

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Baráth Barbara

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

**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2021.**

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Baráth Barbara

Témavezető: Dr. Katona Éva



**DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola**

Debrecen, 2021.

TARTALOMJEGYZÉK

GYAKORI RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1 A vénás tromboembólia (VTE)	6
2.2 Az akut iszkémiás stroke	8
2.3 A fibrinolízis.....	9
2.4. Az α_2 -plazmin inhibitor	11
2.4.1. Az α_2 -PI N-terminális módosulása.....	14
2.4.2. A szolubilis fibroblaszt aktiváló protein (sFAP)	16
2.4.3. Az α_2 -PI C-terminális módosulása.....	18
3. CÉLKITŰZÉSEK	20
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	21
4.1. A trombin-koncentráció és az alvasztási idő hatása az α_2 -plazmin inhibitor alvadékba való beépülésére.....	21
4.2. A FXIII koncentráció hatása az α_2 -plazmin inhibitor alvadékba való beépülésére.....	21
4.3. Betegek és kontrollok	23
4.3.1. Akut iszkémiás stroke-ot elszenvedő betegek.....	23
4.3.2. Vénás tromboembólián átesett betegek	23
4.3.3. Kontrollok.....	24
4.4. Az α_2 -PI antigén beépülése a fibrin alvadékba	24
4.5. PB- α_2 -PI antigén meghatározás.....	25
4.6. Egyéb laboratóriumi vizsgálatok	27
4.7. Statisztikai analízis	27
5. EREDMÉNYEK	29
5.1. A trombin koncentráció és az alvasztási idő hatása a totál α_2 -PI beépülésére a fibrin alvadékba	29
5.2. A FXIII koncentráció hatása az α_2 -PI beépülésére a fibrin alvadékba.....	30

5.3. Az α_2 -PI fibrin alvadékba történő beépülésének mértéke akut iszkémiás stroke-on átesett betegekben és ennek kapcsolata a trombolízis kimetelével	31
5.4. Az α_2 -PI hatása a vénás tromboembólia kialakulására	36
5.5. Az α_2 -PI aktivitás korrelációja az α_2 -PI antigén szintekkel	38
5.6. A kontroll csoportban mért α_2 -PI aktivitás és antigén szintek korrelációja egyéb paraméterekkel.....	40
5.7. Az α_2 -PI aktivitás és antigén szintek változása a kontroll és a betegcsoportban	41
5.8. sFAP antigén szintek	44
5.9. Az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus és az sFAP antigén szintek közötti összefüggés a betegcsoportban	44
5.10. Az α_2 -PI aktivitás, a totál α_2 -PI antigén, a PB- α_2 -PI antigén és az NPB- α_2 -PI antigén szintek összefüggése a VTE kialakulásának kockázatával.....	45
6. MEGBESZÉLÉS	47
7. ÖSSZEFOGLALÁS	54
8. SUMMARY	55
IRODALOMJEGYZÉK.....	56
TÁRGYSZAVAK	67
KEYWORDS	68
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	69
FÜGGELÉK.....	70

GYAKORI RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

α_2-PI	alpha2-plazmin inhibitor
AAA	abdominal aortic aneurysm (hasi aorta aneurizma)
AIS	akut iszkémiás stroke
APCE	antiplazmint hasító enzim (antiplasmin cleaving enzyme)
Asn-α_2-PI	aszparaginnal kezdődő α_2 -PI
BMI	testtömeg index
CHD	koronária szívbetegség
CRP	C-reaktív protein
DM	diabetes mellitus
DVT	mélyvénás trombózis
ELISA	enzyme-linked immunsorbent assay
FII	a véralvadás II-es faktora (protrombin)
FV	a véralvadás V-ös faktora
FXIII	a véralvadás XIII-as faktora
FXIIIa	a véralvadás XIII-as faktorának aktív formája
HT	magas vérnyomás
HRPO	tormaperoxidáz (horseradish-peroxidase)
kDa	kilo-Dalton
LBS	lizin-kötő hely (lysine binding site)
Met-α_2-PI	metioninnal kezdődő α_2 -PI
MI	miokardiális infarktusz
NIHSS	National Institutes of Health Stroke Scale
NPB-α_2-PI	nem-plazminogén-kötő α_2 -PI
PAP-komplex	plazmin-antiplazmin komplex
PB-α_2-PI	plazminogén-kötő α_2 -PI
PC	protein C
PE	tüdőembólia
PS	protein S
rt-PA	rekombináns szöveti-típusú plazminogén aktivátor
sFAP	szolubilis fibroblaszt aktiváló protein
VTE	vénás tromboembólia

1. BEVEZETÉS

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

Az α_2 -plazmin inhibitor (α_2 -PI), mely a plazmin fő inhibitora, fontos szerepet játszhat a trombózis kialakulásában és a trombus fenntartásában. A fibrinháló képződésével párhuzamosan az aktivált XIII-as faktor (FXIIIa) az α_2 -PI-t keresztköti a fibrin α -láncával, így védi az alvadékot a plazmin általi degradációval szemben [1, 2]. Az α_2 -PI a keringésben N-, és C-terminálisan is hasítódik. Az FXIIIa elsősorban a C-terminálisan ép α_2 -PI-t köti kovalensen, a trunkált formát kevésbé, valamint az N-terminálisan hasított formát gyorsabban köti a fibrinhez [3].

Korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy az újonnan képződött trombus ellenálló képessége a korai fibrinolízissel szemben nagyrészt az α_2 -PI fibrin alvadékba történő beépülésétől függ [4, 5]. Annak ellenére, hogy ennek a szabályozási lépésnek nagy jelentősége van és potenciális hatása lehet a trombotikus klinikai események széles körére, meglepően keveset tudunk arról, hogy az α_2 -PI különböző körülmények között hogyan kötődik a fibrinhez. Különböző állatkísérletekből származó eredmények alapján megállapították, hogy összefüggés van a trombolízis kiemenetele és az akut iszkémiás stroke-ot (AIS) elszenvedő egyedek plazmájából nyert fibrin alvadékba beépült α_2 -PI mértéke között [6-9]. Meglepő módon az α_2 -PI beépülésének mértékét a fibrin alvadékba és annak összefüggését a kimenettel trombolízisen átesett AIS betegcsoportban még nem vizsgálták.

Korábbi vizsgálatok, melyek az α_2 -PI és a vénás trombózis kialakulásának kockázatával foglalkoztak, ahol csak α_2 -PI aktivitás szinteket mértek, nem szolgáltatottak meggyőző eredményeket az α_2 -PI szerepéről [10, 11]. Az α_2 -PI C-terminálisan hasított formáinak és azok arányának meghatározásával trombotikus megbetegedésekben eddig csak egy tanulmány foglalkozott, melyben miokardiális infarktust (MI) elszenvedett férfiakban hasonlították össze a C-terminálisan ép és trunkált formák szintjét korban illesztett kontrollcsoporttal [12].

Csak kevés tanulmány vizsgálta az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus és az artériás trombózis közötti kapcsolatot. A p.Arg6Trp polimorfizmus biokémiai vizsgálatok alapján feltételezett védő hatását sem koronária-ateroszklerózis [13], sem AIS-ban szenvedő betegekben nem tudták igazolni [14]. A polimorfizmus hatását vénás trombózisban eddig még nem vizsgálták.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A trombotikus megbetegedések világszerte vezető szerepet töltenek be mind a mortalitásban, mind a morbiditásban. Ezek magába foglalják azokat a betegségeket és állapotokat, melyeknek következménye az intravaszkuláris koaguláció, tehát az éren belüli alvadékképződés vagy más néven trombózis [15, 16]. A trombózis előfordulhat az artériás és vénás keringésben egyaránt. Az artériát érintő elzáródás főleg miokardiális infarktust (MI), vagy akut iszkémiás stroke-ot (AIS) okozhat, míg a vénás keringés elzáródása mélyvénás trombózishoz (DVT) vezet.

2.1 A vénás tromboembólia (VTE)

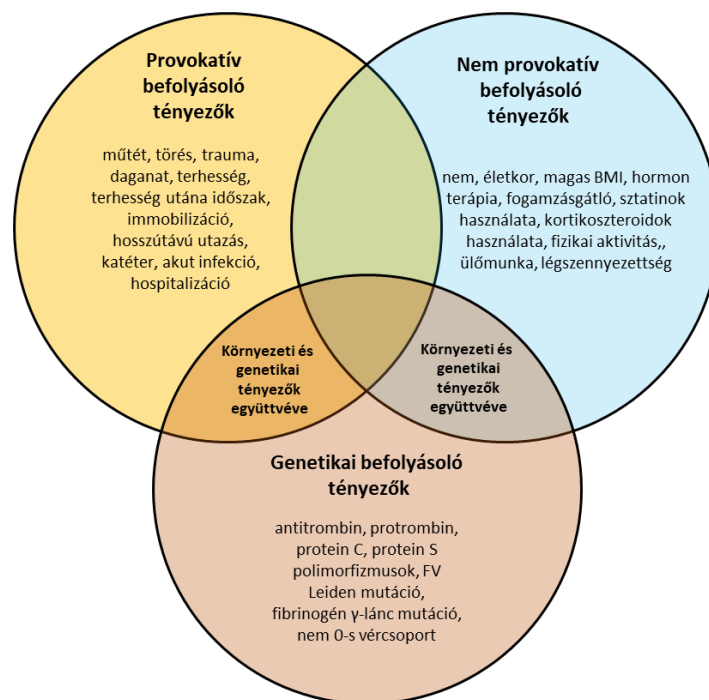
A VTE-ről akkor beszélünk, ha a vénákban a vér fluiditása megváltozik és vérrög alakul ki, mely elzárhatja az ereket. Ha ez a vérrög a végtagok vénáiban keletkezik akkor beszélünk DVT-ről, viszont, ha a kialakult trombus leszakad és a tüdőbe vándorol, akkor tüdőembóliának (PE) nevezzük. A DVT-re jellemző tünetek az ödéma, alsó végtagfájdalom és bőrpír, míg a PE-nál jellegzetes tünet lehet a mellkasi fájdalom, a légszomj, a gyors szívverés és légzés, ájulás, valamint szédülés. A VTE az európai populációban 1000 emberből évente 1-2 főt érint. Csak DVT az esetek 60%-ában alakul ki, a maradék 40%-ban PE fordul elő DVT-vel vagy anélkül [17].

Több tanulmány is vizsgálta az artériás és vénás trombózis kockázati tényezőit, melyekből azt állapították meg, hogy bár a két betegség rizikó tényezői hasonlóak, azonban a VTE kialakulásához az artériás trombózis rizikófaktorai közül csak néhány járul hozzá [18, 19]. A túlsúly, a diabetes mellitus (DM) és a magas vérnyomás szignifikáns összefüggést mutatott a VTE kialakulásának kockázatával, míg a hiperkoleszterinémia vagy a dohányzás nem mutatott statisztikailag szignifikáns összefüggést [19].

A VTE-t mind genetikai, mind környezeti tényezők befolyásolhatják. A környezeti tényezőkön belül megkülönböztetünk provokatív és nem provokatív befolyásoló tényezőket. Nagyon valószínű, hogy a VTE kialakulásának kockázata akkor a legnagyobb, ha a genetikai és a környezeti tényezők együtt érvényesülnek [20]. **(1. ábra)**

Az 1. ábrán felsorolt rizikó tényezők mellett a VTE kialakulásának kockázatát növelheti a transzvéna pacemaker jelenléte, a DM, a magas vérnyomás, a VTE korábbi családi előfordulása, valamint az értágulatos vénák, korábbi felszíni vénás trombózis, vagy részleges végtagbénulással járó neurológiai kórképek [21-26]. Az alacsony high-density lipoprotein

(HDL) és a magas triglicerid (TG) szint növeli a VTE kockázatát, míg az emelkedett HDL szint véd a VTE kialakulásával szemben [27, 28].



1. ábra: A vénás trombózis befolyásoló tényezői [19]

A kor a trombózis egyik legjelentősebb rizikófaktora. A VTE bármilyen korban kialakulhat, de főképp az idős korosztályt érinti. Incidenciája nagyon idős korban kb. 1000x-es a nagyon fiatalokhoz képest [29, 30]. A DVT és a PE előfordulási gyakorisága a kor előrehaladtával nemtől függetlenül növekszik. Fiatal felnőttkorban még a középkorúság előtt a VTE előfordulása alacsony (0,5-1 fő / 1000 fő / év) [31]. Ez az arány a középkorúságtól 80 éves korig lényegesen magasabb (5-7 fő / 1000 fő / év). Hogy miért pont a kor a VTE egyik legjelentősebb befolyásoló tényezője az még nem tisztázott, bár különböző magyarázatokat találhatunk, mint pl. a csökkent mobilitás, növekszik a kockázat-növelő betegségek gyakorisága, csökken az izomtónus, a vénák előregedése, különösen a vénabillentyűké, melyek elengedhetetlenek a jó vénás áramlás fenntartásához [20]. A kor előrehaladtával a VTE-s megbetegedések nagy részét egyre inkább a PE teszi ki mindkét nem esetén [31]. Viszont idős korban a kor már nem értelmezhető a VTE független rizikó tényezőjeként, mivel ebben az életszakaszban már növekedhet a vér alvadékonysága [32]. Továbbá valószínű, hogy a kor hatását befolyásolhatják a VTE magasabb prevalenciájú kockázati tényezői, mint pl. a daganatos megbetegedések, a kórházi tartózkodás és a műtétek [19].

A nemek tekintetében elmondhatjuk, hogy a férfiakban gyakoribb a trombózis kialakulása (130 fő / 100.000 fő / év), mint a nőkben (110 fő / 100.000 fő / év) [31]. Viszont fiatal felnőtt nőkben mégis gyakoribb a VTE kialakulásának kockázata, ami a hormonális változásokhoz köthető [33], de 45 éves kor felett általánosan gyakoribb a VTE a férfiakban. Azt feltételezik, hogy ennek az oka a különböző életvitel, de ez még nem tisztázott [31].

A diéta és a testmozgás is befolyásolhatja a VTE kialakulását. Míg az artériás trombózis a rendszeres testmozgással megelőzhető, addig a vénás trombózisnál ez a folyamat bonyolultabb. Különböző tanulmányok vizsgálták már a VTE kialakulása és a fizikai aktivitás közötti összefüggést, de nem jutottak egyértelmű eredményre. A mérsékelt fizikai aktivitás hasznos, de az erős, kimerítő fizikai teljesítmény vagy a mozgásszegény életvitel magasabb kockázatot jelenthet a VTE kialakulására nézve [34].

A vénás trombózisra a multifaktoriális (nem Mendeli) öröklésment jellemző [35]. Kiváltó okai között több, mint 20 genetikai rizikófaktor szerepel [36], melyeknek többsége a véralvadási rendszer fehérjéinek mutációit jelenti. A rizikófaktorok közül 7 az örökletes túlzott véralvadásért felelős, melyek közül 4 az általános populációban gyakoribb (gamma fibrinogén, V-ös véralvadási faktor (FV), protrombin (FII) 20210A, nem 0-ás vércsoport) és 1,5-3-szoros rizikót eredményezhetnek. A protein C (PC), protein S (PS) és az antitrombin heterozigóta mutációi pedig nagyobb, kb. 10-szeres rizikót jelentenek a VTE kialakulására nézve [19].

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

2.2 Az akut iszkémiás stroke

A stroke az egyik vezető halált és rokkantságot okozó megbetegedés [37, 38], ami évente 17 millió embert érinthet a világon. Kelet-Európában a legnagyobb a betegség incidenciája és a halálozások száma [39], de Magyarországon is a harmadik leggyakoribb a halálokok között [40]. A stroke kb. 85%-a iszkémiás eredetű és az agy véráramlásának elzáródását okozza, ami visszafordíthatatlan agysérülésekhez és későbbi neurológiai deficithez vezethet [41]. Az AIS az agyi katasztrófák kb. 80%-át adja, ezzel szemben a vérzéses stroke kialakulása csak 20% [42]. Az AIS-ban szenvedő betegeknél elengedhetetlen a véráramlás gyors helyreállítása ezzel is csökkentve a rokkantság kialakulásának mértékét. A véráramlás elzáródásának megoldása a trombus feloldása, melynek ma egyetlen farmakológiai kezelése lehetséges: a rekombináns

szöveti-típusú plazminogén aktivátor (rt-PA) intravénás adása (0,9 mg/ttkg) [43], amit a tünetek megjelenésétől 3-4,5 órán belül be kell adni a betegnek (terápiás ablak). Sajnálatos módon a szűk időablak miatt nem minden stroke-on átesett beteg részesülhet megfelelő kezelésben [37, 44, 45]. De a rt-PA kezelés esetén is a betegek csak kb. 30-35%-ánál teljes a felépülés, míg a stroke-on átesettek legfeljebb 6-8%-ánál nem halálos kimenetelű terápiával összefüggő koponyaúri (intrakraniális) vérzés állhat fenn [43, 46-48], mely potenciálisan a tünetek rosszabbodásához vagy a trombolízisen átesett betegek 1%-ánál halálhoz is vezethet [49].

Az AIS rizikófaktorai lehetnek a nem, az életkor, az etnikai hovatartozás, a családi halmozódás, a genetikai faktorok, a magas vérnyomás, a DM, a pitvarfibrilláció, a dohányzás, az iszkémiás szívbetegségek, a hiperlipidémia, a diszlipidémia, a túlzott alkoholfogyasztás, a hormon terápia vagy a droghasználat stb [50].

A stroke világszervezetek együttesen megalkottak egy skála rendszert, a National Institutes of Health Stroke Scale-t (NIHSS), mely alapján képesek lehetünk objektív módon meghatározni a stroke súlyosságát. A skála rendszer több szempontot is figyelembe vesz, melyek a következők: beszédzavar (aphasia), artikulációs zavar (dysarthria), figyelmetlenség (neglect), tudatszint, különböző kérdésekre adott válasz (életkor, dátum), különböző utasítások végrehajtása, látótér, szemmozgás, arcidegbénulás (facialis paresis), izomerő az alsó és a felső végtagoknál, akaratlan mozgás (végtag ataxia), ügyetlenség [51].

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

2.3 A fibrinolízis

A fibrinolitikus rendszer fontos szerepet játszik az emlősök keringésében, a fibrin alvadék lebontásában, az érrendszer normál működésében, valamint megkönnyíti és elősegíti a szövet újraképződését, illetve megakadályozza a vérrögök kialakulását [52]. A rendszer központi enzime a plazmin, melynek inaktív proenzime a plazminogén. Plazminogén aktivátorok hatására aktív plazminná alakul, mely képes a fibrin gyors hasítására és a fibrinből kisebb molekulatömegű polipeptideket, úgynevezett szolubilis fibrin degradációs termékeket hozva létre [53].

A plazminogén egy szerin proteáz, mely termeléséért a máj felelős [53]. Két immunológiailag különböző, fiziológiásan is jelenlévő aktivátor katalizálja a plazminogén-

plazmin átalakulást: a szöveti-típusú plazminogén aktivátor (t-PA) és az urokináz-típusú plazminogén aktivátor (u-PA) [54]. A t-PA főleg a fibrin bontásában vesz részt, míg az u-PA feladata az extracelluláris mátrix lebontása, a szövet újraképződése, a sebgyógyulás folyamatában való részvétel és a sejtmigráció. A t-PA fibrin hiányában gyenge plazminogén aktivátor, viszont aktivitása két nagyságrenddel nagyobb fibrin jelenlétében. [55-57]. A plazmin (és minden szerin proteáz) C-terminális végén elhelyezkedő aktív centrumában szerin, hisztidin és aszparaginsav aminosavak találhatóak (katalitikus triád), valamint az N-terminális rész tartalmaz öt funkcionális homológ domént, melyet Kringle-doméneknek neveznek. Ezek a Kringle-domének több lizin-kötő helyet is tartalmaznak (LBS-lysine binding site), amin keresztül történik a plazminogén fibrinhez, illetve az α_2 -plazmin inhibitorhoz (α_2 -PI) való kötődése [58].

A fibrinolitikus rendszer gátlása a plazminogén aktivátorok valamint a plazmin gátlásán keresztül is megvalósulhat [2, 59, 60]. A plazminogén aktiválás gátlása a plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1) és a plazminogén aktivátor inhibitor-2 (PAI-2) által valósul meg. A plazminogén aktiválását főleg a PAI-1 gátolja, mivel a PAI-2 szintje normál körülmények között a plazmában alacsony vagy egyáltalán ki sem mutatható (kivéve terhességben), de képes gátolni a t-PA-t és az u-PA kétláncú formáját is [61].

