

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**A FXIII AKTIVITÁSA, ANTIGÉN SZINTJE ÉS A FXIII-A VAL34LEU  
POLIMORFIZMUSA CORONARIA BETEGSÉGBEN**

**Dr. Bereczky Zsuzsanna**

**Témavezető: Prof. Muszbek László  
Programvezető: Prof. Muszbek László**

**DEBRECENI EGYETEM  
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM  
KLINIKAI KUTATÓ KÖZPONT  
DEBRECEN, 2007**

## BEVEZETÉS

A véralvadás XIII-as faktora (FXIII) egy tetramer struktúrájú ( $A_2B_2$ ) protranszglutamináz. A tetramer két potenciálisan aktív "A" alegységet (FXIII-A) és két gátló illetve hordozó "B" alegységet (FXIII-B) tartalmaz. A FXIII-A csontvelői eredetű, míg a FXIII-B-t a hepatocyták termelik, a két alegység a plazmában alkot komplexet. A plazmában a FXIII-A kizárólag a komplexben fordul elő, míg a FXIII-B a komplexen kívül, szabadon is megtalálható, ez a teljes mennyiségének kb. 50%-a. A FXIII komplex (továbbiakban FXIII) átlagos plazma koncentrációja 21 mg/L. A celluláris forma FXIII-B-t nem tartalmaz, a sejtekben (thrombocytá, monocytá és macrophag) csak mint  $A_2$  dimer fordul elő. A FXIII-A proteint egy aktivációs peptid (1-37 aminosavak), egy  $\beta$ -szendvics (38-184 aminosavak), a katalitikus, ún. "core" domén (185-515 aminosavak) és két hordó domén (516-628 és 629-730 aminosavak) építik fel. A FXIII-A génje a 6p24-25 régióban helyezkedik el, 15 exonból és 14 intronból áll. Az aktivációs peptidet a II. exon kódolja. A FXIII-B mozaik fehérje, 10 "szusi" domén építi fel, melyekben egyenként két-két diszulfid híd biztosítja a megfelelő struktúra kialakulását. A FXIII-B génje az 1q31-32 régióban található.

A FXIII  $Ca^{2+}$  jelenlétében, a trombin proteolitikus hatására alakul aktív transzglutaminázzá (FXIIIa). A trombin lehasítja a 37 aminosavból álló aktivációs peptidet a FXIII-A-ról, majd  $Ca^{2+}$  jelenlétében a FXIII-B disszociál, és kialakul az enzimatikusan aktív FXIII-A\*. Fibrin jelenlétében ez a folyamat jelentősen felgyorsul. Az aktív transzglutamináz acil-transzfer reakciót katalizál. Első lépésként egy peptid kötésben lévő glutamin reziduum tioacil intermediert alkot a FXIIIa aktív centrumában elhelyezkedő Cys314-gyel, miközben ammónia szabadul fel. Amennyiben primer amin szubsztrát nincsen jelen, a tioacil intermedier hidrolizál és a peptid-kötött glutamin deamidálódik. Primer amin szubsztrát jelenlétében az acil csoport a primer amin szubsztrátra helyeződik át és az amin izopeptid kötéssel a glutamil oldallánchoz kapcsolódik. Amennyiben a szubsztrát amin egy peptid kötésben lévő lizin  $\epsilon$ -aminocsoportja,  $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})\text{lizil}$  képződik és a peptid láncok kovalens kötéssel összekapcsolódnak. A FXIII a koaguláció utolsó fázisában játszik fontos szerepet, fő funkciója a normál hemosztázisban a képződő fibrin láncok kovalens keresztbe kötése, valamint a fibrinolízis szabályozásában részt vevő proteinek fibrin háléhoz történő kapcsolása. A fibrinháló FXIIIa által történő kereszt-kötése növeli annak mechanikai stabilitását, valamint ellenállóbbá teszi a fibrinolízissel szemben. A FXIIIa a fibrin  $\gamma$ - és  $\alpha$ -láncait köti keresztbe, így a

