. <i>Hematológiai eltérések antifoszfolid szindrómában .....</i>	16
<b>1.5. Az antifoszfolid szindróma osztályozása .....</b>	<b>16</b>
<b>1.6. Az antifoszfolid szindróma okozta trombózis lehetséges pathomechanizmusai.....</b>	<b>18</b>
1.6.1. <i>Az aPL-ek hatása a sejtes véralvadásra.....</i>	18
1.6.2. <i>Az aPL-ek hatása a humorális véralvadásra .....</i>	20
<b>1.7. Az antifoszfolid szindróma kísérletes kutatási vonatkozásai .....</b>	<b>21</b>
1.7.1. <i>Az antifoszfolid szindróma fő autoantigénje, a <math>\beta_2</math>-glikoprotein-I .....</i>	21
1.7.2. <i>Antifoszfolid szindrómában megjelenő, kritériumokon kívüli ellenanyagok ....</i>	23
<b>2. CÉLKITŰZÉS.....</b>	<b>25</b>
<b>3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1. A betegek beválogatásának szempontjai, a betegek klinikai jellemzése .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2. A <math>\beta_2</math>GPI ligandum és az anti-<math>\beta_2</math>GPI ellenanyag tisztítása .....</b>	<b>29</b>
3.2.1. <i>Emberi <math>\beta_2</math>GPI tisztítása plazmából .....</i>	29
3.2.2. <i>A <math>\beta_2</math>GPI-preparátum tisztasági vizsgálata Western-blottal és MALDI-TOF-fal .....</i>	30
3.2.3. <i>A <math>\beta_2</math>GPI konformációjának nyitottá és zárttá alakítása.....</i>	31
3.2.4. <i>A <math>\beta_2</math>GPI nyitott/zárt konformációjának elektronmikroszkópos vizsgálata negatív kontrasztosítással .....</i>	32
3.2.5. <i>IgG izotípusú anti-<math>\beta_2</math>GPI ellenanyag tisztítása vérsavóból .....</i>	32
<b>3.3. Az anti-<math>\beta_2</math>GPI és a <math>\beta_2</math>GPI funkcionális vizsgálatai .....</b>	<b>33</b>
3.3.1. <i>Trombingeneráció-teszt.....</i>	33

3.3.2.	<i>A nyitott/zárt konformációjú <math>\beta_2</math>GPI hatása a fibrinképződésre</i>	36
3.3.3.	<i>Az anti-<math>\beta_2</math>GPI és liganduma közötti kölcsönhatás vizsgálata felszíni plazmonrezonanciával</i>	36
3.3.4.	<i>A mikropartikulák befolyása az anti-<math>\beta_2</math>GPI trombingenerációra kifejtett hatására</i>	37
3.3.5.	<i>Az anti-<math>\beta_2</math>GPI vérlemezke-aktivációs hatásának vizsgálata a sejtaktivációt közvetlen és közvetett módon kimutató áramlási citometriás módszerekkel</i>	38
<b>3.4.</b>	<b>Statisztika</b>	<b>40</b>
<b>4.</b>	<b>EREDMÉNYEK</b>	<b>41</b>
<b>4.1.</b>	<b>A <math>\beta_2</math>GPI vérárvadásban betöltött élettani és kórélettani szerepe</b>	<b>41</b>
4.1.1.	<i>A nyitott/zárt konformációjú <math>\beta_2</math>GPI preparálása</i>	41
4.1.2.	<i>A <math>\beta_2</math>GPI késlelteti a fibrinképződést mind az intrinszik, mind az extrinszik útvonalon</i>	42
4.1.3.	<i>A <math>\beta_2</math>GPI elhanyagolható hatást fejt ki a trombingenerációra</i>	44
4.1.4.	<i>A <math>\beta_2</math>GPI auto-ellenanyagához és heparinhoz való kötődésének jellemzése</i>	45
<b>4.2.</b>	<b>Az IgG anti-<math>\beta_2</math>GPI vérárvadásban betöltött kórélettani szerepe</b>	<b>48</b>
4.2.1.	<i>Az anti-<math>\beta_2</math>GPI egyszerre anti- és prokoaguláns hatást fejt ki a kontrollplazma trombingenerációjára</i>	48
4.2.2.	<i>Az anti-<math>\beta_2</math>GPI trombingenerációra kifejtett hatása függ a plazma foszfolipid-tartalmától és <math>\beta_2</math>GPI-szintjétől</i>	49
4.2.3.	<i>Az anti-<math>\beta_2</math>GPI eltérő hatást fejt ki a trombingenerációra az FV<sub>Leiden</sub>- és FII<sub>G20210A</sub>-plazmában</i>	51
4.2.4.	<i>Az anti-<math>\beta_2</math>GPI anti- és prokoaguláns hatását eltérő koagulációs útvonalakon fejt ki</i>	53
4.2.5.	<i>Az anti-<math>\beta_2</math>GPI fokozza a vérlemezkék aktivációs készségét</i>	54
<b>5.</b>	<b>MEGBESZÉLÉS</b>	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b>	<b>65</b>
<b>7.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>66</b>
<b>8.</b>	<b>AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ EREDMÉNYEI, MEGÁLLAPÍTÁSAI, KLINIKAI JELENTŐSÉGE</b>	<b>67</b>
<b>9.</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK</b>	<b>69</b>
<b>10.</b>	<b>TÁRGYSZAVAK</b>	<b>83</b>
<b>11.</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	<b>84</b>
<b>12.</b>	<b>FÜGGELÉK</b>	<b>85</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>ADP</b>	adenozin-difoszfát
<b>AMK</b>	7-amino-4-metil-kumarin
<b>anti-KL</b>	antikardiolipin
<b>anti-PA</b>	antifoszfatidsav (anti-phosphatidic acid)
<b>anti-PE</b>	anti-foszfatidiletanolamin (anti-phosphatidylethanolamine)
<b>anti-PI</b>	anti-foszfatidilinozitol (anti-phosphatidylinositol)
<b>anti-PS</b>	anti-foszfatidilszerin (anti-phosphatidylserine)
<b>anti-PS/PT</b>	anti-foszfatidilszerin/protrombin (antiphosphatidylserine/prothrombin)
<b>anti-<math>\beta_2</math>GPI</b>	anti- $\beta_2$ -glikoprotein-I
<b>anti-<math>\beta_2</math>GPI-DI</b>	$\beta_2$ -glikoprotein-I I-es doménjével reagáló ellenanyag
<b>anti-<math>\beta_2</math>GPI-DIV/V</b>	$\beta_2$ GPI IV-es és V-ös doménjével reagáló ellenanyag
<b>APC</b>	aktivált protein C
<b>aPL</b>	antifoszfolid ellenanyag (antiphospholipid antibody)
<b>APS</b>	antifoszfolid szindróma (antiphospholipid syndrome)
<b>aPTI</b>	aktivált parciális tromboplasztinidő
<b>ASA</b>	acetilszalicilsav (acetylsalicylic acid)
<b>BFP</b>	biológiailag álpozitív (biologically fals positive)
<b>CAPS</b>	katasztrofális antifoszfolid szindróma (catastrophic antiphospholipid syndrome)
<b>CD</b>	csoportdetermináns fehérje (cluster of differentiation)
<b>ELISA</b>	enzimhez kapcsolt immunsorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)
<b>ETP</b>	endogén trombinpotenciál
<b>FII</b>	II-es véralvadási faktor (protrombin)
<b>FITC</b>	fluoreszcein-izotiocianát

<b>FIX</b>	IX-es véralvadási faktor
<b>FL</b>	foszfolipid
<b>FV</b>	V-ös véralvadási faktor
<b>FVII</b>	VII-es véralvadási faktor
<b>FXI</b>	XI-es véralvadási faktor
<b>hAPTI</b>	hígított aktivált parciális tromboplasztinidő
<b>hPI</b>	hígított protrombinidő
<b>hRVMI</b>	hígított Russel-vipera mérég idő
<b>IgG</b>	immunglobulin G
<b>IgM</b>	immunglobulin M
<b>KK</b>	kevert kontrollplazma
<b>LA</b>	lupusz antikoaguláns
<b>LMWH</b>	kis molekulatömegű heparin (low-molecular-weight heparin)
<b>MALDI-TOF</b>	mátrixközvetített lézeres deszorpció/ionizáció – repülési idő (matrix-assisted laser desorption/ionisation–time-of-flight)
<b>MAPS</b>	mikroangiopátiás antifoszfolipid szindróma (microangiopathic antiphospholipid syndrome)
<b>MDP</b>	mikropartikula-depletált plazma
<b>MP</b>	mikropartikula
<b>NHS</b>	N-hidroxi-szukcinimid (N-hydroxisuccinimide)
<b>PAPS</b>	elsődleges antifoszfolipid szindróma (primary antiphospholipid syndrome)
<b>PE</b>	fikoeritrin (phycoerythrin)
<b>PFA</b>	paraformaldehid
<b>PI</b>	protrombinidő
<b>PPP</b>	vérlemezkeszegény plazma (platelet poor plasma)
<b>RA</b>	reumatoid artritisz

<b>SAPS</b>	másodlagos antifoszfolipid szindróma (secondary antiphospholipid syndrome)
<b>SLE</b>	szisztémás lupusz eritematózus
<b>SN-APS</b>	szeronegatív antifoszfolipid szindróma (seronegative antiphospholipid syndrome)
<b>TBS</b>	trisz (trisz-[hidroxi-metil]-amino-metán) pufferelelt sóoldat (tris-buffered saline)
<b>TF</b>	szöveti faktor (tissue factor)
<b>TFPI</b>	szövetifaktorútvonali-inhibitor (tissue factor pathway inhibitor)
<b>TGT</b>	trombingeneráció-teszt
<b>THR</b>	vérlemezkeszám (trombocitaszám)
<b>TI</b>	trombinidő
<b><math>\beta_2</math>GPI</b>	$\beta_2$ -glikoprotein-I

## 1. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az antifoszfolid szindróma az orvostudomány talán egyik legénigmatikusabb betegsége. A szindróma bármely vaszkularizált szövetet érintheti, ezért szinte minden klinikai orvostudományi területhez van kötődése. Ha egy beteg tüneteivel kapcsolatban trombotikus folyamatok gyanúja merül fel, antifoszfolid szindrómára mindig gondolnunk kell.

### 1.1. Történeti áttekintés – A szifilisztől az antifoszfolid szindrómáig

Az antifoszfolid szindróma története a XX. század elején, a szifilisz laboratóriumi kórisméjével kezdődik. A szifilisz első vértesztjét a Wassermann-tesztet már az 1900-as évek elejétől kezdve használták,<sup>1</sup> amellyel nem elhanyagolható arányban nehezen magyarázható eredményeket kaptak, mivel a teszt olyan egyéneknél is pozitív volt, akik sem a klinikai tüneteiket nem mutatta a betegségnek, sem a fertőzést megerősítő tesztekben nem tudták kimutatni a kórokozót. Az ellentmondásos eredmények évtizedeken át tartó fejtörést okoztak orvosoknak, kutatóknak. A módszer egy állati és emberi szövetekből is kivonható, foszfolid természetű antigént használt, ehhez kötődött a reagin, a szifiliszben megjelenő ellenanyag. Pangborn és mtsai. 1941-ben marhaszív alkoholos kivonatából kimutatta, hogy ez a foszfolid antigén egy addig még ismeretlen, „új” anyag, melyet kardiolipinnek neveztek el.

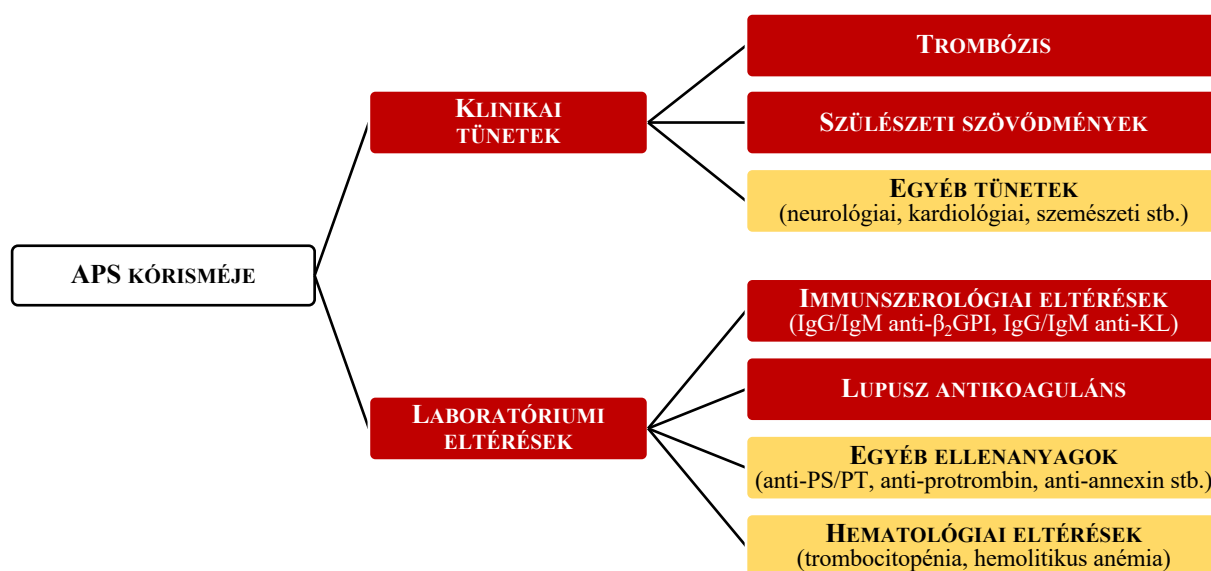
A II. világháború alatt tömeges szifiliszszűrést végeztek katonákon, terhes nőknél, házasság előtt állókon, és a fejtörést az okozta, hogy viszonylag magas volt azon reaginpozitív esetek száma, melyekben a beteg szifilisz tüneteiket nem mutatta, illetve a megerősítőteszt, a *Treponema pallidum* immobilizációs teszt eredménye is negatív volt. Ezeket az eseteket Moore és Mohr biológiailag álpozitívnak (BFP, biologically fals positive) írta le. Már ekkor felismerték, hogy a BFP-eseteket két csoportba tudják osztani: akut – valamilyen nem treponemális fertőzés után, átmenetileg kimutatható –, illetve krónikus – akár egy életen át fennálló, fertőzésekhez nem köthető, ismeretlen eredetű – BFP-esetek.<sup>2</sup> Az 50-es években saját

klinikai megfigyelések alapján Moore és Lutz a BFP-t már egyértelműen a szisztémás kötőszöveti betegségekre, elsősorban az SLE-re (szisztémás lupusz eritematózus) jellemző jelenségnek tekintette.<sup>3</sup> Ezzel egyidőben Conley és Hartmann két SLE-s beteget mutatott be, akikben a BFP-jelenség mellett leírtak egy hőérzékeny, keringő antikoagulánst is, amelynek az alvadást gátló hatása egészséges plazmába is átvihető volt, ez a jelenség a lupusz antikoaguláns (LA),<sup>4</sup> amely egy máig használatos helytelen elnevezés, mivel az LA nem csak lupuszban jelenik meg, illetve *in vivo* nem antikoaguláns hatású. Ekkor már megvoltak a kirakós főbb elemei, először azonban 1983-ban Hughes rakta össze őket, amikor leírta: a laboratóriumi oldalról BFP-vel, antikardiolipin ellenanyagokkal, lupusz antikoagulánssal és trombocitopéniával, a klinikai oldalról pedig artériás vagy vénás trombózissal és/vagy terhességi szövődményekkel jellemzett kórállapot önálló entitás, amelyet ekkor még csak egyszerűen antikardiolipin szindrómának nevezett.<sup>5,6</sup> Néhány évvel később azonban inkább a ma is ismert *antifoszfolipid szindróma (APS)*, illetve első leírója után a *Hughes-szindróma* elnevezés terjedt el.

Az APS történetében a 90-es években következett a második nagyobb felfedezés, amikor három kutatócsoport egymástól függetlenül bizonyította, hogy az antikardiolipin ellenanyagok megkötéséhez bár szükséges a kardiolipin, a ligandum nem közvetlenül maga a lipid, hanem egy már az 50-es évek óta ismert, a keringésben megtalálható, 50 kDa molekulatömegű, negatív töltésű foszfolipid felszínéhez kötődő fehérjekofaktor, az apolipoprotein H vagy más néven a  $\beta_2$ -glikoprotein-I.<sup>7-9</sup> Ezután még számos, foszfolipid felszínhez kötődő fehérjekofaktort azonosítottak (pl. protrombin, annexin V, protein C, protein S stb.), melyek a hozzájuk kötődő auto-ellenanyagokkal együtt szerepet játszhatnak az APS patogenezisében. A kórfolyamat szereplőinek sora mára már tisztázódni látszik, viszont az APS története még korántsem zárult le.

## 1.2. Az antifoszfolipid szindróma meghatározása

Az antifoszfolipid szindróma olyan autoimmun betegség, melyben az artériákat, vénákat vagy kisereket érintő trombózis, illetve terhességi szövődmények alakulhatnak ki, és a tünetek kóroki összefüggésben állnak a betegségben megjelenő keringő antifoszfolipid autoellenanyagokkal (aPL). Az APS kórismézése a 2006-ban Sydney-ben módosított szapporói kritériumok alapján történik.<sup>10</sup> Akkor beszélünk APS-ről, ha annak legalább egy klinikai tünete jelentkezik és legalább egy laboratóriumi eltérése kimutatható, és az utóbbit legalább 12 hét elteltével legalább egyszer megerősítik – hogy kizárják a fertőzések után egyébként gyakran megjelenő, csak néhány hétig tartó, átmeneti pozitivitást.<sup>11</sup> Az APS kivizsgálásának menetét az 1. ábra foglalja össze.



**1. ábra** Az antifoszfolipid szindróma kórisméjének összefoglalása. **piros háttér:** kritériumtünetek, **sárga háttér:** nem-kritériumtünetek, **APS:** antifoszfolipid szindróma, **anti-β<sub>2</sub>GPI:** anti-β<sub>2</sub>-glikoprotein-I, **anti-KL:** antikardiolipin, **anti-PS/PT:** anti-foszfatidilszerint/protrombin

## 1.3. Az antifoszfolipid szindróma klinikai tünetei

### 1.3.1. Trombózis

APS-ben vérrögképződés történhet vénákban, artériákban és kiserekben is, így a betegség bármely vaszkularizált szövetet vagy szervet érinthet, és a szerv működésének

megfelelő tüneteket okozhat. A szaporói kritériumok alapján a trombózt képző eljárással vagy szövettani módszerrel kétséget kizáróan igazolni kell.<sup>10</sup>

Az APS leggyakoribb trombotikus manifesztációit az 1. táblázat az Euro-Phospholipid kohorsz tanulmány alapján foglalja össze. A tanulmányban 1000 APS-ben szenvedő beteget követtek 10 éven át, ez az eddigi legnagyobb, APS-sel foglalkozó epidemiológiai tanulmány.

**1. táblázat** Az APS gyakoribb trombotikus manifesztációi az Euro-Phospholipid kohorsz tanulmány<sup>12</sup> alapján. A tanulmányban 1000 APS-es beteget követtek, a táblázat a tanulmány kezdetén talált trombotikus manifesztációk prevalenciáját mutatja.

Trombotikus manifesztációk	(%)	Trombotikus manifesztációk	(%)
Perifériás trombózis		Hasüreget érintő manifesztációk	
Mélyvénatrombózis	38,9	Renális manifesztációk (glomerulusok/a. renalis/v. renalis trombóza, veseinfarktus)	2,7
Artériás trombózis az alsó végtagban	11,7	Gastrointesztinális manifesztációk (oesophagealis/mesentericus ischaemia)	1,5
Neurológiai manifesztációk		Bőrt érintő manifesztációk	
Migrén	20,2	Livedo reticularis	24,1
Sztrók	19,8	Fekélyek	5,5
TIA	11,1	Pszudovaskulitisz elváltozások	3,9
Epilepszia	7,0	Oszteoartikuláris manifesztációk	
Pulmonális manifesztációk		Oszteonekrózis	2,4
Tüdőembólia	14,1	Szemészeti manifesztációk	
Pulmonális hipertónia	2,2	Amaurosis fugax	5,4
Kardiális manifesztációk		A. retinae trombóza	1,5
Szívbillentyűk megvastagodása, működési zavara	11,6	V. retinae trombóza	0,9
Miokardiális infarktus	5,5	Hematológiai manifesztációk	
Angina pectoris	2,7	Trombocitopénia (<100 G/l)	29,6
Miokardiopátia	2,9	Hemolitikus anémia	9,7

**TIA:** átmeneti iszkémiás roham (*transient ischaemic attack*)

Az APS leggyakoribb megjelenési formája a mélyvénatrombózis. Általánosságban is elmondható, hogy APS-ben a vénás trombózis gyakoribb az artériással szemben. Ritkábban egyéb nagyvénák is trombotizálhatnak, mint pl. a kar vénái, v. subclavia, v. jugularis, v. cava superior/inferior vagy megjelenhet akár thrombophlebitis superficialis az alsó végtagokban (11,7%). Idegrendszeri érintettség esetén az APS nagyon változatos formákban jelentkezhet (pl. migrén, sztrók, epilepszia, szinusz trombózis, neuropszichiátriai zavarok), ilyenkor mindig az érintett idegrendszeri terület működésének megfelelő tünetek alakulnak ki.<sup>13</sup> A belső szervi

manifesztációk közül előfordul még a szívben billentyűvegetáció (2,7%), illetve szívüregi trombózis (0,4%). A hasüregi szervi manifesztációk közül jelentkezhet lépinfarktus (1,1%), hasnyálmirigy-infarktus (0,5%) és még kisebb százalékban Addison-kór, Budd–Chiari-szindróma vagy a v. hepatica trombózisa is. Szintén a vérellátás zavara miatt a bőrben, nyálkahártyákon nekrozis alakulhat ki, ami gyakran az ujjak gangrénájában vagy a septum nasi perforációjában nyilvánul meg.

Az APS-ben kialakuló tünetek kezelése nem különbözik az egyéb okból kialakult trombotikus esetektől, viszont később minden esetben krónikus antikoagulálásra szorul a beteg.

### *1.3.2. Terhességi szövődmények*

Az APS szülészeti szövődményei már korán nyilvánvalóvá váltak, hiszen már a betegség 1983-as leírásakor bekerültek a meghatározásba. A jelenleg használatos szapporói kritériumok alapján a következők tartoznak az antifoszfolipid szindróma terhességi szövődményeihez:

- Legalább egy, más okkal nem magyarázható, morfológiailag egészséges magzat halála a 10. terhességi héten vagy azt követően, vagy
- legalább egy a 34. terhességi hétnél korábban bekövetkező, morfológiailag egészséges magzat koraszülése (i) eklampszia vagy preeklampszia vagy (ii) placentainsufficiencia miatt, vagy
- legalább három, más okkal nem magyarázható spontán abortusz a 10. terhességi hét előtt.

Az APS-ben kialakuló szövődmények érinthetik csak a kismamát, illetve a kismamát és a magzatot egyaránt. A leggyakoribb, izoláltan a kismamát érintő forma a preeklampszia és az eklampszia, melynek prevalenciája rendre 9,5% és 4,4% (2. táblázat). A magzatot – és így

a kismamát is – érintő leggyakoribb terhességi manifesztáció a habituális vetélés, melyet a magzat 10. terhességi hét előtti halála okoz. APS-ben az élve születés aránya 47,7%.

**2. táblázat** Az APS gyakoribb terhességi manifesztációi az Euro-Phospholipid kohorsztanulmány<sup>12</sup> alapján. A tanulmányban 1000 APS-es betegek vizsgáltak, a táblázat a tanulmány kezdetén talált terhességi manifesztációk prevalenciáját mutatja.

Terhességi manifesztációk	(%)
Kismamát érintő manifesztációk	
Preeklampszia	9,5
Eklampszia	4,4
Abruptio placentae	2,0
Posztpartum kardiopulmonális szindróma	0,5
Magzati manifesztációk	
Korai magzati halálozás (< 10 hét)	35,4
Késői magzati halálozás (≥ 10 hét)	16,9
Koraszülött	10,6

Az APS-ben kialakuló terhességi szövődmények korai felismerése, illetve a kockázati csoportok prekoncepcionális azonosítása kiemelkedően fontos. Egyes források szerint a prevenció nélküli APS-terhességek akár 80%-ában szövődmények alakulhatnak ki, viszont megfelelő gyógyszeres prevencióval ez az arány megfordul, és az élveszületés aránya 70% fölé emelkedik.<sup>14</sup>

Terhességi szövődményeket okozó APS-ben a terhesség teljes ideje alatt kis dózisú acetilszalicilsav és profilaktikus dózisú kis molekulású heparin (LMWH) javasolt, trombotikus APS-ben javasolt az addig adagolt véralvadásgátlók, pl. warfarin vagy acenokumarol azonnali elhagyása, és váltani kell a terhesség teljes idejére kis dózisú acetilszalicilsavra és terápiás dózisú LMWH-ra.<sup>14</sup>

#### 1.4. Laboratóriumi eltérések az antifoszfolipid szindrómában

Az autoimmun betegségek laboratóriumi kivizsgálása leggyakrabban az auto-ellenanyagok minőségi és mennyiségi vizsgálatát jelenti. Az APS ebből a szempontból különleges, mivel az ellenanyag-vizsgálat még kiegészül egy harmadik, funkcionális teszttel is.