A véralvadás XIII-as faktora (FXIII) egy tetramer struktúrájú plazma fehérje, egy pro-transzglutamináz, mely két katalitikus A alegységből (FXIII-A) és két hordozó/védő funkciót ellátó B alegységből (FXIII-B) áll [62, 63]. A fibrinolitikus rendszer aktiválódása előtt, a véralvadási kaszkád utolsó szakaszában az inaktív FXIII trombin és Ca^{2+} hatására aktiválódik. Az aktív forma (FXIIIa) a szubsztrát fehérjében a peptid láncokat $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})\text{lizil}$ kötésekkel kovalensen köti össze. A hemosztázisban betöltött fontos feladata a fibrin α - és γ -láncok keresztbe kötése, mely során γ -lánc dimereket és nagy molekulatömegű α -lánc polimereket hoz létre. Egy másik fontos feladata a fibrinolízis inhibitorának, az α_2 -PI-nek a fibrin α -láncához való keresztkötése, mely során az α_2 -PI 14-es pozíciójában lévő glutamin (Gln14) és a fibrin α -láncán található 303-as pozícióban lévő lizin (Lys303) között hoz létre kovalens keresztkötetést [1, 62, 64, 65]. **(2. ábra)**

Az 1950-es évek óta számos kutató foglalkozott már a plazmin inhibitorok vizsgálatával, sokféleségével és funkciójával. 1976-ig egyetlen fiziológiás jelentőségű inhibitorot azonosítottak és tartottak számon, ami az α_2 -makroglobulin volt [66]. De mára a humán plazmából többféle plazmin inhibitor is kimutattak, melyek hatékonyan képesek a plazmin gátlására. Egy kutatócsoport immunkémiai kísérletekkel bizonyította, hogy a humán

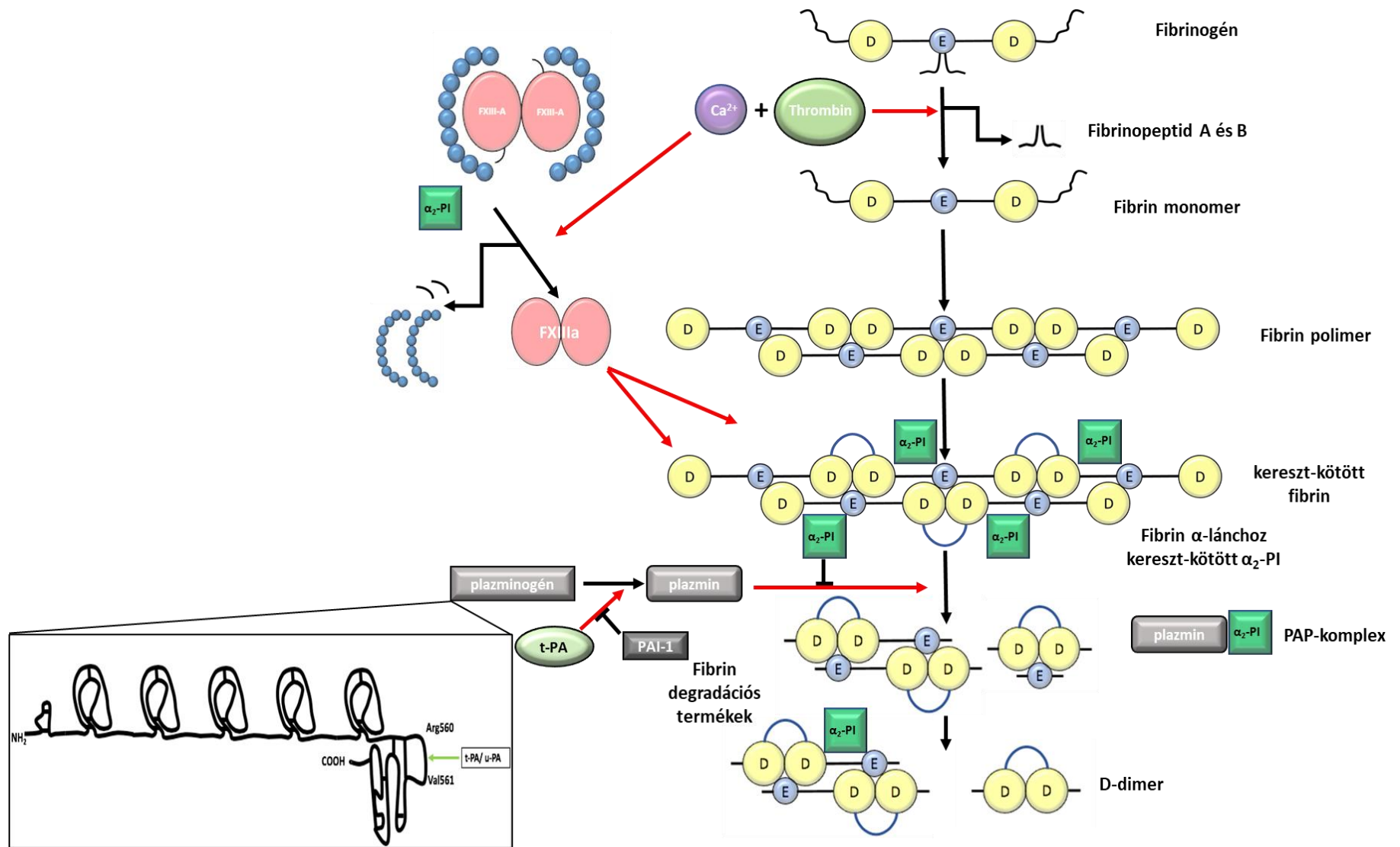
plazmában van egy úgynevezett α_2 -fehérje, mely az urokináz/streptokináz általi aktiváció után is képes gátolni a plazmint. Ez az inhibitor eltért az eddig plazmában kimutatott proteáz inhibitoroktól [67]. Szinte ugyanebben az időben Müllertz és munkatársai urokinázzal aktivált plazmával végzett affinitás kromatográfiai kísérletekkel kimutattak egy fehérjét, ami szintén képes a plazmin hatékony gátlására, valamint kereszt-immunelektroforézissel bizonyították, hogy ez a fehérje ténylegesen képes a plazminhoz kötődni. A plazmin és az eddig ismeretlen inhibitor között létrejövő kölcsönhatás nagyobb aviditással bír, mint a plazmin- α_2 -makroglobulin komplexé [68]. Ezek a kutatócsoportok közel egy időben írták le egymástól függetlenül ennek a plazmin inhibitornak a létezését, de különbözőképpen nevezték el. Egyesek antiplazminnak, mások elsődleges plazmin inhibitornak vagy α_2 -plazmin inhibitornak nevezték. Végül közös megegyezéssel döntöttek az α_2 -plazmin inhibitor elnevezés mellett, mivel immunelektroforézis vizsgálatok során a fehérje az α_2 -globulinok régiójában vándorolt [69]. A közleményekben azonban máig is egyformán alkalmazzák az α_2 -plazmin inhibitor és α_2 -antiplazmin elnevezéseket.

2.4. Az α_2 -plazmin inhibitor

Az α_2 -PI fontos szerepet tölt be a fibrinolitikus rendszer szabályozásában, mint a plazmin legfőbb gátlószere [1]. A humán α_2 -PI egyláncú glikoprotein, mely egy szerin proteáz inhibitor, a serpin szupercsalád tagja. Más serpinektől eltérően az α_2 -PI a C-terminális végén kb. 50-55 aminosavval többet tartalmaz [70, 71]. Az ezen szakaszban található lizineken keresztül képes a plazmin(ogén) kötésére [72]. A humán plazmában kb. 1 μ M (\approx 70 mg/L) koncentrációban kering és az *in vivo* felezési ideje kb. 2,6 nap [69]. Elsődlegesen a máj szintetizálja, majd szekretálja de a vese és az agy is előállíthatja kisebb mennyiségben [73, 74]. Molekulatömege \sim 67 kDa [65], szénhidrát tartalma kb. 11-14% és szulfatált tirozin reziduumokat tartalmaz a 457-es pozícióban [75]. Az α_2 -PI legfőbb feladata a plazmin gátlása, mely során a szabad plazminall sztöchiometrikus 1:1 arányú plazmin-antiplazmin komplexet (PAP-komplex) képez [76]. A plazmában a PAP-komplex féléletideje 12 óra [77]. Az α_2 -PI nem csak a szabad plazmin gátlására képes, hanem a fibrinhez kötődve a fibrinháló felszínén is megtartja inhibitor aktivitását és így képes a plazmin megkötésére és gátlására, ezáltal védi a fibrint a plazmin általi azonnali degradációtól [2, 65, 69]. **(2. ábra)**

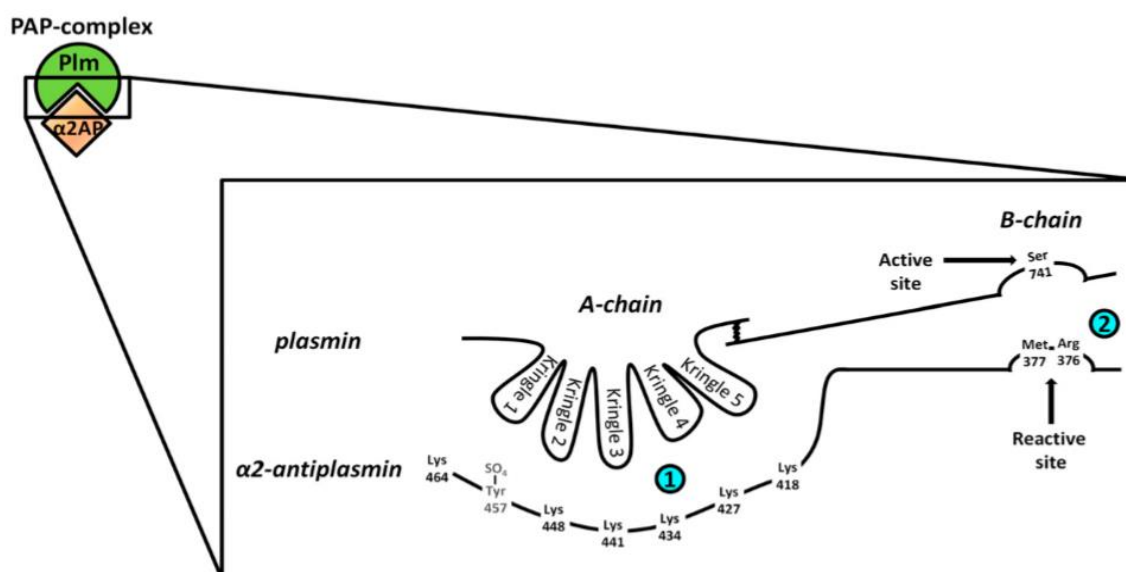
A plazmin α_2 -PI általi gátlása egy két lépéses reakcióban játszódik le [2, 53]. Az első lépés egy másodrendű, reverzibilis folyamat, melyben az α_2 -PI C-terminális régiójában

található 6 db lizin nem kovalens módon kötődik a plazmin(ogén) Kringle-doménjein található LBS-ekhez, egy ún. “cipzár”-szerű kötődéssel egy inaktív komplexet létrehozva. A második lépésben, egy lassú, irreverzibilis, elsőrendű reakcióban az α_2 -PI 376-os pozíciójában lévő arginin és a plazmin reaktív centrális hurkában (RCL) lévő 471-es szerin oldallánca között jön létre kovalens kötés. Kialakul ezáltal a PAP-komplex és megszűnik a plazmin aktivitása [2]. A reakció sebességét befolyásolja a plazmin aktív centrumának, szabad lizin-kötő helyinek, az α_2 -PI lizinjeinek valamint az RCL peptid kötéseinek hozzáférhetősége [78]. Az első reakciót kompetitíven tudjuk gátolni lizin analógokkal, melyek a plazmin LBS-hez bekötődve hatékonyan tudják gátolni az α_2 -PI lizinjeihez való kötődést. Ilyen analóg lehet az ϵ -aminokapronsav (EACA) és a tranexámsav [64, 79]. **(3. ábra)**



2. ábra: A véralvadás utolsó fázisa és a fibrinolízis (saját ábra)

D: D-domén; E: E-domén; FXIIIa: aktivált XIII-as faktor; t-PA: szöveti-típusú plazminogén aktivátor; α₂-PI: alpha2-plazmin inhibitor; PAI-1: plazminogén aktivátor inhibitor 1; PAP-komplex: plazmin-antiplazmin komplex; Ca²⁺: kalcium-ion

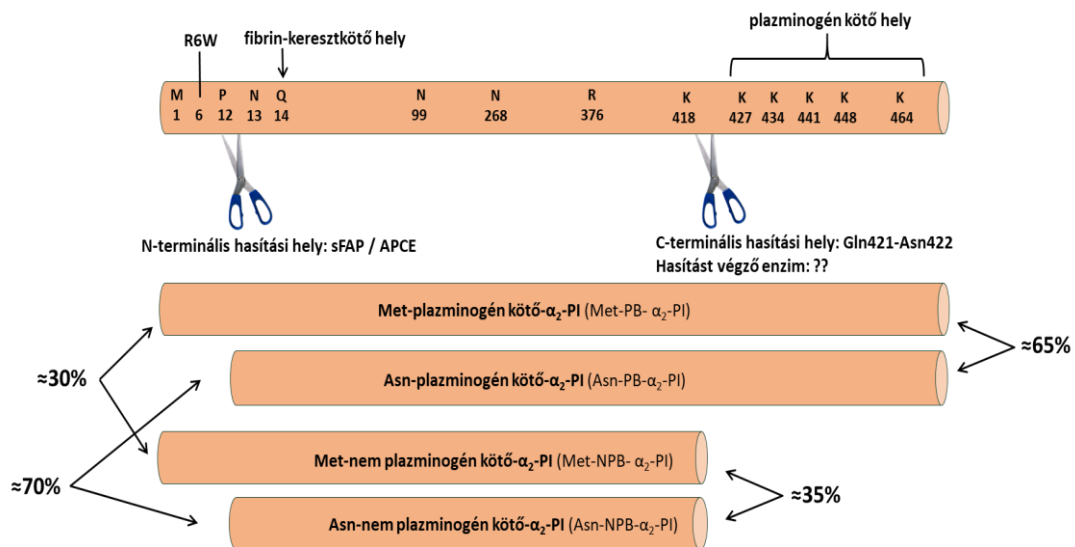


3. ábra: A PAP-komplex képződésének lépései [2]

A SERPINF2 gén kódolja a humán α_2 -PI-t, ami a 17p13.3 kromoszómán található [80]. Ez a gén 491 aminosavból álló fehérjét kódol, amely 27 aminosavnyi szignálpeptidből és egy 464 aminosavból álló egyláncú fehérjéből áll [68, 74, 80-83]. A gén 10 exont és 9 intront tartalmaz, melyek közül a 4. exon kódolja a keresztkötő, illetve a 10. exon kódolja a plazminogén-kötő helyet. Hosszúsága kb. 16 000 bázispár [72]. A humán α_2 -PI DNS szekvenciája 23-28% homológiát mutat egyéb szerpinekkal, illetve 73-81% homológiát mutat más fajokkal (pl. tehén, egér, patkány, nyúl) [84, 85].

2.4.1. Az α_2 -PI N-terminális módosulása

A humán α_2 -PI prekursor formája metionnal kezdődik (Met- α_2 -PI), ilyen formában szekretálódik a májból. A plazmában azonban mindkét végén proteolitikus hasításokat szenvedhet (4. ábra). Az N-terminális hasítást az antiplazmint hasító enzim (antiplasmin cleaving enzyme, APCE), vagy más néven a szolubulis fibroblaszt aktiváló protein (sFAP) végzi, mely lehasítja az első 12 aminosavat a fehérjéről. Az α_2 -PI N-terminálisan a 12-es pozícióban lévő prolin és a 13-as pozícióban lévő aszparagin között szenved hasítást, így kialakul a 452 aminosavból álló, aszparaginnal kezdődő forma (Asn- α_2 -PI). A keringő α_2 -PI 30%-a Met- α_2 -PI, míg 70%-a Asn- α_2 -PI formában van jelen [74, 82]. Mindkét forma egyaránt gátolja a szabad plazmint, de a hasított, nagyobb mennyiségben jelenlévő Asn- α_2 -PI-t a FXIIIa gyorsabban keresztköti a fibrinhez, így ez a forma hatékonyabban képes a fibrinolízis gátlására [86].



4.ábra: Az α_2 -PI hasítási formáinak szisztematikus ábrázolása (saját ábra)

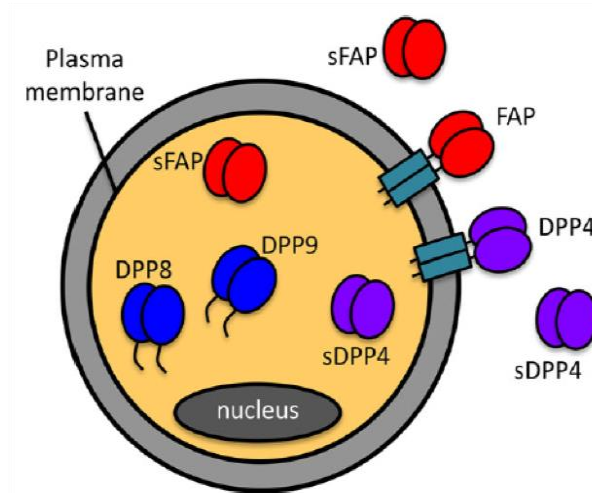
M: metionin; R: arginin; W: triptofán; N: aszparagin; K: lizin; sFAP: szolubilis fibroblaszt aktiváló protein, α_2 -PI: alpha2-plazmin inhibitor

A Met- α_2 -PI N-terminális hasítását az α_2 -PI fehérje génjében található polimorfizmus is befolyásolhatja, melyet Tone és munkatársai génszekvenálással azonosítottak. A 6. aminosavat kódoló nukleotidok között találtak eltérést, mely a fehérje aminosav sorrendjében egy arginin-triptofán cserét eredményezett [85]. A Trp allél gyakorisága egy egészséges populációban 20,5% [87]. A Met- α_2 -PI(Arg6) vagy a Met- α_2 -PI(Trp6) formákat a FXIIIa ugyanolyan hatékonysággal köti a fibrinhez, de az sFAP azt a Met- α_2 -PI-t, amelyben a 6. pozícióban arginin van 8-szor gyorsabban képes hasítani, mint amelyikben triptofán van. Az Asn- α_2 -PI-fibrin FXIII általi keresztkötése azért lehet gyorsabb, mert ebben a hasított formában a Gln2 (eredetileg Gln14) a FXIIIa számára könnyebben hozzáférhető. A Met- α_2 -PI(Arg6) vagy a Met- α_2 -PI(Trp6) esetén az első 12 aminosav jelenléte kevésbé teszi lehetővé a Gln14 hozzáférhetőségét, így a keresztkötési reakció sokkal lassabban megy végbe, mint az Asn- α_2 -PI esetében. Viszont, mindhárom N-terminális forma ugyanolyan mértékben képes a plazmin kötésére és annak gátlására. [88].

Azért, mert csökkenti az α_2 -PI-nek az N-terminális hasítását és ennek révén a FXIIIa általi keresztkötését a fibrinhez, azaz a fibrinolízis gátlását, a polimorfizmusnak védő hatása feltételezhető a trombotikus megbetegedésekkel szemben. A biokémiai vizsgálatok alapján feltételezett védő hatást azonban klinikai tanulmányokban korábban még nem sikerült igazolni.

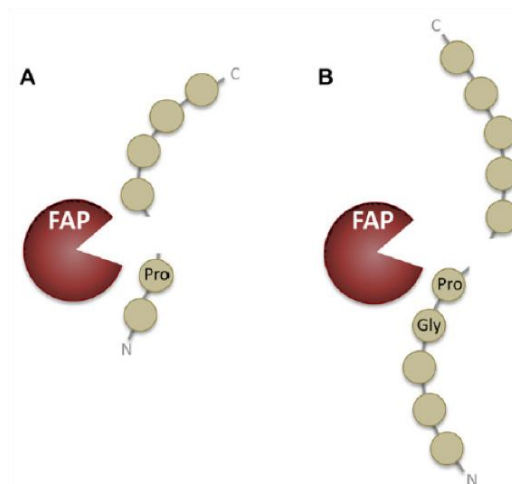
2.4.2. A szolubilis fibroblaszt aktiváló protein (sFAP)

Az sFAP a dipeptidil-peptidáz (DPP) 4 család tagjai közé tartozik, a DPP4, DPP8 és DPP9 mellett. (5. ábra)



5. ábra: A DPP4 család tagjai[89] DPP: dipeptidil peptidáz; FAP: membránhoz kötött fibroblaszt aktiváló protein; sFAP: szolubilis fibroblaszt aktiváló protein

Ezeknek az enzimeknek fontos tulajdonságuk, hogy a fehérjék N-terminális végén az utolsó két aminosavat képesek lehasítani, mely hasítás mindig prolin után történik [89]. A DPP család tagjai közül a FAP a dipeptidil-peptidáz aktivitáson kívül endopeptidáz aktivitással is rendelkezik (6. ábra). Ez a tulajdonság teszi egyedivé a DPP-k között [90, 91]. Az endopeptidáz aktivitás során mindig glicin-prolin után történik a hasítás [91, 92].