keletkezett termékek  $\gamma$ -lánc dimerek és nagy molekulatömegű  $\alpha$ -lánc polimerek. A  $\gamma$ -lánc dimerek kialakulása igen gyors folyamat, kis mennyiségű FXIIIa-t igényel és gyakorlatilag a fibrinopeptid A fibrinogénről történő lehasadása után azonnal elkezdődik. Az  $\alpha$ -láncok többszörös keresztkötése számos acil donor és acil akceptor között jóval lassabb folyamat. A  $\gamma$ -lánc dimerek és  $\alpha$ -lánc polimerek mellett jóval kisebb mennyiségben, de keletkeznek  $\gamma$ - $\alpha$  lánc heterodimerek és  $\gamma$ -lánc trimerek/tetramerek is. Tekintettel arra, hogy az  $\alpha_2$ -plazmin inhibitor kiváló acil donor szubsztrát, a FXIIIa képes keresztkötéssel a fibrin, vagy fibrinogén  $\alpha$ -láncához kapcsolni. Mind a fibrin keresztkötésnek, mind az  $\alpha_2$ -plazmin inhibitor fibrinhez történő kötésének fontos szerepe van a fibrinolízis elleni védelemben. Amennyiben a FXIIIa aktivitását gátoljuk, a fibrinháló plazmin általi degradációja jelentősen fokozódik. Az  $\alpha_2$ -plazmin inhibitor fibrinhez kapcsolódása már a fibrin képződés korai időszakában megtörténik, ezáltal védve az újonnan képződött fibrint a degradációtól, míg az érett thrombus fibrinolízissel szemben tanúsított rezisztenciájáért inkább a fibrin  $\alpha$ -lánc keresztkötések felelősek. Az  $\alpha_2$ -plazmin inhibitor mellett a FXIIIa egyéb, a fibrinolitikus rendszerhez tartozó fehérjét is képes a fibrinhez kötni. A plazminogén és a trombin aktiválta fibrinolízis inhibitor (TAFI) fibrinhez történő kapcsolódásának fiziológias szerepe egyelőre nem ismert. A 2-es típusú plazminogén aktivátor inhibitor (PAI-2) fibrinhez történő kapcsolódás után is megőrzi aktivitását. A terhességtől eltekintve ez a fehérje nem található meg a plazmában, de az alvadékba inkorporálódott monocyták szekretálhatják. A PAI-2 fibrinhez való kapcsolódása feltehetően az urokináz típusú plazminogén aktivátor elleni védelemben játszik szerepet.

A FXIII-A génje meglehetősen polimorf, a kódoló régióban 5 gyakori polimorfizmust írtak le. Ezek közül a Val34Leu polimorfizmus a legkiterjedtebben tanulmányozott, ugyanis thrombo-protéktív hatását feltételezték (lásd később). A polimorfizmus a 2. exonban található, a fehérjében az aktivációs peptidben van, mindössze 3 aminosav távolságra a trombin hasítási helytől. A Leu allél frekvenciája a kaukázusi populációban meglehetősen szűk tartományban változik (24,5-28,8%), a magyar általános populáció vizsgálata egy viszonylag kisebb számú csoport intézetünkben történt vizsgálatától eltekintve korábban nem történt meg. A polimorfizmus biokémiai következményeit számos tanulmány vizsgálta. Mivel a mutáció helye igen közel van a trombin hasítási helyhez, ezért feltételezhető volt, hogy a FXIII trombin általi aktivációját befolyásolja. A Leu34 variáns esetében az aktivációs peptid felszabadulása 2,5-szer gyorsabban történik mint a Val34 variáns

esetében és ez a hatás független a fibrinogén szinttől, bár ismert, hogy a fibrinogén maga is fokozza a katalitikus hatékonyságot. A gyorsabb aktiválódás következtében a Leu34 variáns gyorsabb fibrin  $\gamma$ -és  $\alpha$ -lánc keresztkötéseket és gyorsabb  $\alpha_2$ -plazmin inhibitor-fibrin kötést eredményez. Ezek mellett azt is kimutatták, hogy a Val34Leu polimorfizmus befolyásolja a kialakult fibrin struktúráját. A Leu34 variáns által keresztkötött fibrin finomabb szerkezetű, vékonyabb rostokból és kisebb pórusokból áll, mint a Val34 által keresztkötött. Bár a trombin által történő aktiválódás az egyes genotípusok esetén különbségeket mutat, adekvát módszert (lásd később) és megfelelő inkubációs időt alkalmazva az egyes genotípusok transzglutamináz aktivitása normál egyéneknél nem különbözik.