Az APS laboratóriumi eltéréseire vonatkozó szaporói kritériumok alapján az alábbiak közül legalább az egyik vizsgálatnak pozitív eredményt kell adnia:

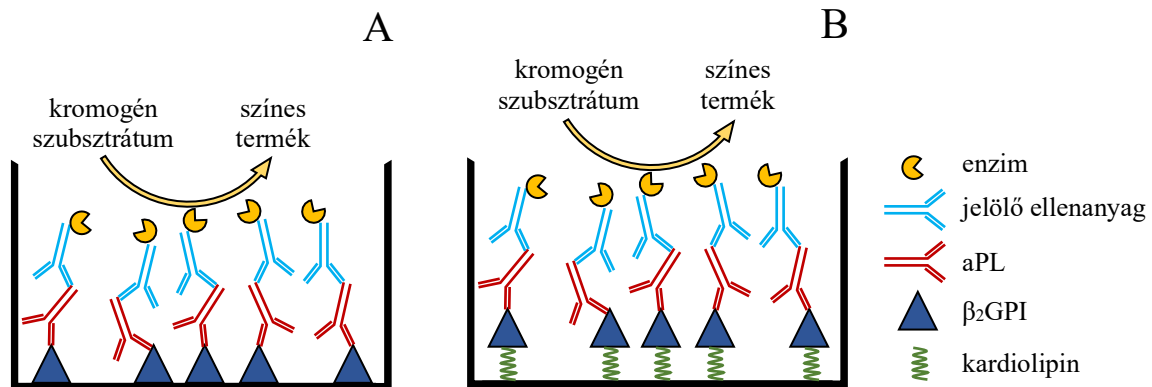
- IgG vagy IgM izotípusú anti- $\beta_2$ -glikoprotein-I (anti- $\beta_2$ GPI)
- IgG vagy IgM izotípusú antikardiolipin (anti-KL)
- lupusz antikoaguláns (LA)

A fenti vizsgálatokat legalább egy alkalommal, legalább 12 hét elteltével meg kell ismételni, amivel elkülöníthető a fertőzések után gyakran megjelenő, átmeneti aPL-pozitivitás a valódi, APS-ben megjelenőtől. Az APS kivizsgálásának ez a lépése a már csak történeti jelentőségű, heveny és krónikus BFP elkülönítő kórisméjének „hagyatéka”.

#### *1.4.1. A klasszikus antifoszfolipid ellenanyagok és a kimutatásukra szolgáló tesztek*

Az első aPL-teszt radioimmunvizsgálat volt, és az anti-KL kimutatását célozta meg.<sup>15</sup> Ma a klasszikus aPL-ek (IgG és IgM izotípusú anti- $\beta_2$ GPI és anti-KL) kikutatására az egyik elterjedt módszer az ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), melyben mikrolemezek műanyag felszínére a vizsgálandó ellenanyagnak megfelelő ligandumot kötik, kardiolipint vagy  $\beta_2$ GPI-et, majd a lemezt mossák, blokkolják és hozzáadják a hígított betegmintát. Az ellenanyagok kötődése után a lemezt újból mossák, majd alkalikus foszfáttal vagy peroxidázzal konjugált anti-humán-IgG, illetve anti-humán-IgM ellenanyaggal jelölik a mintát, és kromogén szubsztrátum hozzáadása után az optikai denzitást a tesztben használt enzim-szubsztrátum párostól függően 405 és 492 nm közötti hullámhosszon mérik.

Az 1990-es felfedezés, hogy a  $\beta_2$ GPI kofaktorként segíti az anti-KL kardiolipinhez való kötődését természetesen ma is megállja a helyét, ezért fontos tisztázni, hogy míg az anti- $\beta_2$ GPI liganduma önmagában a  $\beta_2$ GPI, az anti-KL-é a  $\beta_2$ GPI/kardiolipin komplex. Az anti-KL-teszthez a szükséges kofaktort a betegplazma  $\beta_2$ GPI-tartalma szolgáltatja (2. ábra).



**2. ábra** Anti-β<sub>2</sub>GPI (A) és anti-KL (B) mérési elve ELISA-val. Az ábra az IgG izotípusú aPL-ek mérésén keresztül ábrázolja a két ellenanyag liganduma közötti különbséget. Az anti-β<sub>2</sub>GPI liganduma, a β<sub>2</sub>GPI közvetlenül a műanyag lemezhez rögzül, az anti-KL ligandumát a β<sub>2</sub>GPI/kardiolipin komplex alkotja.

Az ELISA egy viszonylag régóta használt módszer, specificitása és szenzitivitása igen nagy, de az aPL-ek mennyiségi meghatározásában nagy az egyes laboratóriumok közötti eltérés.<sup>16,17</sup> A probléma kiküszöbölésére megoldás volt az automatizált módszerek bevezetése, melyek egyre inkább átveszik az ELISA helyét az aPL-ek kimutatásában. Az egyik ilyen automatizált megoldás az elektrokemilumineszcencia (ECL) elvén működő módszer (pl. BioFlash, AcuStar), melyben a megfelelő szubsztrátumot (kardiolipin, β<sub>2</sub>GPI) gyöngyök felszínére kötik, a betegmintában lévő aPL ezekhez kötődik, majd egy mosási lépés után a vizsgált mintához ECL-molekulával konjugált jelölő ellenanyagot adnak, a felesleget egy mosási lépéssel eltávolítják, majd elektromos áram hatására az ECL-molekula lumineszcens jelet ad, amelynek erősségét kalibrációs görbe segítségével önkényes egységben (U/ml) fejeznek ki.<sup>18</sup> A betegmintát – amely lehet plazma vagy szérum – az automata két különböző hígításban is képes mérni, amivel szélsőséges mértékben kiterjeszhető a mérési skála (6,4 U/ml – 120.000 U/ml). A gyártó ajánlása szerint mind a négy mérési tesztben (IgG/IgM anti-β<sub>2</sub>GPI/anti-KL) a pozitívhatárérték 20 U/ml, viszont javasolja minden laboratóriumnak a saját határérték meghatározását.

#### 1.4.2. *A lupusz antikoaguláns fogalmi meghatározása és laboratóriumi vizsgálata*

A lupusz antikoaguláns egy paradox jelenség, amely a nevét az *in vitro* tapasztalható antikoaguláns hatásáról kapta, viszont *in vivo* ezzel épp ellentétben, protrombotikus hatást vált ki. Meghatározása nem egyszerű, attól függ, hogy miként tekintünk rá. Utalnak rá úgy is, hogy az egyik a három klasszikus ellenanyag közül, tehát tekinthetjük ellenanyagnak; viszont azt is tudjuk, hogy amikor az LA-t mutatjuk ki laboratóriumi kivizsgálás során, akkor egy funkcionális tesztet végzünk, tehát tekinthetünk rá egy a plazmában kimutatható gátlóhatásként is – mindkét megközelítés igaz.

*A vizsgált plazmát akkor tekintjük LA-pozitívnak, ha a plazma alvadási ideje foszfolipidfüggő módon megnyúlik.<sup>19</sup>*

Ha az LA természetét szeretnénk megismerni, akkor ez a megfogalmazás még mindig nem árul el róla sokat, viszont mégis megállja a helyét, mert az LA-ról még ma is csak azt tudjuk bizonyosan, hogy mi a kiváltott hatás, de azt nem, hogy melyik antitest hozza azt létre. Ezt támasztja alá az APS egy különleges esete a szeronegatív forma, amikor mind az anti- $\beta_2$ GPI, mind az anti-KL negatív, a betegplazmában azonban mégis kimutatható LA-hatás.<sup>20</sup>

Az LA-teszt során két dolgot kell bizonyítanunk: (i) a plazma alvadási ideje megnyúlt, (ii) ez a megnyúlás foszfolipidfüggő. Az LA-kivizsgálás előtt egyéb alvadási rendelleneségek kizárására javasolt elvégezni egy teljes alvadási szűrőpanelt, amely a protrombinidőt (PI), az aktivált parciális tromboplastinidőt (aPTI) és a trombinidőt (TI) foglalja magába. Az LA-teszt három lépésből áll: (i) szűrőteszt, (ii) keverékes vizsgálat, (iii) megerősítőteszt. Az LA szűrőtesztjére vonatkozó irányelvek két különböző elven működő tesztet javasolnak, elsősorban a hígított Russel-vipera mérge idő tesztet (hRVMI) és az alacsony foszfolipid-tartalmú, LA-érzékeny aPTI-t. Ha a szűrőtesztben a betegplazma alvadási ideje megnyúlást mutat, ugyanazzal a reagenssel keverékes vizsgálatot végeznek. Ehhez a vizsgált betegplazmát kevert kontrollplazmával 1:1 arányban keverik, ahol az LA-pozitív plazma inkorrigábilis

megnyúlást fog mutatni, ami valamilyen inhibitor jelenlétét valószínűsíti, ellenkező esetben – korrigábilis megnyúlás esetén – faktorhiányt gyaníthatunk. A harmadik lépésben, a megerősítőtesztben megemelik a foszfolipid-koncentrációt, ami – LA-pozitivitás esetén – normalizálja a szűrőtesztben tapasztalt megnyúlást, és bizonyítja az alvadási idő megnyúlásának foszfolipidfüggését.

#### *1.4.3. Hematológiai eltérések antifoszfolipid szindrómában*

A trombocitopénia vérzéssel, az aPL-ek jelenléte pedig trombotikus szövődményeket okozhat, mégis, a két ellentétes hatású állapot gyakran jelentkezik egyszerre. Bár nem tartozik az APS kritériumtünetei közé, a trombocitopénia viszonylag magas – forrásonként különböző –, 30–40%-os prevalenciával fordul elő APS-ben.<sup>21, 22</sup> Ritkábban (~10%) akár < 50 G/l, illetve visszatérő is lehet.<sup>21</sup> A trombocitopéniával járó APS átfedést mutat az idiopátiás trombocitopéniás purpurával (ITP), melyet ekkor másodlagos ITP-nek nevezünk.<sup>23</sup> Egy 68 APS-es beteget vizsgáló tanulmányban a betegek mintegy 40%-ában volt emelkedett az ITP-re jellemző anti-GPIIb/IIIa és/vagy anti-GPIb/IX szintje.<sup>24</sup> Az APS ritkább szövődménye lehet autoimmun hemolitikus anémia (AIHA), ami erős összefüggést mutat az aPL-ek jelenlétével, leggyakrabban azonban SLE-hez társult másodlagos APS-ben jelentkezik.<sup>25</sup> Az AIHA és az ITP együtt is megjelenhet APS-ben, a két állapot együtt Evans-szindrómának nevezzük.

### **1.5. Az antifoszfolipid szindróma osztályozása**

Az APS-t az SLE-hez kötődő betegségként fedezték fel és írták le. Voltak arra vonatkozó feltételezések, hogy a kettő ugyanannak a betegségnek más megjelenési formája vagy az APS az SLE előfutára.<sup>26</sup> Az APS-re ma már egyértelműen önálló entitásként tekintünk,<sup>27</sup> és a többi autoimmun betegséghez való viszonya alapján két típusra oszthatjuk. Amikor az APS önmagában, autoimmun társbetegség(ek) nélkül jelentkezik, elsődleges APS-

ról (PAPS, primary antiphospholipid syndrome) beszélünk. Az APS-t másodlagosnak (SAPS, secondary antiphospholipid syndrome) nevezzük, ha másik autoimmun betegséggel együtt jelentkezik, az APS leggyakoribb társbetegsége az SLE.<sup>28, 29</sup> Ezenkívül társulhat reumatoid artritisszel,<sup>30</sup> Sjögren-szindrómával,<sup>31</sup> szisztémás szklerózissal,<sup>32</sup> polimiozitisszel, dermatomiozitisszel<sup>33</sup> és egyéb autoimmun betegségekkel is. Az elsődleges és másodlagos APS klinikai megjelenési formái megegyeznek, viszont a kettő közötti egyértelmű különbségeket írtak le genetikai hátterükben, ami tovább bizonyítja a PAPS önálló voltát.<sup>27</sup>

A két fő kategória mellett elkülönítenek még további három, ritkább típust is. Az APS legsúlyosabb, életet veszélyeztető formája a katasztrofális APS (CAPS, catastrophic antiphospholipid syndrome) vagy első leírója után Asherson-szindróma.<sup>34</sup> A CAPS-t klinikailag rövid időn belül kialakuló többszervi elégtelenség, kórszövettanilag főleg a kisereket érintő trombózis és laboratóriumi oldalról hemolitikus anémia és aPL-pozitivitás jellemzi. Az APS-es betegek mindössze 1%-át érinti, viszont mortalitása igen magas, 30–40% közé tehető még a korszerű, adekvát terápia ellenére is.<sup>35, 36</sup> Az APS ritkább, a kisereket érintő formájának, a mikroangiopátiás APS-nek (MAPS, microangiopathic antiphospholipid syndrome) az elkülönítését Asherson javasolta 2006-ban.<sup>37</sup> Jellemző rá, hogy hiányoznak a nagyereket érintő trombózisok, a kisértrombózis miatt pedig következményes trombocitopénia és hemolitikus anémia alakul ki. Az APS különleges formáját képviseli az ún. szeronegatív APS (SN-APS, seronegative antiphospholipid syndrome), amelyben az egyetlen különbség a klasszikus APS-hez képest, hogy mindkét ellenanyagteszt (anti- $\beta_2$ GPI és anti-KL) vagy csak átmenetileg pozitív vagy tartósan negatív. A jelenség legvalószínűbb magyarázata, hogy olyan egyéb auto-ellenanyagok jelennek meg a beteg szervezetében, melyeket rutinszerűen nem vizsgálnak.<sup>38</sup> Az SN-APS jó bizonyítéka annak, hogy az antifosfolipid szindrómával kapcsolatban még számos tisztázandó kérdés van.

## 1.6. Az antifosfolipid szindróma okozta trombózis lehetséges pathomechanizmusai

Az antifosfolipid szindróma leírása óta máig nagy kérdés, hogy az aPL-ek milyen mechanizmussal okozzák az egymásnak ellentmondó klinikai protrombotikus tüneteket és a laboratóriumi antikoaguláns eltéréseket. A tünetek kialakulásához vezető eseményeket a „két csapás” elmélet írja le, mely szerint az aPL-ek jelenléte (első csapás) szubklinikai protrombotikus állapotot, lappangó veszélyt jelent. Az aPL-ek prokoaguláns állapotot előidézve előkészítik a terepet egy esetlegesen megjelenő protrombotikus inger (második csapás) számára, amelynek már csak annyi a dolga, hogy „meghúzza a ravaszt”.<sup>39, 40</sup> Többek között ebben rejlik az APS alattomos kiszámíthatatlansága, bizonyos mértékig azonban mégis fel lehet készülni egy ilyen eseményre. A leggyakoribb, második csapásnak számító ingerek közé tartoznak a fertőzések, műtétek (átmeneti bakterémia) sebgyógyulás vagy bármely olyan folyamat, amely az immunrendszert védekezésre kényszeríti.<sup>39</sup>

Az aPL-ek hatásmechanizmusa igen összetett. A hemosztázis sejtes (vérlemezké, endotél, monocita, neutrofil granulocita) és humorális (koagulációs kaszkád, fibrinolitikus rendszer, komplementrendszer) alkotóira is bizonyítottan hatással vannak.

### 1.6.1. Az aPL-ek hatása a sejtes véralvadásra

*Vérlemezkék* – Számos kutatási eredmény bizonyította, hogy az aPL-ek képesek aktiválni a véralvadás központi sejtes szereplőjét, a vérlemezkét.<sup>41-43</sup> Vérlemezke-aktivációs állatkísérletes eredményekkel is sikerült alátámasztani a két csapás elméletet, miszerint az aPL jelenléte önmagában *in vivo* nem okoz trombózist, viszont egy protrombotikus hatású ágens, pl. intraperitoneálisan lipopoliszacharid és az intravénásan aPL együttes adása után az erekben vérlemezkében dús trombusok keletkeznek.<sup>44</sup> A vérlemezkék fosfolipid felszínükön meg tudják kötni a  $\beta_2$ GPI-et, és úgy tűnik, hogy a  $\beta_2$ GPI dimerizálódása is szükséges az aPL-ek vérlemezke-aktiváló hatásának kiváltásához, amit a 2' apolipoprotein-E-receptoron (apoER2') keresztül fejtenek ki.<sup>42</sup>

*Endotélsejtek* – Az endotélsejtek feladata, hogy a vérnek olyan közvetlen környezetet biztosítsanak, amelyben véralvadás csak a szükséges helyen és mértékben indulhat be. Ehhez az érbelhártyának egy egészséges pro- és antikoaguláns egyensúlyt kell fenntartania. Ebből az egyensúlyból az aPL-ek képesek a sejteket kibillenteni és endotéldiszfunkciót előidézni.<sup>45</sup> Az aPL-ek endotélsejtekre kifejtett káros hatása többnyire a sejt által kifejezett fehérjekészlet megváltozásában nyilvánul meg. Az aPL-ek az endotélsejtek MCP-1 (MCP-1) fokozott termelésére sarkallja, az MCP-1 a monocitákban közvetlenül fokozza a szövetifaktor-kifejeződést, ami végül prokoaguláns irányba billenti a hemosztatikus egyensúlyt.<sup>46</sup> Az aPL-ek közvetlenül az endotélsejteken is fokozzák a sejtfelszíni szöveti faktor és vaszkuláris adhéziós molekula-1 és a Weibel–Palade-testekben tárolt interleukin-8 kifejeződését, ami végeredményben fokozza a vér koagulációs készségét, illetve elősegíti a fehérvérsejtek érfalhoz tapadását és így a szervezet gyulladósos válaszát.<sup>47</sup>

*Monociták* – APS-ben a fent említett az endotélsejt általi MCP-1-termelés fokozhatja a monociták szövetifaktor-termelését, azonban számos kísérlettel igazolták, hogy az aPL-ek közvetlenül is fokozzák a monociták felszínén a szöveti faktor kifejeződését, ami közvetlenül hozzájárul a koaguláció beindításához.<sup>48</sup>

*Neutrofil granulociták* – A neutrofil granulociták hemosztázisban betöltött szerepének kutatása még gyerekcipőben jár. Egy új, többek között a véralvadást beindító működésüket nemrégiben fedezték fel, ez a neutrofil extracelluláris csapdák (NET, neutrophil extracellular trap) képződése vagy más néven NET-osis. A NET-ek a neutrofil granulociták maganyagából álló, a sejtől felszabaduló, de attól el nem váló hálószerű képződmények, melyet a sejt a közvetlen környezetébe „vet ki”. A DNS-hálóból álló NET-ek tele vannak antimikrobiális hatású fehérjékkel, így elsődlegesen a kórokozók elpusztításában játszanak fontos szerepet, de nemfertőzéses gyulladásban is leírták már őket, és jelentős protrombotikus hatással is bírnak.<sup>49</sup>

APS-ben is megfigyelték az aPL-ek – elsősorban az anti- $\beta_2$ GPI – NET-osist kiváltó hatását. Az aPL-eken kívül ehhez a mechanizmushoz is szükséges a ligandum, a  $\beta_2$ GPI jelenléte.<sup>50, 51</sup>

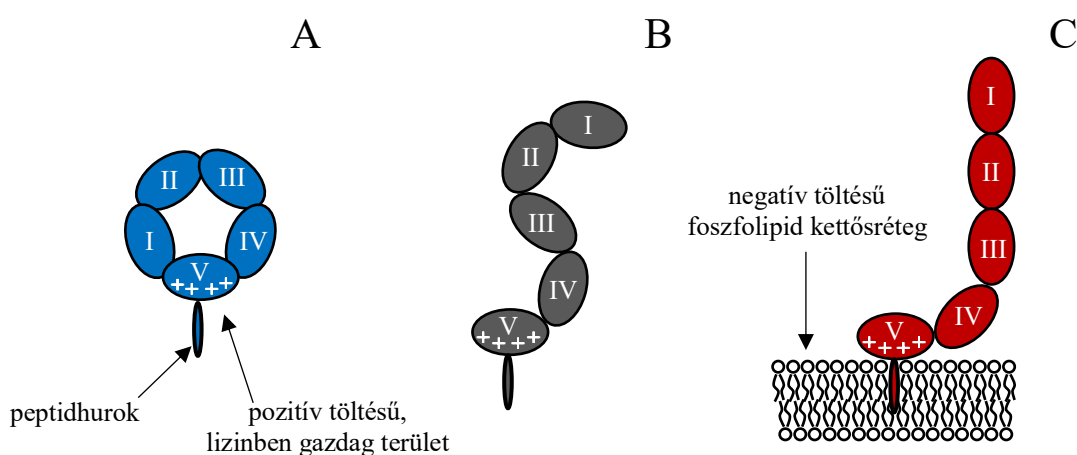
### 1.6.2. Az aPL-ek hatása a humorális véralvadásra

Az aPL-ek legrégebb óta ismert, koagulációra kifejtett hatása a lupusantikoaguláns-hatás, ami az alvadás *in vitro* megnyúlását jelenti, de tudjuk, hogy ez egy paradox jelenség, és a lupusantikoaguláns-pozitivitás *in vivo* fokozott trombózishajlamra utal.<sup>19</sup> A pontos molekuláris mechanizmust illető kérdésre egyelőre nincs egyértelmű válasz, bár Noordermeer és mtsai. nemrégiben közölt eredményei alapján két egymástól független mechanizmus magyarázhatja az LA-hatást: az anti- $\beta_2$ GPI gátolja az V-ös véralvadási faktor (FV) aktív X-es faktor (FXa) általi aktivációját, illetve az anti-protrombin (anti-PT) az FXa-val verseng a foszfolipid felszínéért.<sup>52</sup> Az utóbbi az LA laboratóriumi tesztjének elvét (alacsony és magas foszfolipid-koncentráció) is magyarázza. Szintén régebb óta ismert, és már számtalan kísérlettel igazolták, hogy az aPL-ek – az FV Leiden-mutációjában is megfigyelhető – aktivált protein C (APC) rezisztenciát okoznak.<sup>53-56</sup> Élettani körülmények között a protein C antikoaguláns hatása az FV és FVIII (FVIII-as faktor) hasításán és inaktiválásán keresztül valósul meg. Az, hogy aPL-ek milyen módon okoznak APC-rezisztenciát egyelőre szintén ismeretlen, viszont szoros összefüggést sikerült kimutatni a  $\beta_2$ GPI I-es doménje ellen termelődött ellenanyagok (anti- $\beta_2$ GPI-DI) jelenléte és az APC-rezisztencia között.<sup>57</sup> Az aPL-ek az extrinszik koagulációs útvonalat sem hagyják zavartalanul, gátolják a szövetifaktorútvonal-inhibitor (TFPI, tissue factor pathway inhibitor) működését,<sup>58-60</sup> következésképpen egy az extrinszik útvonal működését korlátozó fontos tényező esik ki, és a koaguláció fokozódik. A  $\beta_2$ GPI élettani működésével kapcsolatban kimutatták, hogy kötődik a XII-es és XI-es faktorhoz és gátolja azokat,<sup>61, 62</sup> így közvetve feltételezhető, hogy az anti- $\beta_2$ GPI-nek ezen véralvadási faktorok működésére is lehet hatása.

## 1.7. Az antifoszfolipid szindróma kísérletes kutatási vonatkozásai

### 1.7.1. Az antifoszfolipid szindróma fő autoantigénje, a $\beta_2$ -glikoprotein-I

Az APS egyik legfontosabb autoantigénjét, a  $\beta_2$ -glikoprotein-I-et ( $\beta_2$ GPI) vagy más néven apolipoprotein H-t (apoH) a 60-as évektől ismerjük, amikor Schultze és mtsai. leírtak egy addig még ismeretlen fehérjét a szérumban.<sup>63</sup> Meglepő, hogy a felfedezése óta a legtöbbet az APS kórélettanában betöltött szerepéről tudunk, élettani működéséről viszont annál kevesebbet. A  $\beta_2$ GPI egy 45–50 kDa (meghatározási módszertől függ) méretű, erősen glikozilált szérumfehérje, amely kb. 200 mg/l koncentrációban van jelen a kerigésben.<sup>64</sup> A molekula öt egymás után gyöngysorszerűen kapcsolódó doménből áll, melyeket római számokkal jelölünk (I–V). Az I–IV. domén a CCP (complement control protein) szuperfamilia tagja, és az azokra jellemző 60 aminosavas ismétlődő peptidszakaszokat tartalmaz. Az V. domén különleges felépítésű, tartalmaz egy a molekula felszínéből kinyúló, horgony szerepét betöltő peptidhurokot, a hurok közvetlen környezetében pedig egy pozitív töltésű, lizinben gazdag terület található (3. ábra, A, B).<sup>65, 66</sup> A  $\beta_2$ GPI ezen eszközök segítségével képes stabilan rögzülni negatív töltésű foszfolipid felszínre (3. ábra, C).



**3. ábra** A  $\beta_2$ -glikoprotein-I három különböző konformációja a zárt vagy cirkuláris (A), az „S” alakú (B) és a nyitott vagy „J” alakú (C). Az egyes doméneket római számok jelölik (I–V). Mindhárom konformációnál az V. domén külső felszínén látható a molekulát a sejtmembránba horgonyzó peptidhurok, illetve „+” jelöli a negatív töltésű foszfolipid felszínhez fekvő, pozitív töltésű, lizingazdag területet.

A molekulának három konformációját írták le, melyek egymásba átalakulhatnak, ezek a zárt vagy cirkuláris, a nyitott vagy „J” alakú és a kettő közötti átmenetet képviselő „S” alakú (3. ábra).<sup>67</sup> A keringésben legnagyobb arányban a zárt forma található meg.<sup>68</sup> Az aPL-ek a nyitott formához kötődnek, illetve elősegítik a molekula felnyílását, így a nyitott formát tekinthetjük az aktív formának.