6. ábra: Az sFAP dipeptidil-peptidáz és endopeptidáz aktivitása[89] sFAP: szolubilis fibroblaszt aktiváló protein; Pro: prolin; Gly: glicin

A FAP két formában található meg a humán szervezetben, szolubilis és membránhoz kötött formában [93]. A FAP egy II-es típusú integráns membránfehérje [94]. A szolubilis formája mind intra-, mind extracellulárisan megtalálható [92, 93].

Az sFAP úgy keletkezik, hogy a FAP transzmembrán doménjében (7-26 aminosavak) a fehérje hasítást szenved a 23-as pozícióban lévő cisztein és a 24-es pozícióban lévő izoleucin között (Cys23-Ile24). Ez a forma képes hasítani endopeptidáz aktivitása révén az I-es típusú kollagén denaturált formáját [95] és az α_2 -PI-t, ezért antiplazmint hasító enzimnek is nevezik (APCE) [94]. Ez az enzim hasítja le az α_2 -PI N-terminális részén lévő első 12 aminosavat [86].

A FAP-ot az aktivált fibroblasztok termelik a sebgyógyulás és az embriogenezis során, valamint epitheliális eredetű daganatos megbetegedésekben is kimutatták az expresszióját. Több kutatócsoport is vizsgálta, hogy milyen daganatos megbetegedésekben expresszálódik a FAP, és azt találták, hogy főleg a prosztatát, a mellet, a hasnyálmirigyet, a gyomort, a colont és a tüdőt érintő daganatok esetén termelődik [96-106].

Korábban már vizsgálták az sFAP antigén szinteket különböző betegcsoportokban. Erre a meghatározásra egy kereskedelembe kapható szendvics ELISA módszert használtak. Tillmanns és munkatársai az sFAP antigén szintjét akut koronária szívbetegségben szenvedőkben és egészséges kontrollokban határozták meg. Ebben a betegcsoportban szignifikánsan magasabb sFAP antigén koncentrációt találtak a kontrollcsoportéhoz képest, illetve az akut koronária szívbetegségben szenvedőknél a férfiakban magasabb értékeket mértek, mint a nőkben. Egy követéses vizsgálat során 407 betegből a felépülés első évében 29 hunyt el, akiknek sokkal alacsonyabb volt az sFAP szintjük, mint akik életben maradtak. Ezen eredmények alapján azt a következtetést vonták le, hogy az alacsony sFAP koncentráció fokozza a mortalitás kockázatát az akut koronária szívbetegségben szenvedő betegek csoportjában [107].

Egy másik kutatócsoport szintén vizsgálta az sFAP antigén szintjét koronária szívbetegségben, AIS betegekben, valamint perifériás artériás betegségben is. Az artériás trombózist elszenvedő betegek és kontrollok között az sFAP szintekben nem találtak szignifikáns különbséget, ezzel szemben a koronária artériás szívbetegségben szenvedőknél bár alacsonyabb sFAP koncentrációt találtak, de ez nem volt szignifikáns a kontrollokhoz hasonlítva. A kontroll csoportban a nemek közötti sFAP szinteket vizsgálva azt találták, hogy a férfiakban magasabb volt ennek a plazmafehérjének a szintje, mint nőkben. Az sFAP szintek a BMI-vel mutattak szignifikáns korrelációt, amiből arra lehet következtetni, hogy az emelkedett BMI magas sFAP antigén koncentrációval társul [108].

Uitte de Willige és munkatársai egy másik tanulmányban megvizsgálták, hogy az sFAP szintek milyen összefüggést mutatnak a májcirrózis súlyosságával. A betegekben emelkedett sFAP koncentrációt találtak a kontrollokhöz képest és ez az emelkedés szignifikáns összefüggést mutatott a májcirrózis súlyosságával [109].

Az sFAP szinteket több betegségben is vizsgálták, de főképp artériás megbetegedések kapcsán voltak le következtetéseket, viszont vénás trombózist elszenvedett betegek körében még nem vizsgálták.

2.4.3. Az α_2 -PI C-terminális módosulása

A plazmában az α_2 -PI nem csak az N-terminális végen szenved proteolitikus hasítást, hanem a C-terminális végen is. Az összes α_2 -PI kb. 35%-a trunkálódik ezen a végen. Az *in vivo* hasítási helyet, egy 2020-ban megjelent közleményben írták le, mely szerint a 421-es glutamin és a 422-es aszparaginsav közé tehető a fő hasítási hely, de más potenciális hasítási helyeket is azonosítottak [110-112]. A hasítást végző enzimet még nem sikerült azonosítani. Az α_2 -PI a C-terminális részen található lizinek segítségével kötődik a plazminogén Kringle-doménjeihez, de ezen szakasz hiányában már nem képes a plazminogén kötésére és ezáltal a plazmin gátlása is lassabb [113]. Több olyan enzimet is azonosítottak már, melyek *in vitro* képesek az α_2 -PI C-terminális hasítására (elasztáz [114] vagy a mátrix metalloproteináz-3 (MMP-3) [115], azonban arra ezek a tanulmányok nem adtak választ, hogy *in vivo* körülmények között is képesek-e hasítani az α_2 -PI-t. Arról is születtek már közlemények, hogy az α_2 -PI C-terminális átalakulása különböző mechanizmussal történhet *in vivo* és *in vitro* körülmények között. Humán C-terminálisan ép α_2 -PI (plasminogen-bind = PB- α_2 -PI) ellenes antitestet használtak kereszt-immunelektroforézis technikában, mellyel azt az eredményt kapták, hogy az a C-terminálisan hasított forma (non-plasminogen-bind = NPB- α_2 -PI), mely *in vivo* keletkezett elvesztette kötőképességét mind a plazminogénhez, mind pedig az antitesthez. Ezzel szemben az *in vitro* C-terminálisan hasított α_2 -PI a plazminogénhez már nem kötődött, viszont megmaradt az antitesthez való kötőképessége. Így ebből arra lehet következtetni, hogy az α_2 -PI C-terminálisan különböző helyeken hasítódik *in vivo* és *in vitro* körülmények között [116].

Kimutatták, hogy a C-terminálisan trunkált α_2 -PI legalább 26 aminosavval rövidebb, mint a teljes hosszúságú α_2 -PI. Ebben a szakaszban 6 lizin található, amelyek közül 5 vesz részt a plazminogénhez való kötésben (**2. 3. 4. ábrák**). Az utolsó 26 aminosavnak megfelelő szintetikus peptid adásával az α_2 -PI asszociációja a plazminhoz csökkent, azt bizonyítva, hogy

ez a szakasz nagy affinitással képes a plazminogén Kringle-doménjeihez kötődni [117]. Más tanulmányok kimutatták, hogy a lizinek közül a tényleges kötődésben a legfontosabb szerepe a 464-es pozícióban lévő lizinnek van, de emellett a többi lizin is részt vesz a kötés megerősítésében úgynevezett “cipzár-szerű” módon [118]. Ezzel szemben Wang és munkatársai leírták, hogy a Lys464 helyett a 448-as pozícióban lévő lizin játssza a legnagyobb szerepet a plazminogénhez való kötődésben [119]. De azt is igazolták, hogy elektrosztatikus kölcsönhatások is szerepet játszhatnak az α_2 -PI C-terminális vége és a plazminogén Kringle-doménjeinek kötésében. Fiziológias pH mellett a plazminogén Kringle-doménjei nettó pozitív töltésűek, ezzel szemben az α_2 -PI C-terminális része nettó negatív töltésű. A negatív töltést egy glutaminsav, 9 aszparaginsav és egy szulfatált tirozin hozza létre [75].

A humán α_2 -PI C-terminális része a lizin mellett tartalmaz még egy arginin-glicin-aszparaginsav (RGD) szekvenciát, mely kulcsfontosságú szerepet tölt be az integrinekhez való kötődésben, illetve a sejtek felismerésében. Ennek a szerepét, viszont csak kis mértékben vizsgálták [120].

3. CÉLKITŰZÉSEK

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

Munkánk során célunk volt vizsgálni:

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

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

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

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

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

A totál α_2 -PI antigén szinteket a kiindulási plazma mintákból és az alvasztás után keletkezett szérumokból az intézetünkben kifejlesztett szendvics ELISA technikával határoztuk meg, amely az α_2 -PI minden formáját felismeri, de nem reagál a PAP-komplexszel (a plazma α_2 -PI referencia tartománya: 48-85 mg/L) [121].

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

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

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

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

- A FXIII deficiens plazmát kiegészítettük plazmából tisztított FXIII preparátummal (FXIII-A₂B₂) különböző koncentrációban (2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 mg/L). A FXIII-t egészséges személyek kevert plazmájából tisztítottuk Loránd és munkatársai közleménye alapján [122].

- A FXIII-mal kiegészített plazmákhoz 2 U/mL trombint és 20 mM CaCl₂-ot adtunk és 30 percig, 37 °C-on inkubáltuk, majd a keletkezett szérumot az alvadéktól centrifugálással elválasztottuk (16100 g, 5 perc).
- A totál α₂-PI antigén szinteket a plazma és a szérum mintákból a fent leírtak alapján határoztuk meg.
- Az alvadékot 3 mg/mL jódacetamidot (IAA) tartalmazó PBS (pH; 7,2) pufferrel alaposan (20x500μL) mostuk CRC oszlopokban (compact reaction columns; Affymetrix, Inc. Cleavland, OH, USA).
- A mosott alvadékot 8M ureát és 5% merkaptotetanolt (Bio-Rad, Hercules, CA USA) tartalmazó redukáló Laemmli mintapufferben szobahőmérsékleten, rázatás mellett 20 óra alatt feloldottuk.
- A feloldott alvadékokat (100x-os hígításban) 7,5%-os SDS-PAGE gélben megfuttattuk. Molekulasúly standardként biotinált molekulasúly markert (Bio-Rad), α₂-PI standardként pedig humán plazmából tisztított α₂-PI preparátumot (Calbiochem, San Diego, CA, USA) használtunk.
- A fehérjéket PVDF membránra (Bio-Rad) elektroblottoltuk 25 V-on 30 percig Trans-Blot Turbo Transfer System (Semi-Dry) segítségével.
- A membránok szabad felszínét 3% zselatint tartalmazó TBS (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 0,1% Tween20, pH 7,4) oldattal blokkoltuk folyamatos rázatás mellett, 1 óráig szobahőmérsékleten.
- A membránokat minden inkubációs lépés után 3x5 percig 25 mL tTBS oldattal mostuk.
- A VECTASTAIN ABC reagens (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) A (Avidin DH) és B (biotinált peroxidáz) komponenseit 1:50, 1:50 arányban hígítva használtuk a molekulasúly markerek detektálására. A komponenseket 1:1 arányban összemérve 30 percig inkubáltuk fénytől elzárva, szobahőmérsékleten. Ezt 80x-os hígításban alkalmaztuk a membránon.
- Az ABC komplexet a tormaperoxidázzal (HRPO) jelzett poliklonális totál α₂-PI ellenes antitesttel (20 000x-es hígításban) együtt 0,5% zselatin-tTBS oldattal hígítva tettünk a membránra. Szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk.
- Az előhíváshoz Pierce ECL Western blot szubsztrátot (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk, melynek komponenseit 1:40 arányban mértük össze.

- A kemilumineszcens jel detektálását Azure c300 készülékben végeztük. (425 nm)

4.3. Betegek és kontrollok

4.3.1. Akut iszkémiás stroke-ot elszenvedő betegek

A tanulmányba 57 AIS-ot elszenvedő beteget vontunk be, akik a tünetek megjelenésétől számítva 4,5 órán belül rt-PA (Alteplase, Boehringer Ingelheim, Germany) trombolízis terápiában részesültek. A betegek beválogatása 2016. szeptembere és 2017. júniusa között a Debreceni Egyetem Neurológiai Klinikáján történt a “European Stroke Organisation 2008. guideline for thrombolysis” ajánlás alapján [123]. A stroke diagnózisának felállítása a neurológiai tünetek alapján radiológusok által kontrasztanyag nélküli, egyszerű CT és CT angiográfia (CTA) segítségével történt. A kizárási és a beválogatási kritériumok megegyeztek a standard kizárási és beválogatási kritériumokkal. Azok a betegek, akik mechanikus tromboembólián estek át, kizárásra kerültek a tanulmányból. A betegeket a rövid-távú kimenet alapján csoportosítottuk a funkcionális neurológiai státusz (National Institutes of Health Stroke Scale score, NIHSS) változása alapján, a felvételtől számított trombolízis utáni 7. napra. Ha az NIHSS pontszám 4 ponttal csökken, vagy a 7. napra 0-ra változik, akkor jó kimenetelről beszélünk, míg a pontszám növekedése legalább 4 ponttal kedvezőtlen kimenetelt jósolhat [43, 124-126]. A vérzéses transzformációk jelenlétét (intrakraniális vérzés) az ECASS II kritérium szerint határoztuk meg a kontroll CT alapján az esemény után 24 órával. A perifériás vérvétel az AIS betegek esetén a felvételtől, a trombolízis terápia előtt történt. A rutin laboratóriumi meghatározások (ionok, glükóz, máj-, és vesefunkció tesztek) szérumból standard protokollok alapján a központi laboratóriumban történtek.

4.3.2. Vénás tromboembólián átesett betegek

A tanulmányba 218 nem rokon vénás tromboembóliát elszenvedett beteget vontunk be, akik a Debreceni Egyetem Trombózis Központjában kerültek felvételre a 2014-es évben. A vérminták gyűjtése legalább 3 hónappal az akut esemény után történt. Azokat a betegeket, akiknek malignus betegségük volt, vagy antitrombin, PC vagy PS deficienciával rendelkeztek nem válogattuk be a tanulmányba. A DVT gyanúját color Doppler-ultrahang vagy venográfiás vizsgálattal erősítették meg, míg a PE-t az Európai Kardiológiai Társaság ajánlásai alapján diagnosztizálták [127].

4.3.3. Kontrollok

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

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

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

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

4.4. Az alvadékba beépült totál α_2 -PI meghatározása

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

4.5. PB- α_2 -PI antigén meghatározás

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

A módszer beállítása során elsőként az volt a célunk, hogy a totál α_2 -PI antigén meghatározására szolgáló ELISA technikához hasonló szendvics rendszert hozzunk létre.

A totál α_2 -PI meghatározás esetén streptavidinnel fedett 96 lyukú lemezen (KaiSA96 Lockwell streptavidin coated microtiter plate, Kaivogen Oy, Turku, Finnország) a mintát együtt inkubáljuk a laboratóriumunkban kifejlesztett biotinált totál α_2 -PI ellenes monoklonális egér elfogó antitesttel (minden formát felismerő), majd az antitesten keresztül a felszínhez lekötődött α_2 -PI-t HRPO jelzett poliklonális kecske anti- α_2 -PI (GA2AP-AP) alkalmazásával detektáljuk.

A PB- α_2 -PI meghatározás esetén első lépésben egy az α_2 -PI C-terminális végére specifikus biotinált egér monoklonális antitestet (3AP, Technoclone, Bécs, Ausztria) alkalmaztunk elfogó antitestként, mely bizonyítottan a C-terminálisan ép, plazminogén kötő formát ismeri fel. Ebben az összeállításban azonban a PB- α_2 -PI ELISA nem működött megfelelően.

Ezért következő lépésben lecseréltük a detektáló antitestet egy új poliklonális totál α_2 -PI ellenes antitestre (LS-C20657, LSBio, Seattle, WA, USA), ami az N-terminális részen ismeri fel a fehérjét, így biztosan nem interferál a 3AP antitest kötődésével. Azonban, ebben a rendszerben sem kaptunk értékelhető jelet, amiből arra következtettünk, hogy a 3AP antitest nem alkalmas elfogó antitestként.

Ezért a továbbiakban a totál α_2 -PI ELISA-ban használt poliklonális detektáló antitest (GA2AP-AP) jelöletlen formáját kötöttük az ELISA lemez felszínére (EB, Thermo Fischer Scientific), majd az α_2 -PI-t tartalmazó minta hozzáadása után a PB- α_2 -PI ellenes antitestet (3AP) adtuk a lyukakhoz. A lekötődött 3AP detektálására biotinált anti-egér IgG-t (Southern Biotech), majd streptavidin-HRPO komplexet (Southern Biotech) alkalmaztunk.

Meghatároztuk az ELISA minden komponensének optimális koncentrációját és megvizsgáltuk a módszer reprodukálhatóságát az optimalizált körülmények alkalmazása mellett. A sorozaton belüli variációs együttható a normál és a patológiás α_2 -PI koncentráció esetén 2,3% és 8,6%, míg a teljes (laboratóriumon belüli) reprodukálhatóság 5,8% és 12,5%-nak adódott.

Az általunk fejlesztett PB- α_2 -PI antigén ELISA meghatározás részletezve:

- 96 lyukú lemez (EB, Thermo Fischer Scientific) felszínét poliklonális kecske totál α_2 -PI ellenes antitesttel (GA2AP-AP) (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{L}/\text{luk}$, 0,2 M NaHCO_3 -ban, pH 9,6) fedtük és inkubáltuk egy éjszakán át +4°C-on.
- A lemezt 150 $\mu\text{L}/\text{luk}$ hígító pufferrel (1% BSA, 0,1% Tween20-TBS (50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,4)) blokkoltuk 1 óráig, szobahőmérsékleten.
- A blokkolás után 100 $\mu\text{L}/\text{luk}$ hígított standardot, plazmát vagy szérum mintát vittünk fel a lemezre és 1 óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk.
- Majd 100 μL 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ egér monoklonális anti-humán PB- α_2 -PI antitestet (3AP, Technoclone) vittünk fel a lemez lukjaiba és 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten.
- 100 μL biotinált kecske anti-egér IgG-t (Southern Biotech) adtunk a lemez minden lukjába 5000x-es hígításban és szintén 1 óráig, szobahőmérsékleten inkubáltuk.
- Ezután 100 μL streptavidin-HRPO konjugátumot (Southern Biotech) mértünk a lukakba 3000x-es hígításban és 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten.
- A lemez lukjaiba 100 μL 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine (TMB, One Component HRP Microwell Substrate, Diarect Ag, Freiburg, Németország) oldatot mértünk és sötétben 10 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk.
- A reakciót 50 μL 2M H_2SO_4 oldattal állítottuk le.
- Az abszorbanciát 450 nm-en detektáltuk iEMS MF ELISA olvasóban (Labsystems Oy, Helsinki, Finnország).
- A lépések között a lemezt háromszor mostuk 300 $\mu\text{L}/\text{luk}$ 0,05% Tween20-at tartalmazó TBS mosó oldattal.
- A módszert standard humán plazmára (Siemens) kalibráltuk. Mivel a normál humán plazmában a PB- α_2 -PI a totál α_2 -PI-nek 65%-a, így a standard humán plazma PB- α_2 -PI tartalmát 0,65 U/L-nek tekintettük. A koncentrációt úgy kaptunk, hogy az ELISA-val meghatározott totál α_2 -PI koncentrációt szoroztuk 0,65-tel. Így az ismert koncentrációjú PB- α_2 -PI-t tartalmazó standard humán plazmából hígítottuk a standard görbe pontjait 10-500 $\mu\text{g}/\text{L}$ koncentráció tartományban.
- Kereskedelmi forgalomban kapható normál és patológiás kontrollt (Siemens) és kevert humán plazmát (20 egészséges egyén 1:1 arányban kevert plazmája) használtuk minőségi kontrollként 1000x-es hígításban.
- A mintákat minden esetben párhuzamosokban mértük és az eredményt a két mérés átlaga alapján kalkuláltuk.