A FXIII aktivitás, FXIII antigén koncentráció és a coronaria sclerosis (CS)/myocardialis infarctus (MI) összefüggéséről az elmúlt időszakban több közlés született. Az eredmények értékelését azonban jelentősen megnehezíti az, hogy a FXIII aktivitásának meghatározására alkalmazott módszerek meglehetősen heterogének és nem minden esetben ugyanazt a tulajdonságát mérik a FXIII-nak. Ezért a korábbi tanulmányok eredményeinek ismertetése előtt szükséges a FXIII aktivitás/antigén meghatározására szolgáló módszerek rövid áttekintése. Legkorábban a fibrin alvadék koncentrált ureában, vagy monoklór ecetsavban történő oldékonyságát vizsgálva vontak le következtetéseket a FXIII aktivitására vonatkozóan. Ez a módszer azonban nem standardizált, nem ad kvantitatív eredményt és csak az igen súlyos (1% alatti) FXIII deficienciát ismeri fel. Ez a módszer ma már szűrő módszerként sem ajánlható. A ma alkalmazott funkcionális tesztek közös tulajdonsága, hogy a FXIII-t trombinnal és  $\text{Ca}^{2+}$ -mal aktiválják, majd a FXIIIa transzglutamináz aktivitását kvantitatívan meghatározzák. A transzglutamináz aktivitás meghatározása alapvetően két módszerrel történhet: 1. a transzglutamináz reakció első lépésében felszabaduló ammónia detektálásával, vagy 2. protein szubsztráthoz keresztkötött kis molekula tömegű aminok vizsgálatával.

1. Az ammónia detektálását ma egy NADP(H) dependens glutamát dehidrogenáz (GIDH) indikátor reakcióval végzik. Saját laboratóriumunkban kifejlesztett kinetikus spektrofotometriás assay-ben egy NADPH molekula NADP-vé alakulása felel meg egy molekula ammónia felszabadulásának, így az ammónia felszabadulás folyamatosan monitorozható 340 nm-en. Az alvadást (fibrin polimerizációt) a tesztben egy gátló tetrapeptid alkalmazásával akadályozzuk meg. Amin szubsztrátként glicin etilésztert alkalmazunk, glutamin donor szubsztrátként az  $\alpha_2$ -plazmin inhibitor N-terminális szekvenciájának megfelelő szintetikus 12 tagú peptidet alkalmazunk. A plazma vak reakció bevezetése a korábban – különösen

alacsony tartományban – észlelt szisztémás fölé mérést akadályozza meg. A módszer másik nagy előnye, hogy magas trombin koncentrációt alkalmaz a FXIII aktiválására, ezért elegendő a plazmában lévő FXIII teljes mértékű aktivációjára alacsony koncentrációjú, vagy kóros fibrinogén esetén is. Nagyon lényeges tulajdonsága a tesztnek, hogy a FXIII-A Val34Leu polimorfizmusa (lásd a későbbiekben) nem befolyásolja az eredményeket. Az ammónia felszabadulás detektálásán alapuló tesztek előnyei, hogy valódi kinetikus enzimikus módszerek, egylépéses, gyors tesztek, könnyen automatizálhatók, megfelelően megállapított referencia tartomány rendelkezésre áll.