Egy fehérjének, génnek, vitaminnak az élettani szerepe általában annak hiány-állapotában vagy károsodása esetén ismerhető fel működésének kiesése vagy kóros működése révén. Bár a  $\beta_2$ GPI genetikai hiánya nagyon ritka, egy japán felmérésben 222 egészséges egyén 6,3%-ában a  $\beta_2$ GPI-et kódoló *APOH* gén kereteltolódási mutációja a fehérje heterozigóta hiányát okozta, ami miatt a  $\beta_2$ GPI szérumszintje a tanulmányban mért átlagos 243 mg/l-ről 86 mg/l-re csökkent. Ugyanebben a tanulmányban azonosítottak két családot homozigóta  $\beta_2$ GPI-deficienciával. Az egyének lipidprofilját és a véralvadási állapotát vizsgálva a  $\beta_2$ GPI-hiánynak sem a heterozigóta sem a homozigóta formájában nem tudtak kimutatni a fehérje működésének kiesésére utaló eltérést.<sup>69</sup>

A  $\beta_2$ GPI eddig megismert működései:

- Különböző mechanizmusok révén gátolja a vérlemezkék – elsősorban az ADP (adenozin-difoszfát) indukálta – aggregációját, amit az anti- $\beta_2$ GPI antitestek felfüggesztenek, így a trombociták aggregációs készsége fokozódik.<sup>70, 71</sup>
- Kötődik a XI-es véralvadási faktorhoz, és gátolja annak XII-es faktor általi aktivációját.<sup>61</sup>
- Gátolja a trombin prokoaguláns működését.<sup>72</sup>
- Megvédi a trombint a heparin és kofaktora általi inaktivációtól.<sup>73</sup>
- Kötődik a C3 komplementfaktorhoz, amelyben konformációváltozást idéz elő, és elősegíti a faktor H és I általi lebomlását, így csökkentve a komplementrendszer aktivációs készségét.<sup>74</sup>

Egyre több adat gyűlik az irodalomban a  $\beta_2$ GPI élettani működésével kapcsolatban, azonban a C-vitamin-hiány – skorbut, vashiány – anémia vagy a *CFTR* gén mutáció – cisztás fibrózis analógiája mentén egyelőre nem sikerült központi szerepet hozzárendelni a molekulához.

### 1.7.2. Antifoszfolipid szindrómában megjelenő, kritériumokon kívüli ellenanyagok

Változó jelentőségűnek tekintik az IgA izotípusú aPL-eket, mivel egyelőre ellentmondásosak az adatok a klinikai értékükről. Az izolált IgA aPL-pozitivitás ritka, így nehéz megítélni fontosságát, leginkább SLE-hez társult SAPS-ben lehet hasznosítani a trombózis- vagy terhességi morbiditási kockázat megítélésére.<sup>75-77</sup> Egyes vizsgálatok felhívják a figyelmet az IgA anti- $\beta_2$ GPI ellenanyagok heterogenitására, miszerint összefüggést találtak a  $\beta_2$ GPI IV-es és V-ös doménje elleni IgA ellenanyagok (IgA anti- $\beta_2$ GPI-DIV/V) és az APS trombotikus tünetei között.<sup>78, 79</sup>

Az APS kritériumain kívül eső ellenanyagok közül talán a legnagyobb figyelmet a protrombin, illetve a foszfatidilszerin/protrombin komplexszel reagáló ellenanyag (anti-PT és anti-PS/PT) kapott. Egy több mint 7000 betegeredményt felölelő rendszerezett áttekintő közlemény elemzése alapján az anti-PS/PT-pozitivitás esetén a trombóziskockázat 5,11-szorosára, míg anti-PT-pozitivitás esetében 1,82-szorosára nő, így az anti-PS/PT jobb kórjóslati értékkel bír trombózisra vonatkozóan, és a tanulmány javasolja az anti-PS/PT vizsgálatát APS-ben.<sup>80</sup>

Az anti- $\beta_2$ GPI heterogén ellenanyagcsoportot jelöl, melyhez a  $\beta_2$ GPI különböző doménjei elleni ellenanyagok tartoznak. Közülük trombózissal a legszorosabb összefüggést az I-es domén G40–R43 epitópja<sup>81</sup> elleni (anti- $\beta_2$ GPI-DI) mutat. Egy 442 anti- $\beta_2$ GPI-pozitív beteget vizsgáló klinikai tanulmányban az anti- $\beta_2$ GPI-DI prevalenciája 243/442 (55%) volt, eredményeik alapján az anti- $\beta_2$ GPI-DI pozitivitása 3,5-szeresére növelte a trombózis, illetve 2,4-szeresére a terhességi szövődmények kockázatát.

A teljesség kedvéért érdemes említést tenni a fentieken kívül azokról az ellenanyagokról, melyek az antifosfolipid ellenanyag fogalmával ellentétben nem fehérje-fosfolipid komplexekkel, hanem közvetlenül fosfolipidekkel, pl. foszfatidilszerinnel (anti-PS), foszfatidsavval (anti-PA), foszfatidilinozittal (anti-PI) vagy foszfatidiletanolaminnal (anti-PE) reagálnak. Ezeknek egyelőre úgy tűnik, hogy klinikai jelentőségük kicsi, és kísérleti körülmények között is nagy az ezeket övező bizonytalanság. Sokszor keresztreakciót mutatnak az antikardiolipin-teszttel vagy anti- $\beta_2$ GPI-teszttel, és az ezeket vizsgáló tanulmányok sem találtak biztató eredményeket,<sup>82</sup> melyek hozzájárulnának az antifosfolipid szindróma kórlelettanának alaposabb megismeréséhez.

## 2. CÉLKITŰZÉS

Munkánk fő célkitűzése az antifoszfolipid szindróma molekuláris kórélettanának tanulmányozása volt a betegség központi antigénjének, a  $\beta_2$ -glikoprotein-I-nek és a vele reagáló ellenanyagának, az anti- $\beta_2$ -glikoprotein-I-nek az élettani és kórélettani szerepét vizsgáló molekuláris biológiai és funkcionális vizsgálatokkal.

A következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. Az irodalomban fellelhető adatok alapján hipotézisünk az volt, hogy a  $\beta_2$ GPI zárt és nyitott konformációja – az ellenanyagától függetlenül – eltérő élettani működésű, és ez a különbség megmutatkozik a véralvadásra kifejtett hatásában. Ezért célul tűztük ki, hogy vizsgáljuk a zárt és nyitott konformációjú  $\beta_2$ GPI hatását az extrinszik és intrinszik koagulációs útvonalakat vizsgáló alvadási időkre és a koaguláció globális jellemzésére alkalmas trombingenerációra.
2. Ismert, hogy az anti- $\beta_2$ GPI a  $\beta_2$ GPI nyitott formájához kötődik, illetve segíti annak nyitott konformációba való átalakulását. Hipotézisünk az volt, hogy felszíni plazmonrezonancia segítségével az anti- $\beta_2$ GPI és a zárt/nyitott konformációjú  $\beta_2$ GPI között eltérő ellenanyag–ligandum kölcsönhatás mutatható ki.
3. Az anti- $\beta_2$ GPI ellenanyagok által kifejtett paradox hatás (*in vitro* antikoaguláns, *in vivo* protrombotikus) egy és ugyanazon kísérleti körülmények között nehezen vizsgálható, és egyelőre kevesen foglalkoztak ezzel a kérdéssel. Azt feltételeztük, hogy az anti- $\beta_2$ GPI az egymással ellentétes hatásait különböző, egymástól független, párhuzamosan zajló mechanizmusok révén fejt ki. Számos irodalmi adatból ismert, hogy az anti- $\beta_2$ GPI hatásai szinte kivétel nélkül  $\beta_2$ GPI-függő módon valósulnak meg, a lupusantikoaguláns-hatásáról pedig ismert, hogy foszfolipidfüggő. Célunk volt az

anti- $\beta_2$ GPI trombingenerációra kifejtett hatásának vizsgálata kontrollplazmában változtatva a  $\beta_2$ GPI- és foszfolipid-koncentrációt, illetve VII-es, IX-es és XI-es faktorhiányos plazmában az extrinszik és intrinszik útvonalra kifejtett hatásának vizsgálata.

4. Továbbá célunk volt a „két csapás” elmélet kiterjesztéseként vizsgálni, hogy az anti- $\beta_2$ GPI mint szerzett protrombotikus ágens milyen hatással van a két leggyakoribb veleszületett protrombotikus betegségben, az V-ös véralvadási faktor heterozigóta Leiden-mutációjában és a protrombin gén G20210A heterozigóta polimorfizmusában szenvedő beteg trombingenerációjára.
5. Az anti- $\beta_2$ GPI bizonyítottan hatással van a véralvadás sejtes szereplőire is, ezért a „két csapás” elmélet vizsgálatát átemeltük sejtes kísérletekbe is. Hipotézisünk szerint az anti- $\beta_2$ GPI-nek vérlemezke-aktiváló, de legalább a vérlemezkék aktivációs ingerekre adott válaszára érzékenyítő hatása van.

### 3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. A betegek beválogatásának szempontjai, a betegek klinikai jellemzése

A kutatásunkhoz a mintagyűjtést a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság Egészségügyi Tudományos Tanács engedélyével (engedélyszám: 45368-1/2017/EKU) végeztük. A kísérleteinkbe beválogatott betegeket két csoportba oszthatjuk: (i) antifoszfolipid szindrómások, akik vérsavójából IgG anti- $\beta_2$ GPI ellenanyagot tisztítottunk, (ii) az V-ös véralvadási faktor Leiden-mutációját heterozigóta formában hordozó (FV<sub>Leiden</sub>) vagy a protrombin gén G20210A polimorfizmusát heterozigóta formában hordozó (FII<sub>G20210A</sub>) egyének, akik vérplazmáját trombingenerációs vizsgálatainkban használtuk.

Az IgG anti- $\beta_2$ GPI ellenanyagok tisztításához az APS-es betegek beválogatási szempontjai a következők voltak: LA-pozitivitás, anti-KL-pozitivitás és anti- $\beta_2$ GPI-pozitivitás – az utóbbi szintje meghaladja a szeropozitivitási referenciahatár (20 U/ml) 25-szörösét. Összesen 11 APS-es és egy LA-pozitív beteget válogattunk be, akik közül 4-nek volt valamilyen társbetegsége, vagyis másodlagos antifoszfolipid szindrómája volt, 7-nek nem volt társbetegsége, tehát elsődleges antifoszfolipid szindrómában szenvedett, illetve 1 betegnek 12 hétnél hosszabban fennálló aPL-pozitivitása volt, de klinikai tüneteket nem mutatott, így az APS kórisméjének feltételei nem teljesültek. Egy betegnek terhességi szövődménye és vénás trombózis is volt, míg két beteg esetében mind vénás, mind artériás trombózis előfordult, illetve egy beteg az APS tekintetében tünetmentes volt. A mintavétel idejében két beteg semmilyen véralvadásgátló kezelést nem kapott, a többi vagy antikoaguláns, vagy vérlemezkegátló szert kapott. (3. táblázat)

A TG-mérésekhez hemosztazeológiai diagnosztikai laboratóriumból olyan betegektől gyűjtöttünk Na-citráttal alvadásgátolt plazmát, akiknél molekuláris genetikai módszerrel

**3. táblázat** A kísérleteinkbe beválogatott antifoszfolipid szindrómás betegek laboratóriumi eredményei és klinikai tünetei

Beteg	Neme	Életkora (év)	Laboratóriumi eredmények				Klinikai tünetek				Véralvadásgátló**	Autoimmun társbetegség
			IgG anti-β <sub>2</sub> GPI (U/ml)	IgG anti-KL (U/ml)	LA	THR*	Artériás trombozís	Vénás trombozís	Terhességi szövődmény	Kórisme		
1.	nő	35	674	175	poz.	272	neg.	neg.	poz.	SAPS	ASA	RA
2.	nő	35	903	164	poz.	6	poz.	poz.	neg.	PAPS	ASA	—
3.	nő	40	1.126	260	poz.	134	neg.	poz.	neg.	PAPS	acnok.	—
4.	nő	28	1.346	223	poz.	276	neg.	poz.	poz.	PAPS	apixab.	—
5.	férfi	20	2.520	449	poz.	31	neg.	poz.	—	PAPS	dabig.	—
6.	nő	36	2.864	384	poz.	30	neg.	poz.	neg.	SAPS	acnok.	SLE
7.	nő	28	2.915	575	poz.	32	neg.	poz.	neg.	PAPS	rivarox.	—
8.	nő	51	3.750	496	poz.	120	neg.	poz.	neg.	SAPS	acnok.	SLE
9.	nő	33	5.540	> 2.024	poz.	78	neg.	poz.	neg.	SAPS	—	SLE
10.	nő	54	11.526	2.133	poz.	108	neg.	poz.	neg.	PAPS	LMWH	—
11.	nő	27	14.639	> 2.024	poz.	216	neg.	neg.	neg.	LA-poz.	—	—
12.	nő	55	60.411	3.909	poz.	45	poz.	poz.	neg.	PAPS	LMWH	—

**anti-β<sub>2</sub>GPI:** anti-β<sub>2</sub>-glikoprotein-I, **anti-KL:** antikardiolipin, **LA:** lupusz antikoaguláns, **THR:** vérelemkészám, **poz.:** pozitív, **neg.:** negatív, **PAPS:** elsődleges antifoszfolipid szindróma, **SAPS:** másodlagos antifoszfolipid szindróma, **LA-poz.:** lupuszantikoaguláns-pozitivitás, **ASA:** acetilszalicilsav, **acnokum.:** acenokumarol, **apixab.:** apixaban, **rivarox.:** rivaroxaban, **LMWH:** kis molekulású heparin, **RA:** reumatoid artritisz, **SLE:** szisztémás lupusz eritematózus; **IgG anti-β<sub>2</sub>GPI szeropozitivitási határértéke:** 20 U/ml, **IgG anti-KL szeropozitivitási határértéke:** 20 U/ml, vérelemkészám referenciatartomány: 130–400 G/l (a vastagon szedett vérelemkészám trombotopéniát jelez)

\* a beteg kórtörténetében szereplő legalacsonyabb vérelemkészám

\*\* vérálvadásgátló terápia a mintavétel idejében

mege erősítették, hogy vagy az FV Leiden-mutációját vagy a protrombin gén G20210A polimorfizmusát heterozigóta formában hordozzák, viszont a másakra nézve vad genotípusúak.

### 3.2. A $\beta_2$ GPI ligandum és az anti- $\beta_2$ GPI ellenanyag tisztítása

#### 3.2.1. Emberi $\beta_2$ GPI tisztítása plazmából

A  $\beta_2$ GPI tisztítását egy Artenjak és mtsai. által már leírt módszer<sup>83</sup> alapján végeztük, melyet egy a molekula konformációját nyitottá és zárttá alakító lépéssel egészítettünk ki (4. ábra). Egészséges donoroktól vett, Na-citráttal alvadásgátolt teljes vért centrifugáltunk (1.500 g, 15 min, szobahőmérséklet). A plazmát leszívtuk, kevertük, majd még egyszer centrifugáltuk (10.000 g, 10 min, szobahőmérséklet), az így előkészített plazmamintát fagyasztottuk és felhasználásig mélyhűtőben tároltuk  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on. A fehérjetisztítási folyamat három lépésből állt: (i) fehérjekicsapás perklórsavval, (ii) heparin-affinitáskromatográfia, (iii) kationcserélő kromatográfia.



#### 4. ábra $\beta_2$ GPI emberi vérplazmából történő preparálásának fő lépései a tisztítástól a konformáció-átalakításig

*Fehérjekicsapás perklórsavval* – Körülbelül 200 ml, Na-citráttal alvadásgátolt, hemosztazeológiai diagnosztikai laboratóriumból gyűjtött, kevert kontrollplazmát olvasztottunk vízfürdőn ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 15 min), majd azonnal  $< 4\text{ }^\circ\text{C}$ -ra hűtöttük jégen. A kicsapási lépést végig jégen végeztük. A plazmát fiziológiás sóoldattal kétszeresére hígítottuk, majd folytonos keverés mellett 20 perc alatt 60%-os töménységű perklórsavat 285 mM végtöménység eléréséig perisztaltikus pumpa segítségével cseppenként adtunk hozzá. Ezután a csapadékot centrifugáltuk (3.270 g, 20 min,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ), majd a felülúszót leszívtuk, amelynek a pH-értékét 8,0-ra állítottuk 1 M töménységű NaOH-oldattal, majd az így keletkezett preparátumot

a következő, heparin-affinitáskromatográfiás lépésben használt kötőpufferrel (0,02 M trisz [trisz- $\{$ hidroxil-metil $\}$ -amino-metán] / HCl, 0,03 M NaCl, pH 8,0) szemben 4 °C-on egy éjszakán át dializáltuk.

*Heparin-affinitáskromatográfia* – A dializátumot heparin-affinitáskromatográfiás oszlopra (HiTrap Heparin [5 ml], GE Healthcare, Svédország, Uppsala) vittük fel. Ezt követte egy mosási lépés, amellyel megszabadultunk a heparinhoz nem kötődő fehérjéktől, majd a heparin kötötte fehérjéket 350 mM NaCl-ot tartalmazó, a trisz/HCl kötőpufferrel minden egyéb tekintetben megegyező oldattal 1,5 ml-es frakciókban eluáltuk. A frakciók összfehérje-tartalmát 280 nm hullámhosszon spektrofotometriával mértük, majd a fehérjét tartalmazó frakciókat kevertük, és a következő, kationcserélő kromatográfiás lépésben használt kötőpufferrel (0,05 M CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa, 0,05 M NaCl, pH 4,8) szemben 4 °C-on egy éjszakán át dializáltuk.

*Kationcserélő kromatográfia* – A dializátumot erős kationcserélő kromatográfiás oszlopra (UNOsphere S [5 ml], BioRad, USA) vittük fel. Az oszlopot az acetátalapú kötőpufferrel mostuk, amivel megszabadultunk az oszlop töltetéhez nem kötődő fehérjéktől, majd a kötődő fehérjéket 300 mM NaCl-ot tartalmazó, az acetát kötőpufferrel minden egyéb tekintetben megegyező oldattal 1,5 ml-es frakciókban eluáltuk.

A frakciók összfehérje-koncentrációját 280 nm hullámhosszon spektrofotometriával mértük.

### 3.2.2. *A $\beta_2$ GPI-preparátum tisztasági vizsgálata Western-blottal és MALDI-TOF-fal*

*Western-blot* – A  $\beta_2$ GPI-tisztítási módszer utolsó lépése, a kationcserélő kromatográfia során keletkezett eluátumsor egymástól egyenlő távolságra lévő különböző pontjaiból mintát vettünk. A fehérjéket 10%-os nártium-dodecil-szulfát–poliakrilamid gélen redukáló körülmények között választottuk szét, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra vittük át. A membránt TBS-ben (tris-buffered saline, trisz pufferelte sóoldat; 20 mM trisz/HCl, 500 mM NaCl) oldott 3%-os gelatinnal (BioRad, USA) 1 órán át blokkoltuk. A membránra kötött

fehérjéket antihumán- $\beta_2$ GPI (kecskében termeltetett; Novus Biologicals, USA, Colorado, Littleton) elsődleges és HRP-vel (horseradish peroxidase, tormaperoxidáz) konjugált antikecske-IgG (nyúlban termeltetett; Sigma-Aldrich, USA) másodlagos ellenanyaggal jelöltük. A jelölést a HRP egy kemilumineszcens szubsztrátumával (Immobilon Western, Millipore, USA, Massachusetts, Billerica) hívtuk elő. Ezt követően a membránt a nemfajlagos fehérjekimutatásra alkalmas Coomassie brilliant blue R250 (Sigma-Aldrich) festékekkel festettük.

*MALDI-TOF* – A  $\beta_2$ GPI-oldatot tömegspektrometriás vizsgálatához C18 kromatográfiás módosított pipettahegygel (Pierce Biotechnology, Thermo Scientific, USA, Illinois, Rockford) töményítettük. A tömegspektrometriát 96 férőhelyes csiszolt acéllemez segítségével MicroFlex LT MALDI-TOF tömegspektrométeren (Bruker Daltonics GmbH) végeztük. Matrixként mustársavat (etanolban oldott transz-3,5-dimetoxi-4-hidroxi-fahéjsav; Merck) használtunk. Először a mintát, majd a mátrixot vittük fel a lemezre 1-1  $\mu$ l térfogatban.

### 3.2.3. *A $\beta_2$ GPI konformációjának nyitottá és zárttá alakítása*

Az irodalomban már korábban leírták, hogy a  $\beta_2$ GPI konformációja zártból nyitottá – és vice versa – alakítható a fehérjét tartalmazó oldószer pH-értékének és NaCl-koncentrációjának különböző irányú és mértékű változtatásával.<sup>68</sup> Körülbelül 2-2 mg tisztított  $\beta_2$ GPI-et nyitópufferrel (20 mM HEPES [4-{2-hidroxietyl}-1-piperazin-etánszulfonsav], 1,15 M NaCl, pH 11,5) és zárópufferrel (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 3,4) szemben 48 órán át dializáltunk. Ezen kezelés után mindkét preparátumot HBS-sel (HEPES-buffered saline, HEPES pufferelte sóoldat; 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4) szemben 24 órán át dializáltuk. A dialízist minden esetben 4–8 °C-on végeztük. A konformációátalakítás hatásosságát és hatékonyságát strukturális tekintetben transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével, funkcionális tekintetben pedig alvadási tesztekkel ellenőriztük.

#### 3.2.4. *A $\beta_2$ GPI nyitott/zárt konformációjának elektronmikroszkópos vizsgálata negatív kontrasztosítással*

Szénfilmmel bevont rézrácst (Electron Microscopy Sciences, USA, Pennsylvania, Hatfield) parázsfénykisüléssel kezeltünk (10 mA, 30 s) – és tettünk hidrofóbbá –, majd 5-5  $\mu$ l 450  $\mu$ g/ml töménységű, HBS-ben oldott zárt és nyitott  $\beta_2$ GPI-preparátumot vittünk fel a rácusra. A fehérjeoldatcseppet 60 másodperc múlva leitattuk, a rácst 5-5  $\mu$ l desztillált vízzel háromszor mostuk, majd 5-5  $\mu$ l uranil-formiáttal (Electron Microscopy Sciences, USA, Pennsylvania, Hatfield) kétszer 20 másodpercig festettük. A rácst félretettük száradni, majd JEOL 1010 transzmissziós elektronmikroszkóp (JEOL, USA) segítségével 80 kV gyorsítófeszültség alkalmazásával vizsgáltuk a preparátumot. Három-három, a teljes mintát jól jellemző látómezőt választottunk ki. Mindkét preparátumban a kiválasztott látómezőkben – a könnyebb azonosíthatóság okán – a zárt konformációjú molekulákat megszámoltuk, amivel jól tudtuk jellemzi a konformációátalakítás hatékonyságát.

#### 3.2.5. *IgG izotípusú anti- $\beta_2$ GPI ellenanyag tisztítása vérsavóból*

Az IgG anti- $\beta_2$ GPI ellenanyagot antifoszfolipid szindrómás betegek vérsavójából kétlépes affinitáskromatográfiás módszerrel tisztítottuk. Az első lépésben a betegvérsavót kötőpufferben (20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0) ötszörösére hígítottuk, majd a mintát ligandumként Protein G-t tartalmazó affinitáskromatográfiás oszlopra (HiTrap Protein G [5 ml], GE Healthcare, Svédország, Uppsala) vittük fel. Az oszlopot kötőpufferrel mostuk, majd a Protein G kötötte össz-IgG-t savas elúcióval (100 mM glicin/HCl, pH 2,7) nyertük ki. A második lépést megelőzte egy közbenső lépés, amelyben ligandumként  $\beta_2$ GPI-et tartalmazó affinitáskromatográfiás oszlopot készítettünk. Ehhez összesen 3 mg natív  $\beta_2$ GPI-et kötöttünk fel NHS-sel (N-hidroxi-szukcinimid) előaktivált oszlopra (HiTrap NHS-activated [1 ml], GE Healthcare, Svédország, Uppsala) primer aminocsoporton keresztül a gyártó használati

utasításának megfelelően. Az ellenanyag-tisztítás második lépésében az első lépésből származó IgG-eluátumot a foszfátalapú kötőpufferrel szemben egy éjszakán át dializáltuk, majd felvittük a  $\beta_2$ GPI-oszlopra, majd egy kötőpufferes mosási lépést követően a kikötődött ellenanyagokat a glicin/HCl-alapú savas pufferrel eluáltuk. Ezen teljes folyamat végére az antifosfolipid szindrómás betegek vérsavójából IgG izotípusú anti- $\beta_2$ GPI ellenanyagokat vontunk ki.

### **3.3. Az anti- $\beta_2$ GPI és a $\beta_2$ GPI funkcionális vizsgálatai**

#### *3.3.1. Trombingeneráció-teszt*

A trombingeneráció-tesztekben hét különböző plazmát használtunk: (i) egészséges egyénektől származó kevert kontrollplazmát (KK), (ii) az V-ös véralvadási faktor Leiden-mutációját heterozigóta formában hordozó egyénektől származó kevert plazma (FV<sub>Leiden</sub>), (iii) a protrombin gén G20210A polimorfizmusát heterozigóta formában hordozó egyénektől származó individuális plazmát (FII<sub>G20210A</sub>), (iv) FVII-, (v) FIX-, (vi) FXI-hiányos plazmát (Siemens Healthcare, Németország, Marburg) és (vii) egészséges egyénektől származó mikropartikula-depletált plazmát (MDP; részletes leírását lásd: 3.3.4-es fejezet). A plazmamintákhoz  $\beta_2$ GPI-et és/vagy anti- $\beta_2$ GPI-et adtunk hozzá változó koncentrációban. Az egyes trombingeneráció-mérések részletes összeállítását a 4. táblázat foglalja össze.

TGT-méréseinket a következők szerint végeztük: minden esetben vérlemezkesszegény plazmát (PPP, platelet poor plasma) használtunk, amihez a donoroktól származó vérmintát centrifugáltuk (1.500 g, 10 min, 20 °C), majd a leszívott plazmát még egyszer centrifugáltuk (10.000 g, 10 min, 20 °C). A plazma térfogatának 10%-ában  $\beta_2$ GPI-et és/vagy anti- $\beta_2$ GPI-et különböző végkoncentrációban adtunk hozzá. Az így előkezelt plazmából 80  $\mu$ l-t 96 lyukú fekete, műanyag mikrolemezbe (Greiner Bio-One North America Inc., USA, Monroe) mértünk be, majd 20  $\mu$ l 1 vagy 5 pM TF-et (szöveti faktor) és 4  $\mu$ M FL-t (foszfolipid) tartalmazó

reagenst (PPP-Reagent LOW vagy PPP-Reagent, Thrombinoscope BV, Hollandia, Maastricht) adtunk hozzá. (Egy kísérlet esetében 1 pM TF mellett 0,5 µM FL-t használtunk, amihez – a gyári reagensek megfelelő hígítását alkalmazva – saját készítésű reagenst használtunk [4. táblázat, 3. sor].)