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

4.6. Egyéb laboratóriumi vizsgálatok

- A totál α_2 -PI antigén szinteket intézetünkben korábban fejlesztett szendvics ELISA technikával határoztuk meg [121].
- A minták fibrinogén koncentrációját Clauss-módszerrel Siemens BCS-XP koagulométeren (Siemens Healthineers, Erlangen, Németország) mértük.
- A C-reaktív protein (CRP) és a koleszterin szinteket rutin laboratóriumi módszerrel Roche/Hitachi Modular P800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) készüléken határoztuk meg.
- A FXIII-A₂B₂ antigén szinteket laboratóriumunkban kidolgozott szendvics ELISA technika segítségével mértük [124, 128].
- A DNS-t a citráttal alvadásgátolt teljes vérből izoláltuk QIAamp DNA Blood Mini Kit segítségével (Qiagen, Hilden, Németország). Az α_2 -PI Arg6Trp (rs2070863) polimorfizmust valós idejű PCR-rel (RT-PCR) LightCycler® 480 készülékkel (Roche Diagnostic) határoztuk meg.
- Az FV Leiden és a FII 20210 G>A mutációkat intézetünkben már korábban meghatározták [129].
- Az α_2 -PI aktivitást Berichrom α_2 -PI aktivitás assay segítségével határoztuk meg BCS-XP koagulométeren.
- Az sFAP antigén koncentráció meghatározását humán FAP DuoSet® ELISA (R&D System, Abingdon, UK) kit segítségével a gyártó leírása alapján végeztük. A méréshez a kalibrációs görbe pontjait rekombináns humán FAP-ból hígítottuk.

4.7. Statisztikai analízis

Az adatok eloszlásának meghatározására a Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztuk. A normál eloszlású adatokat átlag \pm SD, a nem normál eloszlást mutató adatokat medián (IQR) értékekkel prezentáltuk. Normál eloszlású minták esetén, független mintás T-próbával határoztuk meg a csoportok átlagai közti különbséget, míg Mann-Whitney U teszt segítségével a rangszámok közötti különbségeket adtuk meg, nem normál eloszlású csoportok esetén. A csoportok közötti kategorikus változóknál való különbséget a χ^2 -próbával

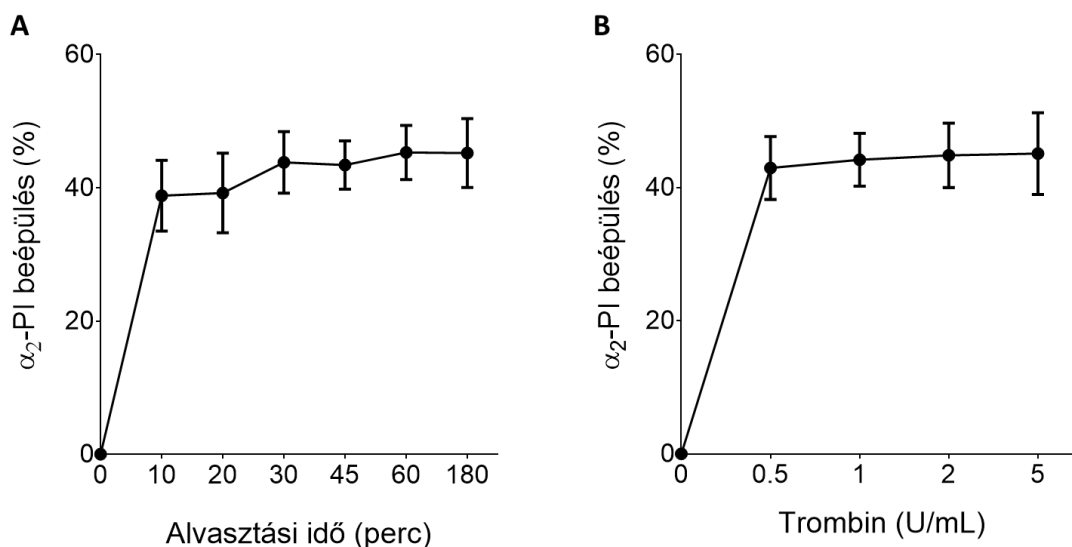
vizsgáltuk. Az α_2 -PI aktivitás és a totál α_2 -PI, PB- α_2 -PI és a NPB- α_2 -PI közötti korrelációt kétváltozós korrelációs analízissel számoltuk (Pearson korrelációt használtunk azoknak a paramétereknek az összevetésére, melyek normál eloszlást mutattak; Spearman korrelációt használtunk azoknál a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

5. EREDMÉNYEK

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

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

A módszer alkalmazása előtt megvizsgáltuk a trombin koncentrációjának és az alvasztási időnek a hatását az α_2 -PI beépülésének mértékére. A **7. ábrán** látható, hogy a totál α_2 -PI maximális beépülése az alvadékba megközelítőleg 45%. A beépülésnek ezt a szintjét már relatíve alacsony trombin koncentráció mellett el tudjuk érni (0,5-2 U/mL), magasabb trombin koncentrációnak már nincs további hatása (**7.B ábra**). Az α_2 -PI beépülése a fibrin alvadékba viszonylag gyorsan megtörténik 2 U/mL trombin koncentráció mellett (**7.A ábra**).



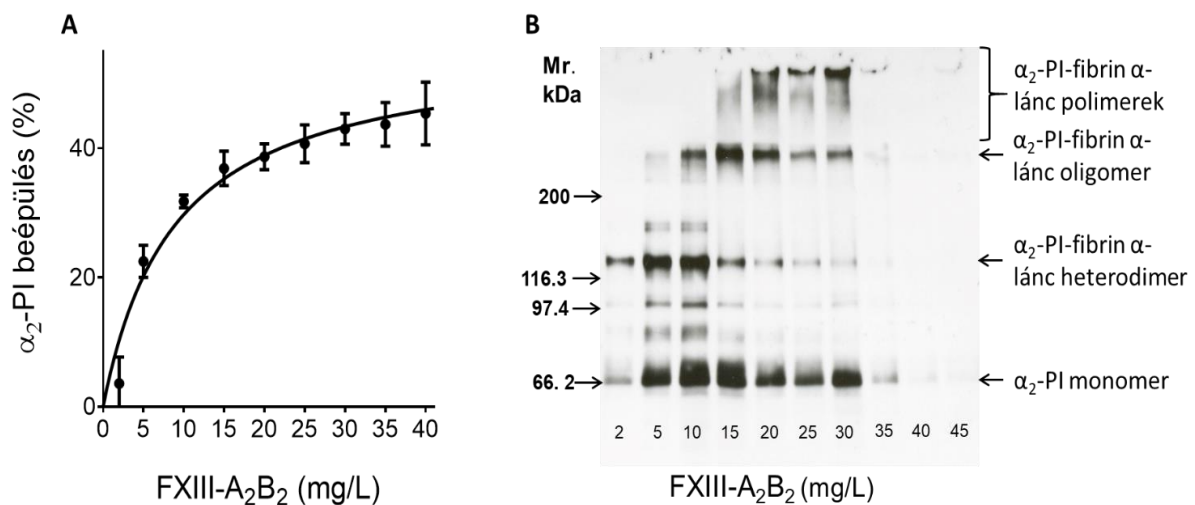
7.ábra: (A) Az α_2 -PI beépülésének időfüggése, (B) A trombin koncentráció hatása az α_2 -PI fibrin alvadékba való beépülésére; Az ábrák 10 normál minta alvasztása során kapott eredmények átlagát és szórását mutatják. α_2 -PI: alpha2-plazmin inhibitor

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

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

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

A FXIII koncentráció hatását az α_2 -PI alvadékba való beépülésének mértékére Western blottal is megvizsgáltuk. Az alvadékokat alapos mosás után 8M ureát tartalmazó Laemmli-féle mintapufferben feloldottuk, majd redukáló SDS-PAGE-t követően a fehérjéket PVDF membránra blottoltuk, ahol az α_2 -PI-t az összes formát felismerő poliklonális anti- α_2 -PI antitesttel jelöltük meg. A **8.B ábrán** látható, hogy a FXIII koncentráció emelkedésével fokozatosan nő a fibrin α -lánc polimerekhez kötött α_2 -PI és csökken a kisebb molekulatömegű termékek mennyisége. 30 mg/L feletti FXIII szintnél már olyan erős a fibrin α -láncok keresztkötése, hogy nem sikerült az alvadékot oly mértékben feloldani, hogy az a gélbe be tudjon diffundálni. Ezért ezzel a módszerrel a normál FXIII koncentráció feletti hatás biztonságosan már nem vizsgálható az extrém fibrin keresztkötés miatt. Az ábrán az α_2 -PI monomernek megfelelő sávban az is látható, hogy az intenzív mosás ellenére jelentős mennyiségű nem kovalensen kötött α_2 -PI is található az alvadékban, melynek mennyisége nem függ a FXIII koncentrációtól.



8. ábra: A plazma FXIII szint hatása az α_2 -PI fibrin alvadékba való beépülésének mértékére. A FXIII deficiens plazmát (α_2 -PI = 62 mg/L) egészítettünk ki különböző koncentrációjú tisztított FXIII-mal majd trombinnal és kalciummal megvalasztottuk. (A) A beépült α_2 -PI mennyiségét a kiegészített plazma és a keletkezett szérumok α_2 -PI koncentrációja alapján kalkuláltuk és az ábrán az alvadékba beépült α_2 -PI %-os aránya látható; (B) A mosott és feloldott alvadékok Western blot analízise (az α_2 -PI detektálására HRPO jelzett poliklonális anti- α_2 -PI antitestet használtunk) látható.

α_2 -PI: alpha2-plazmin inhibitor; Mr: molekulásúly marker; kDa: kilo-Dalton

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

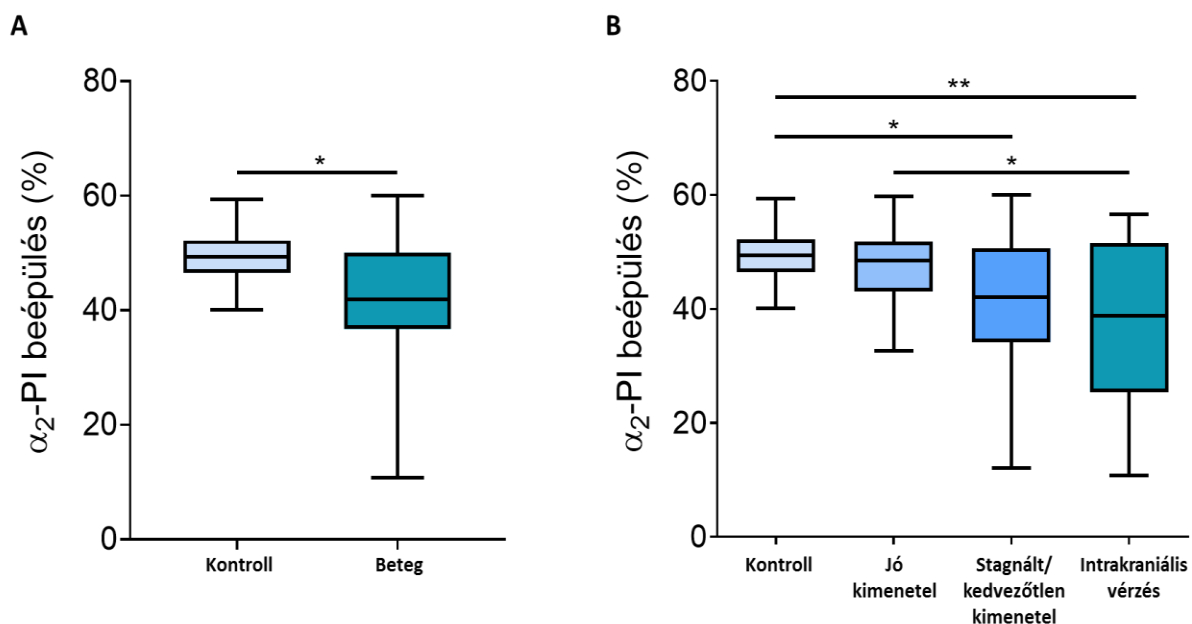
A fentiekben ismertetett alvasztásos módszert alkalmaztuk annak vizsgálatára, hogy az α_2 -PI plazma alvadékba történő beépülésének mértéke összefügg-e a trombolízis kimenetelével AIS-on átesett betegekben. Meghatároztuk az α_2 -PI beépülésének mértékét, valamint a fibrinogén és a FXIII-A₂B₂ szinteket 57 AIS beteg (akik intravénás trombolízisen estek át a tünetek megjelenésétől 4,5 órán belül) trombolízis előtti, valamint 26 korban illesztett egészséges kontroll citrátos plazma mintájából A betegeket a rövid-távú kimenetel szerint csoportosítottuk. A vizsgált csoportok jellemzői az **1. táblázat**ban láthatóak. A terápiával összefüggő intrakraniális (intracerebrális) vérzésben szenvedő betegek szignifikánsan idősebbek voltak és szignifikánsan súlyosabb stroke-ot szenvedtek el a felvételtkor NIHSS pontok alapján, szemben azokkal, akik jó kimenetellel rendelkeztek. A FXIII szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak minden betegcsoportban, szemben a kontrollokkal. A fibrinogén szintek magasabbak voltak azokban a betegekben, akiknél

sikertelen volt a trombolízis terápia és stagnáló/rossz kimenetellel rendelkeztek, szemben a kontrollokkal. Meg kell említeni, hogy a felvételtkor CRP szint szignifikánsan emelkedett volt azoknál a betegeknél, akik stagnáló/rossz kimenetellel rendelkeztek, illetve akik terápiával-összefüggő intrakraniális vérzésben szenvedtek, az egészséges kontrollokhöz viszonyítva. A lízis utáni intrakraniális vérzésben szenvedők csoportjában a plazma α_2 -PI szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a kontrollokhöz képest. Az α_2 -PI beépülésének mértéke a fibrin alvadékba jelentősen alacsonyabb volt a teljes betegpopulációban szemben a kontrollokkal (**9.A ábra**). Amikor a betegeket csoportosítottuk a terápia kimenetele alapján, a beépülés mértéke szignifikánsan alacsonyabb volt a stagnált/rossz kimenetellel rendelkező és lízis utáni intrakraniális vérzésben szenvedő betegeknél ($41,5 \pm 11,8\%$ és $37,3 \pm 14,0\%$) összehasonlítva az egészséges kontrollokkal ($49,4 \pm 4,6\%$) (**9.B ábra**). Az α_2 -PI beépülésének mértéke a jó kimenettel rendelkező betegeknél ($47,4 \pm 6,7\%$) nem különbözött szignifikánsan az egészségesektől. Másrészt, az α_2 -PI beépülése lényegesen alacsonyabb volt azokban a betegeknél, akik terápiával összefüggő intrakraniális vérzésben szenvedtek, összehasonlítva a jó kimenetellel rendelkező betegeknél (**9.B ábra**).

1.táblázat: Az akut iszkémiás stroke-ot elszenvedett betegek és a kontrollok jellemzői

	Kontroll (n=26)	Jó kimenetel (n=25)	Stagnáló/ rossz kimenetel (n=20)	Terápiával összefüggő intrakraniális vérzés (n=12)
Kor (év)	66,4±5,6	61,4±13,6	67,5±12,6	72,2±10,0 ^{§§}
Nem (Nő/Férfi)	12/14	12/13	8/12	7/5
Magas vérnyomás (nem/igen)	13/13	5/16	2/15*	4/6
Dohányzás (nem/igen)	21/5	16/5	12/5	7/3
BMI	27,1±4,2	28,4±4,8	27,6±4,1	26,4±4,9
Felvételkori NIHSS	-	4,0 (3,0-7,0)	9 (5-11,5)	10,0 (5,0-16,0) [§]
NIHSS 7 nappal a trombolízis után	-	1,0 (0,0-2,0)	11,0 (6,5-16,0) ^{§§§}	10 (6,5-11,0) ^{§§§}
CRP (mg/L)	1,7 (0,8-3,4)	2,9 (1,4-5,1)	4,9 (2,8-7,1)**	5,3 (2,5-11,9)**
Fibrinogén (g/L)	3,6±0,5	3,9±1,3	4,3±1,5*	4,2±2,0
FXIII-A₂B₂ antigén (mg/L)	28,2±4,3	23,4±5,5*	22,9±7,6*	21,3±6,7**
Plazma α₂-PI (mg/L)	66,9±8,7	64,9±10,8	56,8±12,8	52,8±19,7* [§]
Szérum α₂-PI (mg/L)	33,9±4,2	34,1±6,1	32,2±5,9	32,2±13,3
α₂-PI p.Arg6Trp (Vad/Hordozó)	15/5	17/8	13/7	6/6

*A folyamatos változók értékeit átlag±SD és nem normál eloszlás esetén medián (IQR) formában adjuk meg. Rövidítések: N: nő; Ffi: férfi; BMI: testtömeg-index; NIHSS: The National Institutes of Health Stroke Scale; CRP: C-reaktív protein; α₂-PI: α₂-plazmin inhibitor; *: p<0,05 beteg vs. kontroll; **: p<0,01 beteg vs. kontroll; §: p<0,05 beteg vs. jó kimenetel; §§: p<0,01 beteg vs. jó kimenetel; §§§: p<0,01 beteg vs. jó kimenetel*



9.ábra: Az α_2 -PI beépülés a fibrin alvadékba. A plazma minták alvasztása trombinnal és Ca^{2+} -mal. A plazma és a szérum antigén szintek közötti különbséget kiszámoltuk és a plazma értékekhez viszonyítva %-ban adtuk meg (A) a kontroll és a teljes betegcsoportban; illetve (B) a kontroll és a különböző kimenettel rendelkező betegcsoportokban. A box-whiskers plotok mutatják a mediánt, az interkvartilis tartományt és a teljes tartományt. *: $p < 0,05$ beteg vs. kontroll; **: $p < 0,01$; α_2 -PI: alpha2-plazmin inhibitor

Megvizsgáltuk, hogy az α_2 -PI beépülés mértéke a fibrin alvadékba milyen korrelációt mutat egyéb paraméterekkel (2. táblázat). A kontroll csoportban a fibrinogén statisztikailag szignifikáns korrelációt mutatott az α_2 -PI beépülésének mértékével. A betegcsoportban pozitív, szignifikáns korrelációt találtunk a plazma α_2 -PI, a FXIII szintek és az α_2 -PI fibrin alvadékba történő beépülése között. Továbbá, erős, negatív, szignifikáns összefüggést találtunk a betegekben a felvételi NIHSS és az α_2 -PI beépülés mértéke között. Ebből arra lehet következtetni, hogy súlyosabb stroke esetén *in vitro* kevesebb α_2 -PI épül be az alvadékba. Mivel az α_2 -PI beépülése a fibrin alvadékba limitált (45-50%), ennek az összefüggésnek a legvalószínűbb oka az lehet, hogy az akut esemény során bekövetkező jelentős *in vivo* fogyás miatt az α_2 -PI forma, mely képes a fibrinhez kötődni és beépül az alvadékba, kisebb mennyiségben van jelen azon betegek plazma mintáiban, akik súlyosabb stroke-ot szenvedtek el. Az NIHSS és az α_2 -PI beépülésének mértéke közötti negatív

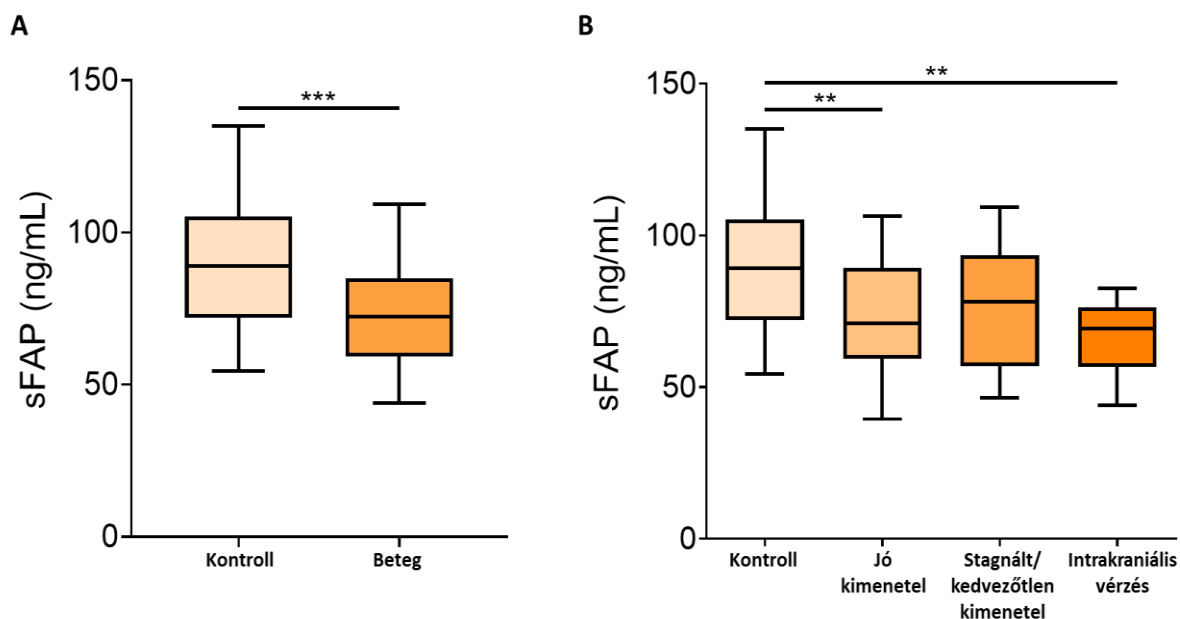
összefüggés különösen erős volt a lízis utáni intrakraniális vérzésben szenvedő betegek alacsonyabb csoportjában ($r = -0,627$, $p = 0,039$).