2. Az amin inkorporáción alapuló módszerek esetén fluoreszcensen jelölt (danzil-kadaverin), radioizotóppal jelzett ( $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ) putreszin, hisztamin, vagy glicin-etilészter, dinitro-fenil kadaverin, illetve biotinált kadaverin szolgál amin szubsztrátként, mely a FXIIIa által kovalensen hozzákapcsolódik egy fehérje acil donor glutamin oldalláncához. A nem kötődött jelzett aminosavat eltávolítják, a fehérjéhez kapcsolódott frakciót kvantitatívan meghatározzák. Az amin inkorporációs tesztek közös előnye a magas szenzitivitás, hátrányuk az időigényesség. Amennyiben a fehérje szubsztrát mikrotitráló lemez felületéhez van kötve, a nem kötődött frakció eltávolítása könnyebb, így a teszt gyorsabb (mikrotiter lemez módszer). Utóbbi módszerek közös hibája, hogy a lemez felületéhez kötött protein szubsztrát koncentrációja általában szuboptimális, ezért a reakció nem követi a nulladrendű kinetikát, így a mért enzimaktivitás nem lineáris az enzim katalitikus koncentrációjával. Az általánosan alkalmazott mikrotiter lemez módszer fent említett hibája mellett ebben a tesztben nagyon alacsony trombin koncentrációt (1 U/mL) alkalmaznak a FXIII aktiválására, ezért a plazmában lévő FXIII csak részlegesen aktiválódik. A FXIII trombin által történő aktiválódásának mértéke függ a FXIII-A Val34Leu polimorfizmusától. A Leu34 variáns FXIII szignifikánsan gyorsabban aktiválódik a vad típusú fehérjéhez viszonyítva, a heterozigóták FXIII aktivációjának sebessége a kettő közé esik. 1 U/mL trombin koncentrációnál ezért a FXIII trombin által aktivált mennyisége erősen függ a Val34Leu genotípustól, a trombin koncentrációt növelve ez a különbség eltűnik. Bár a FXIII specifikus aktivitása és a katalitikus hatékonysága a különböző Val34Leu genotípusok esetén azonos, elégtelen trombin aktiváció következtében ugyanazon mennyiségű Val/Val, Val/Leu, Leu/Leu FXIII különböző transzglutamináz aktivitás értéket mutat, ami Val/Val FXIII esetében alacsony, Leu/Leu FXIII esetében fölé mérést eredményez. Emiatt, genetikai analízis hiányában egy adott FXIII aktivitást ezzel a teszttel nem értékelhetünk,

ugyanis nem megítélhető, hogy pl. a FXIII aktivitás emelkedése valós, vagy csak a Leu/Leu FXIII jelenléte által okozott fölmérésről van szó.

A FXIII koncentrációjának meghatározására ELISA módszereket alkalmaznak. A plazma FXIII komplex (FXIII A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) és az egyes alegységek elkülönítve is mérhetők. Elsődleges tesztként a FXIII A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> meghatározása ajánlott. A FXIII A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> meghatározására intézetünkben egy egy-lépéses szendvics ELISA kidolgozása történt meg, biotinált anti-FXIII-B és peroxidázzal jelzett anti-FXIII-A monoklonális antitestekkel, streptavidinnel fedett mikrolemezekon a teszt gyorsan kivitelezhető. A szabad FXIII alegységek és a fibrinogén nem interferálnak a meghatározással. Az ELISA-val kapott eredmények – kivéve azt a rendkívül ritka esetet, amikor kóros, nem aktiválható FXIII-A szintetizálódik - jól korrelálnak a kinetikus spektrofotometriás aktivitás méréssel kapott értékekkel.

A plazma FXIII aktivitásának és antigén koncentrációjának a CS/MI-sal mutatott összefüggését vizsgáló néhány tanulmány általában a fent említett mikrolemes módszert alkalmazta, ezért eredményeiket erősen befolyásolhatta a FXIII-A Val34Leu polimorfizmusa, mindemellett az eredmények meglehetősen ellentmondóak. Az ellentmondás feloldására szükséges a CS/MI és a plazma FXIII szintek összefüggésének vizsgálata olyan funkcionális teszt alkalmazásával, ahol a FXIII-A Val34Leu polimorfizmusából eredő eltérő sebességű FXIII aktiváció nem befolyásolja a mért transzglutamináz aktivitást, valamint annak feltárása, hogy a különböző genotípusok FXIII szintekre gyakorolt befolyásoló hatása adekvát módszer alkalmazása mellett észlelhető-e a coronaria betegek esetén.

A coronaria betegség súlyos népegészségügyi probléma mind férfiak, mind nők esetében. A betegség jelentkezése, a klinikai tünetek, és a terápiára adott válaszban különbségek mutatkoznak a két nem között. Az atheroscleroticus plaque rupturája, ill. eróziója a koaguláció és a thrombocyták aktivációjához vezet, melynek következtében az akut ischaemiás események közvetlen kiváltó tényezője az intracoronariás thrombus kialakulása. Bár az alvadási tényezők szerepe a coronaria betegségekben még nem teljesen feltárt, feltételezhető, hogy a protromboticus állapotok (emelkedett alvadási faktor szintek) és a fibrinolízis zavara emelheti a MI kockázatát. A "klasszikus" kockázati tényezők mellett ezért az utóbbi időben néhány hemosztazeológiai tényező szerepe is felmerült. Ezek közül legszélesebb körben a fibrinogént és a plazminogén aktivátor inhibitor (PAI-1) vizsgálták. Amellett, hogy rizikó faktor szerepüket megerősítették, jelentős nemek közötti különbségeket is észleltek e két tényező vonatkozásában. A nők fibrinogén szintje általában magasabb a férfiakénál és a fibrinogén szint magas vérnyomással mutatott pozitív korrelációja