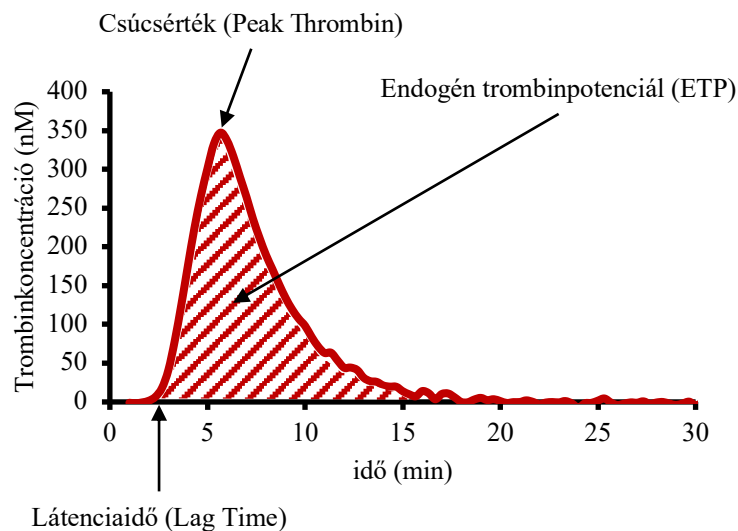
**4. táblázat** A trombingeneráció-mérés különböző összeállításai a vizsgált plazmatípus, a plazmamin-tához adott anti-β<sub>2</sub>GPI és/vagy β<sub>2</sub>GPI végkoncentrációja és a reagens-összetétel tekintetében.

	Plazmatípus	Anti-β <sub>2</sub> GPI (U/ml)	β <sub>2</sub> GPI (µg/ml)	Reagens-összetétel	
				TF (pM)	FL (µM)
<i>Anti-β<sub>2</sub>GPI hatása kevert kontrollplazmában</i>					
1.	KK	15–125	—	1	4
2.	KK	125–500	—	1	4
<i>MP- és β<sub>2</sub>GPI-szint befolyásoló hatása</i>					
3.	KK, MDP	500	—	1	0,5, 4
4.	KK	—	zárt/nyitott; 15, 30	5	4
5.	KK	15–125	natív; 200–1000	1	4
<i>Anti-β<sub>2</sub>GPI hatása öröklött trombofiliában</i>					
6.	FV <sub>Leiden</sub> , FII <sub>G20210A</sub>	125–500	—	1	4
<i>Anti-β<sub>2</sub>GPI hatása az extrinszik és intrinszik útra</i>					
7.	FVII-, FIX-, FXI- hiányos	500	—	5	4

**anti-β<sub>2</sub>GPI:** anti-β<sub>2</sub>-glikoprotein-I, **β<sub>2</sub>GPI:** β<sub>2</sub>-glikoprotein-I, **TF:** szöveti faktor (tissue factor), **FL:** foszfolipid, **KK:** kevert kontroll, **MP:** mikropartikula, **FV:** V-ös véralvadási faktor, **FII:** II-es véralvadási faktor, **FVII:** VII-es véralvadási faktor, **FIX:** IX-es véralvadási faktor, **FXI:** XI-es véralvadási faktor, **MDP:** mikropartikula-depletált plazma

A mikrolemezt fluoreszcens mikrolemez-olvasóba (Thermo Scientific Fluoroskan Ascent FL Thermo Fisher Scientific, Kína, Shanghai) tettük; a műszer a plazmát és a reagenst 10 percig 37 °C-on inkubálta, majd automatikusan 20 µl, CaCl<sub>2</sub>-t és AMC-t tartalmazó indítóreagenst (FluCa Kit; Thrombinoscope BV, Hollandia, Maastricht) adott hozzá. A fluoreszcens jeleket 60 percen át detektáltuk. Az eredményeket a Thrombinoscope szoftver

(Diagnostica Stago) segítségével értékeltük ki. Az eredmények elemzése során a **látenciaidőt** (Lag Time; az indítóreagens hozzáadása és a trombingeneráció kezdete között eltelt idő [min]), a **csúcsértéket** (Peak Thrombin; az egy időpillanatban mért legmagasabb trombinmennyiség [nM]) és a görbe alatti területnek megfelelő paramétert, az **endogén trombinpotenciált** (ETP; [nM × min]) vettük figyelembe (5. ábra).



**5. ábra** A trombingeneráció-teszt során nyert trombogram részei.

A TGT-méréseket megelőzően, a mérési körülmények optimalizálásához, 15–500 U/ml végkoncentrációban anti- $\beta_2$ GPI-et adtunk kevert kontrollplazmához, és a trombingenerációt 1, 5 és 20 pM TF-fel és 4  $\mu$ M FL-lel (20 pM TF: PPP-Reagent HIGH, Thrombinoscope BV, Hollandia, Maastricht) indítottuk be. Bár az időparaméterek (látenciaidő, csúcsidő [Time-to-Peak; a csúcsérték eléréséhez szükséges idő <sup>46</sup>]) a lupusantikoaguláns-jelenségnek megfelelően mindhárom TF-koncentráció esetében megnyúltak, az időparaméterekben a legjobb eredmény a legalacsonyabb TF-koncentrációnál (1 pM) kaptuk, így a későbbi kísérleteinkben – ahol lehetőségünk volt rá – az 1 pM TF-koncentrációt használtuk. A faktorhiányos plazmák esetében a faktorhiányból eredően a trombingeneráció jelentősen gyengébb, így nagyobb mennyiségű TF szükséges ahhoz, hogy értékelhető trombogramot

kapjunk, ezért a faktorhiányplazmákkal és a hozzájuk tartozó kontrollplazmával végzett méréseknél 5 pM TF-koncentrációt alkalmaztunk (4. táblázat, 7. sor)

### 3.3.2. *A nyitott/zárt konformációjú $\beta_2$ GPI hatása a fibrinképződésre*

A nyitott és a zárt konformációjú  $\beta_2$ GPI fibrinképződésre kifejtett hatását hígított aktivált parciális tromboplasztinidő (hAPTI) teszttel és hígított protrombinidő (hPI) teszttel vizsgáltuk. A hAPTI-tesztekben 100  $\times$ -os, a hPI-tesztekben 500  $\times$ -os hígítású, a teszteknek megfelelő reagenst (APTI-reagens: PTT-LA Lupus Anticoagulant-Sensitive APTT Reagent, Diagnostica Stago, Franciaország, Asnières sur Seine; PI-reagens: Dade Innovin, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Németország, Marburg) használtunk. A reagenseket fiziológiás sóoldatban (0,9% NaCl) hígítottuk. Összesen 80  $\mu$ l kevert kontrollplazmához 20  $\mu$ l vak HBS-t, illetve 15 és 30  $\mu$ g/ml végkoncentrációban 20  $\mu$ l nyitott és zárt konformációjú  $\beta_2$ GPI/HBS-t adtunk, és 37 °C-on inkubáltuk 1 percig. A hAPTI- vagy hPI-reagensből 100  $\mu$ l-t adtunk a plazmához, majd 37 °C-on inkubáltuk 3 percig. A fibrinképződést 100  $\mu$ l 37 °C-ra előmelegített – a hAPTI esetében 25 mM-os, a hPI esetében 20 mM-os törzsoldatú – CaCl<sub>2</sub>-oldattal indítottuk be, és az alvadék keletkezéséig eltelt időt másodpercben mértük.

### 3.3.3. *Az anti- $\beta_2$ GPI és liganduma közötti kölcsönhatás vizsgálata felszíni plazmonrezonanciával*

A felszíni plazmonrezonanciát (SPR, surface plasmon resonance) Biacore X készüléken (GE Healthcare, Svédország, Uppsala) végeztük. Az antifoszfolipid szindrómás betegektől származó anti- $\beta_2$ GPI-preparátumokból kiválasztottunk 5-öt, melyeket primer aminocsoportokon keresztül a gyártó használati utasítását követve külön-külön SPR érzékelőcsipre (500 nm, közepes sűrűségű karboximetildextrán hidrogéllal bevont csip, XanTec bioanalytics GmbH, Düsseldorf) kötöttünk fel. A szabadon maradt, nem kötő NHS-csoportokat a mérőcellában, illetve a teljes NHS-felületet a referenciacellában etanol-amminnal

deaktiváltuk. A  $\beta_2$ GPI-heparin kölcsönhatás tanulmányozásához heparinnal fedett SPR-csipet (Heparin, 50 nm hidrogéllal bevont csip, XanTec bioanalytics GmbH, Düsseldorf) használtunk. Összesen 90  $\mu$ l nyitott és zárt konformációjú  $\beta_2$ GPI-et hígítottunk futtatópufferben (10 nM HEPES, 150 nM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% felületaktív anyag, pH 7,4), majd a hígított analitikumot hat különböző koncentrációban (50, 100, 150, 300, 500 és 750 nM) fecskendeztük be a műszer mikroáramlási cellájába. A rendszer áramlási sebessége 10  $\mu$ l/min, hőmérséklete 37 °C volt a teljes kísérlet ideje alatt. Két mérés között a csipet 30  $\mu$ l regenerálópufferrel (10 mM glicin/HCl, pH 2,5, GE Healthcare, Svédország, Uppsala) regeneráltuk. A görbeillesztéshez a Langmuir-féle 1:1 arányú kötődési modellt használtuk. Az egyensúlyi disszociációs állandót ( $K_d$ ) és az asszociációs sebességi állandót ( $k_a$ ) a BIAevaluation szoftver (GE Healthcare, Svédország, Uppsala) segítségével számítottuk és elemeztük.

#### 3.3.4. *A mikropartikulák befolyása az anti- $\beta_2$ GPI trombingenerációra kifejtett hatására*

Ahhoz, hogy a mikropartikulák (MP) véralvadásra kifejtett hatását az anti- $\beta_2$ GPI trombingenerációra kifejtett hatásának vonatkozásában vizsgáljuk, MP-k kevert kontrollplazmából való elválasztásával mikropartikula-depletált plazmát (MDP) készítettünk. Ehhez öt egészséges donortól vett, Na-citráttal alvadásgátolt teljes vért centrifugáltunk (1.500 g, 15 min, 20 °C). A plazmát leszívtuk, kevertük és még egyszer centrifugáltuk (10.000 g, 10 min, 20 °C), az így keletkezett plazma egy részét félretettük trombingenerációs kevert kontrollplazmának (KK). A plazma maradékából újabb centrifugálási lépéssel (16.000 g, 30 min, 20 °C) eltávolítottuk az MP-ket, amit áramlási citometriai vizsgálattal erősítettünk meg. A centrifugált minta térfogatának felső 90%-át, az MDP-t leszívtuk. A centrifugacső alján maradt 10%-ot (mikropartikula-dús plazma) az áramlási citometriai megerősítő vizsgálatra használtuk.

Az MP-eket méretük, foszfatidil-szerin- és a CD41-pozitivitásuk (vérlemezkére jellemző sejtfelszíni molekula) alapján azonosítottuk. A méretkalibráláshoz (mérettartomány: 0,3–1,0  $\mu\text{m}$ ) kalibrációs gyöngyöket (Megamix-Plus, SSC, Biocytex, Franciaország) használtunk, az áramlási citometriai méréseket BD FACSCanto II áramlási citométeren végeztük. A KK-ból kivont MP-k mennyiségét a mintaelőkészítés során alkalmazott hígulási arányok és a mérés során alkalmazott térfogatáram alapján számoltuk.

A 8-as beteg vérsavójából tisztított anti- $\beta_2\text{GPI}$ -et adtunk mind KK-hoz, mind MDP-hez 500 U/ml végkoncentrációban. A trombingenerációhoz alacsony (4  $\mu\text{M}$  FL + 0,5 pM TF) és magas (4  $\mu\text{M}$  FL + 1 pM TF) TF-tartalmú indítóreagenst használtunk. A TGT-t a 3.3.1-es fejezetben leírtak szerint végeztük.

### *3.3.5. Az anti- $\beta_2\text{GPI}$ vérlemezke-aktivációs hatásának vizsgálata a sejtaktivációt közvetlen és közvetett módon kimutató áramlási citometriás módszerekkel*

Az általunk használt, vérlemezke-aktivációt közvetlenül kimutató áramlási citometriai módszer a sejt felszíni P-szelektin-kifejeződés (PSE, P-szelektin-expresszió) vizsgálata, a közvetett módszer pedig a vérlemezke–fehérvérsejt heterotipikus aggregátumok képződésének kimutatása.

A P-szelektin-kifejeződés vizsgálatához egészséges egyénektől vett, Na-citráttal alvadásgátolt teljes vérből, alacsony fordulatszámú centrifugálással (170 g, 15 min, 20 °C) vérlemezkes plazmát (PRP, platelet-rich plasma) nyertünk, majd a vérlemezkeszámot 250 G/l-re állítottuk be ugyanazon vérvételből származó, nagy fordulatszámú centrifugálással (1.500 g, 15 min, 20 °C) nyert PPP-vel. A PRP-hez 10  $\mu\text{M}$  végkoncentrációjú TRAP-ot (trombinreceptor-aktiváló peptid), illetve 5  $\mu\text{g/ml}$  és 10  $\mu\text{g/ml}$  végkoncentrációjú anti- $\beta_2\text{GPI}$ -et adtunk. Az aktivációval egyidőben a vérlemezke azonosítására alkalmas sejt felszíni fehérjét, a glikoprotein IX-et (CD42a) és az aktivációját jelző P-szelektint (CD62P) a megfelelő,

fluoreszcein-izotiocianáttal és fikoeritrinnel konjugált ellenanyaggal (anti-CD42a-FITC, anti-CD62P-PE) jelöltük. A vérlemezkéket 37 °C-os vízfürdőn inkubáltuk 5 percig, majd az aktivációt 60 perces, 1%-os PFA-val (paraformaldehid) történő fixálással állítottuk le, majd a mintákat FC500 Beckman Coulter áramlási citométeren mértük. Az anti-CD62P-PE nemfajlagos kötődéséből származó jelek torzító hatását, minden mérési összeállítás esetében, fajlagos ellenanyaggal jelölt minták és izotípuskontrollal (IgG1-PE) jelölt minták párhuzamos mérésével, majd a nemfajlagos kötődésből származó jelerősség figyelmen kívül hagyásával küszöböltük ki. Ezen mérésekben két szempont szerint kapuztuk a sejtpopulációkat: (i) méret és granuláltság és (ii) CD42a- és CD62P-pozitivitás alapján. A méret–granuláltság alapú kapuzással meg tudtuk állapítani a vérlemezkékből származó mikropartikulák, a sejtfelszíni fehérjék pozitivitása alapján történővel pedig az aktiválódott vérlemezkék arányát.

A vérlemezke–fehérvérsejt heterotipikus aggregátumok vizsgálatában a vérlemezke–monocita és vérlemezke–granulocita aggregátumokat azonosítottuk. Ehhez egészséges egyénektől vett, Na-citráttal alvadésgátolt teljes vért használtunk. Teljes vér 100 µl-éhez 10 µM végkoncentrációjú TRAP-ot, illetve 5 µg/ml és 10 µg/ml végkoncentrációjú anti-β<sub>2</sub>GPI-et adtunk. Az aktivációval egyidőben a vérlemezkék (CD42a) és a monociták (CD14) azonosítására alkalmas sejtfelszíni fehérjét a megfelelő ellenanyaggal (anti-CD42a-FITC, anti-CD14-PE) jelöltük. A mintákat 37 °C-os vízfürdőn 15 percig inkubáltuk. Az aktiválás után a mintákban a vörösvértesteket lizáltuk (BD FACS lysing solution), 3-szor mostuk PBS-sel (foszfát pufferelte sóoldat, phosphate-buffered saline), majd 30 percig fixáltuk 1%-os PFA-val. A mintákat FC500 Beckman Coulter áramlási citométeren mértük. A vérlemezkék azonosítására és arányának meghatározására alkalmas anti-CD42a-FITC nemfajlagos kötődéséből származó jelek torzító hatását az P-szelektin-kifejeződés vizsgálatához hasonló módon, izotípuskontroll (IgG2a-FITC) használatával küszöböltük ki. Az vérlemezke–fehérvérsejt aggregátumok azonosításához a monocitákat CD14-pozitivitás alapján kapuztuk,

a granulociták méret és granuláltság alapján biztonságosan elkülöníthetők voltak. A fehérvérsejtek és vérlemezkék együttes jelenlétét az egyes fehérvérsejtpopulációkon belül az események CD42a-pozitivitásának arányával vizsgáltuk.

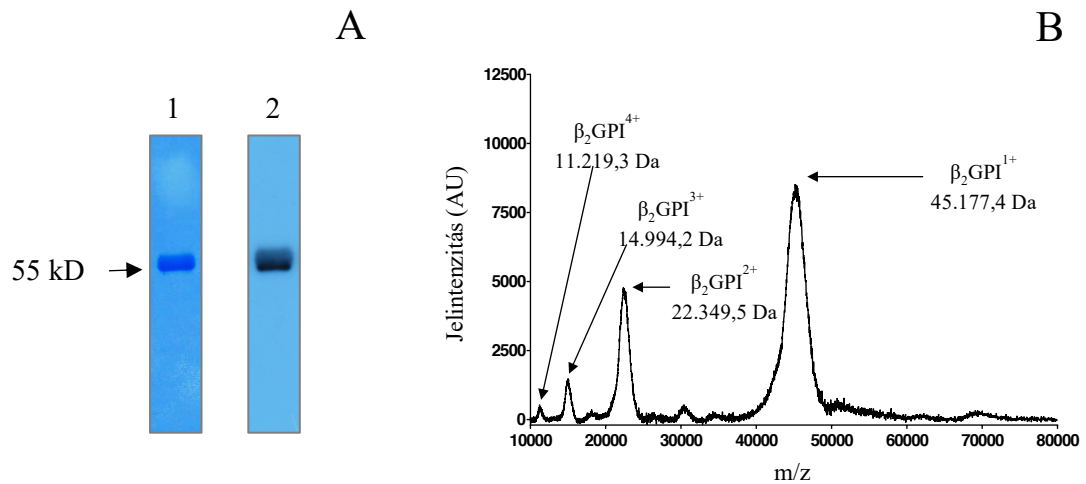
### **3.4. Statisztika**

A statisztikai elemzést GraphPad Prism szoftverrel végeztük. Az egyes csoportok normális eloszlását Kolmogorov–Smirnov-teszttel vizsgáltuk. A normális eloszlást mutató csoportokat egyutas varianciaanalízissel (one-way ANOVA), a normális eloszlást nem mutató csoportokat Kruskal–Wallis-teszttel hasonlítottuk össze. Az SPR-vizsgálatokban a nyitott/zárt  $\beta_2$ GPI eredményeit párosított t-próbával hasonlítottuk össze. A csoportok közötti statisztikai különbséget  $P < 0,05$  esetében tekintettük szignifikánsnak.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A $\beta_2$ GPI véralvadásban betöltött élettani és kórélettani szerepe

#### 4.1.1. A nyitott/zárt konformációjú $\beta_2$ GPI preparálása

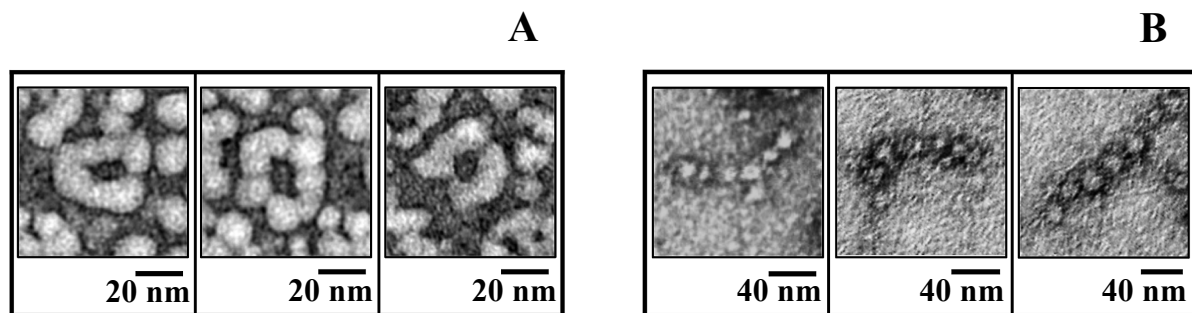


**6. ábra** A  $\beta_2$ GPI-preparátum minőségi vizsgálata Western-blottal (A; összfehérjefestés: 1-es sáv, fajlagos fehérjekimutatás: 2-es sáv) és MALDI-TOF-fal (B; az egyes csúcsok a fehérjemolekula különböző töltöttségi állapotának felelnek meg). *m/z*: tömeg/töltés, *AU*: önkényes egység (arbitrary unit)

*$\beta_2$ GPI-preparátum minőségi vizsgálata* – A különböző konformációjú  $\beta_2$ GPI koagulációs kaszkádra kifejtett hatásának vizsgálatához humán vérplazmából natív  $\beta_2$ GPI-et tisztítottunk. Western-blottal összfehérjefestés során egyetlen sáv rajzolódott ki a membránon körülbelül az 55 kDa-os molekulaméretnek megfelelő magasságban (6. ábra, A, 1-es sáv), amely megfelelt az ellenanyag-jelöléssel fajlagosan kimutatott fehérjének (6. ábra, A, 2-es sáv). A MALDI-TOF-eredmények szintén azt mutatták, hogy a mintánkban csak egy ~45,2 kDa méretű molekula volt jelen (6. ábra, B). A Western-blot és a MALDI-TOF eredménye bár ellentmondásosnak tűnhet, külön-külön mindkettő megfelel az irodalomban közölt adatoknak.<sup>84, 85</sup> A kettő közötti különbségre a magyarázatot a  $\beta_2$ GPI erősen glikozilált jellege adja (a cukor oldalláncok kölcsönhatásba lépve a poliakrilamid géllal csökkentik a molekulák elektroforetikus futási sebességét). Western-blottal és MALDI-TOF-fal végezett

ellenőrző kísérleteinkkel sikerült igazolnunk, hogy a fehérjetisztítási folyamat során kinyert molekula  $\beta_2$ GPI, és hogy a preparátum kísérleteink szempontjából jelentékeny szennyeződést nem tartalmazott.

*$\beta_2$ GPI konformációjának átalakítása* – A tisztított natív  $\beta_2$ GPI konformációját különböző NaCl-koncentrációjú és pH-értékű oldószerrel próbáltuk nyitottá és zárttá alakítani, hogy vizsgálni tudjuk a két konformáció funkcionális különbségeit a koaguláció vonatkozásában. Az eljárás hatásosságát és hatékonyságát vizsgálandó a molekulákat elektronmikroszkópos képalkotás segítségével, negatív kontrasztosítással tettük láthatóvá.



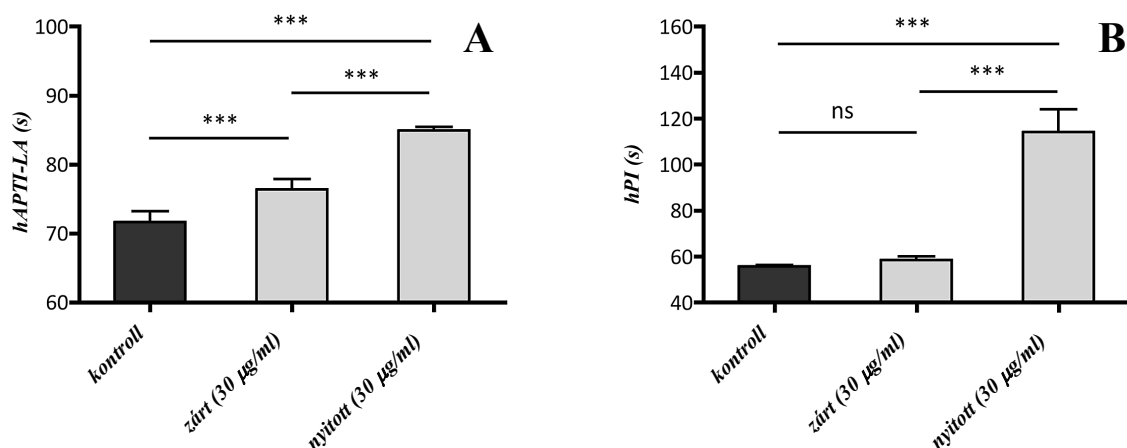
**7. ábra** A zárt (A; eredeti nagyítás: 150.000  $\times$ ) és a nyitott (B; eredeti nagyítás: 120.000  $\times$ ) konformációjú  $\beta_2$ GPI negatív kontrasztosítással készített transzmissziós elektronmikroszkópos felvétele

A 7. ábra A részén látható, hogy a zárópufferrel kezelt  $\beta_2$ GPI molekulák gyűrű alakú, zárt konformációt vettek fel, az ábra B része mutatja a  $\beta_2$ GPI hosszúságú, pálcika alakú nyitott konformációját. A zárt és nyitott konformációjú molekulát negatív kontrasztosítással láthatóvá tettük, amivel sikerült bizonyítanunk a záró- és nyitóbufferes kezelés hatásosságát. A kezelés hatékonyságának számszerűsítéséhez a  $\beta_2$ GPI<sub>zárt</sub> és a  $\beta_2$ GPI<sub>nyitott</sub> mintában 3-3 látótérben megszámoltuk a zárt molekulákat. A  $\beta_2$ GPI<sub>zárt</sub> mintában összesen 103, a  $\beta_2$ GPI<sub>nyitott</sub>-ban 3 db zárt konformációjú  $\beta_2$ GPI-et találtunk, ez alapján ezt a módszert igen hatékonyak ítéltük.