2.táblázat: Különböző paraméterek korrelációja az α_2 -PI fibrin alvadékba történő beépülésének mértékével

	Kontroll csoport (n=26)	Beteg csoport (n=57)	Totál (n=83)
Kor	-0,051 (0,803)	-0,224 (0,093)	-0,200 (0,070)
Fibrinogén	0,453 (0,039)	0,224 (0,098)	0,171 (0,137)
FXIII-A₂B₂	0,101 (0,622)	0,303 (0,022)	0,357 (0,001)
Plazma α_2-PI	0,284 (0,160)	0,544 (<0,001)	0,540 (<0,001)
Felvételkori NIHSS	-	-0,449 (0,001)	

Az értékek a Pearson korrelációs együtthatót és zárójelben a statisztikai szignifikanciát mutatják, $r(p)$; $p < 0.05$; α_2 -PI: alpha2-plazmin inhibitor; NIHSS: The National Institutes of Health Stroke Scale

Az sFAP szintje és a α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus befolyásolja az α_2 -PI N-terminális hasítását és ezáltal az α_2 -PI FXIII általi keresztötését a fibrinhez. Ezért meghatároztuk ezen paramétereket is a vizsgált csoportokban. Az sFAP szint szignifikánsan alacsonyabb volt a betegekben, mint az egészséges kontrollokban (**10.A ábra**), különösen a terápiával összefüggő vérzéses szövődményekkel rendelkezők, illetve a jó kimenettel rendelkező betegek csoportjában, az egészséges kontrollokhoz viszonyítva (**10.B ábra**). Az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus nem befolyásolta a kimenetelt (**1. táblázat**) és az allél frekvencia gyakorlatilag azonos volt a beteg és a kontroll csoportokban. Az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus nem befolyásolta az α_2 -PI beépülésének mértékét a fibrin alvadékba egyik betegcsoportban sem (nem prezentált adat).



10.ábra: A szolubilis fibroblaszt aktiváló protein (sFAP) szintek a kontroll és a teljes betegpopulációban (A) illetve a kontroll és a különböző kimenettel rendelkező betegek csoportjában (B). A box-whiskers plotok mutatják a mediánt, az interkvartilis tartományt és a teljes tartományt. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; sFAP: szolubilis fibroblaszt aktiváló protein

5.4. Az α_2 -PI hatása a vénás tromboembólia kialakulására

Ebbe a tanulmányba 218 vénás tromboembóliát elszenvedett, illetve korban és nemben illesztett 218 egészséges kontroll személyt vontunk be. A csoportok medián életkora 40 év volt és a férfiak és nők eloszlása is azonos volt a két csoportban (105 és 113). A 218 VTE beteg között 44 esetben fordult elő mind DVT, mind PE, 9 esetben csak PE volt kimutatható. A vaszkuláris megbetegedések rizikófaktorai közül a túlsúlynak, a magas vérnyomásnak és a hiperkoleszterinémiának, a FV Leiden és a FII 20210 G>A mutációknak volt nagyobb prevalenciája a betegekben, mint a kontrollokban. Jelenleg is dohányzók a VTE csoportban nem várt módon kevesebben voltak, feltehetőleg azért, mert a betegek az első VTE esemény után megváltoztatták dohányzási szokásaikat. A CRP, a fibrinogén és a plazma FXIII aktivitás és antigén (FXIII-A₂B₂) szintek szignifikánsan magasabbak voltak a betegekben, mint a kontrollokban (**3. táblázat**). A szerzett rizikó faktorok közül fogamzásgátló szedése vagy hormon terápia 19, trauma 13, hosszú távú utazás 8, műtét 7, szülés utáni időszak 5, lupus antikoaguláns 3, kortikoszteroid kezelés 2, tumor 2, terhesség 2, visszértágulat 2 esetben fordult elő a betegcsoportban.

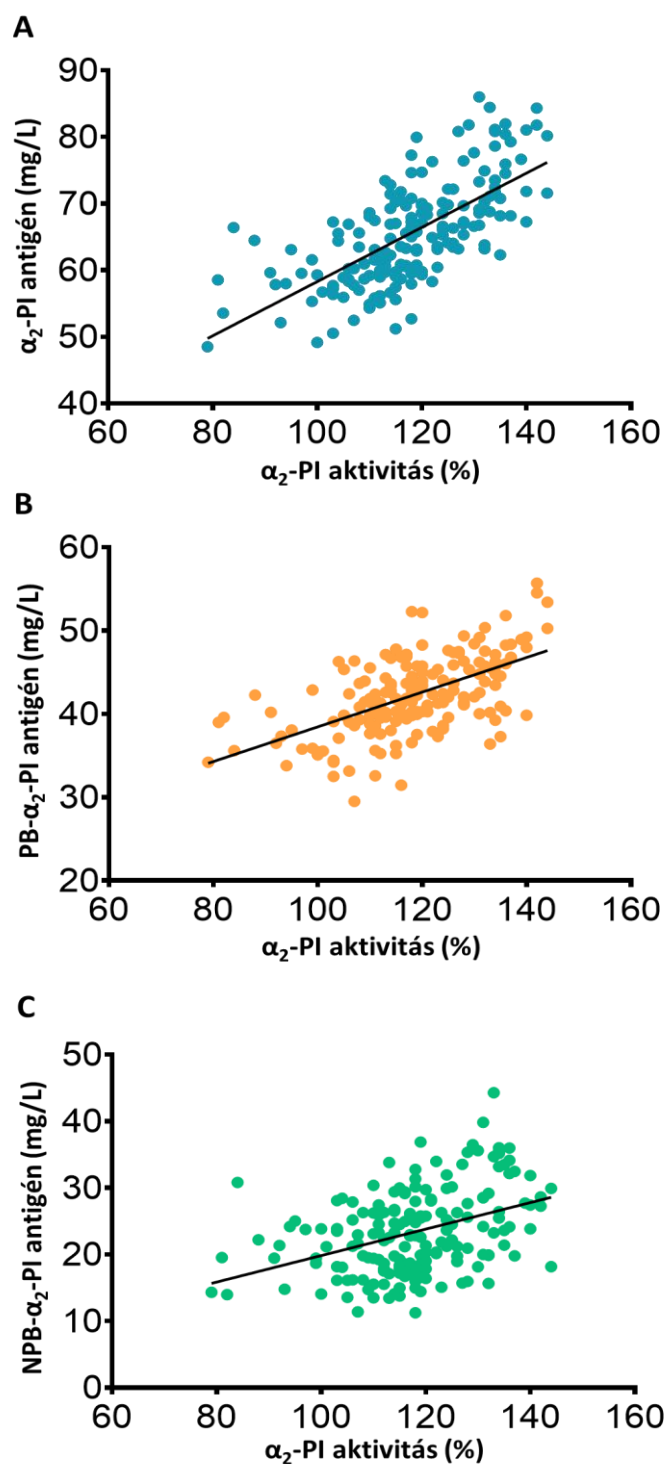
3.táblázat: A vénás trombózison átesett betegek és az egészséges kontrollok karakterizálása

	Kontroll (n=218)	VTE (n=218)	P
Nem (Nő/Férfi)	113/105	113/105	
Kor (medián (IQR))	40 (30-50)	40 (30-53)	<0,001
Magas vérnyomás (nem/igen)	170/45	114/104	<0,001
Dohányzás (nem/igen)	157/58	186/32	0,002
Hiperkoleszterinémia (nem/igen)	165/17	156/62	<0,001
FV Leiden p.R506Q vad típus	193	144	
heterozigóta	25	62	
homozigóta	0	12	
Q506 hordozó frekvencia	11,5%	33,9%	<0,001
Q506 allél frekvencia	5,7%	19,7%	<0,001
FII 20210 G > A vad típus	210	204	
heterozigóta	8	14	
homozigóta	0	0	
A hordozó frekvencia	3,7%	6,4%	0,274
A allél frekvencia	1,8%	3,2%	0,274
α_2-PI p.R6W vad típus	136	141	
heterozigóta	72	67	
homozigóta	10	10	
W6 hordozó frekvencia	37,6%	35,3%	0,889
W6 allél frekvencia	21,1%	20,0%	0,889
BMI (medián (IQR))	25,2 (21,8-28,7)	29,0 (25,9-32,9)	<0,001
Fibrinogén (átlag \pm SD)	3,4 \pm 0,58	3,7 \pm 0,66	<0,001
CRP mg/L (medián (IQR))	1,6 (0,9-3,5)	3,8 (2,3-6,7)	<0,001
Koleszterin (medián (IQR))	4,75 (4,2-5,4)	5,16 (4,5-6,0)	<0,001
FXIII aktivitás %	109,5 \pm 24,8	119,6 \pm 27,4	<0,001
FXIII A₂B₂ antigén %	107,2 \pm 23,6	117,8 \pm 27,4	<0,001

$p < 0,05$; α_2 -PI: alpha2-plazmin inhibitor; BMI: testtömeg-index, CRP: C-reaktív protein, IQR: interkvartilis tartomány; R: arginin; W: triptofán, FXIII: XIII-as faktor; VTE: vénás tromboembólia

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

A kontroll csoportban megvizsgáltuk, hogy az α_2 -PI aktivitás meghatározás eredményei hogyan korrelálnak a totál és a C-terminálisan ép és trunkált α_2 -PI antigén koncentráció értékekkel. A legnagyobb korrelációt az α_2 -PI aktivitás és a totál α_2 -PI antigén szintek között találtuk ($r=0,690$, $p<0,001$). A PB- α_2 -PI antigén szint szintén erős korrelációt mutatott az aktivitás értékekkel ($r=0,562$, $p<0,001$), ugyanakkor az NPB- α_2 -PI antigén és az α_2 -PI aktivitás szintek között jóval gyengébb korrelációt találtunk ($r=0,394$, $p<0,001$). **(11. ábra)** A betegcsoportban hasonló korrelációkat találtunk: a totál α_2 -PI antigén esetén: $r=0,782$; PB- α_2 -PI esetén: $r=0,610$; és NPB- α_2 -PI esetén: $r=0,477$; ($p<0,001$). A betegcsoportban mutatott nagyobb korrelációs értékek feltehetőleg annak a szélesebb tartománynak köszönhetőek, amelyet az emelkedett α_2 -PI szint okoz ebben a csoportban. Nem találtunk szignifikáns korrelációt az α_2 -PI aktivitás és a NPB- α_2 -PI százalékos aránya között ($r=0,121$, $p=0,107$).



11.ábra: Az α_2 -PI aktivitás és α_2 -PI antigén szintek korrelációja a kontroll csoportban. (A) totál α_2 -PI; (B) PB- α_2 -PI (C) NPB- α_2 -PI
 α_2 -PI: alpha2-plazmin inhibitor; PB- α_2 -PI: plazminogén-kötő α_2 -PI; NPB- α_2 -PI: nem-plazminogén-kötő α_2 -PI

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

Az α_2 -PI aktivitás és antigén szintek egyéb paraméterekkel való korreláció analízise azt mutatta, hogy az α_2 -PI aktivitás, a totál α_2 -PI és a PB- α_2 -PI antigén szintek mérsékelt, de szignifikáns korrelációt mutattak a fibrinogén és a koleszterin értékekkel. Gyenge korrelációt találtunk a BMI-vel, de ez az összefüggés csak a totál α_2 -PI szintekkel volt statisztikailag szignifikáns. Az α_2 -PI aktivitás, a totál α_2 -PI és a PB- α_2 -PI mérsékelt negatív összefüggést mutattak a korrrelációval (4. táblázat). A PB- α_2 -PI és a nemek között találtunk negatív összefüggést, ami azt jelenti, hogy a férfiak alacsonyabb PB- α_2 -PI szinttel rendelkeztek, mint a nők. Meglepő volt viszont, hogy az NPB- α_2 -PI antigén szint nem mutatott korrelációt a fentebb említett paraméterekkel. Csak a CRP-vel és a magas vérnyomással mutatott gyenge összefüggést.

4. táblázat: Az α_2 -PI és az sFAP szintek független korrelációja más paraméterekkel a kontroll csoportban

	α_2 -PI aktivitás	Totál α_2 -PI antigén	PB- α_2 -PI antigén	NPB- α_2 -PI antigén	sFAP antigén
Fibrinogén	0,289 (<0,001)	0,295 (<0,001)	0,242 ((0,002))	n.s.	-0,160 ((0,039))
BMI	n.s.	0,190 ((0,014))	n.s.	n.s.	0,219 ((0,004))
Koleszterin	0,238 ((0,002))	0,233 ((0,003))	0,253 ((0,001))	n.s.	n.s.
Kor	-0,226 ((0,004))	-0,157 ((0,043))	-0,199 ((0,010))	n.s.	n.s.
Nem	n.s.	n.s.	-0,156 ((0,045))	n.s.	n.s.
CRP	n.s.	n.s.	n.s.	0,187 ((0,015))	n.s.
Magas vérnyomás	n.s.	n.s.	n.s.	0,193 ((0,012))	n.s.
FXIII aktivitás	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,202 ((0,009))

$p < 0,05$; n.s.: nem szignifikáns; BMI: testtömeg-index; CRP: C-reaktív protein; α_2 -PI: alpha2-plazmin inhibitor; PB- α_2 -PI: plazminogén-kötő α_2 -plazmin inhibitor; NPB- α_2 -PI: nem plazminogén-kötő α_2 -plazmin inhibitor

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

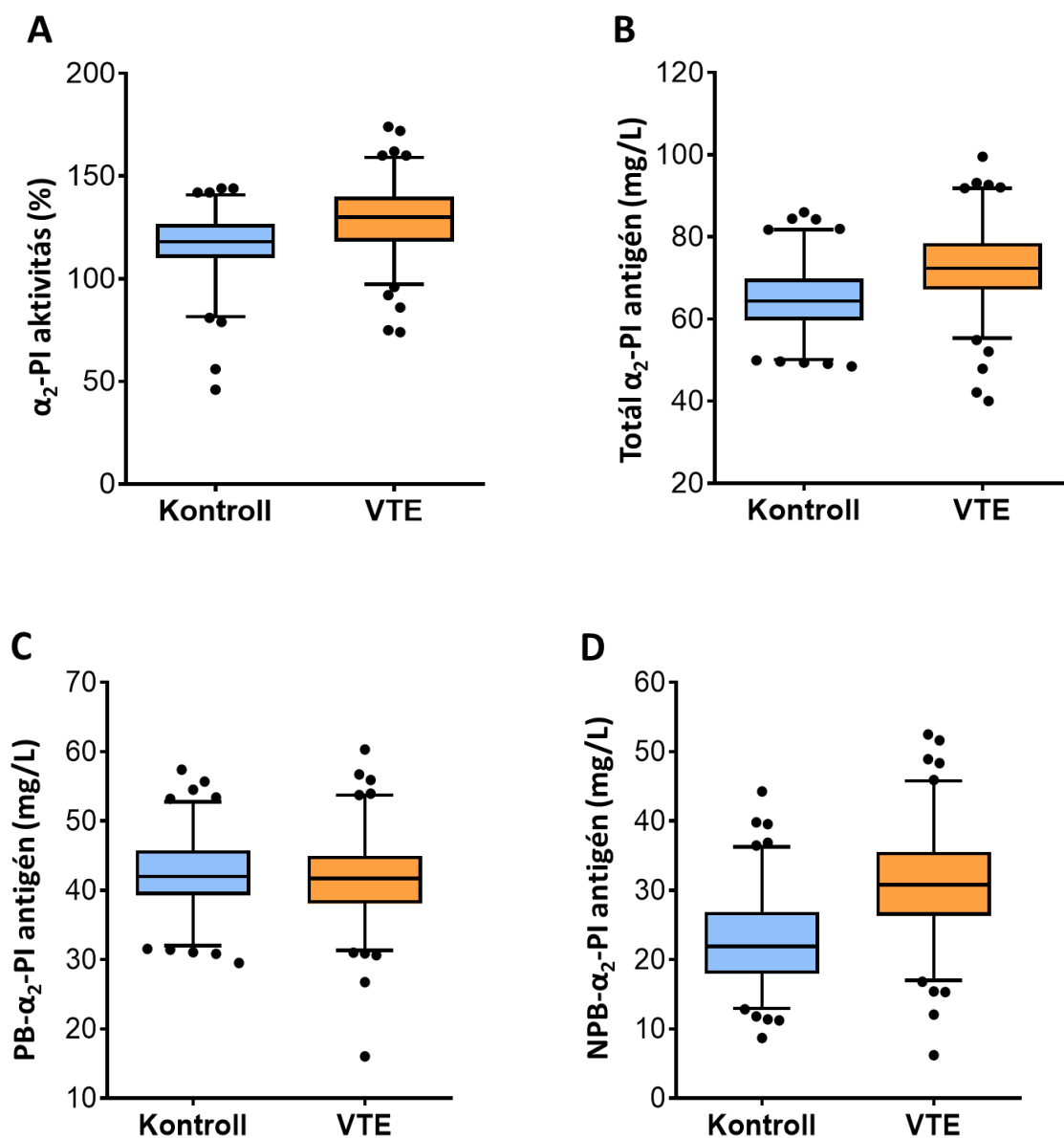
Az α_2 -PI aktivitás és antigén szintek szignifikáns emelkedést mutattak a VTE csoportban (5. táblázat; 12. ábra). A fibrinogénre, BMI-re, koleszterinre és a korra való korrigálás nem módosította jelentősen az eredményeket. A C-terminálisan ép PB- α_2 -PI átlagos értékeiben nem volt szignifikáns különbség a beteg és a kontroll csoportban, azonban korrigálva az eredményeket a két csoport közötti különbség statisztikailag szignifikáns eltérést mutatott. Mivel a totál α_2 -PI magasabb volt a betegekben, a PB- α_2 -PI antigén szint nem tért el így nem volt meglepetés, hogy az NPB- α_2 -PI szintén szignifikáns emelkedést mutatott a betegcsoportban és az eredmény a fenti paraméterekre való korrekció után sem változott.

5.táblázat: Mért paraméterek a kontroll és a betegcsoportban

	Kontroll (n=218)	VTE (n=218)	P
α_2 -PI aktivitás % nem korrigált	117±14,5	130±15,6	<0,001
korrigált	118 (115-120)	129 (127-131)	<0,001
Totál- α_2 -PI antigén (mg/L) nem korrigált	65,1±7,7	72,7±9,2	<0,001
korrigált	65,9 (64,6-67,2)	72,4 (71,2-73,6)	<0,001
PB- α_2 -PI antigén (mg/L) nem korrigált	42,3±4,9	41,8±5,6	0,295
korrigált	42,6 (41,9-43,4)	41,2 (40,5-41,9)	0,013
NPB- α_2 -PI antigén (mg/L) nem korrigált	21,9 (18,0-26,9)	30,8 (26,3-35,5)	<0,001
korrigált	23,6 (22,5-24,7)	31,1 (30,1-32,0)	<0,001
NPB- α_2 -PI antigén %	34,6±7,0	43,3±6,5	<0,001
sFAP μ g/L nem korrigált	76,3 (65,3-90,1)	80,5 (67,0-99,8)	0,044
korrigált	79,8 (76,6-82,9)	83,4 (80,3-86,6)	0,123

A normál és nem normál eloszlású, nem korrigált értékek esetében az átlag±SD-t és a mediánt (IQR) adtuk meg. A korrigált értékeknél korrigált átlagként (95%-os CI) tüntettük fel. $p < 0,05$; Az α_2 -PI aktivitás és totál α_2 -PI antigén értékeket korrigáltuk nemre, koleszterin, fibrinogén és BMI értékekre; a PB- α_2 -PI antigén értékeket korrigáltuk koleszterin, fibrinogén és BMI értékekre; az NPB- α_2 -PI antigén értékeket CRP-re, HT-re és korra korrigáltuk; az sFAP értékeket BMI-re, fibrinogénre és FXIII aktivitásra korrigáltuk; α_2 -PI: alpha2-plazmin

inhibitor; PB- α_2 -PI: plazminogén-kötő α_2 -plazmin inhibitor; NPB- α_2 -PI: nem plazminogén-kötő α_2 -plazmin inhibitor; BMI: testtömeg-index; CRP: C-reaktív protein; HT: magas vérnyomás; sFAP: szolubilis fibroblaszt aktiváló protein



12. ábra: Különböző α_2 -PI formák nem korrigált szintjei a kontroll és a betegcsoportban α_2 -PI: *alpha2-plazmin inhibitor; PB- α_2 -PI: plazminogén-kötő alpha2-plazmin inhibitor; NPB- α_2 -PI: nem-plazminogén-kötő alpha2-plazmin inhibitor; VTE: vénás tromboembólia*

A nők magasabb PB- α_2 -PI antigén és alacsonyabb NPB- α_2 -PI antigén szinttel rendelkeztek mindkét csoportban, de a különbség csak a PB- α_2 -PI szint esetén volt

statisztikailag szignifikáns (**6. táblázat**). Az NPB- α_2 -PI százalékos aránya a totál α_2 -PI antigén szinthez viszonyítva szignifikánsan magasabb volt a férfiakban mindkét csoportban. Az α_2 -PI aktivitás, a totál α_2 -PI antigén és a PB- α_2 -PI antigén szintek emelkedése kiemelkedőbb volt a nőkben a VTE csoportban (**6. táblázat**).