csak nőkben volt igazolható. A Framingham tanulmányban a CS és a fibrinogén csak diabetes mellitusban szenvedő nők esetén mutatott szignifikáns összefüggést. A coronaria betegségben szenvedő nők PAI-1 szintjét szignifikánsan emelkedettebbnek észlelték a férfiakéhoz viszonyítva. Mivel a FXIII szoros kapcsolatban van a fibrinogénnel, illetve a fibrinolízis szabályozásában is részt vesz, ezért feltételezhető a szerepe a CS/MI kialakulásában, és a fent említett tanulmányok alapján felmerül a nemek közötti különbségek lehetősége is.

A FXIII-A Val34Leu polimorfizmusa és a MI összefüggését számos tanulmány vizsgálta, az eredmények azonban meglehetősen ellentmondóak. Az első közlések szerint a Leu34 allél jelenléte protektív hatású a MI-sal szemben. Később olyan tanulmányok is megjelentek, melyek ezt a protektív hatást nem igazolták. Ezen ellentmondás hátterében feltehetően gén-gén, gén-környezet interakciók állnak. Kimutatták, hogy a fibrinogén koncentráció emelkedésével párhuzamosan bekövetkező fibrin alvadék permeabilitás változás a Leu34 allélek növekvő száma szerint csökkenő mértékű. Ezek alapján felmerül annak a lehetősége, hogy a Leu34 allél protektív hatása csak emelkedett fibrinogén koncentráció esetén érvényesül. Ezt a hipotézist eddig még nem ellenőrizték coronaria betegekben. A Leu34 allél protektív hatásával kapcsolatos ellentmondó eredmények miatt egy az eddig közölt adatok alapján végzett meta-analízis is szükséges.

## **CÉLKITŰZÉSEK**

1. A FXIII-A Val34Leu polimorfizmus vizsgálata a magyar általános populációban és cardiovascularis betegekben, a Leu34 allél frekvenciájának meghatározása a magyar általános populációban. A FXIII-A Leu34 allél CS/MI-sal szemben kifejtett protektív hatásának vizsgálata a fibrinogén szint függvényében.
2. A saját eredmények és az eddig megjelent közlések adatai alapján meta-analízis végzése a FXIII-A Val34Leu polimorfizmusa és a CS/MI összefüggésével kapcsolatos eddigi ellentmondó eredmények összefoglaló értékelésére.
3. A FXIII aktivitásának és antigén koncentrációjának adekvát módszerrel történő meghatározásával annak feltérképezése, hogy van-e összefüggés a FXIII szintek és a CS/MI között, jelent-e fokozott kockázatot az emelkedett FXIII aktivitás/antigén ezekre a betegségekre nézve, van-e a nemek között különbség ebben a tekintetben.

4. A FXIII aktivitásának és antigén koncentrációjának adekvát módszerrel történő meghatározása esetén annak megállapítása, hogy CS/MI-ban befolyásolja-e a FXIII-A Val34Leu polimorfizmusa a plazma FXIII szinteket.