#### 4.1.2. A $\beta_2$ GPI késlelteti a fibrinképződést mind az intrinszik, mind az extrinszik útvonalon

A kísérleteink során elvégzett alvadásiidő-tesztek kettős szerepet töltek be: első sorban a  $\beta_2$ GPI két konformációjának fibrinképződésre kifejtett hatását szeretnénk velük

vizsgálni, másodsorban a konformációátalakítás hatásosságát megerősítő tesztként is szolgáltak. Két alvadási szűrőtesztet használtunk: az aPTI egy a mindennapi gyakorlatban használt alvadási szűrőteszt, amelyben kontaktaktivátort, foszfolipideket és  $\text{Ca}^{2+}$ -t használnak az alvadás beindítására, míg a PI egy olyan szűrőteszt, melyben a fibrinképződést kontaktaktivátor helyett szöveti faktorról váltják ki; ennek megfelelően az aPTI-vel az intrinzik, míg a PI-vel az extrinzik koagulációs útvonalat vizsgáljuk.



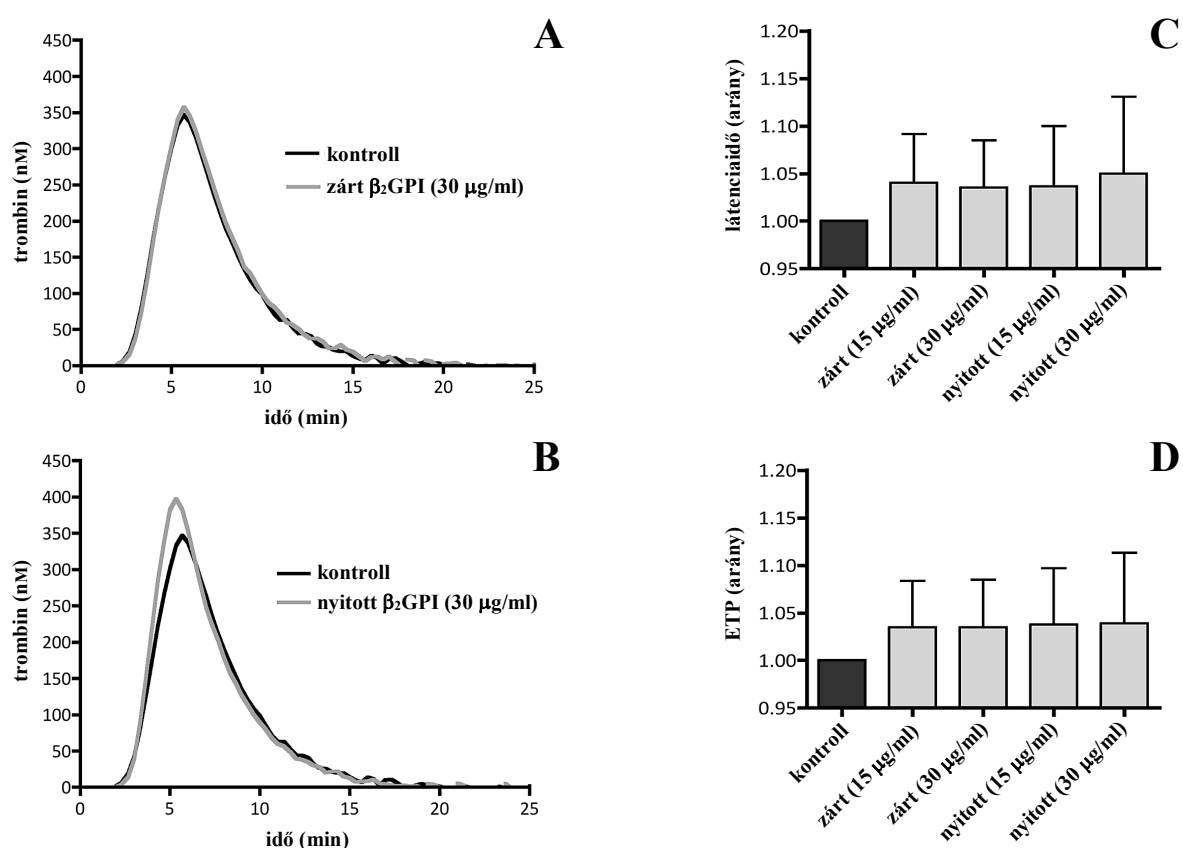
**8. ábra** A  $\beta_2\text{GPI}$  zárt és nyitott konformációjának funkcionális vizsgálata alvadásiidő-tesztekkel kevert kontrollplazmában. A két konformáció fibrinképződésre kifejtett hatásának vizsgálatához LA-ra érzékeny hAPTI-tesztet (A, 100  $\times$ -os reagenshígítás) és hPI-tesztet (B, 500  $\times$ -os reagenshígítás) használtunk. A diagramon az eredmények átlagát és standard deviációját ábrázoltuk ( $n = 5$ ). \*\*\*:  $P < 0,001$ , ns: nem szignifikáns

A hAPTI-tesztben a  $\beta_2\text{GPI}_{\text{zárt}}$  6,6%-kal ( $P < 0,001$ ), a  $\beta_2\text{GPI}_{\text{nyitott}}$  még tovább, összesen 18,5%-kal ( $P < 0,001$ ) növelte meg a fibrinképződés idejét a kontrollhoz képest (8. ábra, A). A PI-tesztben a  $\beta_2\text{GPI}_{\text{zárt}}$ -nak elhanyagolható hatását tapasztaltuk, ellenben a  $\beta_2\text{GPI}_{\text{nyitott}}$  egy igen erőteljes hatást váltott ki: a PI-t 105%-kal ( $P < 0,001$ ) növelte 55,7 s-ról 114,1 s-ra (8. ábra, B). Eredményeink alapján a  $\beta_2\text{GPI}$  nyitott formája megközelítőleg hússzor erősebb hatást fejtett ki az extrinzik koagulációs útvonalra, mint a  $\beta_2\text{GPI}$  zárt formája.

#### 4.1.3. A $\beta_2$ GPI elhanyagolható hatást fejt ki a trombingenerációra

Az alvadási idő-tesztekkel ellentétben a TGT-nek az az előnye, hogy a koagulációs folyamat alatt keletkezett trombin mennyiségét képes mérni, ami a trombin véralvadásban kifejtett pleiotróp hatása miatt globálisabb képet ad a véralvadási állapotról.

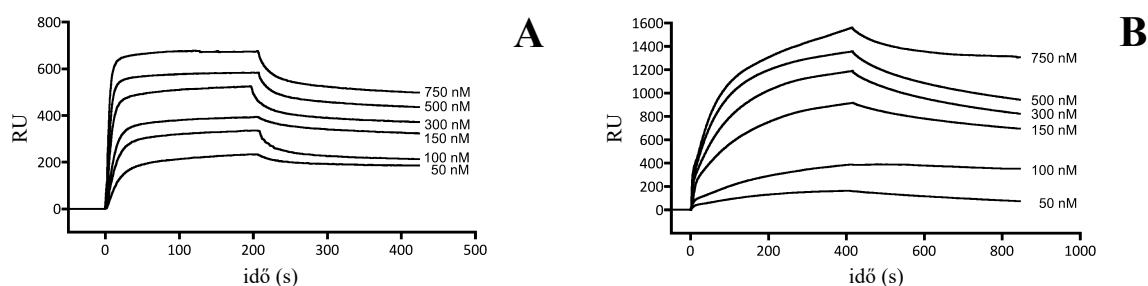
Az alvadási tesztekben tapasztalt hatáshoz hasonlóan a  $\beta_2$ GPI – mindkét konformációja, mindkét koncentrációban – enyhe időbeli nyújtó hatást fejtett ki: a  $\beta_2$ GPI<sub>nyitott</sub> 30  $\mu$ g/ml koncentrációban 4,1%-kal nyújtotta meg a látenciaidőt, bár ez a változás statisztikailag nem volt szignifikáns. Az ETP, a TGT alatt mért teljes trombinmennyiség is enyhe emelkedést mutatott, de statisztikailag ez sem volt szignifikánsan magasabb a kontrollértékekhez képest (9. ábra, C, D).



**9. ábra** A  $\beta_2$ GPI zárt és nyitott konformációjának hatása kevert kontrollplazma trombingenerációjára. A két trombogram mutatja a – 30  $\mu$ g/ml végkoncentrációjú – zárt (A) és nyitott (B) konformációjú  $\beta_2$ GPI hatását. Az oszlopdiagramokon a vizsgált minta látenciaidejét (C) és ETP-jét (D), a minta/kontroll hányadosok átlagát és standard deviációját ábrázoltuk.

#### 4.1.4. A $\beta_2$ GPI auto-ellenanyagához és heparinhoz való kötődésének jellemzése

A  $\beta_2$ GPI nyitott és zárt formájának és auto-ellenanyagának a kölcsönhatását egészséges donorok plazmájából tisztított  $\beta_2$ GPI és 5 APS-es beteg vérsavójából tisztított anti- $\beta_2$ GPI-gyel, SPR segítségével vizsgáltuk. Vizsgálatainkban először anti- $\beta_2$ GPI-et kötöttünk SPR-csip felszínére, és  $\beta_2$ GPI<sub>zárt</sub>-at és  $\beta_2$ GPI<sub>nyitott</sub>-at injektáltunk a mikroáramlási cellába hat különböző koncentrációban (10. ábra).



**10. ábra** A zárt (A) és nyitott (B) konformációjú  $\beta_2$ GPI 6-6 különböző koncentrációja és az anti- $\beta_2$ GPI közötti kölcsönhatást jellemző szenzorgram. RU: válaszegység (response unit; önkényes egység)

A nyitott és zárt formának hasonló disszociációs egyensúlyi állandóit kaptuk: bár mind a  $\beta_2$ GPI<sub>zárt</sub>, mind a  $\beta_2$ GPI<sub>nyitott</sub> az anti- $\beta_2$ GPI-hez erős affinitást mutatott ( $K_d$ -értékei rendre  $5,17 \times 10^{-8}$  M és  $7,18 \times 10^{-8}$  M, a két eredmény között nem volt statisztikailag szignifikáns különbség (5. táblázat).

**5. táblázat** A zárt és nyitott konformációjú  $\beta_2$ GPI auto-ellenanyagával való kölcsönhatásának disszociációs egyensúlyi és asszociációs sebességi állandóinak átlaga és standard deviációja

	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )		$K_d$ (M)	
	Zárt $\beta_2$ GPI	Nyitott $\beta_2$ GPI	Zárt $\beta_2$ GPI	Nyitott $\beta_2$ GPI
Átlag	$3,13 \times 10^5$	$8,31 \times 10^4$	$5,17 \times 10^{-8}$	$7,18 \times 10^{-8}$
SD	$1,86 \times 10^5$	$6,89 \times 10^4$	$6,41 \times 10^{-8}$	$7,10 \times 10^{-8}$

$K_d$ : disszociációs egyensúlyi állandó,  $k_a$ : asszociációs sebességi állandó,  $n = 5$

Az ellenanyag és liganduma közötti kölcsönhatás vizsgálata során második lépésben végeztünk egy megerősítő mérést, mely során a kísérlet orientációját megfordítottuk, és natív

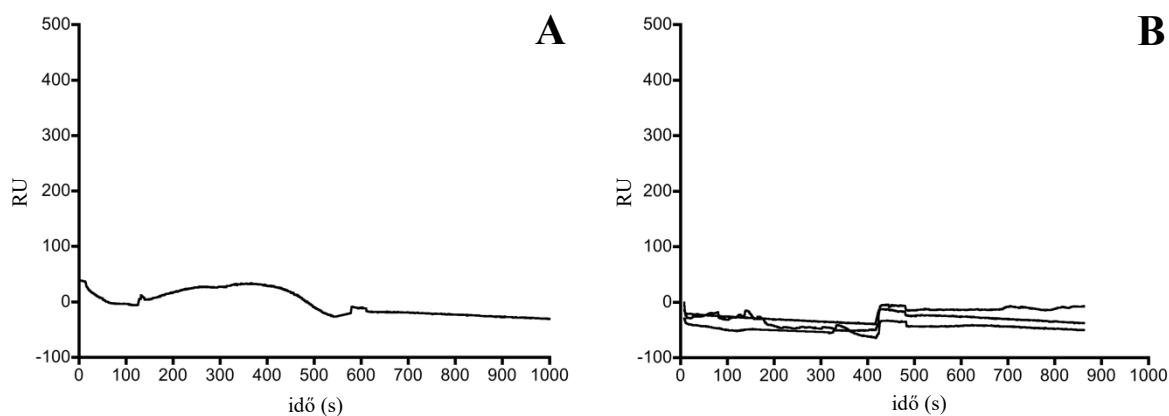
$\beta_2$ GPI-et kötöttünk SPR-csip felszínére, majd három betegből (1., 2., 5. beteg [3. táblázat]) származó anti- $\beta_2$ GPI-et áramoltattunk a ligandum fölött. Ezzel a megerősítő lépéssel megbizonyosodtunk arról, hogy eredményeink a valóságnak megfelelőek. A fordított orientációjú mérés során az első méréshez hasonlóan nagy affinitásra jellemző,  $10^{-8}$  M nagyságrendű  $K_d$ -t kaptunk (6. táblázat).

**6. táblázat** Natív  $\beta_2$ GPI és anti- $\beta_2$ GPI kölcsönhatásának fordított orientációban elvégzett SPR-méréséből származó disszociációs egyensúlyi állandók

	1. beteg	2. beteg	5. beteg
$K_d$ (M)	$1,14 \times 10^{-8}$	$2,62 \times 10^{-8}$	$1,14 \times 10^{-8}$

$K_d$ : disszociációs egyensúlyi állandó

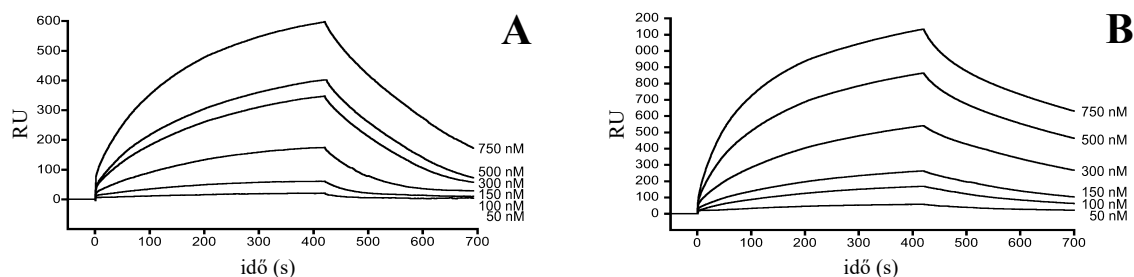
A  $\beta_2$ GPI és auto-ellenanyaga közötti kölcsönhatás vizsgálatában elvégeztük a kísérletet egy az általunk vizsgálat ellenanyaggal azonos izotípusú, de a kísérletünkben irreleváns fajlagosságú (IgG anti-FXIII), illetve kontrollellenanyaggal (kontroll-IgG) is, amivel kizárhattuk a nemfajlagos kötődésből származó, esetleges téves eredményt.



**11. ábra** Kontrollkísérlet a  $\beta_2$ GPI és anti- $\beta_2$ GPI közötti kölcsönhatás vizsgálatához. A kontroll-IgG (A), illetve az IgG anti-FXIII (B) és az SPR-csipre kötött, natív  $\beta_2$ GPI közötti kölcsönhatást jellemző szenzorgramok. **RU**: válaszegység (response unit; önkényes egység)

Az anti-FXIII-mal és a kontroll-IgG-vel végzett kontrollkísérletben nem kaptunk értékelhető jeleket, ami arra utal, hogy a  $\beta_2$ GPI és az IgG ellenanyagok közötti nemfajlagos kötődés, és az abból származó SPR-jelek elhanyagolhatók (11. ábra).

A  $\beta_2$ GPI és heparin közötti kölcsönhatás vizsgálatához a felszínén heparint kötött SPR-csipet használtunk, majd  $\beta_2$ GPI<sub>zárt</sub>-at és  $\beta_2$ GPI<sub>nyitott</sub>-at 6-6 különböző koncentrációban injektáltunk a mikroáramlási cellába (12. ábra).



**12. ábra** A zárt (A) és nyitott (B) konformációjú  $\beta_2$ GPI 6-6 különböző koncentrációja és a heparin közötti kölcsönhatást jellemző szenzorgram. **RU**: válaszegység (response unit; önkényes egység)

Várakozásainknak megfelelően a  $\beta_2$ GPI jelentős affinitást mutatott a heparinhoz, és bár statisztikailag szignifikáns különbség nélkül, a nyitott konformációnál egy nagyságrenddel erősebb ( $K_d = 2,98 \times 10^{-7}$ ) affinitást találtunk a zárthoz ( $K_d = 3,50 \times 10^{-6}$ ) képest (7. táblázat).

**7. táblázat** A zárt és nyitott konformációjú  $\beta_2$ GPI heparinnal való kölcsönhatásának disszociációs egyensúlyi és asszociációs sebességi állandóinak átlaga és standard deviációja

	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )		$K_d$ (M)	
	Zárt $\beta_2$ GPI	Nyitott $\beta_2$ GPI	Zárt $\beta_2$ GPI	Nyitott $\beta_2$ GPI
Átlag	$3,78 \times 10^3$	$9,09 \times 10^3$	$3,50 \times 10^{-6}$	$2,98 \times 10^{-7}$
SD	$3,48 \times 10^3$	$9,21 \times 10^2$	$1,81 \times 10^{-6}$	$9,03 \times 10^{-8}$

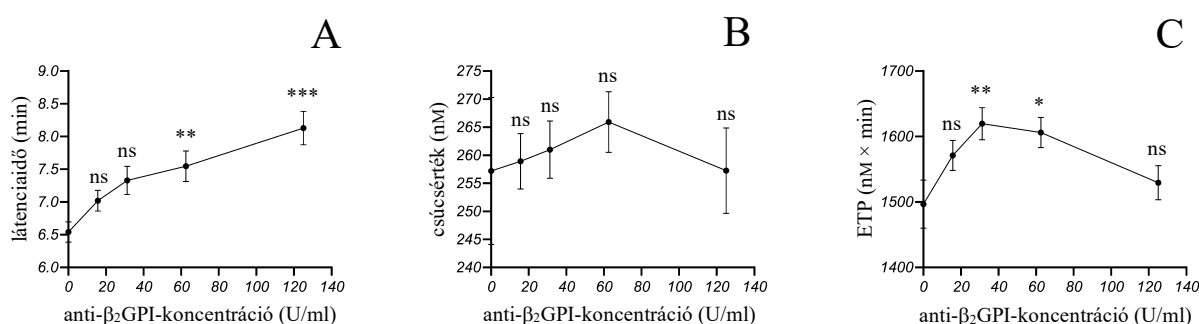
$K_d$ : disszociációs egyensúlyi állandó,  $k_a$ : asszociációs sebességi állandó,  $n = 5$

## 4.2. Az IgG anti- $\beta_2$ GPI véralvadásban betöltött kórélettani szerepe

### 4.2.1. Az anti- $\beta_2$ GPI egyszerre anti- és prokoaguláns hatást fejt ki a kontrollplazma trombin-generációjára

Az anti- $\beta_2$ GPI kevert kontrollplazma trombingenerációjára kifejtett hatását alacsony (15–125 U/ml) és magas (125–500 U/ml) koncentrációtartományban is vizsgáltuk. A reakciót 1  $\mu$ M TF-fel és 4  $\mu$ M FL-lel indítottuk be.

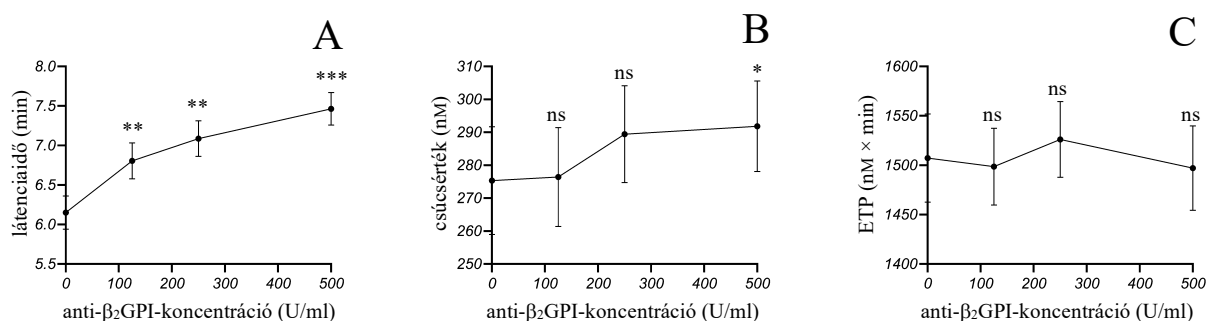
Az ellenanyag paradox hatást fejtett ki a KK trombingenerációjára mind alacsony, mind magasabb koncentrációban. Alacsony koncentrációtartományban a lupusz antikoaguláns alvadási időt nyújtó hatásának megfelelően az anti- $\beta_2$ GPI a látenciaidőt már 62 U/ml-nél szignifikánsan nyújtotta (6,54 min-ről 7,55 min-re;  $P < 0,01$ ), ami 125 U/ml-nél még tovább fokozódott (8,13 min;  $P < 0,001$ ; 13. ábra, A). Ezzel ellentmondásos módon viszont az ellenanyag a mennyiségi paraméterekben növekedést okozott: bár a csúcserőben is láttunk némi emelkedés, 31 U/ml anti- $\beta_2$ GPI szignifikánsan, 1496  $\text{nM} \times \text{min}$ -ről 1619  $\text{nM} \times \text{min}$ -re növelte a teljes reakció alatt keletkezett trombin össz mennyiségét (13. ábra, B, C).



**13. ábra** Alacsony koncentrációjú anti- $\beta_2$ GPI hatása kontrollplazma trombingenerációjára. A grafikonokon az átlagot és a középérték közepes hibáját (SEM) ábrázoltuk.  $n = 9$ , ns: nem szignifikáns, \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,01$ , \*\*\*:  $P < 0,001$

A magasabb koncentrációtartományban végzett kísérletben az időparaméterre való hatásban az előző méréshez hasonló eredményeket kaptunk: 125 U/ml anti- $\beta_2$ GPI már szignifikánsan nyújtotta a látenciaidőt ( $P < 0,01$ ), amely hatás 500 U/ml-nél még erősebbnek

mutatkozott ( $P < 0,001$ ; 14. ábra, A). Az anti- $\beta_2$ GPI mennyiségi paramétereiket növelő hatását magasabb koncentrációknál is sikerült kimutatni, azonban itt az ellenanyag az ETP-re nem volt hatással, viszont a csúcserőértéket 500 U/ml-nél szignifikánsan növelte ( $P < 0,05$ ; 14. ábra, B, C).

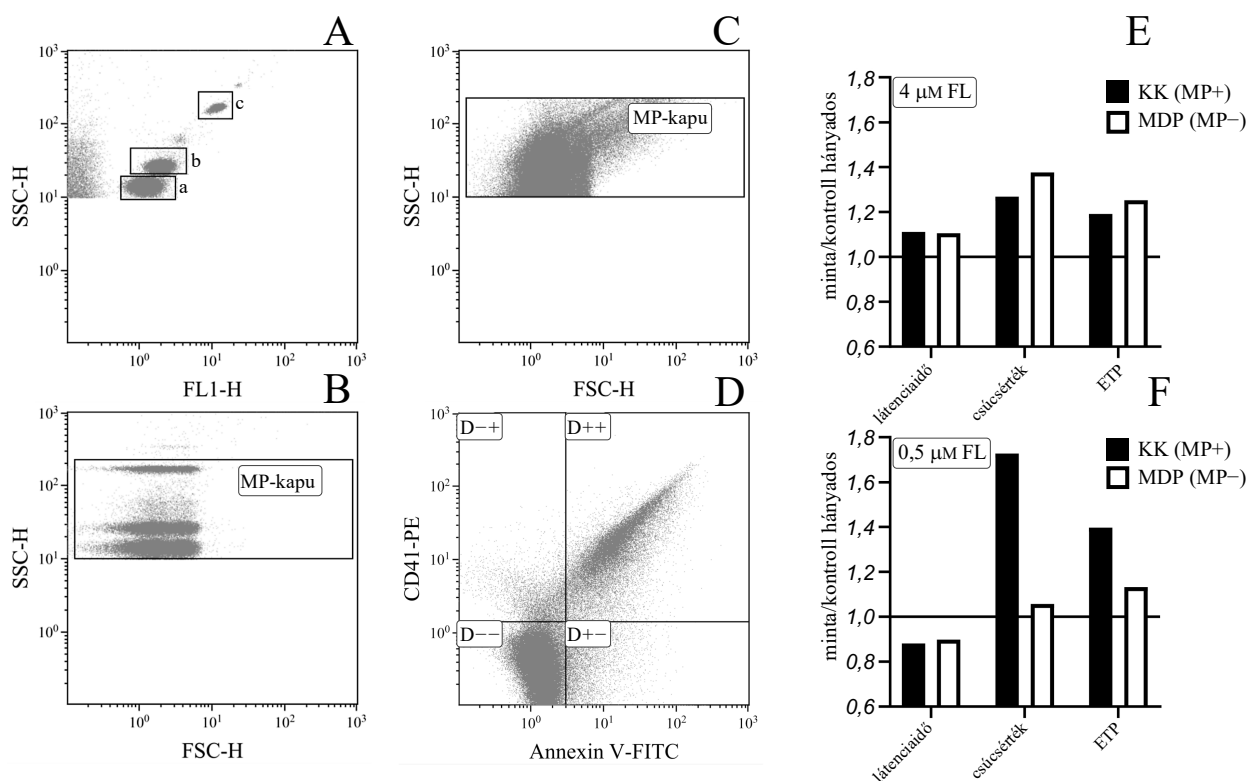


**14. ábra** Magas koncentrációjú anti- $\beta_2$ GPI hatása kontrollplazma trombingenerációjára. A grafikonokon az átlagot és a középérték közepes hibáját (SEM) ábrázoltuk.  $n = 14$ , ns: nem szignifikáns, \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,01$ , \*\*\*:  $P < 0,001$

#### 4.2.2. Az anti- $\beta_2$ GPI trombingenerációra kifejtett hatása függ a plazma foszfolipid-tartalmától és $\beta_2$ GPI-szintjétől

Kevert kontrollplazmából többszörös centrifugálással eltávolítottuk az MP-eket, amit áramlási citometriai vizsgálattal erősítettünk meg (15. ábra, A–D). A kísérletben alkalmazott hígulási arányok és a mérés során alkalmazott térfogatáram alapján számolva, a KK-ból 1287 MP/ $\mu$ l-t sikerült eltávolítanunk. A kísérletben először hagyományos módon 4  $\mu$ M FL-t használtunk, így az eddigiekhez hasonlóan az anti- $\beta_2$ GPI az időparamétert 11%-kal nyújtotta, a csúcserőértéket és az ETP-t pedig rendre 27%-kal és 19%-kal növelte (15. ábra, E). A kísérlet második felében a reagens FL-tartalmát 0,5  $\mu$ M-ra csökkentettük, hogy az ellenanyag hatását minél inkább függővé tegyük a rendszer FL- és MP-tartalmától. Ezen körülmények felfüggesztették az ellenanyag látenciaidőt nyújtó hatását (a látenciaidő megközelítőleg 10%-kal csökkent a kontrollhoz képest), viszont a csúcserő sokkal kifejezettebb, 73%-os emelkedést mutatott (15. ábra, F). Az MP-k eltávolításának önmagában sem 4, sem 0,5  $\mu$ M FL-koncentráció mellett nem volt hatása a látenciaidőre, viszont az MP-k eltávolításával az anti- $\beta_2$ GPI-nek eltűnt az a markáns, csúcserőértéket emelő hatása, amelyet 4  $\mu$ M FL-koncentráció

mellett láttunk. Ugyanezt a jelenséget, kisebb különbséggel bár, az ETP esetében is megfigyelhettük (15. ábra, E, F).