6.táblázat: Az α_2 -PI szintek nemek közötti megoszlása a kontroll és a betegcsoportban

	Kontroll			VTE		
	Nő (n=113)	Férfi (n=105)	P	Nő (n=113)	Férfi (n=105)	P
α_2-PI aktivitás % nem korrigált	118±15,3	116±13,4	0,200	134±14,1	125±15,5	<0,001
korrigált	119 (116-122)	115 (112-118)	0,082	134 (132-137)	125 (122-128)	<0,001
Totál-α_2-PI ag mg/L nem korrigált	65,5±7,7	64,7±7,8	0,435	73,9±8,9	71,5±9,1	<0,001
korrigált	66,1 (64,5-67,7)	64,7 (63,1-66,4)	0,277	74,1 (72,5-75,7)	71,5 (69,8-73,1)	0,029
PB-α_2-PI ag mg/L nem korrigált	43,3±4,6	41,3±4,7	0,002	43,4±5,5	40,0±5,2	<0,001
korrigált	42,9 (42,0-43,9)	41,3 (40,3-42,3)	0,034	43,4 (42,4-44,4)	40,0 (39,0-41,0)	<0,001
NPB-α_2-PI ag mg/L nem korrigált	21,2 (17,5-26,2)	23,6 (18,7-28,0)	0,061	29,5 (25,8-35,3)	31,5 (26,9-35,6)	0,205
korrigált	23,0 (21,8-24,3)	23,5 (22,1-24,8)	0,677	30,6 (29,3-31,8)	31,4 (30,1-32,8)	0,374
NPB-α_2-PI ag %	33,5±7,4	35,8±6,3	0,012	41,1±5,7	43,6±7,1	0,003
sFAP μg/L nem korrigált	74,3 (63,3-87,6)	78,6 (69,1-92,4)	0,073	77,4 (64,8-94,4)	83,6 (69,3-103,1)	0,019
korrigált	78,8 (74,4-83,2)	80,6 (76,1-85,1)	0,860	79,2 (74,8-83,7)	88,0 (83,5-92,5)	0,037

A normál és nem normál eloszlású, nem korrigált értékek esetében az átlag±SD-t és a mediánt (IQR) adtuk meg. A korrigált értékeknél korrigált átlagként (95%-os CI) tüntettük fel. p<0,05; Az α_2 -PI aktivitás és totál α_2 -PI antigén értékeket korrigáltuk nemre, koleszterin, fibrinogén és

BMI értékekre; a PB- α_2 -PI antigén értékeket korigáltuk koleszterin, fibrinogén és BMI értékekre; az NPB- α_2 -PI antigén értékeket CRP-re, HT-re és korra korigáltuk; az sFAP értékeket BMI-re, fibrinogénre és FXIII aktivitásra korigáltuk; α_2 -PI: alpha2-plazmin inhibitor; PB- α_2 -PI: plazminogén-kötő α_2 -plazmin inhibitor; NPB- α_2 -PI: nem plazminogén-kötő α_2 -plazmin inhibitor; BMI: testtömeg-index; CRP: C-reaktív protein; HT: magas vérnyomás; sFAP: szolubilis fibroblaszt aktiváló protein

5.8. sFAP antigén szintek

Az sFAP antigén szintek gyenge pozitív korrelációt a BMI-vel és a FXIII aktivitás szintekkel és gyenge negatív összefüggést a fibrinogén szintekkel mutattak a kontroll csoportban (**4. táblázat**). Az sFAP medián értékei szignifikánsan emelkedettebbek voltak a VTE csoportban, habár a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns a BMI, a fibrinogén és FXIII aktivitás szintekre való korigálás után (**5. táblázat**). A beteg csoportban a férfiak magasabb medián sFAP értékekkel rendelkeztek, mint a nők (**6. táblázat**), míg a kontroll csoportban a férfiak és a nők között ez nem volt statisztikailag szignifikáns.

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

Az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus és az sFAP antigén szint hatását vizsgáltuk a VTE kialakulására. A polimorfizmus genotípusának eloszlása megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúlynak a vizsgált populációban ($\chi^2 = 0,2284$, $p = 0,6327$). A Trp6 hordozó és a Trp allél frekvencia nem tért el szignifikánsan egymástól a kontroll és a betegcsoportban (**3. táblázat**). Nem volt szignifikáns összefüggés a Trp allél hordozása és a VTE előfordulása között a teljes vizsgálati populációban (OR: 0,912, 95% CI: 0,617-1,348, $p=0,645$). Azoknak az egyéneknek, akiknek az sFAP értéke a felső harmadban volt ($n=90/72$ a beteg/kontroll csoportban) nem volt szignifikánsan magasabb rizikójuk a VTE előfordulására nézve (OR: 1,246, 95% CI: 0,793-1,959, $p=0,340$), összehasonlítva azokkal az esetekkel, akiknek a legalsó harmadban volt az sFAP szintjük ($n=71/70$ a beteg/kontroll csoportban). Azonban, ha a polimorfizmus hatását csak azon személyek csoportjában vizsgáltuk, akiknek az sFAP szintje a felső harmadban volt (R6/W6=62/28 és 41/31 a beteg és a kontroll csoportban), kimutatható volt egy szignifikáns védőhatás a VTE kialakulására nézve. A FV Leiden

mutáció, a magas vérnyomás, a BMI, a CRP, a fibrinogén és a koleszterin szintekre való korrigálás után az OR: 0,425, 95% CI: 0,199-0,911, p=0,028.

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

A felső harmadban található α_2 -PI aktivitás, a totál α_2 -PI antigén és az NPB- α_2 -PI antigén szintek erős összefüggést mutattak a VTE kialakulásának rizikójával (7. táblázat). A korrigálás után, az OR értékek minden esetben csökkentek, de továbbra is szignifikánsan magasak maradtak. A felső harmadban lévő PB- α_2 -PI antigén szintek egy alacsonyabb VTE rizikóval társultak, de ez az összefüggés csak az egyéb befolyásoló tényezőkre való korrigálás után lett statisztikailag szignifikáns (7. táblázat). Az emelkedett antigén koncentráció hatásán kívül, a magas NPB- α_2 -PI %-os aránya is szignifikánsan emelkedett VTE rizikót eredményez.

7.táblázat: Az α_2 -PI szintek összefüggése a VTE kialakulásának kockázatával

Paraméter n (felső harmad/alsó harmad kontroll vs betegek)	OR	95% CI	Szignifikancia (p)
α_2 -PI aktivitás % (45/61 vs 130/25)	7,049	3,963-12,537	<0,001
korrigált	5,895	2,714-12,806	<0,001
Totál- α_2 -PI ag mg/L (72/72 vs 157/14)	11,214	5,932-21,201	<0,001
korrigált	7,645	3,459-16,896	0,029
PB- α_2 -PI ag mg/L (72/72 vs 62/80)	0,775	0,487-1,234	0,283
korrigált	0,367	0,173-0,762	0,007
NPB- α_2 -PI ag mg/L (72/72 vs 175/8)	21,875	10,025-47,733	<0,001
korrigált	9,868	4,095-23,783	<0,001
NPB- α_2 -PI ag % (72/72 vs 169/10)	16,900	8,254-34,604	<0,001
korrigált	8,367	3,635-19,259	<0,001

Azokat az eseteket, akiknek az α_2 -PI szintjei a felső harmadban voltak (>123% α_2 -PI aktivitás, >68,1 mg/L totál- α_2 -PI antigén, >44,4 mg/L PB- α_2 -PI antigén, >25,2 mg/L NPB-

α_2 -PI antigén és >38,4% NPB- α_2 -PI%) hasonlítottuk össze azokkal az esetekkel, akiknek az α_2 -PI szintjei a legalsó harmadba estek (<113% α_2 -PI aktivitás, <60,9 mg/L totál- α_2 -PI antigén, <40,2 mg/L PB- α_2 -PI antigén, <19,1 mg/L NPB- α_2 -PI antigén és <31,1% NPB- α_2 -PI%). $p < 0.05$; A korrigáláshoz a következő paramétereket tettük be a logisztikus regressziós modellbe: fibrinogén, magas vérnyomás, FV Leiden mutáció, FII 20210 G>A mutáció és a transzformált koleszterin, BMI és CRP.

α_2 -PI: alpha2-plazmin inhibitor; PB- α_2 -PI: plazminogén-kötő α_2 -plazmin inhibitor; NPB- α_2 -PI: nem plazminogén-kötő α_2 -plazmin inhibitor; BMI: testtömeg-index; CRP: C-reaktív protein; ag: antigén; VTE: vénás tromboembólia; OR: esélyhányados; CI: konfidencia intervallum

6. MEGBESZÉLÉS

Korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy az újonnan képződött trombus ellenálló képessége a korai fibrinolízissel szemben nagyrészt az α_2 -PI fibrin alvadékba történő beépülésétől függ [4, 5]. Annak ellenére, hogy ennek a szabályozási lépésnek nagy jelentősége van és potenciális hatása lehet a trombotikus klinikai események széles körére, meglepően keveset tudunk arról, hogy az α_2 -PI különböző körülmények között hogyan kötődik a fibrinhez. Jelen munkám során kifejlesztettünk egy olyan módszert, mellyel meg tudjuk határozni az α_2 -PI beépülésének mértékét a fibrin alvadékba, még pedig úgy, hogy a plazmából és a plazma alvasztása után készült szérumból mért α_2 -PI antigén szintek különbségeként megadható a beépült α_2 -PI mennyisége és %-os aránya is egyaránt. Ezt a módszert használva az első (akut iszkémiás stroke-ot elszenvedő betegek vs. egészséges kontrollok) tanulmányban az α_2 -PI beépülésének mértéke az egészséges kontrollokban $44,0 \pm 4,6\%$ volt. Korábbi tanulmányokban, tisztított fehérjékből létrehozott alvadékban SDS-PAGE és Western blot technikák segítségével vizsgálták az α_2 -PI és a fibrin α -lánc keresztkötést és az eredmények alapján az α_2 -PI bekötődését a fibrinhez csupán csak 30% körülire becsülték [86, 130]. Ezeknek a kísérleteknek a limitációja lehetett, hogy tisztított α_2 -PI-t használtak a kísérletekhez, ami csak a plazminogén-kötő formát tartalmazta, illetve a Western blot technika nem alkalmas a nagy molekulatömegű α_2 -PI-fibrin α -lánc polimerek mennyiségi analízisére. Az α_2 -PI fibrin alvadékba történő beépülésének mértéke a plazmából és az alvasztás után keletkezett szérumból ELISA technikával meghatározott α_2 -PI szintek különbségeként megadható. Egy a közelmúltban megjelent közleményben hasonló módszert használtak a Chandler hurokban készített plazma trombusba beépült α_2 -PI kvantitálására, amelyben a beépülést kb. 30-50%-ra becsülték [5]. Eredményeink azt mutatják, hogy nem csak a FXIIIa által keresztkötött α_2 -PI épül be az alvadékba, hanem kisebb mennyiségben nem kovalensen módon is kötődik az α_2 -PI a fibrinhez, amit Tsurupa és munkatársai vizsgálatai is alátámasztanak [2, 131]. Ez utóbbi nem kovalens kölcsönhatás feltételezhetően hozzájárul az α_2 -PI megfelelő elhelyezkedéséhez, ezáltal megkönnyíti a keresztkötési folyamatot [131]. Korábbi megállapításokkal ellentétben [65], kimutattuk, hogy 8% FXIII koncentráció esetén az α_2 -PI fibrin alvadékba való beépülése még nem éri el a maximumát. A beépült α_2 -PI kb. 100% plazma FXIII koncentrációig meredeken emelkedik és a FXIII koncentráció további emelkedése bár kisebb mértékben, de tovább fokozza a beépülést, ami hozzájárulhat a stabilabb alvadék kialakulásához. Ez a hiányzó biokémiai kapcsolat magyarázhatja a FXIII akut trombotikus eseményekben betöltött szerepét a klinikai

megfigyelésekben. Jelentek már meg olyan közlemények, melyekben fiatal felnőttekben, különösen nőkben az emelkedett FXIII szintek emelkedett MI rizikóval társultak [132-134]. A csökkent fibrinolitikus kapacitást fiatalokban a MI és a stroke rizikófaktoraként határozták meg, de a pontos mechanizmust egyelőre nem sikerült meghatározni [135, 136]. Feltételezhető, hogy az emelkedett FXIII szint általi α_2 -PI nagymértékű beépülése a fibrin alvadékba és a fibrinolízis hatékony gátlása szerepet játszhat az oklúziós trombus fenntartásában olyan körülmények között, ahol az ateroszklerózis nem túl kiterjedt [133].

A trombolitikus kezelés során a fibrinolízist gátló szabályozási lépéseket le kell győzni a trombus hatékony feloldásának érdekében. Állatmodellben már bemutatták, hogy a trombus t-PA által kiváltott trombolízissel szembeni ellenállását nagymértékben befolyásolja az újonnan képződött trombusokban lévő aktív α_2 -PI mennyisége [6-9]. Az alvadékhoz kötött α_2 -PI gátlása jelentősen fokozta a trombolízist nyúl juguláris véna trombózis modellben [6], míg ha egereket kezeltek α_2 -PI ellenes monoklonális antitesttel a trombus gyorsan feloldódott [7]. Az emelkedett α_2 -PI szinteket és gátlásának hatását alaposan tanulmányozták stroke trombolízis egérmódelben és azt az eredményt kapták, hogy az alvadékhoz kötött α_2 -PI gátlása fokozhatja a trombolízist akut stroke-ot elszenvedett betegekben [6, 8, 9]. Az állatmodellekből származó eredmények alapján lehetséges összefüggés van a trombolízis kimenetele és az akut iszkémiás stroke-ot elszenvedő betegek plazmájából nyert fibrin alvadékba való α_2 -PI beépülés mértéke között. A kísérletes stroke modellekből származó ismereteink ellenére, meglepő módon az α_2 -PI beépülésének mértékét a fibrin alvadékba AIS-ot elszenvedő, trombolízisen átesett betegcsoportban és a kimenetellel való összefüggésben még nem vizsgálták. Jelen munkánkban bemutattuk, hogy AIS betegekben a tünetek megjelenésétől számítva 4,5 órán belül alacsonyabb mértékű *in vitro* α_2 -PI beépülést találtunk a fibrin alvadékba a súlyosabb stroke-ban szenvedőknél. Az eredményeink azt szemléltetik, hogy szignifikáns negatív összefüggés van a felvételi NIHSS és az α_2 -PI beépülés mértéke között. Ezeket az eredményeket az α_2 -PI jelentős fogyásával magyarázhatjuk a plazmában az akut esemény során. Mivel az α_2 -PI beépülés mértéke limitált (45-50%), így feltételezhetjük, hogy az α_2 -PI azon része, mely beépülhet az alvadékba kevésbé elérhető a súlyosabb stroke-ot elszenvedő betegek plazma mintájában a jelentős *in vivo* fogyás miatt. Régóta ismert, hogy a súlyosabb stroke kevésbé kedvező trombolízis kimenetellel és lízissel szembeni ellenállással társul és ugyanakkor nagyobb esély van a vérzéses komplikációra, de ennek az összefüggésnek a pontos oka még nem tisztázott [137]. Jelen tanulmányban az α_2 -PI *in vitro* beépülése a fibrin alvadékba szignifikánsan alacsonyabb volt azokban a betegekben, akik trombolízis utáni intrakraniális vérzésben szenvedtek, szemben azokkal, akik kedvezőbb

kimenettel rendelkeztek. Összhangban az irodalomban leírtakkal [138, 139], azok a betegek, akik terápiával összefüggő koponyaűri vérzésben szenvedtek a felvételkor szignifikánsan súlyosabb stroke-ot diagnosztizáltak (magasabb NIHSS pontszám). A súlyosabb stroke egy nagyobb méretű trombussal társulhat, több α_2 -PI épül be és így kevésbé lesz fogékony a trombolízisre, de magasabb lesz a vérzéses rizikó. Ezekben az esetekben az α_2 -PI *in vitro* beépülésének kisebb mértéke azt mutathatja, hogy *in vivo* a fibrinolízis egyensúlya a vérzés felé tolódik el a trombus közvetlen környezetében. Az alvadékhoz kötött α_2 -PI kevésbé hozzáférhető és emiatt ezekben az esetekben a t-PA által kiváltott hemosztatikus hatás elleni védelem csökkenhet. A lízis utáni intrakraniális vérzés az rt-PA indukálta trombolízis sajnálatos mellékhatása, illetve a klinikai eredményekre gyakorolt káros hatása ellenére a pontos patomechanizmus kevésbé ismert [137, 140, 141]. A betegek felvételi mintáiból származó kísérleti eredmények, melyek összefüggést mutatnak a későbbi intrakraniális vérzéses eseményekkel hasznosak lehetnek ezen események hátterének megértése érdekében, illetve segíthetnek egy megelőzési stratégiát is kidolgozni, hogy a jövőben elkerülhetőek legyenek a trombolízis terápiával összefüggő koponyaűri vérzések.

Ebben a tanulmányban vizsgáltuk az α_2 -PI heterogenitását befolyásoló sFAP szint és az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus hatását is, de nem tudtunk összefüggést kimutatni ezen tényezők és a klinikai kimenetel között. Más tanulmányokban, az artériás trombólízisben szenvedő (akut koronária szívbetegség, iszkémiás stroke, perifériás artériás betegség) betegekben az sFAP szintek nem különböztek a kontrolloktól [2, 108]. A mi vizsgálatunkban, az sFAP szintek csökkenést mutattak a betegekben a kontrollokhoz viszonyítva, mely összhangban van Uitte de Willige és munkatársai által vizsgált MI betegcsoportban kapott eredménnyel [108], akik 392 MI beteg plazma mintájában határozták meg az sFAP antigén szinteket. Az sFAP értékek az akut esemény után néhány hónappal mutattak csökkenést a kontrollokhoz képest, viszont az idő előre haladtával az sFAP értékek normalizálódtak.

Azt is bemutattuk, hogy az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmusnak nincs hatása a trombolízis terápia kimenetelére és az allél frekvencia sem tért el egymástól a kontroll és a betegcsoportban. Csak kevés tanulmány vizsgálta az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus hatását a trombotikus események kialakulásának kockázatára [2], de ezek a vizsgálatok nem voltak meggyőzőek vagy nem tudták kimutatni az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus hatását az artériás trombólízis kialakulásának kockázatára.

A jövőben jól megtervezett, prospektív tanulmányokra van szükség annak vizsgálatára, hogy ezek a paraméterek hogyan befolyásolják az α_2 -PI heterogenitását és ennek milyen összefüggése van az artériás trombotikus események kialakulásának kockázatára nézve.