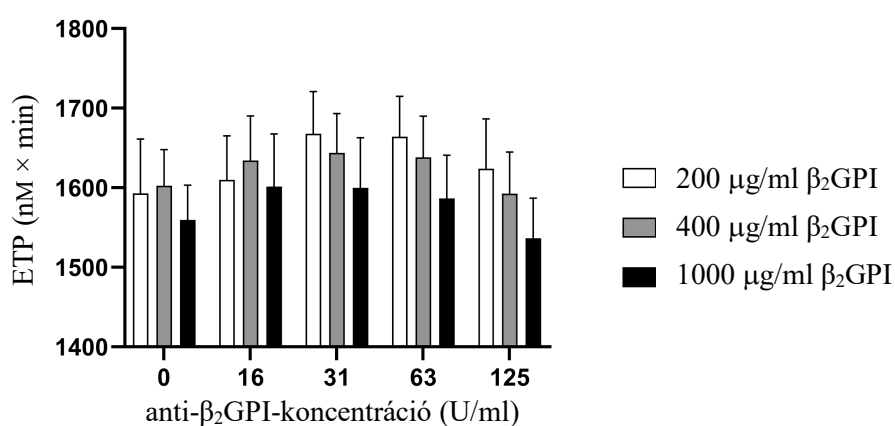


**15. ábra** Az ábra A–D része a mikroparikulák kevert kontrollplazmából való eltávolításának áramlási citometriás vizsgálatát mutatja, az E, F részen látható, hogy a mikropartikula-depléció hogyan befolyásolta az anti- $\beta_2$ GPI trombingeneárcióra kifejtett hatását. Az MP-eket méret (C) és CD41 – annexin V dupla pozitívitás (D, „D++” jelzésű kvadráns) alapján azonosítottuk. Az MP-k mérettartományát (A, a–c: 0,3–1,0  $\mu$ m) méretkalibrációs gyöngyökkel határoztuk meg (A, B). Az anti- $\beta_2$ GPI-et 500 U/ml végkoncentrációban kevert kontrollplazmához (E, F, tele oszlop) és mikropartikula-depletált plazmához (E, F, üres oszlop) adtuk hozzá, és a trombingenerációt 1 pM szöveti faktor mellett 4  $\mu$ M (E) vagy 0,5  $\mu$ M (F) foszfolipid elindítottuk be. Az oszlopdiagramokon egy mérés hármas ismétlésének átlagait ábrázoltuk. Az oszlopdiagramokon 500 U/ml anti- $\beta_2$ GPI hatásának eredményei és a vak kontroll eredményei hányadosát ábrázoltuk.  $n = 1$ , **SSC**: oldalirányú fényszórás (side-scatter), **FSC**: előre irányuló fényszórás (forward-scatter), **PE**: fikoeritrin, **FITC**: fluoreszcein-izotiocianát, **FL**: foszfolipid, **MDP**: mikropartikula-depletált plazma, **MP+**: mikropartikula jelen van, **MP-**: mikropartikula nincs jelen

Az anti- $\beta_2$ GPI a  $\beta_2$ GPI-hez kötődve fejti ki a hatását a véralvadásra, illetve APS-ben az élettaninál sokkal magasabb  $\beta_2$ GPI-szinteket írtak le. Ez alapján megvizsgáltuk, hogy a  $\beta_2$ GPI koncentrációjának változása hogyan befolyásolja az anti- $\beta_2$ GPI trombingenerációra kifejtett hatását.  $\beta_2$ GPI-et 200–1000  $\mu$ g/ml végkoncentrációban és anti- $\beta_2$ GPI-et 15–125 U/ml

végkoncentrációban kevert kontrollplazmához adtuk, majd a trombingenerációt 1 pM TF-fel és 4  $\mu$ M FL-lel indítottuk be.

A  $\beta_2$ GPI befolyásoló hatását leginkább az ETP-re való hatásában láttuk. A korábbi eredményekhez hasonlóan az ellenanyag növelte az ETP-t, ami a 31 U/ml-nél volt a legkifejezettebb, viszont  $\beta_2$ GPI koncentrációjának egyidejű növekedésével az anti- $\beta_2$ GPI ETP-növelő hatása csökkenni látszott, 1000  $\mu$ g/ml esetében már minden ellenanyag-koncentrációnál (16. ábra).

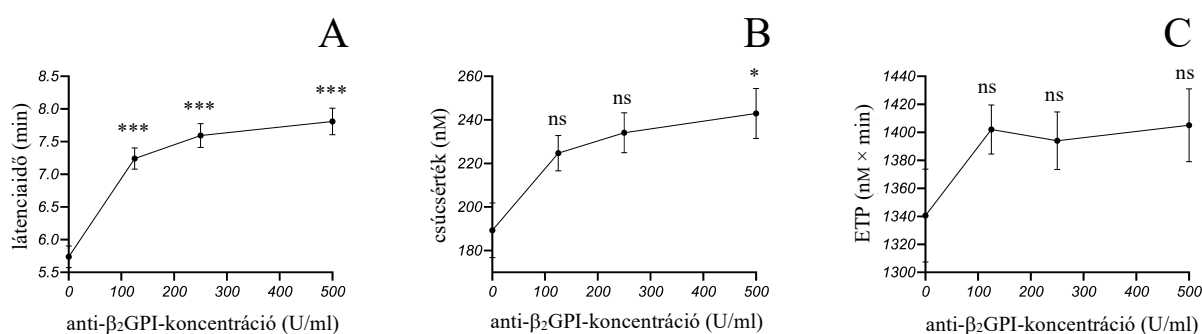


**16. ábra** A  $\beta_2$ GPI befolyásoló hatása az anti- $\beta_2$ GPI trombingenerációban kifejtett hatására. Az oszlopdiagramon az átlagot és a középérték közepes hibáját (SEM) ábrázoltuk.  $n = 4$

#### 4.2.3. Az anti- $\beta_2$ GPI eltérő hatást fejt ki a trombingenerációra az $FV_{Leiden}$ - és $FII_{G20210A}$ -plazmában

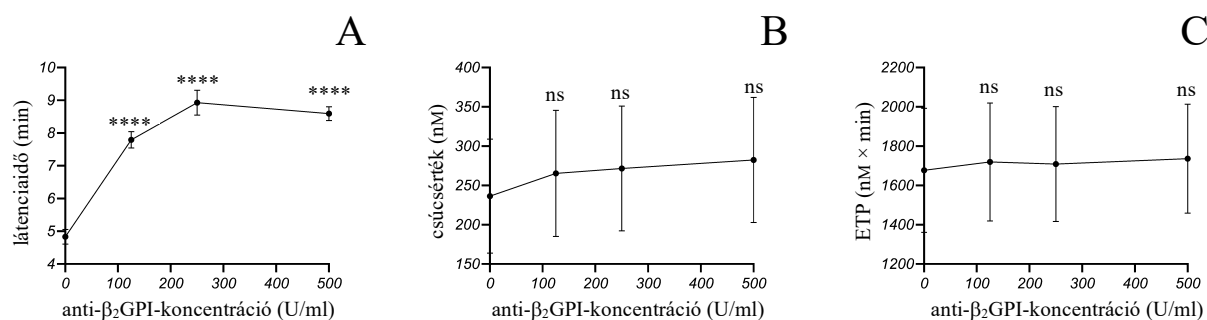
Megvizsgáltuk, hogy az anti- $\beta_2$ GPI a kontrollplazmában tapasztalt paradox hatását ki tudja-e fejtetni a két leggyakoribb öröklött trombofiliában, tovább fokozza-e a protrombotikus állapotot az V-ös véralvadási faktor Leiden-mutációjának és a protrombin gén G20210A polimorfizmusának heterozigóta formájában.  $FV_{Leiden}$ - és  $FII_{G20210A}$ -plazmához anti- $\beta_2$ GPI-et 125–500 U/ml végkoncentrációban adtuk, majd a trombingenerációt 1 pM TF-fel és 4  $\mu$ M FL-lel indítottuk be.

Az anti- $\beta_2$ GPI FV<sub>Leiden</sub>-plazmában az LA-hatást a kontrollplazmában tapasztaltakhoz hasonlóan mutatta, már a legalacsonyabb koncentrációban is szignifikánsan nyújtotta a látenciaidőt ( $P < 0,001$ ). Az anti- $\beta_2$ GPI 500 U/ml koncentrációja az FV<sub>Leiden</sub>-plazmában is képes volt fokozni a mennyiségi paraméterek közül a csúcsértéket 189 nM-ról 243 nM-ra ( $P < 0,05$ ), azonban ez a hatás nem volt jelentősebb a kontrollplazmában tapasztaltnál (17. ábra, B, C).



**17. ábra** Az anti- $\beta_2$ GPI hatása a FV<sub>Leiden</sub>-plazma trombingenerációjára. A grafikonon az eredmények átlagát és a középérték közepes hibáját (SEM) ábrázoltuk.  $n = 5$ , ns: nem szignifikáns, \*:  $P < 0,05$ , \*\*\*:  $P < 0,001$

A kísérletet a FII<sub>G20210A</sub>-plazmával is elvégezve azt kaptuk, hogy az anti- $\beta_2$ GPI a látenciaidőt még erősebben nyújtotta ( $P < 0,0001$ , 18. ábra, A), viszont a korábbi kísérletekben tapasztaltakhoz képest a FII<sub>G20210A</sub> esetében a mennyiségi paramétereket (csúcsérték, ETP) nem emelte (18. ábra, B, C).

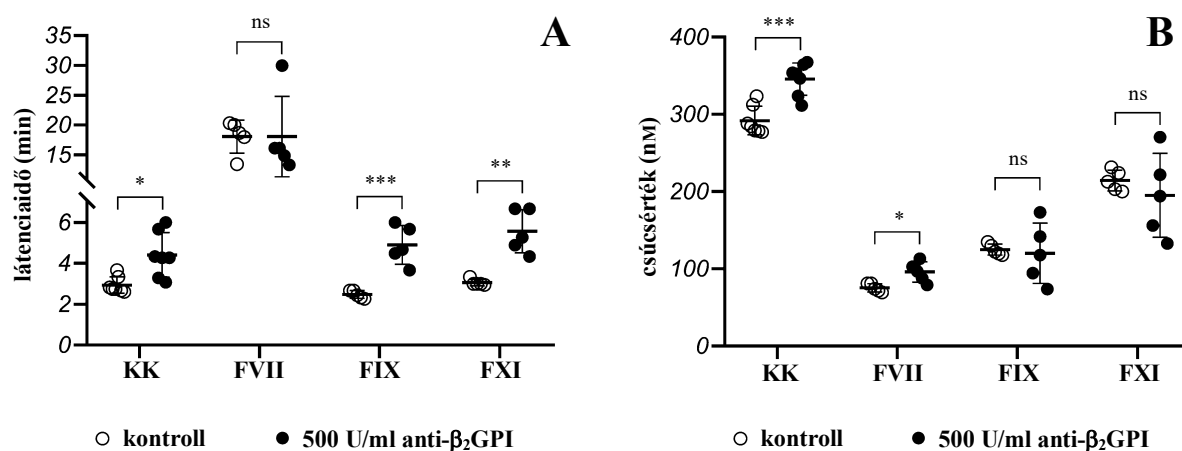


**18. ábra** Az anti- $\beta_2$ GPI hatása a FII<sub>G20210A</sub>-plazma trombingenerációjára. A grafikonon az eredmények átlagát és a középérték közepes hibáját (SEM) ábrázoltuk.  $n = 5$ , ns: nem szignifikáns, \*\*\*\*:  $P < 0,0001$

#### 4.2.4. Az anti- $\beta_2$ GPI anti- és prokoaguláns hatását eltérő koagulációs útvonalakon fejté ki

Az eddig bemutatott hatásokért felelős mechanizmus(oka)t is vizsgáltuk, amihez FVII-, FIX- és FXI-hiányos plazmát használtunk. A plazmákhoz 500 U/ml végkoncentrációban anti- $\beta_2$ GPI-et adtunk. A faktorhiányos plazmáknak a trombingenerációja jelentősen gyengébb az egészséges plazmáéhoz képest, 1 pM TF-fel nem kaptunk reprodukálható trombogramot, ezért ebben a kísérletsorozatban magasabb koncentrációjú, 5 pM TF-fel és 4  $\mu$ M FL-lel indítottuk be a trombingenerációt.

A látenciaidő a KK-ban, a FIX- és FXI-hiányos plazmában kontrolljaiban hasonlóak voltak, viszont a FVII-hiányos plazmában érthető módon (mivel szöveti faktortal indítjuk be a reakciót) látványosan hosszabb időt vett igénybe, hogy elinduljon a trombingeneráció. A FIX és a FXI hiánya nem befolyásolta az anti- $\beta_2$ GPI látenciaidőt nyújtó hatását, viszont a FVII-hiányos plazmában az időnyújtó hatás teljesen elmaradt (19. ábra, A).



**19. ábra** Az anti- $\beta_2$ GPI hatása KK, FVII-, FIX- és FXI-hiányos plazma trombingenerációjára. **KK:** kevert kontrollplazma, **FVII:** VII-es faktorhiányos plazma, **FIX:** IX-es faktorhiányos plazma, **FXI:** XI-es faktorhiányos plazma, **ns:** nem szignifikáns, \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,01$ , \*\*\*:  $P < 0,001$

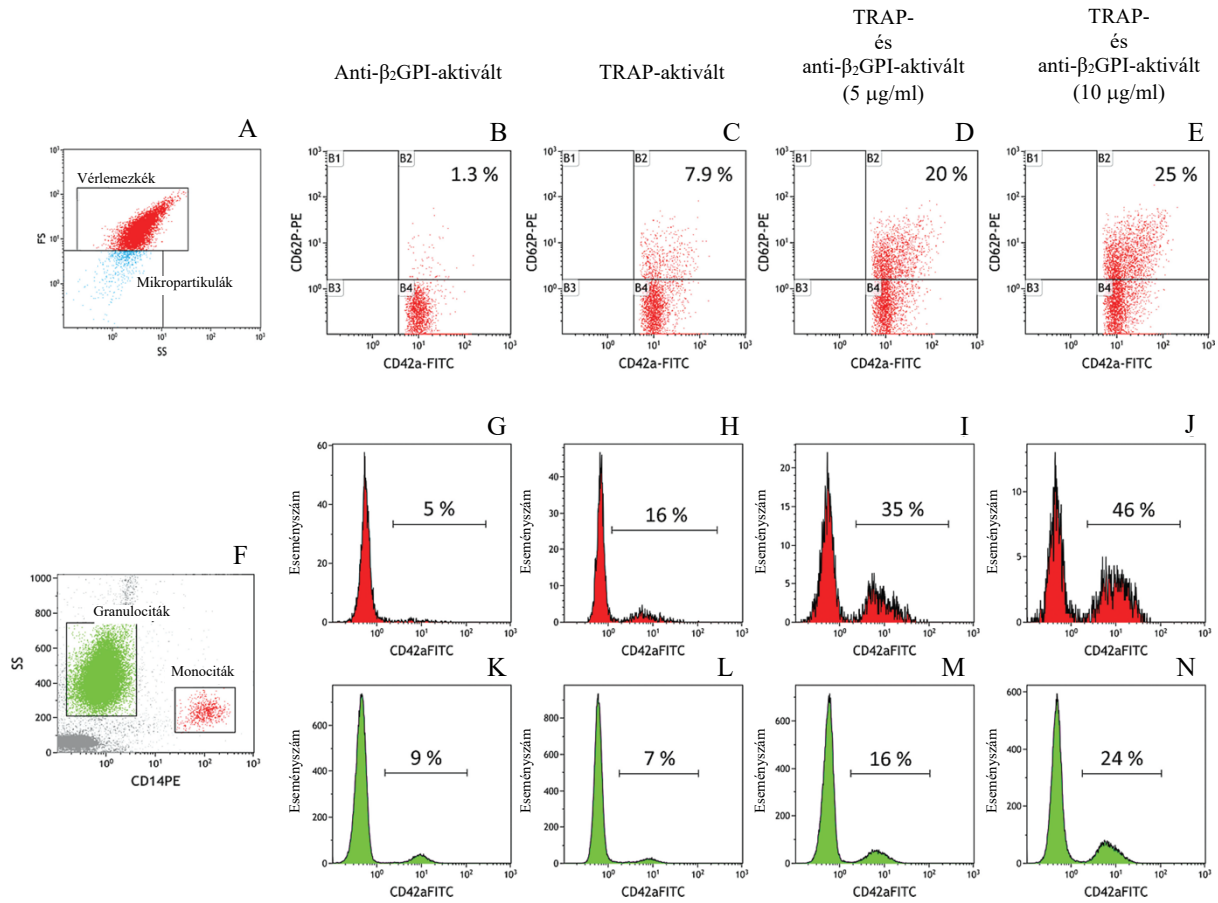
A csúcsérték mindhárom faktorhiányplazmában jelentősen alacsonyabb a KK-hoz képest. Az anti- $\beta_2$ GPI a KK-ban egy igen kifejezett emelkedést okozott a csúcsértékben, amit részben a FVII-hiányos plazmában is látunk, ellenben az intrinszik útvonalhoz tartozó faktorok

hiányában ez a csúcsértéket fokozó hatás elmaradt, sőt enyhe csökkenés volt megfigyelhető (19. ábra, B).

#### *4.2.5. Az anti- $\beta_2$ GPI fokozza a vérlemezék aktivációs készségét*

A vérlemezék anti- $\beta_2$ GPI kiváltotta aktivációjának vizsgálatához közvetlen és közvetett vizsgálómódszereket használtunk. A „két csapás” elméletet alátámasztandó, a vérlemezéket egyszerre inkubáltuk anti- $\beta_2$ GPI-vel és egy már ismert aktiváló ágnessel, TRAP-pal, amely a trombin receptoron keresztül erős aktivációs ingert jelent a vérlemezéknek. A TRAP-ot olyan (szupraminimális) koncentrációban alkalmaztuk, amely túllépi az aktivációhoz szükséges küszöbkoncentrációt, de a lehető legkisebb mértékű vérlemezke-aktivációt váltja ki, ez előkísérletek alapján 10  $\mu$ M-nak adódott.

Amikor a vérlemezéket csak anti- $\beta_2$ GPI-vel inkubáltuk, a P-szelektin-kifejeződés nagyon hasonló volt a kontroll értékhez (1,3%), hasonlóan a vérlemezéknek a monocitákkal és a granulocitákkal képzett heterotipikus aggregátumainak aránya jelentéktelen különbséget mutatott kontrollértékhez képest. A szupraminimális TRAP-koncentráció, ahogyan ez várható volt, a P-szelektin-pozitív vérlemezék arányát enyhén növelte (7,9%), hasonlóan a vérlemezke–monocita aggregátumok arányát. Annak ellenére, hogy az ellenanyag önmagában nem váltott ki aktivációt, a TRAP hatását elősegíteni látszik, az anti- $\beta_2$ GPI koncentrációjának növelésével a TRAP-hatás is fokozódik mind a közvetlen, mind a közvetett aktivációs vizsgálatban. (20. ábra)



**20. ábra** Az anti-β<sub>2</sub>GPI hatása a P-szelektin-kifejeződés és a vérlemezke–monocita, illetve vérlemezke–granulocita aggregátumok arányára. Az anti-β<sub>2</sub>GPI önmagában nem okozott kimutatható aktivációt sem a közvetlen sem a közvetett vizsgálómódszerben, azonban koncentrációfüggően fokozta 10<sup>-5</sup> M TRAP kiváltotta P-szelektin-kifejeződést (B–E). Ezenkívül a vérlemezkek és monociták közötti (G–J), illetve a vérlemezkek és granulociták közötti heterotipikus aggregátumok képződését (K–N) is koncentrációfüggően fokozta. **FS**: előre szórt fény (forward scatter), **SS**: oldalra szórt fény (side scatter), **FITC**: fluoreszcein-izotiocianát, **PE**: fikoeritrin

## 5. MEGBESZÉLÉS

A  $\beta_2$ -glikoprotein-I már 60 éve ismert, kapcsolatáról az antifoszfolipid szindrómával pedig már több mint 30 éve tudunk. A fehérje élettani sokoldalúságát mutatja, hogy többek között anti- és prokoaguláns tulajdonságai is vannak, ilyen pl. a XI-es véralvadási faktor aktiválódásának gátlása, vagy a trombin lebomlásának gátlása. A  $\beta_2$ GPI jelenléte szükséges az auto-ellenanyaga által kifejtett kóros hatások kiváltásához is. Genetikai hiánya nagyon ritka, így nehezen vizsgálható élettani szerepe is, és mivel részleges és teljes  $\beta_2$ GPI-hiányban nem sikerült működésbeli kiesést leírni sem a véralvadásban sem a zsíryanycserében,<sup>69</sup> a  $\beta_2$ GPI eddig talált hatásai vagy mellékesebb szerepet tölthetnek be az élettanában, vagy az az eddig megismertnél sokkal összetettebb. Állatkísérletekben ettől eltérő hatást figyeltek meg Sheng és mtsai., akik egérikísérletben modellezték a részleges és teljes  $\beta_2$ GPI-hiányt. A  $\beta_2$ GPI-szint csökkenésével egyre alacsonyabb trombingnerációt tapasztaltak, így eredményeik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a  $\beta_2$ GPI-nek *in vivo* prokoaguláns hatása lehet.

A  $\beta_2$ GPI működésének megértéséhez figyelembe kell venni azt is, hogy két szélsőséges konformációját írták le: a zárt (cirkuláris) és a nyitott („J” alakú) formát. Mivel a keringésben főleg a zárt forma fordul elő, és az anti- $\beta_2$ GPI hozzájárul a molekula felnyílásához, inkább a nyitott forma tekinthető a biológiailag működőnek.<sup>65, 68</sup> Kísérleteinkben  $\beta_2$ GPI-et tisztítottunk, amelyet MALDI-TOF-fal 41,5 kDa molekulaméretűnek találtunk, és a pufferkörülmények változtatásával zárt és nyitott konformációjúvá alakítottunk. Elektronmikroszkópos módszer segítségével sikerült azonosítanunk a zárt és a nyitott konformációjú molekulát. A nyitott forma jelentős mértékben nyújtotta a foszfolipidfüggő alvadási időket. A hPI-tesztben a nyitott forma látványos nyúlást okozott, míg a zárt a kontrollhoz nagyon hasonló eredményt adott, ami alapján a hPI-teszt alkalmasnak tűnik a biológiailag aktív és inaktív forma elkülönítésére. Trombingeneráció-tesztben is vizsgáltuk a  $\beta_2$ GPI hatását, amihez a gyártó ajánlása alapján az

alapértelmezett összetételű indítóreagenst (5 pM szöveti faktor és 4  $\mu$ M foszfolipid) használtuk, ebben a vizsgálatban azonban még a nyitott konformációjú  $\beta_2$ GPI-gyel sem kaptunk szignifikáns eredményt. Ezek az eredmények megfelelnek az irodalomban találhatókkal, Ninivaggi és mtsai. hasonló mérési körülmények között ennek megfelelő eredményeket kaptak, a  $\beta_2$ GPI nem volt hatással a trombingenerációra, illetve a gátló hatás csak alacsony koncentrációjú foszfolipid mellett volt megfigyelhető a hPI-tesztben talált eredményeinkhez hasonlóan.

A  $\beta_2$ GPI V. doménje különleges abból a szempontból, hogy foszfolipidek kötésére alkalmas részek találhatóak a felszínén, viszont a molekula nemcsak foszfolipidekhez, hanem heparinhoz is képes kötődni.<sup>86, 87</sup> A  $\beta_2$ GPI sokoldalúságát példázza az is, hogy képes megkötni és megvédeni a trombint a heparinkofaktor II általi gátlástól.<sup>73</sup> A  $\beta_2$ GPI és a heparin közötti kölcsönhatást vizsgálva SPR-rel azt kaptuk, hogy bár mindkét konformációjú  $\beta_2$ GPI kötődött a heparinhoz, a nyitott egy nagyságrenddel nagyobb affinitást mutatott a heparin iránt. Kolyada és mtsai. kimutatták, hogy a heparin bár kötődik a  $\beta_2$ GPI-hez, a kötődés nem a foszfolipidkötő lizinoldalláncon keresztül valósul meg, így ezek működésére nincs hatással.<sup>87</sup> Elképzelhető, hogy ez a körülmény befolyásolja az APS-ben adott heparin- vagy LMWH-terápia hatásosságát és így azok optimális terápiás dózisát is. Ez a kérdés azonban további vizsgálatokat igényel, mivel a heparin a  $\beta_2$ GPI-nek a véralvadási faktorokkal a foszfolipid felszínéért való versengését, és az ilyen módon megvalósuló antikoaguláns hatását nem akadályozza meg, ugyanakkor a  $\beta_2$ GPI a trombinlebomlás megakadályozásával protrombotikus hatást fejt ki, így nehéz lenne megjósolni, hogy a heparin dózisának változtatásával melyik hatás érvényesül jelentősebben.

Vizsgáltuk a  $\beta_2$ GPI két konformációjának auto-ellenanyagához való kötődésének erősségét SPR-rel. Az vizsgálat szempontjából irreleváns ellenanyagokkal is elvégeztük a kísérletet a nemfajlagos kötődések kizárása céljából, ezekkel az ellenanyagokkal nem kaptunk

értékelhető szenzorgramokat, ami arra utal, hogy a nemfajlagos kötődés elhanyagolható mértékű. Mindkét konformáció kötődött az ellenanyagához, a megfigyelt kötődések erőssége a  $10^{-8}$  M tartományba esett mindkét konformáció esetében, amit fordított orientációjú kísérlettel is megerősítettünk. Nem minden anti- $\beta_2$ GPI ellenanyag idéz elő kóros állapotot, a legerősebb összefüggést a  $\beta_2$ GPI I-es doménje ellen termelődött anti- $\beta_2$ GPI-nek tulajdonítják, amely kötődéséhez szükséges az antigén nyitott konformációja.<sup>88</sup> Mivel az SPR-csipek felszínén minden vizsgálat esetében ugyanannyi ligandum (anti- $\beta_2$ GPI) volt, illetve ugyanolyan koncentrációban fecskendeztük be az analitikumot (zárt/nyitott  $\beta_2$ GPI) a mikroáramlási cellákba, a szenzorgramok RU-értékeiből levonható az a következtetés, hogy az ellenanyagok nagyobb mennyiségű nyitott  $\beta_2$ GPI-et tudtak megkötni, mint zártat. Eredményeinket tovább finomította volna az anti- $\beta_2$ GPI-DI arányának meghatározása a mintáinkban, ezek az eredmények azonban segíthetnek még alaposabban megérteni a  $\beta_2$ GPI működésének részleteit.

A  $\beta_2$ GPI élettani működésével kapcsolatban bár még számtalan tisztázandó kérdés van, a legtöbbet mégis az antifosfolipid szindrómában betöltött kórélettani hatásáról tudunk, mivel többek között az ellene termelődő és vele reagáló auto-ellenanyagokhoz és az általuk kiváltott hatásokhoz köthetők az APS kórélettani folyamatai. Már az APS 1983-as leírása<sup>5</sup> előtt ismerték azt az önellentmondó jelenséget, hogy ha egy beteg plazmája inkorrigábilis, foszfolipidfüggő megnyúlást mutat az alvadási tesztekben, akkor abban a betegben nem vérzésre, épp ellenkezőleg trombózisra lehet számítani. A lupusz antikoaguláns jelenségét az antifosfolipid ellenanyagok okozzák,<sup>19</sup> viszont mivel azok egy heterogén csoportot képeznek, nem egyértelmű, hogy melyik ellenanyag(ok) és milyen molekuláris mechanizmus(ok) felelős(ek) ezért az összetett hatásért. Számos klinikai és kísérletes eredmény utal arra, hogy a  $\beta_2$ GPI I-es doménjével reagáló anti- $\beta_2$ GPI a kóros antitest, és ez tehető felelőssé a trombózis fokozott kockázatáért.<sup>57, 89, 90</sup>

APS-ben már régóta megfigyelték, hogy fokozott trombingeneráció jellemző a betegségre, a protrombin F<sub>1+2</sub> fragmentuma és a fibrinopeptid A szintjének együttes emelkedését írták le anti-KL-pozitív APS-es betegekben.<sup>91</sup> Ezek a klinikai eredmények azonban nem voltak elég meggyőzőek, mert fokozott trombingenerációt csak alkalmoszerűen tudtak kimutatni APS-ben. Kísérletes körülmények között azonban már sikerült bizonyítani, hogy az APS-es betegekből származó anti-β<sub>2</sub>GPI dóziszfüggő módon képes fokozni a lézer kiváltotta artériás trombózist egérmódelben.<sup>92</sup> Az aPL-ek *in vivo* hatását egyéb állatkísérletekben is bizonyították már, ahol szintén trombózist fokozó hatását írták le.<sup>44</sup> Kísérleteinkben az anti-β<sub>2</sub>GPI koagulációra kifejtett hatását vizsgáltuk, hogy jobban megértsük a trombózist okozó hatásuk mechanizmusát. Ehhez APS-es betegek vérsavójából IgG izotípusú anti-β<sub>2</sub>GPI-et tisztítottunk, és egészséges plazma trombingenerációját mértük az ellenanyagok hozzáadása után. A tesztben 1 pM szöveti faktort használtunk, mert a trombingeneráció-teszt ismertén érzékenyebb, amikor alacsonyabb mennyiségű szöveti faktort alkalmazunk. Ezen körülmények között jobban vizsgálhattuk az anti-β<sub>2</sub>GPI jól ismert *in vitro* időnyújtó hatását. Az LA-hatás mellett az anti-β<sub>2</sub>GPI trombinképződést fokozó hatását is megfigyeltük. Az egyes betegmintákból külön-külön tisztítottuk az ellenanyagokat, így az eredményeket összevethettük a hozzájuk tartozó betegek klinikai tulajdonságival. Amikor a betegeket vérlemezkeszám alapján (legalább közepsúlyos trombocitopénia < 100 G/l ≤ élettani vérlemezkeszám vagy csak enyhe trombocitopénia) két csoportba osztottuk, a TGT-ben tapasztalt eredményeik alapján sem a látenciaidőben, sem a csúcserértékben nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között. Ugyanígy jártunk el a betegek két csoportra osztásában az *ex vivo* mért anti-β<sub>2</sub>GPI-szint alapján is (alacsony < 5000 U/ml ≤ magas), az eredmények alapján itt sem tudtunk különbséget kimutatni a két csoport között.

Retrospektív tanulmány alapján az V-ös véralvadási faktor Leiden-mutációját (FV<sub>Leiden</sub>) hordozókban a tünetmentes egyének ETP-je nem különbözik az egészségesekétől.<sup>93</sup>

Vizsgálatinkban azt találtuk, hogy a magas anti- $\beta_2$ GPI a heterozigóta FV<sub>Leiden</sub>-plazmában is növelte a trombin csúcskoncentrációját a KK-ban találtakhoz hasonlóan, ami azt jelenti, hogy a leggyakoribb öröklött trombózishajlamban az aPL-ek jelenléte tovább növelheti a trombózis kockázatát. Az anti- $\beta_2$ GPI egy másik, gyakori öröklött trombózishajlamban, a protrombint kódoló gén G20210A polimorfizmusában (FII<sub>G20210A</sub>) is késleltette a trombingenerációt. Bár azt figyeltük meg, hogy a csúcsérték és az ETP növekedni kezdett az anti- $\beta_2$ GPI hatására, statisztikailag szignifikáns hatást nem sikerült kimutatnunk még a legmagasabb ellenanyag-koncentrációban (500 U/ml) sem. Ezt magyarázhatja, hogy a FII<sub>G20210A</sub>-plazmában találtuk a legerőteljesebb, 79%-os látenciaidőt nyújtó hatást, ami a prokoaguláns hatást ellensúlyozza, szemben a FV<sub>Leiden</sub>- és KK-ban talált 34%-os és 21%-os késleltető hatással.

Az APS-ben tapasztalható aPL-szintek és a hozzájuk tartozó klinikai kép nagyon változó, akár 100 U/ml ellenanyagszint mellett is alakulhatnak ki trombotikus szövődmények, illetve kiugróan magas értékekkel is lehetnek a betegek tünetmentesek. Emiatt megvizsgáltuk, hogy az anti- $\beta_2$ GPI képes-e kifejtetni az eddig tapasztalt hatásokat alacsonyabb koncentráció-tartományban is. Azt találtuk, hogy a laboratóriumi pozitívítási határt (20 U/ml) csupán 2–3-szor meghaladó aPL-értékek is képesek voltak a látenciaidőt szignifikánsan nyújtani, és emellett még az ETP-t is szignifikánsan növelni, ami megegyezik az *in vivo* tapasztaltakkal, miszerint az aPL koncentrációja nem feltétlenül függ össze a klinikai állapot súlyosságával.

Az aPL-ek koagulációs rendszerre kifejtett hatásának magyarázatára több, egymást kiegészítő elmélet és kísérletes eredmény született. Az egyik legrégebb óta ismert mechanizmus, az APC-rezisztencia.<sup>54, 56, 94</sup> Ezzel azonban az általunk is használt, sejtmentes körülmények között feltételezhetően nem kell számolni – hacsak mesterségesen hozzá nem adjuk a rendszerhez az aktivált protein C-t vagy az annak aktivációját elősegítő trombomodulint – mivel a trombin szubsztrátumfajlagosságának megváltozását és így az antikoaguláns működését az endotélsejtek felszínén kifejeződő trombomodulin segíti elő.

Egyéb mechanizmusok, melyek viszont sejtmentes környezetben is számításba jöhetnek, a véralvadási faktorokat, illetve az azokat szabályozó rendszereket érintik. Ilyen lehet az annexin-A5-rezisztencia,<sup>95</sup> a fibrinolízis gyengítése<sup>96</sup> vagy a szövetifaktorútvonali-inhibitor (TFPI) működésének gátlása.<sup>59, 97</sup> Vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy a TG-kísérleteinkben tapasztalt pro- és antikoaguláns hatást az anti- $\beta_2$ GPI milyen útvonalakon fejti ki, amihez KK-t és véralvadási faktorhiányos plazmát használtunk. A faktorhiány miatt alacsonyabb TF-koncentrációval (1 pM) sok esetben nem kaptunk értékelhető trombogramot, ezért ezekben a kísérletekben a korábbiaktól eltérően magasabb, 5 pM szövetifaktor-koncentrációval indítottuk be a reakciót. Ebből kifolyólag a KK csúcsértéke is jelentősen magasabb lett. Önmagában a faktorhiányok is erőteljesen befolyásolták a trombingeneráció paramétereit. Az indítóreagens összetételéből (TF + FL) érthető, hogy a FVII-hiányos plazma látenciaideje volt a leghosszabb és a csúcsértéke a legalacsonyabb. A FIX- és a FXI-hiányban a látenciaidők hasonlóak voltak a KK-ban mértékéhez. A csúcsértékek a FVII-től távolodva nőttek, a legmagasabb, a KK-éhoz közeli volt a FXI-, majd következett a FIX-, és a legalacsonyabb a FVII-hiányban volt. A hiányplazmákban az IgG anti- $\beta_2$ GPI ellenanyag hatása az időparaméterekre és a mennyiségi paraméterekre elkülönültni látszott annak megfelelően, hogy az extrinszik vagy az intrinszik útvonal maradt ép a plazmában. Az extrinszik út károsításakor az anti- $\beta_2$ GPI képes volt emelni a trombin mennyiségét, de a látenciaidőt nem tudta nyújtani, nem úgy az intrinszik út károsodásakor, ahol az ellenanyag képes volt késleltetni, de a trombin mennyiségi növekedése elmaradt. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az anti- $\beta_2$ GPI által kifejtett lupusantikoaguláns-hatás paradoxonja egymástól független, a koagulációs kaskád különböző pontjain megvalósuló, párhuzamosan zajló folyamatok eredménye, amelyek elképzelhető, hogy állandó „kötélhúzásban” vannak egymással, és a trombólizist véglegesen kiváltó hatás (második csapás) ezt a feszülő kötelet rántja meg pro irányba.

Több kísérlettel is igazolták, hogy az anti- $\beta_2$ GPI hatásának kialakulásához szükséges maga a ligandum, a  $\beta_2$ GPI is.<sup>42</sup> Banzato és Pengo kimutatta, hogy a tripla pozitív (LA, IgG anti-KL, IgG anti- $\beta_2$ GPI) APS-es betegekben a  $\beta_2$ GPI szintje szignifikánsan magasabb. Ezen eredmények mentén elindulva terveztük meg kísérleteinket, melyekben a  $\beta_2$ GPI szintjét emelve vizsgáltuk a ligandum befolyásoló hatását az anti- $\beta_2$ GPI TGT-ben kifejtett hatására. Azt kaptuk, hogy a  $\beta_2$ GPI magasabb koncentrációi képesek mérsékelni az anti- $\beta_2$ GPI hatását, ami mögött feltételezhető egy „hígulási” mechanizmus, melynek lényege, hogy az összes ellenanyag  $\beta_2$ GPI-hez kötött formában van, emellett nagy arányban van jelen olyan  $\beta_2$ GPI, melyhez nem kötődik ellenanyag, így a szabad  $\beta_2$ GPI és a  $\beta_2$ GPI/anti- $\beta_2$ GPI komplex között versengés alakul ki a koagulációban betöltött szerepért.

A trombingenerációs vizsgálati rendszerünk bár sejtmentes volt, a TGT mintaelőkészítése olyan volt, hogy mikropartikulák maradhattak a plazmában, melyek szintén hozzájárulhattak az észlelt hatásokhoz. Annak vizsgálatára, hogy az MP-k milyen arányban járulnak hozzá az anti- $\beta_2$ GPI hatásához, mikropartikulákat távolítottunk el a KK-ból, és a mikropartikula-depletált plazmához adtuk hozzá az anti- $\beta_2$ GPI-et. A reagens-összetétel megfelelt a KK-ban használtéval (1 pM TF, 4  $\mu$ M PL), ekkor azonban nem kaptunk különbséget a KK-ban és az MDP-ben tapasztalt anti- $\beta_2$ GPI-hatások között. Azért, hogy a rendszer érzékenyebb legyen az FL-koncentrációra és az MP-k jelenlétére, csökkentettük a reagens FL-koncentrációját 0,5  $\mu$ M-ra. Ekkor már a reagens viszonylag magas foszfolipid-tartalma nem fedte el a KK és az MDP foszfolipid-koncentrációja közötti különbséget, és MP-k jelenlétében az anti- $\beta_2$ GPI sokkal magasabb csúcsérték-emelkedést váltott ki, mint azok hiányában. Ez a kísérlet is megerősíti azt az elképzelést, hogy az anti- $\beta_2$ GPI egyszerre, egymástól független, pro- és antikoaguláns hatást fejt ki; magasabb FL-koncentráció mellett az antikoaguláns hatás elnyomja a prokoagulánst, alacsony FL-koncentráció mellett azonban a prokoaguláns tud érvényesülni, és TGT-ben a csúcsérték drasztikusan megemelkedik.

A keringésben található mikropartikulák legnagyobb mennyisége sejtaktivációból, elsősorban vérlemezke-aktivációból származik.<sup>98</sup> Úgy tűnik, hogy az aPL-ek hemosztázisra gyakorolt hatása és az MP-k befolyásoló hatása két egymásba szövődő folyamat, mivelhogy az aPL-ek sejtaktivációs készségét már számos közlemény közvetlen és közvetett módon is bizonyította mind *in vivo*, mind *in vitro*.<sup>44, 99, 100</sup> Vizsgálatainkban szintén megpróbáltuk bizonyítani az anti- $\beta_2$ GPI vérlemezkeaktiváló hatását, egyben a „két csapás” elméletet, miszerint az aPL-ek jelenléte önmagában csak megengedő tényezője a fokozott trombózishajlagnak. Mind a vérlemezkék aktivációját közvetlenül kimutató P-szelektin-kifejeződési vizsgálatban, mind az aktivációt közvetetten, a vérlemezke-fehérvérsejt aggregátumokat meghatározó vizsgálatban azt tapasztaltuk, hogy az anti- $\beta_2$ GPI jelenléte önmagában nem elegendő inger a sejtaktivációhoz, azonban egy közvetlen aktivációs ágens hatását, a TRAP-ét képes volt fokozni koncentrációfüggő módon. Állatkísérletek, *in vivo* eredményei is alátámasztják a „két csapás” elméletet, miszerint az aPL-ek intravénás befecskendezése nem közvetlen kiváltója, hanem fokozó tényezője a trombosishoz.<sup>43, 44</sup>

Kísérleteinkkel bemutattuk és igazoltuk a  $\beta_2$ GPI véralvadásban kifejtett különböző élettani hatásait. Sikerült kimutatnunk az aPL-ek által kifejtett paradox hatást, miszerint egyszerre anti- és prokoaguláns hatással is bírnak, ami a trombin képződésének időbeliségében és mennyiségében mutatkozott meg. Ezt a kettős hatást sikerült elkülönítve is bemutatnunk, külön koagulációs útvonalakhoz rendelve a két eltérő működést. Ezekkel az eredményekkel egy újabb képkockája rajzolódott ki az  $\beta_2$ -glikoprotein-I élettani hatásainak és az antifosfolipid szindróma kórélettanának. Még ma is számos alapvető kérdés megválaszolatlan az antifosfolipid szindrómával kapcsolatban. A PubMed adatbázisa alapján az *antiphospholipid syndrome* keresőszó alatt több mint 14.400 közlemény jelent meg 1977 és 2021 között, ami tetemes mennyiségű ismeretet feltételez. Ez azonban valószínűleg csak a jéghegy csúcsa, amit jól jellemez az is, hogy a 2018-as dublini ISTH SSC konferencia Lupus

Anticoagulant vitafórumán Vittorio Pengo, az antifoszfolipid szindróma egyik neves kutatója azt mondta hallgatóságának: „Ha most feltenném önöknek a kérdést, hogy mi az a lupusz antikoaguláns, nem tudnák megválaszolni, mert ezt ma még senki nem tudja!”

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az antifoszfolid szindrómában kialakuló kórfolyamatok háttérében megbúvó pontos molekuláris folyamatok/szereplők máig tisztázatlanok. Ismert, hogy antifoszfolid szindrómában artériás és/vagy vénás trombózis, illetve terhességi szövődmények alakulhatnak ki. Ezek a kórfolyamatok bizonyított összefüggésben állnak az antifoszfolid szindrómában kimutatható auto-ellenanyagok jelenlétével, illetve egy az ezen ellenanyagok által kifejtett paradox hatással, a lupusz antikoagulánssal. A lupusz antikoaguláns (LA) pozitivitása *in vitro* antikoaguláns, *in vivo* protrombotikus következményekkel jár, azonban ennek az önellentmondó hatásnak a molekuláris háttérére eddig még nincs egyértelmű magyarázat.

Célul tűztük ki az LA-jelenség vizsgálatát, illetve az anti- $\beta_2$ GPI (anti- $\beta_2$ -glikoprotein-I) kórélettani és az antifoszfolid szindróma központi molekulája, a  $\beta_2$ GPI élettani működésének vizsgálatát. Ehhez az ellenanyagot, illetve a ligandumát tisztítottuk, és vizsgáltuk, hogyan viselkednek kevert kontroll, öröklött protrombotikus, illetve mesterségesen előállított faktorhiányplazmákban.

Eredményeink rávilágítottak arra, hogy az anti- $\beta_2$ GPI-nek szerepe van az LA-hatás kialakulásában, melynek mind az antikoaguláns, mind a protrombotikus összetevőit ki tudtuk mutatni trombingenerációs vizsgálattal. A trombingeneráció-tesztekből nyert eredményeink arra engednek következtetni, hogy a két ellentétes hatás két különböző koagulációs útvonalon keresztül valósul meg. A  $\beta_2$ GPI hatásait sikerült összefüggésbe hoznunk a molekula már eddig is ismert konformációváltozásaival, amiből arra következtethetünk, hogy a nyitott konformációt tekinthetjük a biológiailag aktívnek.

## 7. SUMMARY

The exact molecular processes/players underlying the pathophysiology of antiphospholipid syndrome are still unclear. It is known that in antiphospholipid syndrome, arterial and/or venous thromboses and pregnancy morbidity may develop. These pathological processes are proved to be related to the presence of autoantibodies detectable in antiphospholipid syndrome and to a paradox effect—exerted by these autoantibodies—the lupus anticoagulant. LA (lupus anticoagulant) positivity entails *in vitro* anticoagulant effect and *in vivo* prothrombotic events, however, still there is no clear explanation for the molecular background of this contradictory effect.

Our objective was to investigate the LA phenomenon, the pathophysiology of anti- $\beta_2$ GPI (anti- $\beta_2$ -glycoprotein-I) and the physiological function of  $\beta_2$ GPI, the central molecule of the antiphospholipid syndrome. To address this, we purified antibody and its ligand and investigated the effect they exert on normal pooled, hereditary prothrombotic and artificial factor deficient plasmas.

Our results demonstrated the role of anti- $\beta_2$ GPI in the development of LA effect, of which both the anticoagulant and the prothrombotic components were detectable by thrombin generation assay. Our thrombin generation test results suggest that the two opposing effects are exerted via two different coagulation pathways. We were able to relate the effect of  $\beta_2$ GPI to its already known conformational changes, which suggests that the open conformation can be considered the biologically active form.

## 8. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ EREDMÉNYEI, MEGÁLLAPÍTÁSAI, KLINIKAI JELENTŐSÉGE

*A  $\beta_2$ -glikoprotein-I ( $\beta_2$ GPI) élettani és kórélettani hatására vonatkozó új megállapítások:*

- A  $\beta_2$ GPI nyitott konformációja statisztikailag szignifikánsan nyújtja a foszfolipidfüggő alvadási időket, melyek közül a protrombinidő alkalmas a biológiailag aktív (nyitott) és inaktív (zárt) konformáció elkülönítésére.
- A  $\beta_2$ GPI konformációtól függetlenül kötődik a heparinhoz, azonban a nyitott konformáció egy nagyságrenddel nagyobb affinitást mutat a heparin iránt.
- A  $\beta_2$ GPI mindkét konformációjában kötődik az auto-ellenanyagához (anti- $\beta_2$ GPI), amelyek nagyobb mennyiségű nyitott  $\beta_2$ GPI-et képesek megkötni.

*Az anti- $\beta_2$ -glikoprotein-I (anti- $\beta_2$ GPI) kórélettani hatására vonatkozó új megállapítások:*

- Az anti- $\beta_2$ GPI szerepet játszik a lupusz antikoaguláns paradox hatásának kialakulásában. Az ellenanyag egyszerre fejt ki a trombinképződést késleltető és a trombinképződést fokozó hatást.
- Az anti- $\beta_2$ GPI a prokoaguláns hatását az intrinszik, az antikoaguláns hatását az extrinszik útvonalon fejt ki.
- Az anti- $\beta_2$ GPI pro- és antitrombotikus hatását egészséges plazmán kívül az V-ös véralvadási faktor Leiden-mutációját heterozigóta formában hordozó plazmában és a protrombin gén G20210A polimorfizmusát heterozigóta formában hordozó plazmában is ki tudja fejteni, amivel a trombofiliát képes tovább fokozni.
- Az anti- $\beta_2$ GPI által kifejtett hatást befolyásolja a plazma foszfolipid-koncentrációja. Alacsony foszfolipid-koncentráció mellett erősebben érvényesül az anti- $\beta_2$ GPI protrombotikus hatása.