Korábbi vizsgálatok, melyek az α_2 -PI és a vénás trombólzis kialakulásának kockázataival foglalkoztak, ahol csak α_2 -PI aktivitás szinteket mértek, nem szolgáltatottak meggyőző eredményeket. Vannak tanulmányok, melyek nem mutattak összefüggést az α_2 -PI szintek és a vénás trombólzis kialakulása között [10, 11], de ez valószínűleg az alacsony esetszámoknak köszönhető. Egy nagyobb tanulmányban (MEGA tanulmány), Meltzer és munkatársai azt találták, hogy az α_2 -PI pozitív összefüggést mutatott az alvadék lízis idővel, de nem találtak összefüggést az α_2 -PI és a VTE rizikó között, miután BMI-re korrigáltak [142]. Az α_2 -PI C-terminálisan módosított formáit csak egy tanulmányban vizsgálták MI-t elszenvedett férfiakban összehasonlítva korban illesztett kontrollcsoporttal [12]. Jelen tanulmányban, mi mind az α_2 -PI aktivitás és az α_2 -PI antigén szinteket meghatároztuk; az α_2 -PI aktivitást kereskedelmi forgalomban kapható aktivitás kit segítségével, míg a totál és a PB- α_2 -PI antigén szinteket a laboratóriumunkban fejlesztett szendvics ELISA technikákkal határoztuk meg [121]. Az NPB- α_2 -PI szinteket a totál és a PB- α_2 -PI antigén eredményekből kalkuláltuk. Ebben a tanulmányban a VTE betegek 13%-kal magasabb átlag α_2 -PI aktivitással, 11,8% -kal magasabb átlag totál α_2 -PI antigén és 41%-kal magasabb átlag NPB- α_2 -PI antigén szintekkel rendelkeztek, összehasonlítva a kontrollokkal, míg a PB- α_2 -PI szintek nem tértek el szignifikánsan a két csoportban (**5 táblázat, 12. ábra**). A kontroll csoportban mért NPB- α_2 -PI antigén százalékos aránya ($34,6 \pm 7,0\%$) megegyezik azzal a 35%-kal, amit korábban publikáltak [113, 143] és szignifikánsan emelkedett ($43,3 \pm 6,5\%$) volt a VTE csoportban. Mindkét csoportban jó korreláció volt megfigyelhető a mért aktivitás és a totál antigén szintek között és a PB- α_2 -PI antigén szintek között egyaránt (**11. ábra**). Az aktivitás eredmények korrelációja az NPB- α_2 -PI antigén értékekkel mérsékelt volt, ami megerősíti azt a feltételezést, hogy az α_2 -PI aktivitás meghatározására szolgáló módszer elsősorban a PB- α_2 -PI szintjét méri, mely az aktívabb, kinetikusan gyorsabb plazmin inhibitor [12, 144]. Uitte de Willige és munkatársai szignifikánsan negatív korrelációt találtak az NPB- α_2 -PI antigén szintek százalékos aránya és az α_2 -PI aktivitás között a MEGA tanulmányon belül 60 kontroll plazmát megvizsgálva [12], azonban mi nem találtunk szignifikáns korrelációt az NPB- α_2 -PI szintek százalékos aránya és az α_2 -PI aktivitás értékek között.

A vaszkuláris megbetegedések kockázati tényezői és az α_2 -PI szintek közötti összefüggés vizsgálatára többszörös lineáris regressziós analízist végeztünk. Az α_2 -PI aktivitás, a totál α_2 -PI és a PB- α_2 -PI antigén szintek független, pozitív összefüggést mutattak a BMI-vel, a totál koleszterin szintekkel, valamint negatív összefüggést mutattak az életkorral (**4.táblázat**). Ez az eredmény összhangban van Meltzer és munkatársai eredményeivel, akik az α_2 -PI aktivitás korrelációját vizsgálták a vaszkuláris rizikó faktorokkal egy 464 férfiból álló

kontrollcsoportban (anamnézisükben nem szerepelt MI) [145]. Ezzel szemben az NPB- α_2 -PI antigén szint nem korrelált a fent említett paraméterekkel, de gyenge összefüggést mutatott a magas vérnyomással és a CRP szintekkel. A gyenge kapcsolat a gyulladás hiányának/alacsony szintjének, vagy a magas vérnyomás ritka előfordulásának köszönhető a kontrollcsoportban. Ez az eredmény felveti annak a lehetőségét, hogy a gyulladással/endothél aktivációval kapcsolatos proteolitikus enzimek lehetnek felelősek az α_2 -PI C-terminális hasításáért.

Az α_2 -PI szintekkel független összefüggést mutató paraméterekre való korrigálást követően az α_2 -PI aktivitás, totál és NPB- α_2 -PI antigén szintek átlagában a szignifikáns különbség megmaradt a VTE betegek és a kontrollok között, valamint a PB- α_2 -PI antigén szint enyhe csökkenése a VTE betegekben statisztikailag szignifikáns eltérést mutatott a kontroll csoporthoz képest (**5.táblázat**). A betegpopulációkban emelkedett α_2 -PI aktivitás, totál α_2 -PI, NPB- α_2 -PI antigén szintek és az emelkedett C-terminális hasítás százalékos aránya (felső harmad vs alsó harmad) függetlenül társul a VTE rizikóval (**7. táblázat**); míg az emelkedett PB- α_2 -PI szintek alacsonyabb VTE rizikót mutattak. A molekula C-terminális vége fontos az α_2 -PI plazminnal való kötődés kezdeti reakciójában [12, 111, 146]. Kluft vizsgálatai alapján az aktivált FXIII elsősorban a C-terminálisan intakt PB- α_2 -PI-t köti keresztbe a fibrin láncokkal [3]. A keresztkötött α_2 -PI megtartja inhibitor aktivitását és a fibrin felszínén is képes gátolni a plazmint, ezáltal védi a fibrint a plazmin általi degradációtól [76, 147]. Azt is leírták, hogy az NPB- α_2 -PI is képes a plazminnal komplexet alkotni, de ez egy nagyon lassú reakció [112, 146]. Így a C-terminális hasításnak jelentős klinikai következményei lehetnek, mivel a plazminogén-kötő szekvenciák eltávolítása erősen befolyásolja az α_2 -PI aktivitását. Az NPB- α_2 -PI fehérjét nem tudták még nagy mennyiségben kitisztítani a plazmából így a fibrinolízisben betöltött szerepét még nem tudták alaposan megvizsgálni. Jelenlegi ismereteink alapján nem tudunk egyértelmű választ adni arra a kérdésre, hogy az NPB- α_2 -PI szint emelkedésének a PB- α_2 -PI szint csökkenése nélkül van-e valamilyen funkcionális következménye, vagy csupán az éppen zajló kóros folyamatok mellékhatása lehet. További vizsgálatok szükségesek a C-terminálisan trunkált α_2 -PI emelkedett koncentrációjának funkcionális következményeinek tisztázására.

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

PI(Trp6)-t, így a Trp6 variáns jelenléte az N-terminális hasítás csökkentésével illetve a fibrinolízis gátlásának csökkentésével jár, ezért védőhatású lehet [2].

Csak kevés tanulmány vizsgálta az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus és az artériás trombólízis közötti kapcsolatot. Előző tanulmányainkban az p.Arg6Trp polimorfizmusnak nem volt szignifikáns hatása koronária-ateroszklerózisos betegekben [13] és AIS betegekben sem [14], de a polimorfizmus jelenléte befolyásolta a trombólízis terápia kimenetelét; a Trp6 allél jelenléte védő hatású volt az iszkémiás elváltozások kialakulása ellen [14]. Egy tanulmány a polimorfizmus és hasi aorta aneurizma (abdominal aortic aneurysm (AAA)) kialakulása közötti összefüggést vizsgálta. Megállapították, hogy a Trp6 hordozók kismértékű, de statisztikailag szignifikáns csökkenést mutattak az AAA kialakulásának kockázatában [148]. A mi tanulmányunk az első, ami vizsgálta az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus hatását vénás tromboembóliát elszenvedett betegekben. Jó egyezést mutatva korábbi vizsgálatok eredményeivel a p.Arg6Trp allél frekvenciája 0,795 / 0,205 volt a teljes vizsgált populációban [12, 87, 144]. A Trp6 allél hordozása és az allél frekvencia nem mutatott különbséget a beteg és a kontroll csoportban (**3.táblázat**) és nem találtunk összefüggést a Trp6 allél jelenléte és a VTE kialakulásának kockázata között (OR: 0,912, 95% CI: 0,617-1,348, p=0,645).

Az sFAP szinteket és az α_2 -PI N-terminális hasítását határozták meg artériás trombólízisban: koronária szívbetegségben (CHD) szenvedő, a AIS-t elszenvedő, vagy perifériás artériás betegségben szenvedő betegekben és kontroll személyekben. Szignifikáns korrelációt találtak az sFAP szint és az N-terminális hasítás között. Az sFAP szint medián értéke hasonló volt az artériás trombólízis elszenvedő betegekben és a kontrollokban [108], habár a CHD betegekben az sFAP szint csökkent az első hónapban az esemény után. Az sFAP szintek és az N-terminális hasítás mértéke között jó korrelációt találtak májcirrózisban szenvedő betegnél [109]. Jelen tanulmányunkban az sFAP antigén szintek gyenge, pozitív korrelációt mutattak a BMI-vel, a FXIII aktivitás értékekkel és gyenge, negatív összefüggést találtunk a fibrinogén szintekkel a kontroll csoportban (**4.táblázat**). Korábban arról is beszámoltak, hogy a hiperlipidémiában szenvedő egyéneknél szignifikánsan emelkedettebb volt az sFAP koncentráció, illetve a férfiakban is szignifikánsan magasabb sFAP szinteket mértek, mint a nőkben [108], azonban mi nem találtunk összefüggést a totál koleszterin szintekkel és nem találtunk szignifikáns különbséget az sFAP szintekben a férfiak és nők között a kontrollcsoportban, de a VTE csoportban a férfiakban magasabb átlag sFAP szinteket mértünk, mint a nőkben (**6.táblázat**). Az sFAP antigén szint medián értéke szignifikánsan megemelkedett a VTE csoportban, azonban a korrigálást követően ez a különbség már nem volt statisztikailag szignifikáns (**5.táblázat**). Azoknál az egyéneknél, akiknél az sFAP szint a

felső harmadba esett, nem volt szignifikánsan magasabb a VTE kialakulásának kockázata (OR: 1,246, 95% CI: 0,793-1,959, p=0,340).

Figyelembe véve, hogy az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmusa jelentősen befolyásolja az α_2 -PI sFAP általi N-terminális hasítását, megvizsgáltuk, hogy kimutatható-e a két paraméter interakciója. Miután a betegséghez társuló egyéb rizikó tényezőket is figyelembe vettük, elsőként tudtuk kimutatni a Trp6 allél védő hatását a vénás trombózis előfordulásával szemben magasabb sFAP szintekkel rendelkező egyéneknél. Az a tény, hogy ki tudtuk mutatni a polimorfizmus védő hatását magas sFAP szint esetén indirekt módon bizonyítja, hogy az sFAP szintje befolyásolja a VTE rizikót. Azonban, a fibrinhez való keresztkötést és annak hatását a fibrinolízisre számos egyéb tényező is befolyásolja, mint pl. az α_2 -PI, a fibrinogén és FXIII plazma szintje, ezen faktorok genetikai polimorfizmusai stb. Ezért a magas sFAP szint VTE rizikót befolyásoló hatásának igazolásához jóval nagyobb esetszámmal és a vizsgált csoportokba történő beválogatás során az egyéb befolyásoló paraméterekre való megfelelő illesztésre lenne szükség.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

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

Megvizsgáltuk a totál, a PB-, és az NPB- α_2 -PI antigén, az α_2 -PI aktivitás, az sFAP antigén szinteket és a p.Arg6Trp polimorfizmus jelenlétét 218 VTE beteg és 218 egészséges kontroll mintájában. A totál és az NPB- α_2 -PI szintek szignifikánsan emelkedettebbek voltak a betegcsoportban, szemben a kontrollokkal, míg a PB- α_2 -PI szintek nem különböztek. A magas NPB- α_2 -PI szintek független emelkedett rizikót mutattak a VTE kialakulásának kockázatára nézve (korrigált OR: 9,868; CI: 4,095-23,783). Az sFAP szintek szignifikánsan magasabbak voltak a betegcsoportban. Sem az emelkedett sFAP, sem az α_2 -PI p.Arg6Trp polimorfizmus önmagában nem volt hatással a VTE rizikóra, de mi ki tudtuk mutatni az emelkedett sFAP szint és a pArg6Trp polimorfizmus közötti interakciót, azaz a magas sFAP szint mellett a Trp6 allél hordozása alacsonyabb VTE rizikóval társult.

8. SUMMARY

α_2 -plasmin inhibitor (α_2 -PI) is the main physiological inhibitor of plasmin, but the efficient inhibition of fibrinolysis is primarily based on α_2 -PI covalently bound to fibrin by XIII (FXIII). It is a heterogeneous protein in the plasma due to N- and C-terminal cleavages that have functional consequences. The plasminogen-binding form (PB- α_2 -PI) is converted to a non-plasminogen-binding form (NPB- α_2 -PI) by C-terminal truncation. Soluble fibroblast activation protein (sFAP) cleaves off a 12 amino acids long N-terminal fragment; the resulting shortened inhibitor is a better substrate for FXIII. The rate of N-terminal cleavage is decreased by p.Arg6Trp polymorphism of α_2 -PI.

In this work we investigated the factors modifying α_2 -PI incorporation into the fibrin clot and whether the extent of incorporation has clinical consequences. We also investigated the heterogeneity of α_2 -PI in venous thromboembolism (VTE) and the effect of the heterogeneity on VTE risk.

Unlike the previously reported results, FXIII levels even at levels above the upper limit of normal increased α_2 -PI incorporation into the fibrin clot.

We measured fibrinogen, FXIII, and sFAP levels, α_2 -PI incorporation, and α_2 -PI p.Arg6Trp polymorphism from samples of 57 acute ischemic stroke patients (AIS) before thrombolysis and 26 healthy controls. There was no significant difference between α_2 -PI incorporation of controls and patients with good outcomes ($49.4 \pm 4.6\%$ vs. $47.4 \pm 6.7\%$, $p = 1.000$), however, in patients suffering post-lysis intracranial haemorrhage the incorporation was significantly lower ($37.3 \pm 14.0\%$, $p = 0.004$). It seems that in the case of intravenous thrombolysis treatment of stroke patients α_2 -PI incorporation shows an association with the outcome of therapy, particularly with intracranial haemorrhage.

We also investigated total, PB- and NPB- α_2 -PI antigen levels, α_2 -PI activity, sFAP antigen levels and p.Arg6Trp polymorphism in 218 patients with VTE patients and 218 healthy controls. Total α_2 -PI and NPB- α_2 -PI levels were significantly elevated in VTE as compared to controls, while PB- α_2 -PI levels did not differ. High NPB- α_2 -PI levels independently increased the risk of VTE (adjusted OR: 9.868; CI: 4.095–23.783). sFAP levels were significantly elevated in the VTE group. Neither elevated sFAP levels nor the α_2 -PI p.Arg6Trp polymorphism alone affected the risk of VTE, however, we could demonstrate an interaction between the polymorphism and high sFAP levels, as in individuals with elevated sFAP levels the carriage of Trp6 allele associated with lower VTE risk.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Aoki, N., Natural inhibitors of fibrinolysis. *Prog Cardiovasc Dis*, 1979. **21**(4): p. 267-86.
2. Abdul, S., et al., Natural heterogeneity of alpha2-antiplasmin: functional and clinical consequences. *Blood*, 2016. **127**(5): p. 538-45.
3. Kluft, C., P. Los, and A.F. Jie, The molecular form of alpha 2-antiplasmin with affinity for plasminogen is selectively bound to fibrin by factor XIII. *Thromb Res*, 1984. **33**(4): p. 419-25.
4. Jansen, J.W., et al., Influence of factor XIIIa activity on human whole blood clot lysis in vitro. *Thromb Haemost*, 1987. **57**(2): p. 171-5.
5. Fraser, S.R., N.A. Booth, and N.J. Mutch, The antifibrinolytic function of factor XIII is exclusively expressed through alpha(2)-antiplasmin cross-linking. *Blood*, 2011. **117**(23): p. 6371-4.
6. Reed, G.L., 3rd, G.R. Matsueda, and E. Haber, Inhibition of clot-bound alpha 2-antiplasmin enhances in vivo thrombolysis. *Circulation*, 1990. **82**(1): p. 164-8.
7. Singh, S., A. Houg, and G.L. Reed, Releasing the Brakes on the Fibrinolytic System in Pulmonary Emboli: Unique Effects of Plasminogen Activation and alpha2-Antiplasmin Inactivation. *Circulation*, 2017. **135**(11): p. 1011-1020.
8. Houg, A.K., D. Wang, and G.L. Reed, Reversing the deleterious effects of alpha2-antiplasmin on tissue plasminogen activator therapy improves outcomes in experimental ischemic stroke. *Exp Neurol*, 2014. **255**: p. 56-62.
9. Reed, G.L., et al., alpha2-Antiplasmin: New Insights and Opportunities for Ischemic Stroke. *Semin Thromb Hemost*, 2017. **43**(2): p. 191-199.
10. Mellbring, G., et al., Fibrinolytic activity in plasma and deep vein thrombosis after major abdominal surgery. *Thromb Res*, 1983. **32**(6): p. 575-84.
11. Paramo, J.A., M.J. Alfaro, and E. Rocha, Postoperative changes in the plasmatic levels of tissue-type plasminogen activator and its fast-acting inhibitor--relationship to deep vein thrombosis and influence of prophylaxis. *Thromb Haemost*, 1985. **54**(3): p. 713-6.
12. Uitte de Willige, S., et al., Proteolytic and genetic variation of the alpha-2-antiplasmin C-terminus in myocardial infarction. *Blood*, 2011. **117**(24): p. 6694-701.
13. Katona, E., et al., The effect of alpha-2 plasmin inhibitor Arg6Trp polymorphism on the risk of coronary artery disease. *J Thromb Haemost*, 2015. **13**: p. 342-343.

14. Bagoly, Z., et al., The effect of factor XIII and other regulators of fibrinolysis on the outcome of thrombolysis in ischemic stroke patients. *J Thromb Haemost*, 2013. **11**: p. 405-406.
15. Day, I.S.C.f.W.T., Thrombosis: a major contributor to the global disease burden. *J Thromb Haemost*, 2014. **12**(10): p. 1580-90.
16. Byrnes, J.R. and A.S. Wolberg, Newly-Recognized Roles of Factor XIII in Thrombosis. *Semin Thromb Hemost*, 2016. **42**(4): p. 445-54.
17. Heit, J.A., F.A. Spencer, and R.H. White, The epidemiology of venous thromboembolism. *J Thromb Thrombolysis*, 2016. **41**(1): p. 3-14.
18. Ageno, W., et al., Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism: a meta-analysis. *Circulation*, 2008. **117**(1): p. 93-102.
19. Crous-Bou, M., L.B. Harrington, and C. Kabrhel, Environmental and Genetic Risk Factors Associated with Venous Thromboembolism. *Semin Thromb Hemost*, 2016. **42**(8): p. 808-820.
20. Rosendaal, F.R., Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2005: p. 1-12.
21. Heit, J.A., et al., Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Arch Intern Med*, 2000. **160**(6): p. 809-15.
22. Cushman, M., et al., Fibrin fragment D-dimer and the risk of future venous thrombosis. *Blood*, 2003. **101**(4): p. 1243-8.
23. Smeeth, L., et al., Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting. *Lancet*, 2006. **367**(9516): p. 1075-1079.
24. Sweetland, S., et al., Duration and magnitude of the postoperative risk of venous thromboembolism in middle aged women: prospective cohort study. *BMJ*, 2009. **339**: p. b4583.
25. Barsoum, M.K., et al., Is progestin an independent risk factor for incident venous thromboembolism? A population-based case-control study. *Thromb Res*, 2010. **126**(5): p. 373-8.
26. Roach, R.E., et al., Increased risk of CVD after VT is determined by common etiologic factors. *Blood*, 2013. **121**(24): p. 4948-54.
27. Deguchi, H., et al., High-density lipoprotein deficiency and dyslipoproteinemia associated with venous thrombosis in men. *Circulation*, 2005. **112**(6): p. 893-9.
28. Doggen, C.J., et al., Serum lipid levels and the risk of venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(10): p. 1970-5.

29. Rosendaal, F.R., Thrombosis in the young: epidemiology and risk factors. A focus on venous thrombosis. *Thromb Haemost*, 1997. **78**(1): p. 1-6.
30. Oger, E., Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d'Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale. *Thromb Haemost*, 2000. **83**(5): p. 657-60.
31. Silverstein, M.D., et al., Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Arch Intern Med*, 1998. **158**(6): p. 585-93.
32. Luxembourg, B., et al., Intrinsic clotting factors in dependency of age, sex, body mass index, and oral contraceptives: definition and risk of elevated clotting factor levels. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2009. **20**(7): p. 524-34.
33. Roach, R.E., et al., Sex difference in risk of second but not of first venous thrombosis: paradox explained. *Circulation*, 2014. **129**(1): p. 51-6.
34. Borch, K.H., et al., Physical activity and risk of venous thromboembolism. The Tromso study. *Haematologica*, 2010. **95**(12): p. 2088-94.
35. Rosendaal, F.R. and P.H. Reitsma, Genetics of venous thrombosis. *J Thromb Haemost*, 2009. **7 Suppl 1**: p. 301-4.
36. Gohil, R., G. Peck, and P. Sharma, The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving approximately 120,000 cases and 180,000 controls. *Thromb Haemost*, 2009. **102**(2): p. 360-70.
37. Sacco, R.L., et al., An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 2013. **44**(7): p. 2064-89.
38. Lozano, R., et al., Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 2012. **380**(9859): p. 2095-128.
39. Szocs, I., D. Bereczki, and E. Belicza, [Results of stroke care in Hungary in the frame of international comparison]. *Orv Hetil*, 2016. **157**(41): p. 1635-1641.
40. KSH, Halálózások a gyakoribb halálokok szerint (1990–)
http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_wnh001.html?lang=hu. 2020.
41. Stoll, G., C. Kleinschnitz, and B. Nieswandt, Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment. *Blood*, 2008. **112**(9): p. 3555-62.