- Az anti- $\beta_2$ GPI által kifejtett véralvadási-aktivációs hatás megfelel a két csapás elméletnek, miszerint a véralvadási fokozott aktivációjához az ellenanyag jelenléte csak megengedő tényező, a fokozott aktiváció kialakulásához szükséges valamilyen közvetlen aktiváló ágens.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Wassermann A, Neisser A, Bruck C. Eine serodiagnostische reaktion bei syphilis. *Dtsch Med Wochenschr.* 1906;32:745.
2. Moore JE, Mohr CF. Biologically false positive serologic tests for syphilis; type, incidence, and cause. *J Am Med Assoc.* Oct 4 1952;150(5):467–73. doi:10.1001/jama.1952.03680050033010
3. Moore JE, Lutz WB. The natural history of systemic lupus erythematosus: An approach to its study through chronic biologic false positive reactors. *Journal of Chronic Diseases.* 1955/03/01/ 1955;1(3):297–316. doi:https://doi.org/10.1016/0021-9681(55)90039-4
4. Conley CL, Hartmann RC. A Hemorrhagic Disorder Caused by Circulating Anticoagulant in Patients with Disseminated Lupus Erythematosus. presented at: J Clin Invest; 1952;
5. Hughes GR. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *Br Med J (Clin Res Ed).* Oct 15 1983;287(6399):1088–9. doi:10.1136/bmj.287.6399.1088
6. Hughes GR. The anticardiolipin syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* Oct–Dec 1985;3(4):285–6.
7. Galli M, Comfurius P, Maassen C, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet.* Jun 30 1990;335(8705):1544–7. doi:10.1016/0140-6736(90)91374-j
8. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet.* Jul 21 1990;336(8708):177–8. doi:10.1016/0140-6736(90)91697-9
9. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta

- 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 1990;87(11):4120–4. doi:10.1073/pnas.87.11.4120
10. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*. Feb 2006;4(2):295–306. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x
  11. Asherson RA, Cervera R. Antiphospholipid antibodies and infections. *Ann Rheum Dis*. May 2003;62(5):388–93. doi:10.1136/ard.62.5.388
  12. Cervera R, Boffa MC, Khamashta MA, Hughes GR. The Euro-Phospholipid project: epidemiology of the antiphospholipid syndrome in Europe. *Lupus*. Sep 2009;18(10):889–93. doi:10.1177/0961203309106832
  13. Graf J. Central Nervous System Manifestations of Antiphospholipid Syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. Nov 2017;43(4):547–560. doi:10.1016/j.rdc.2017.06.004
  14. Gadó K, Domján G. Antiphospholipid syndrome and pregnancy. *Orvosi Hetilap*. 01 Aug. 2012 2012;153(31):1207–1218. doi:10.1556/oh.2012.29425
  15. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet*. Nov 26 1983;2(8361):1211–4. doi:10.1016/s0140-6736(83)91267-9
  16. Devreese KMJ. How to Interpret Antiphospholipid Laboratory Tests. *Curr Rheumatol Rep*. Jun 19 2020;22(8):38. doi:10.1007/s11926-020-00916-5
  17. Pengo V, Biasiolo A, Bison E, Chantarangkul V, Tripodi A. Antiphospholipid antibody ELISAs: survey on the performance of clinical laboratories assessed by using lyophilized affinity-purified IgG with anticardiolipin and anti-beta2-Glycoprotein I activity. *Thromb Res*. 2007;120(1):127–33. doi:10.1016/j.thromres.2006.07.014
  18. Bolton JS, Chaudhury S, Dutta S, et al. Comparison of ELISA with electrochemiluminescence technology for the qualitative and quantitative assessment of serological

responses to vaccination. *Malaria Journal*. 2020/04/17 2020;19(1):159. doi:10.1186/s12936-020-03225-5

19. Molhoek JE, de Groot PG, Urbanus RT. The Lupus Anticoagulant Paradox. *Semin Thromb Hemost*. Jul 2018;44(5):445–452. doi:10.1055/s-0037-1606190

20. Yin D, de Groot PG, Ninivaggi M, Devreese KMJ, de Laat B. Clinical Relevance of Isolated Lupus Anticoagulant Positivity in Patients with Thrombotic Antiphospholipid Syndrome. *Thromb Haemost*. Dec 31 2020;doi:10.1055/a-1344-4271

21. Atsumi T, Furukawa S, Amengual O, Koike T. Antiphospholipid antibody associated thrombocytopenia and the paradoxical risk of thrombosis. *Lupus*. 2005;14(7):499–504. doi:10.1191/0961203305lu2145rr

22. Cervera R, Piette JC, Font J, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum*. Apr 2002;46(4):1019–27. doi:10.1002/art.10187

23. Pietras NM, Pearson-Shaver AL. Immune Thrombocytopenic Purpura. *StatPearls*. StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.

24. Galli M, Daldossi M, Barbui T. Anti-glycoprotein Ib/IX and IIb/IIIa antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost*. May 1994;71(5):571–5.

25. Merashli M, Arcaro A, Graf M, Gentile F, Ames PRJ. Autoimmune haemolytic anaemia and antiphospholipid antibodies in paediatrics: a systematic review and meta-analysis. *Clin Rheumatol*. May 2021;40(5):1967–1973. doi:10.1007/s10067-020-05436-2

26. Tarr T, Lakos G, Bhattoa HP, Szegedi G, Shoenfeld Y, Kiss E. Primary antiphospholipid syndrome as the forerunner of systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2007;16(5):324–8. doi:10.1177/0961203307077993

27. Belizna C, Stojanovich L, Cohen-Tervaert JW, et al. Primary antiphospholipid syndrome and antiphospholipid syndrome associated to systemic lupus: Are they different entities? *Autoimmun Rev.* Aug 2018;17(8):739–745. doi:10.1016/j.autrev.2018.01.027
28. Mezhov V, Segan JD, Tran H, Cicuttini FM. Antiphospholipid syndrome: a clinical review. *Med J Aust.* Aug 2019;211(4):184–188. doi:10.5694/mja2.50262
29. Pons-Estel GJ, Andreoli L, Scanzi F, Cervera R, Tincani A. The antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity.* 2017/01/01/ 2017;76:10–20. doi:https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.10.004
30. Gladd DA, Olech E. Antiphospholipid antibodies in rheumatoid arthritis: identifying the dominoes. *Curr Rheumatol Rep.* Feb 2009;11(1):43–51. doi:10.1007/s11926-009-0007-3
31. Ota S, Muro Y, Kono M, Goto N, Akiyama M. Antiphospholipid antibody-positive Sjögren's syndrome with leg ulcers. *J Dermatol.* Nov 2019;46(11):e429–e430. doi:10.1111/1346-8138.15014
32. Martin M, Martinez C, Arnaud L, et al. Association of antiphospholipid antibodies with active digital ulceration in systemic sclerosis. *RMD Open.* 2019;5(2):e001012. doi:10.1136/rmdopen-2019-001012
33. Souza FH, Levy-Neto M, Shinjo SK. Antiphospholipid syndrome and dermatomyositis/polymyositis: a rare association. *Rev Bras Reumatol.* Aug 2012;52(4):642–4.
34. Asherson RA. The catastrophic antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol.* Apr 1992;19(4):508–12.
35. Cervera R, Rodríguez-Pintó I, Espinosa G. The diagnosis and clinical management of the catastrophic antiphospholipid syndrome: A comprehensive review. *J Autoimmun.* Aug 2018;92:1–11. doi:10.1016/j.jaut.2018.05.007
36. Espinosa G, Rodríguez-Pintó I, Cervera R. Catastrophic antiphospholipid syndrome: an update. *Panminerva Med.* Sep 2017;59(3):254–268. doi:10.23736/s0031-0808.17.03324-9

37. Asherson RA. New subsets of the antiphospholipid syndrome in 2006: "PRE-APS" (probable APS) and microangiopathic antiphospholipid syndromes ("MAPS"). *Autoimmun Rev.* Dec 2006;6(2):76–80. doi:10.1016/j.autrev.2006.06.008
38. Pignatelli P, Ettore E, Menichelli D, Pani A, Violi F, Pastori D. Seronegative antiphospholipid syndrome: refining the value of "non-criteria" antibodies for diagnosis and clinical management. *Haematologica.* Mar 2020;105(3):562–572. doi:10.3324/haematol.2019.221945
39. Asherson RA. The catastrophic antiphospholipid syndrome, 1998. A review of the clinical features, possible pathogenesis and treatment. *Lupus.* 1998;7 Suppl 2:S55–62. doi:10.1177/096120339800700214
40. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, et al. Inflammatory response and the endothelium. *Thromb Res.* 2004;114(5–6):329–34. doi:10.1016/j.thromres.2004.06.045
41. Hollerbach A, Müller-Calleja N, Ritter S, et al. Platelet Activation by Antiphospholipid Antibodies Depends on Epitope Specificity and is Prevented by mTOR Inhibitors. *Thromb Haemost.* Jul 2019;119(7):1147–1153. doi:10.1055/s-0039-1685453
42. Zhang W, Gao F, Lu D, et al. Anti- $\beta$ 2 glycoprotein I antibodies in complex with  $\beta$ 2 glycoprotein I induce platelet activation via two receptors: apolipoprotein E receptor 2' and glycoprotein I  $\alpha$ . *Front Med.* Mar 2016;10(1):76–84. doi:10.1007/s11684-015-0426-7
43. Membre A, Wahl D, Latger-Cannard V, et al. The effect of platelet activation on the hypercoagulability induced by murine monoclonal antiphospholipid antibodies. *Haematologica.* Apr 2008;93(4):566–73. doi:10.3324/haematol.12364
44. Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, et al. Thrombus formation induced by antibodies to beta2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood.* Oct 1 2005;106(7):2340–6. doi:10.1182/blood-2005-03-1319

45. Clemens N, Frauenknecht K, Katzav A, Sommer C, von Landenberg P. In vitro effects of antiphospholipid syndrome-IgG fractions and human monoclonal antiphospholipid IgG antibody on human umbilical vein endothelial cells and monocytes. *Ann N Y Acad Sci.* Sep 2009;1173:805–13. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04632.x
46. Cho CS, Cho ML, Chen PP, et al. Antiphospholipid antibodies induce monocyte chemoattractant protein-1 in endothelial cells. *J Immunol.* Apr 15 2002;168(8):4209–15. doi:10.4049/jimmunol.168.8.4209
47. Velásquez M, Rojas M, Abrahams VM, Escudero C, Cadavid Á P. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Antiphospholipid Syndrome: Association With Clinical Manifestations. *Front Physiol.* 2018;9:1840. doi:10.3389/fphys.2018.01840
48. Vega-Ostertag ME, Ferrara DE, Romay-Penabad Z, et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in antiphospholipid antibody-mediated thrombosis and endothelial cell activation. *J Thromb Haemost.* Sep 2007;5(9):1828–34. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02680.x
49. Thiam HR, Wong SL, Wagner DD, Waterman CM. Cellular Mechanisms of NETosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* Oct 6 2020;36:191–218. doi:10.1146/annurev-cellbio-020520-111016
50. Yalavarthi S, Gould TJ, Rao AN, et al. Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: a newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumatol.* Nov 2015;67(11):2990–3003. doi:10.1002/art.39247
51. You Y, Liu Y, Li F, Mu F, Zha C. Anti- $\beta$ 2GPI/ $\beta$ 2GPI induces human neutrophils to generate NETs by relying on ROS. *Cell Biochem Funct.* Mar 2019;37(2):56–61. doi:10.1002/cbf.3363

52. Noordermeer T, Molhoek JE, Schutgens REG, et al. Anti- $\beta$ 2-glycoprotein I and anti-prothrombin antibodies cause lupus anticoagulant through different mechanisms of action. *J Thromb Haemost.* Apr 2021;19(4):1018–1028. doi:10.1111/jth.15241
53. Wahl D, Membre A, Perret-Guillaume C, Regnault V, Lecompte T. Mechanisms of antiphospholipid-induced thrombosis: effects on the protein C system. *Curr Rheumatol Rep.* Feb 2009;11(1):77–81. doi:10.1007/s11926-009-0011-7
54. de Laat B, Eckmann CM, van Schagen M, Meijer AB, Mertens K, van Mourik JA. Correlation between the potency of a beta2-glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant and the level of resistance to activated protein C. *Blood Coagul Fibrinolysis.* Dec 2008;19(8):757–64. doi:10.1097/MBC.0b013e32830f1b85
55. Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, Iwatani Y, Kanakura Y. Acquired activated protein C resistance associated with IgG antibodies against beta2-glycoprotein I and prothrombin as a strong risk factor for venous thromboembolism. *Clin Chem.* Mar 2005;51(3):545–52. doi:10.1373/clinchem.2004.043414
56. Galli M, Willems GM, Rosing J, et al. Anti-prothrombin IgG from patients with antiphospholipid antibodies inhibits the inactivation of factor Va by activated protein C. *Br J Haematol.* Apr 2005;129(2):240–7. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05438.x
57. Zuily S, de Laat B, Guillemin F, et al. Anti-Domain I  $\beta$ 2-Glycoprotein I Antibodies and Activated Protein C Resistance Predict Thrombosis in Antiphospholipid Syndrome: TAC(I)T Study. *J Appl Lab Med.* Nov 1 2020;5(6):1242–1252. doi:10.1093/jalm/jfaa072
58. Adams M, Breckler L, Stevens P, Thom J, Baker R, Oosttryck R. Anti-tissue factor pathway inhibitor activity in subjects with antiphospholipid syndrome is associated with increased thrombin generation. *Haematologica.* Aug 2004;89(8):985–90.

59. Salemink I, Blezer R, Willems GM, Galli M, Bevers E, Lindhout T. Antibodies to beta2-glycoprotein I associated with antiphospholipid syndrome suppress the inhibitory activity of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost.* Oct 2000;84(4):653–6.
60. Müller-Calleja N, Hollerbach A, Ritter S, et al. Tissue factor pathway inhibitor primes monocytes for antiphospholipid antibody-induced thrombosis. *Blood.* Oct 3 2019;134(14):1119–1131. doi:10.1182/blood.2019001530
61. Shi T, Iverson GM, Qi JC, et al. Beta 2-Glycoprotein I binds factor XI and inhibits its activation by thrombin and factor XIIa: loss of inhibition by clipped beta 2-glycoprotein I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 16 2004;101(11):3939–44. doi:10.1073/pnas.0400281101
62. Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, Koike T. Beta2-glycoprotein I, anti-beta2-glycoprotein I, and fibrinolysis. *Thromb Res.* 2004;114(5–6):461–5. doi:10.1016/j.thromres.2004.07.013
63. Schultze HE, Heide K, Haupt H. Über ein bisher unbekanntes niedermolekulares  $\beta$ 2-Globulin des Humanserums. *Naturwissenschaften.* 1961/01/01 1961;48(23):719–719. doi:10.1007/BF00620967
64. de Laat B, de Groot PG, Derksen RH, et al. Association between beta2-glycoprotein I plasma levels and the risk of myocardial infarction in older men. *Blood.* Oct 22 2009;114(17):3656–61. doi:10.1182/blood-2009-03-212910
65. McDonnell T, Wincup C, Buchholz I, et al. The role of beta-2-glycoprotein I in health and disease associating structure with function: More than just APS. *Blood Rev.* Jan 2020;39:100610. doi:10.1016/j.blre.2019.100610
66. Hoshino M, Hagihara Y, Nishii I, Yamazaki T, Kato H, Goto Y. Identification of the phospholipid-binding site of human beta(2)-glycoprotein I domain V by heteronuclear magnetic resonance. *J Mol Biol.* Dec 15 2000;304(5):927–39. doi:10.1006/jmbi.2000.4243

67. Hammel M, Kriechbaum M, Gries A, Kostner GM, Laggner P, Prassl R. Solution structure of human and bovine beta(2)-glycoprotein I revealed by small-angle X-ray scattering. *J Mol Biol.* Aug 2 2002;321(1):85–97. doi:10.1016/s0022-2836(02)00621-6
68. Agar C, van Os GM, Mörgelin M, et al. Beta2-glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood.* Aug 26 2010;116(8):1336–43. doi:10.1182/blood-2009-12-260976
69. Yasuda S, Tsutsumi A, Chiba H, et al. beta(2)-glycoprotein I deficiency: prevalence, genetic background and effects on plasma lipoprotein metabolism and hemostasis. *Atherosclerosis.* Oct 2000;152(2):337–46. doi:10.1016/s0021-9150(99)00496-7
70. Hulstein JJ, Lenting PJ, de Laat B, Derksen RH, Fijnheer R, de Groot PG. beta2-Glycoprotein I inhibits von Willebrand factor dependent platelet adhesion and aggregation. *Blood.* Sep 1 2007;110(5):1483–91. doi:10.1182/blood-2006-10-053199
71. Nimpf J, Wurm H, Kostner GM. Interaction of beta 2-glycoprotein-I with human blood platelets: influence upon the ADP-induced aggregation. *Thromb Haemost.* Aug 30 1985;54(2):397–401.
72. Pozzi N, Acquasaliente L, Frasson R, et al.  $\beta_2$  -Glycoprotein I binds to thrombin and selectively inhibits the enzyme procoagulant functions. *J Thromb Haemost.* Jun 2013;11(6):1093–102. doi:10.1111/jth.12238
73. Rahgozar S, Giannakopoulos B, Yan X, et al. Beta2-glycoprotein I protects thrombin from inhibition by heparin cofactor II: potentiation of this effect in the presence of anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies. *Arthritis Rheum.* Apr 2008;58(4):1146–55. doi:10.1002/art.23387
74. Gropp K, Weber N, Reuter M, et al.  $\beta_2$ -glycoprotein I, the major target in antiphospholipid syndrome, is a special human complement regulator. *Blood.* Sep 8 2011;118(10):2774–83. doi:10.1182/blood-2011-02-339564

75. Lakos G, Kiss E, Regéczy N, et al. Isotype distribution and clinical relevance of anti-beta2-glycoprotein I (beta2-GPI) antibodies: importance of IgA isotype. *Clin Exp Immunol*. Sep 1999;117(3):574–9. doi:10.1046/j.1365-2249.1999.01007.x
76. Bertolaccini ML, Atsumi T, Escudero Contreras A, Khamashta MA, Hughes GR. The value of IgA antiphospholipid testing for diagnosis of antiphospholipid (Hughes) syndrome in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. Dec 2001;28(12):2637–43.
77. Fanopoulos D, Teodorescu MR, Varga J, Teodorescu M. High frequency of abnormal levels of IgA anti-beta2-glycoprotein I antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: relationship with antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol*. Apr 1998;25(4):675–80.
78. Akhter E, Shums Z, Norman GL, Binder W, Fang H, Petri M. Utility of antiphosphatidylserine/prothrombin and IgA antiphospholipid assays in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. Mar 2013;40(3):282–6. doi:10.3899/jrheum.120084
79. Murthy V, Willis R, Romay-Penabad Z, et al. Value of isolated IgA anti-β2 - glycoprotein I positivity in the diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum*. Dec 2013;65(12):3186–93. doi:10.1002/art.38131
80. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. A systematic review. *Thromb Haemost*. Feb 2014;111(2):354–64. doi:10.1160/th13-06-0509
81. Iverson GM, Reddel S, Victoria EJ, et al. Use of single point mutations in domain I of beta 2-glycoprotein I to determine fine antigenic specificity of antiphospholipid autoantibodies. *J Immunol*. Dec 15 2002;169(12):7097–103. doi:10.4049/jimmunol.169.12.7097
82. Bertolaccini ML, Amengual O, Andreoli L, et al. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force. Report on antiphospholipid syndrome laboratory

- diagnostics and trends. *Autoimmun Rev.* Sep 2014;13(9):917–30.  
doi:10.1016/j.autrev.2014.05.001
83. Artenjak A, Leonardi A, Križaj I, et al. Optimization of unnicked  $\beta$ 2-glycoprotein I and high avidity anti- $\beta$ 2-glycoprotein I antibodies isolation. *J Immunol Res.* 2014;2014:195687.  
doi:10.1155/2014/195687
84. Yan X, Morselt HW, Scherphof GL, Poelstra K, Kamps JA. The role of beta2-glycoprotein I in liposome-hepatocyte interaction. *Biochim Biophys Acta.* Dec 15 2004;1667(2):208–14. doi:10.1016/j.bbamem.2004.10.008
85. Mehdi H, Yang X, Peeples ME. An altered form of apolipoprotein H binds hepatitis B virus surface antigen most efficiently. *Virology.* Mar 1 1996;217(1):58–66.  
doi:10.1006/viro.1996.0093
86. Guerin J, Sheng Y, Reddel S, Iverson GM, Chapman MG, Krilis SA. Heparin inhibits the binding of beta 2-glycoprotein I to phospholipids and promotes the plasmin-mediated inactivation of this blood protein. Elucidation of the consequences of the two biological events in patients with the anti-phospholipid syndrome. *J Biol Chem.* Jan 25 2002;277(4):2644–9.  
doi:10.1074/jbc.M110176200
87. Kolyada A, De Biasio A, Beglova N. Identification of the binding site for fondaparinux on Beta2-glycoprotein I. *Biochim Biophys Acta.* Oct 2013;1834(10):2080–8.  
doi:10.1016/j.bbapap.2013.06.009
88. de Laat B, Derksen RH, van Lummel M, Pennings MT, de Groot PG. Pathogenic anti-beta2-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta2-glycoprotein I only after a conformational change. *Blood.* Mar 1 2006;107(5):1916–24. doi:10.1182/blood-2005-05-1943
89. De Craemer AS, Musial J, Devreese KM. Role of anti-domain 1- $\beta$ 2 glycoprotein I antibodies in the diagnosis and risk stratification of antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* Sep 2016;14(9):1779–87. doi:10.1111/jth.13389

90. Durigutto P, Grossi C, Borghi MO, et al. New insight into antiphospholipid syndrome: antibodies to  $\beta$ 2glycoprotein I-domain 5 fail to induce thrombi in rats. *Haematologica*. Apr 2019;104(4):819–826. doi:10.3324/haematol.2018.198119
91. Ginsberg JS, Demers C, Brill-Edwards P, et al. Increased thrombin generation and activity in patients with systemic lupus erythematosus and anticardiolipin antibodies: evidence for a prothrombotic state. *Blood*. Jun 1 1993;81(11):2958–63.
92. Arad A, Proulle V, Furie RA, Furie BC, Furie B.  $\beta$ <sub>2</sub>-Glycoprotein-1 autoantibodies from patients with antiphospholipid syndrome are sufficient to potentiate arterial thrombus formation in a mouse model. *Blood*. Mar 24 2011;117(12):3453–9. doi:10.1182/blood-2010-08-300715
93. Billoir P, Duflot T, Fresel M, Chrétien MH, Barbay V, Le Cam Duchez V. Thrombin generation profile in non-thrombotic factor V Leiden carriers. *J Thromb Thrombolysis*. Apr 2019;47(3):473–477. doi:10.1007/s11239-019-01821-0
94. Zuily S, Ait Aissa K, Membre A, Regnault V, Lecompte T, Wahl D. Thrombin generation in antiphospholipid syndrome. *Lupus*. Jun 2012;21(7):758–60. doi:10.1177/0961203312440059
95. de Laat B, Wu XX, van Lummel M, Derksen RH, de Groot PG, Rand JH. Correlation between antiphospholipid antibodies that recognize domain I of beta2-glycoprotein I and a reduction in the anticoagulant activity of annexin A5. *Blood*. Feb 15 2007;109(4):1490–4. doi:10.1182/blood-2006-07-030148
96. Gombás J, Tanka-Salamon A, Skopál J, Nagy Z, Machovich R, Kolev K. Modulation of fibrinolysis by the combined action of phospholipids and immunoglobulins. *Blood Coagul Fibrinolysis*. Jan 2008;19(1):82–8. doi:10.1097/MBC.0b013e3282f38c6f
97. Lean SY, Ellery P, Ivey L, et al. The effects of tissue factor pathway inhibitor and anti-beta-2-glycoprotein-I IgG on thrombin generation. *Haematologica*. Oct 2006;91(10):1360–6.

98. Hargett LA, Bauer NN. On the origin of microparticles: From "platelet dust" to mediators of intercellular communication. *Pulm Circ.* Apr 2013;3(2):329–40. doi:10.4103/2045-8932.114760
99. Billoir P, Miranda S, Damian L, Richard V, Benhamou Y, Le Cam Duchez V. Development of a thrombin generation test in cultured endothelial cells: Evaluation of the prothrombotic effects of antiphospholipid antibodies. *Thromb Res.* Sep 2018;169:87–92. doi:10.1016/j.thromres.2018.07.021
100. Breen KA, Sanchez K, Kirkman N, et al. Endothelial and platelet microparticles in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Res.* Feb 2015;135(2):368–74. doi:10.1016/j.thromres.2014.11.027



Nyilvántartási szám: DEENK/425/2021.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szabó Gábor

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szabó, G.**, Bekéné Debreceni, I., Tarr, T., Soltész, P., Osterud, B., Kappelmayer, J.: Anti-[beta]2-glycoprotein I autoantibodies influence thrombin generation parameters via various mechanisms.  
*Thromb. Res.* 197, 124-131, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2020.10.032>  
IF: 3.944 (2020)
2. **Szabó, G.**, Antal-Szalmás, P., Kerényi, A., Péntes-Daku, K., Bécsi, B., Kappelmayer, J.: Laboratory Approaches to Test the Function of Antiphospholipid Antibodies.  
*Semin. Thromb. Hemost.* "Accepted by Publisher", 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0041-1730357>  
IF: 4.18 (2020)
3. **Szabó, G.**, Péntes-Daku, K., Torner, B., Fagyas, M., Tarr, T., Soltész, P., Kis, G., Antal, M., Kappelmayer, J.: Distinct and overlapping effects of [beta]2-glycoprotein I conformational variants in ligand interactions and functional assays.  
*J. Immunol. Methods.* 487, 112877, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2020.112877>  
IF: 2.303

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10,427**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
10,427**

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

Debrecen, 2021.08.31.



## 10.TÁRGYSZAVAK

$\beta_2$ GPI	$\beta_2$ GPI
anti- $\beta_2$ GPI	anti- $\beta_2$ GPI
antifoszfolipid szindróma	antiphospholipid syndrome
faktorhiányplazma	factor deficient plasma
felszíni plazmonrezonancia	surface plasmon resonance
kromatográfia	chromatography
Leiden-mutáció	Leiden mutation
lupusz antikoaguláns	lupus anticoagulant
protrombin G20210A	prothrombin G20210A
trombingeneráció	thrombin generation

## 11.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt Prof. Dr. Kappelmayer Jánosnak, témavezetőmnek szeretnék köszönetet mondani, mert tanulhattam tőle mind szakmailag, mind emberileg, illetve hogy minden tőle telhetőt megtett, hogy legjobb tudásával, tapasztalatával támogasson a fokozatszerzés felé vezető úton.

Külön köszönettel tartozom Bekéné Debreceni Ildikónak, akitől a kutatói laboratóriumi készségeim nagy részét és kutatói szemléletet tanultam, és akitől még a PhD-tanulmányaim kezdetén a legtöbb technikai segítséget kaptam.

Hálás vagyok a Laboratóriumi Medicina Intézet minden asszisztensének, analitikusának és minden dolgozójának, akik még a mindennapi diagnosztikai munka sűrűjében is szakítottak időt arra, hogy segítsenek a munkámban. Külön köszönet illeti meg a hemosztazeológiai diagnosztikai laboratórium munkatársait, közülük is leginkább Nagy Erzsébetet (Micit) és Györfiné Veszprémi Anikót, akik alkalmanként még a munkaidejük után is segítettek betegmintákat válogatni.

Szeretném megköszönni volt TDK-témavezetőmnek, Dr. Benkő Ilonának (DE, ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet docense), hogy 2016-ban egyengette az utam és segített a PhD-tanulmányaim elindításában.

Végül szeretnék az egész családomnak megköszönni minden segítséget, amit tőlük kaptam, hogy biztattak, segítettek, és hogy mellettem voltak és vannak.

A kutatómunkát támogatta:

OTKA K16 120725 és GINOP-2.3.2-15-2016-00043

## **12.FÜGGELÉK**

A függelék az értekezés alapját képző közleményeket tartalmazza.