42. Hankey, G.J., Stroke. *Lancet*, 2017. **389**(10069): p. 641-654.
43. National Institute of Neurological, D. and P.A.S.S.G. Stroke rt, Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 1995. **333**(24): p. 1581-7.
44. Medcalf, R.L., Fibrinolysis: from blood to the brain. *J Thromb Haemost*, 2017. **15**(11): p. 2089-2098.
45. Ruggeri, Z.M. and G.L. Mendolicchio, Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res*, 2007. **100**(12): p. 1673-85.
46. Phipps, M.S. and C.A. Cronin, Management of acute ischemic stroke. *BMJ*, 2020. **368**: p. 16983.
47. Hacke, W., et al., Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 2008. **359**(13): p. 1317-29.
48. Seet, R.C. and A.A. Rabinstein, Symptomatic intracranial hemorrhage following intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke: a critical review of case definitions. *Cerebrovasc Dis*, 2012. **34**(2): p. 106-14.
49. Miller, D.J., J.R. Simpson, and B. Silver, Safety of thrombolysis in acute ischemic stroke: a review of complications, risk factors, and newer technologies. *Neurohospitalist*, 2011. **1**(3): p. 138-47.
50. Arboix, A., Cardiovascular risk factors for acute stroke: Risk profiles in the different subtypes of ischemic stroke. *World J Clin Cases*, 2015. **3**(5): p. 418-29.
51. Balami, J.S., et al., The exact science of stroke thrombolysis and the quiet art of patient selection. *Brain*, 2013. **136**(Pt 12): p. 3528-53.
52. Wiman, B. and A. Hamsten, The fibrinolytic enzyme system and its role in the etiology of thromboembolic disease. *Semin Thromb Hemost*, 1990. **16**(3): p. 207-16.
53. Rijken, D.C. and H.R. Lijnen, New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost*, 2009. **7**(1): p. 4-13.
54. Rijken, D.C., G. Wijngaards, and J. Welbergen, Immunological characterization of plasminogen activator activities in human tissues and body fluids. *J Lab Clin Med*, 1981. **97**(4): p. 477-86.
55. Rijken, D.C. and S. Uitte de Willige, Inhibition of Fibrinolysis by Coagulation Factor XIII. *Biomed Res Int*, 2017. **2017**: p. 1209676.
56. Medved L, N.W., Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb Haemost*, 2003. **89**(3): p. 409-19.

57. Doolittle, R.F. and L. Pandi, Binding of synthetic B knobs to fibrinogen changes the character of fibrin and inhibits its ability to activate tissue plasminogen activator and its destruction by plasmin. *Biochemistry*, 2006. **45**(8): p. 2657-67.
58. Forsgren, M., et al., Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen. *FEBS Lett*, 1987. **213**(2): p. 254-60.
59. Declerck, P.J. and A. Gils, Three decades of research on plasminogen activator inhibitor-1: a multifaceted serpin. *Semin Thromb Hemost*, 2013. **39**(4): p. 356-64.
60. Medcalf, R.L. and S.J. Stasinopoulos, The undecided serpin. The ins and outs of plasminogen activator inhibitor type 2. *FEBS J*, 2005. **272**(19): p. 4858-67.
61. Ganrot, P.O., Inhibition of plasmin activity by alpha-2-macroglobulin. *Clin Chim Acta*, 1967. **16**(2): p. 328-9.
62. Muszbek, L., et al., Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev*, 2011. **91**(3): p. 931-72.
63. Komaromi, I., Z. Bagoly, and L. Muszbek, Factor XIII: novel structural and functional aspects. *J Thromb Haemost*, 2011. **9**(1): p. 9-20.
64. Kimura, S. and N. Aoki, Cross-linking site in fibrinogen for alpha 2-plasmin inhibitor. *J Biol Chem*, 1986. **261**(33): p. 15591-5.
65. Sakata, Y. and N. Aoki, Cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *J Clin Invest*, 1980. **65**(2): p. 290-7.
66. Harpel, P.C. and R.D. Rosenberg, Alpha 2-macroglobulin and antithrombin-heparin cofactor: modulators of hemostatic and inflammatory reactions. *Alpha 2-macroglobulin. Prog Hemost Thromb*, 1976. **3**: p. 145-89.
67. Collen, D., C. De, and M. Verstraete, Immunochemical distinction between antiplasmin and alpha-antitrypsin. *Thromb Res*, 1975. **7**(1): p. 245-9.
68. Mullertz, S. and I. Clemmensen, The primary inhibitor of plasmin in human plasma. *Biochem J*, 1976. **159**(3): p. 545-53.
69. Moroi, M. and N. Aoki, Isolation and characterization of alpha2-plasmin inhibitor from human plasma. A novel proteinase inhibitor which inhibits activator-induced clot lysis. *J Biol Chem*, 1976. **251**(19): p. 5956-65.
70. Lijnen, H.R., et al., Amino-acid sequence of human alpha 2-antiplasmin. *Eur J Biochem*, 1987. **166**(3): p. 565-74.
71. Larkin, M.A., et al., Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 2007. **23**(21): p. 2947-8.

72. Hirosawa, S., et al., Organization of the human alpha 2-plasmin inhibitor gene. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(18): p. 6836-40.
73. Wiman, B. and D. Collen, Purification and characterization of human antiplasmin, the fast-acting plasmin inhibitor in plasma. Eur J Biochem, 1977. **78**(1): p. 19-26.
74. Bangert, K., et al., Different N-terminal forms of alpha 2-plasmin inhibitor in human plasma. Biochem J, 1993. **291** (Pt 2): p. 623-5.
75. Hortin, G., et al., Sulfation of a tyrosine residue in the plasmin-binding domain of alpha 2-antiplasmin. J Biol Chem, 1987. **262**(7): p. 3082-5.
76. Wiman, B. and D. Collen, On the mechanism of the reaction between human alpha 2-antiplasmin and plasmin. J Biol Chem, 1979. **254**(18): p. 9291-7.
77. Collen, D. and B. Wiman, Turnover of antiplasmin, the fast-acting plasmin inhibitor of plasma. Blood, 1979. **53**(2): p. 313-24.
78. Wiman, B., H.R. Lijnen, and D. Collen, On the specific interaction between the lysine-binding sites in plasmin and complementary sites in alpha2-antiplasmin and in fibrinogen. Biochim Biophys Acta, 1979. **579**(1): p. 142-54.
79. Collen, D., et al., Metabolism of plasminogen in healthy subjects: effect of tranexamic acid. J Clin Invest, 1972. **51**(6): p. 1310-8.
80. Sumi, Y., et al., Structure of the carboxyl-terminal half of human alpha 2-plasmin inhibitor deduced from that of cDNA. J Biochem, 1986. **100**(5): p. 1399-402.
81. Collen, D., Identification and some properties of a new fast-reacting plasmin inhibitor in human plasma. Eur J Biochem, 1976. **69**(1): p. 209-16.
82. Koyama, T., et al., Different NH₂-terminal form with 12 additional residues of alpha 2-plasmin inhibitor from human plasma and culture media of Hep G2 cells. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **200**(1): p. 417-22.
83. Sumi, Y., et al., Expression and characterization of pro alpha 2-plasmin inhibitor. J Biochem, 1989. **106**(4): p. 703-7.
84. Holmes, W.E., et al., Primary structure of human alpha 2-antiplasmin, a serine protease inhibitor (serpin). J Biol Chem, 1987. **262**(4): p. 1659-64.
85. Tone, M., et al., Structure of human alpha 2-plasmin inhibitor deduced from the cDNA sequence. J Biochem, 1987. **102**(5): p. 1033-41.
86. Lee, K.N., et al., A novel plasma proteinase potentiates alpha2-antiplasmin inhibition of fibrin digestion. Blood, 2004. **103**(10): p. 3783-8.
87. Christiansen, V.J., et al., The effect of a single nucleotide polymorphism on human alpha 2-antiplasmin activity. Blood, 2007. **109**(12): p. 5286-92.

88. Lee, K.N., et al., Why alpha-antiplasmin must be converted to a derivative form for optimal function. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(10): p. 2095-104.
89. Gorrell, M.D., Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clin Sci (Lond)*, 2005. **108**(4): p. 277-92.
90. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 1995. **333**(24): p. 1581-7.
91. Edosada, C.Y., et al., Peptide substrate profiling defines fibroblast activation protein as an endopeptidase of strict Gly(2)-Pro(1)-cleaving specificity. *FEBS Lett*, 2006. **580**(6): p. 1581-6.
92. Yu, D.M., et al., The dipeptidyl peptidase IV family in cancer and cell biology. *FEBS J*, 2010. **277**(5): p. 1126-44.
93. Hamson, E.J., et al., Understanding fibroblast activation protein (FAP): substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy. *Proteomics Clin Appl*, 2014. **8**(5-6): p. 454-63.
94. Lee, K.N., et al., Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. *Blood*, 2006. **107**(4): p. 1397-404.
95. Aggarwal, S., et al., Fibroblast activation protein peptide substrates identified from human collagen I derived gelatin cleavage sites. *Biochemistry*, 2008. **47**(3): p. 1076-86.
96. Scanlan, M.J., et al., Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(12): p. 5657-61.
97. Bhati, R., et al., Molecular characterization of human breast tumor vascular cells. *Am J Pathol*, 2008. **172**(5): p. 1381-90.
98. Chen, D., et al., Activation of EDTA-resistant gelatinases in malignant human tumors. *Cancer Res*, 2006. **66**(20): p. 9977-85.
99. Cohen, S.J., et al., Fibroblast activation protein and its relationship to clinical outcome in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*, 2008. **37**(2): p. 154-8.
100. Ge, Y., et al., Fibroblast activation protein (FAP) is upregulated in myelomatous bone and supports myeloma cell survival. *Br J Haematol*, 2006. **133**(1): p. 83-92.
101. Iwasa, S., et al., Increased expression of seprase, a membrane-type serine protease, is associated with lymph node metastasis in human colorectal cancer. *Cancer Lett*, 2003. **199**(1): p. 91-8.

102. Koperek, O., et al., Molecular characterization of the desmoplastic tumor stroma in medullary thyroid carcinoma. *Int J Oncol*, 2007. **31**(1): p. 59-67.
103. Mori, Y., et al., The expression of a type II transmembrane serine protease (Seprase) in human gastric carcinoma. *Oncology*, 2004. **67**(5-6): p. 411-9.
104. Narra, K., et al., Phase II trial of single agent Val-boroPro (Talabostat) inhibiting Fibroblast Activation Protein in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*, 2007. **6**(11): p. 1691-9.
105. Okada, K., et al., Seprase, a membrane-type serine protease, has different expression patterns in intestinal- and diffuse-type gastric cancer. *Oncology*, 2003. **65**(4): p. 363-70.
106. Zhang, M.Z., et al., Expression of seprase in effusions from patients with epithelial ovarian carcinoma. *Chin Med J (Engl)*, 2007. **120**(8): p. 663-8.
107. Tillmanns, J., et al., Circulating concentrations of fibroblast activation protein alpha in apparently healthy individuals and patients with acute coronary syndrome as assessed by sandwich ELISA. *Int J Cardiol*, 2013. **168**(4): p. 3926-31.
108. Uitte de Willige, S., et al., Plasma levels of soluble fibroblast activation protein in arterial thrombosis: determinants and cleavage of its substrate alpha-2-antiplasmin. *Int J Cardiol*, 2015. **178**: p. 105-10.
109. Uitte de Willige, S., et al., Increased N-terminal cleavage of alpha-2-antiplasmin in patients with liver cirrhosis. *J Thromb Haemost*, 2013. **11**(11): p. 2029-36.
110. Wiman, B., Affinity-chromatographic purification of human alpha 2-antiplasmin. *Biochem J*, 1980. **191**(1): p. 229-32.
111. Wiman, B., T. Nilsson, and B. Cedergren, Studies on a form of alpha 2-antiplasmin in plasma which does not interact with the lysine-binding sites in plasminogen. *Thromb Res*, 1982. **28**(2): p. 193-9.
112. Abdul, S., et al., On the localization of the cleavage site in human alpha-2-antiplasmin, involved in the generation of the non-plasminogen binding form. *J Thromb Haemost*, 2020. **18**(5): p. 1162-1170.
113. Kluft, C., et al., The mutual relationship between the two molecular forms of the major fibrinolysis inhibitor alpha-2-antiplasmin in blood. *Blood*, 1986. **67**(3): p. 616-22.
114. Kolev, K., et al., Regulation of fibrinolytic activity of neutrophil leukocyte elastase, plasmin, and miniplasmin by plasma protease inhibitors. *J Biol Chem*, 1994. **269**(25): p. 17030-4.

115. Lijnen, H.R., B. Van Hoef, and D. Collen, Inactivation of the serpin alpha(2)-antiplasmin by stromelysin-1. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1547**(2): p. 206-13.
116. Leebeek FW, L.P., Kluft C., A monoclonal antibody against the COOH-terminal site of alpha2-antiplasmin reveals heterogeneity in the non-plasminogen binding form of alpha2-antiplasmin. *Fibrinolysis*, 1996. **10**(Suppl 2): p. 67-70.
117. Hortin, G.L., B.L. Gibson, and K.F. Fok, Alpha 2-antiplasmin's carboxy-terminal lysine residue is a major site of interaction with plasmin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988. **155**(2): p. 591-6.
118. Lu, B.G., et al., Contribution of Conserved Lysine Residues in the {alpha}2-Antiplasmin C Terminus to Plasmin Binding and Inhibition. *J Biol Chem*. **286**(28): p. 24544-52.
119. Wang, H., et al., Identification of amino acids in antiplasmin involved in its noncovalent 'lysine-binding-site'-dependent interaction with plasmin. *Eur J Biochem*, 2003. **270**(9): p. 2023-9.
120. Takada, Y., X. Ye, and S. Simon, The integrins. *Genome Biol*, 2007. **8**(5): p. 215.
121. Teraz-Orosz, A., et al., A new ELISA method for the measurement of total alpha2-plasmin inhibitor level in human body fluids. *J Immunol Methods*, 2019. **471**: p. 27-33.
122. Lorand, L., R.B. Credo, and T.J. Janus, Factor XIII (fibrin-stabilizing factor). *Methods Enzymol*, 1981. **80 Pt C**: p. 333-41.
123. European Stroke Organisation Executive, C. and E.S.O.W. Committee, Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *Cerebrovasc Dis*, 2008. **25**(5): p. 457-507.
124. Szekely, E.G., et al., Low factor XIII levels after intravenous thrombolysis predict short-term mortality in ischemic stroke patients. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 7662.
125. Simonsen, C.Z., et al., Early neurological deterioration after thrombolysis: Clinical and imaging predictors. *Int J Stroke*, 2016. **11**(7): p. 776-82.
126. Toth, N.K., et al., Elevated Factor VIII and von Willebrand Factor Levels Predict Unfavorable Outcome in Stroke Patients Treated with Intravenous Thrombolysis. *Front Neurol*, 2017. **8**: p. 721.
127. Konstantinides, S.V., 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur Heart J*, 2014. **35**(45): p. 3145-6.
128. Katona, E., et al., A simple, quick one-step ELISA assay for the determination of complex plasma factor XIII (A2B2). *Thromb Haemost*, 2000. **83**(2): p. 268-73.

129. Mezei, Z.A., et al., Factor XIII levels and factor XIII B subunit polymorphisms in patients with venous thromboembolism. *Thromb Res*, 2017. **158**: p. 93-97.
130. Tamaki, T. and N. Aoki, Cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor and fibronectin to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *Biochim Biophys Acta*, 1981. **661**(2): p. 280-6.
131. Tsurupa, G., et al., Noncovalent interaction of alpha(2)-antiplasmin with fibrin(ogen): localization of alpha(2)-antiplasmin-binding sites. *Biochemistry*. **49**(35): p. 7643-51.
132. Hacke, W., et al., Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA*, 1995. **274**(13): p. 1017-25.
133. Bagoly, Z., et al., Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thromb Res*, 2012. **129**(3): p. 382-7.
134. Bereczky, Z., et al., Elevated factor XIII level and the risk of myocardial infarction in women. *Haematologica*, 2007. **92**(2): p. 287-8.
135. Guimaraes, A.H., et al., Hypofibrinolysis is a risk factor for arterial thrombosis at young age. *Br J Haematol*, 2009. **145**(1): p. 115-20.
136. Meltzer, M.E., et al., The impact of the fibrinolytic system on the risk of venous and arterial thrombosis. *Semin Thromb Hemost*, 2009. **35**(5): p. 468-77.
137. Jensen, M., et al., Clinical Characteristics and Outcome of Patients With Hemorrhagic Transformation After Intravenous Thrombolysis in the WAKE-UP Trial. *Front Neurol*, 2020. **11**: p. 957.
138. Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. The NINDS t-PA Stroke Study Group. *Stroke*, 1997. **28**(11): p. 2109-18.
139. Whiteley, W.N., et al., Risk of intracerebral haemorrhage with alteplase after acute ischaemic stroke: a secondary analysis of an individual patient data meta-analysis. *Lancet Neurol*, 2016. **15**(9): p. 925-933.
140. Bagoly, Z., et al., Markers of Coagulation and Fibrinolysis Predicting the Outcome of Acute Ischemic Stroke Thrombolysis Treatment: A Review of the Literature. *Front Neurol*, 2019. **10**: p. 513.
141. Yaghi, S., A. Eisenberger, and J.Z. Willey, Symptomatic intracerebral hemorrhage in acute ischemic stroke after thrombolysis with intravenous recombinant tissue plasminogen activator: a review of natural history and treatment. *JAMA Neurol*, 2014. **71**(9): p. 1181-5.

142. Meltzer, M.E., et al., Venous thrombosis risk associated with plasma hypofibrinolysis is explained by elevated plasma levels of TAFI and PAI-1. *Blood*, 2010. **116**(1): p. 113-21.
143. Sasaki, T., T. Morita, and S. Iwanaga, Identification of the plasminogen-binding site of human alpha 2-plasmin inhibitor. *J Biochem*, 1986. **99**(6): p. 1699-705.
144. Clemmensen, I., et al., Properties of three different molecular forms of the alpha 2 plasmin inhibitor. *Eur J Biochem*, 1981. **120**(1): p. 105-12.
145. Meltzer, M.E., et al., Plasma levels of fibrinolytic proteins and the risk of myocardial infarction in men. *Blood*. **116**(4): p. 529-36.
146. Christensen, U. and I. Clemmensen, Purification and reaction mechanisms of the primary inhibitor of plasmin from human plasma. *Biochem J*, 1978. **175**(2): p. 635-41.
147. Sakata, Y. and N. Aoki, Significance of cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin in inhibition of fibrinolysis and in hemostasis. *J Clin Invest*, 1982. **69**(3): p. 536-42.
148. Bridge, K.I., et al., The alpha-2-antiplasmin Arg407Lys polymorphism is associated with abdominal aortic aneurysm. *Thromb Res*, 2014. **134**(3): p. 723-8.

TÁRGYSZAVAK

alpha2-plazmin inhibitor

vénás tromboembólia

akut iszkémiás stroke

trombolízis

fibrin alvadék

alfa2-plazmin inhibitor beépülés

XIII-as faktor

plazminogén-kötő alpha2-plazmin inhibitor

nem-plazminogén-kötő alpha2-plazmin inhibitor

szolubilis fibroblaszt aktiváló protein

KEYWORDS

alpha2-plasmin inhibitor

venous thromboembolism

acute ischemic stroke

trombolysis

fibrin clot

incorporation of alpha2-plasmin inhibitor

Factor XIII

plasminogen-bind alpha2-plasmin inhibitor

non-plasminogen-bind alpha2-plasmin inhibitor

soluble fibroblast activation protein

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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

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

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

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

Köszönettel tartozom TDK hallgatóimnak a közös munkáért és a támogatásért.

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

Munkámat szeretett Szüleimnek ajánlom!

A kutatómunkát támogató pályázatok:

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

FÜGGELÉK

Megjelent publikációk és kéziratok gyűjteménye



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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

Jelölt: Baráth Barbara
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





További közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,778

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

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

Debrecen, 2021.08.12.