## **BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### *Betegek és kontroll személyek:*

A tanulmányba a Debreceni Egyetem, Orvos-és Egészségtudományi Centrum Kardiológiai Intézetébe coronaria betegség gyanújával 18 hónap alatt felvett 1010 beteget vontunk be. A coronaria sclerosis jelenlétének, kiterjedésének és súlyosságának megítélése coronarographiás vizsgálattal történt. Amennyiben egy vagy több coronaria ágban a stenosis elérte, vagy meghaladta az 50%-ot (szignifikáns stenosis), a betegeket CS-ben szenvedőnek tekintettük (CS+). Amennyiben a stenosis mértéke nem érte el az 50%-ot, úgy a coronarographiás eredményt negatívnak tekintettük (CS-). Az acut MI diagnózisát (MI+) annak jelentkezésekor az American College of Cardiology (ACC) és a European Society of Cardiology (ESC) kritériumai alapján állították fel. A későbbiekben részletezett laboratóriumi vizsgálatokra a mintavétel az infarctust követően három hónappal, vagy később került sor. Az eredmények feldolgozásakor 55 személyt a diagnózis bizonytalansága, vagy hiányzó laboratóriumi eredmények miatt kizártunk. Azokat a személyeket, akik nem rendelkeztek szignifikáns coronaria sclerosissal és az anamnesisben MI sem volt explorálható, klinikai kontroll személyeknek tekintettük (CS-MI-). A többi vizsgált személyt különböző alcsoportokba osztottuk a szignifikáns coronaria stenosis és MI megléte alapján, kialakítva a következő betegcsoportokat: CS-MI+, CS+MI- és CS+MI+. A vizsgálatba bevont személyek esetében a CS és MI tényének igazolásán túlmenően regisztráltuk a diabetes mellitus, hypertonia jelenlétét, valamint a dohányzási szokásokat. A napi 10 szál cigarettát, vagy annál többet fogyasztókat tekintettük folyamatos dohányzóknak. A tanulmány a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével történt.

A magyarországi általános populáció genetikai vizsgálatához a vérmintákat a DEOEC Megelőző Orvostani Intézet/Népegészségügyi Iskola által koordinált Háziorvosi Morbiditás Adatgyűjtés Program keretében gyűjtöttük. Magyarország



négy megyéjének 22 különböző háziiorvosi praxisából randomszerűen kiválogatott 1146 személy genetikai vizsgálatát végeztük el.

#### *Laboratóriumi módszerek:*

A vérvétel éhgyomorra történt. A kémiai, immunkémiai paraméterek vizsgálatát natív szérumból végeztük a mintavétel napján. A homocisztein szintet EDTA-val alvadásgátolt vérből két órán belül szeparált plazmából végeztük, melyet a feldolgozásig  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltunk. A fibrinogén szintet, a FXIII aktivitás és antigén szintjét Na-citráttal alvadásgátolt vérből szeparált plazmából végeztük, a mintákat feldolgozásig szintén  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A szérum összkoleszterin, LDL-koleszterin, HDL-koleszterin, triglicerid, apoA1, apoB és lipoprotein(a) (Lp(a)) meghatározása rutin klinikai kémiai módszerekkel történt Roche Integra 700 klinikai kémiai analizátoron (Roche, Mannheim, Németország). A C-reaktív protein (CRP) meghatározása Roche Integra 400 klinikai kémiai analizátoron történt. A plazma fibrinogén szintet módosított Clauss módszerrel STA Compact koagulométerrel határoztuk meg (Diagnostica Stago, Asnieres, Franciaország) Reanal Fibrinogén kit alkalmazásával (Reanal-Ker Kft., Budapest, Magyarország). A plazma homocisztein koncentrációját fluoreszcens polarizációs immunassay-ben Abbott AxSYM immunkémiai analizátoron határoztuk meg (Abbott, Abbott Park, IL, USA). A plazma FXIII aktivitásának meghatározása intézetünkben kifejlesztésre került módosított optimalizált kinetikus spektrofotometriás assayvel történt (REA-chrom FXIII kit, Reanal-Ker Kft.). A FXIII  $\text{A}_2\text{B}_2$  komplex koncentrációjának meghatározását a szintén intézetünkben kifejlesztett egylépéses szendvics ELISA-val végeztük (R-ELISA, Reanal-Ker Kft.). A FXIII Val34Leu polimorfizmusának detektálására Na-citráttal alvadásgátolt vérből végzett DNS izolálást (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden, Németország) követően valós idejű PCR-t és fluoreszcencia rezonancia energia transzfer alapú detektálást, olvadáspont görbe analízist végeztünk Roche LightCycler készüléken intézetünkben kifejlesztett módszer alapján.

#### *Statisztikai módszerek:*

A különböző laboratóriumi eredmények eloszlását paraméterenként Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk. Azon paraméterek esetében, melyek szignifikánsan eltértek a normál (Gaussi) eloszlástól, logaritmosos transzformációval normalizáltuk az eloszlást. Az eredményeket az átlag (95% konfidencia intervallum, CI), a

logaritmusosan transzformált paraméterek esetében mértani átlag (anti-log 95% CI) formában fejeztük ki. A folyamatos változók esetében a vizsgált csoportok közötti különbségeket Student-féle t-tesztel elemeztük. A nem folyamatos változók esetében a különbségeket  $\chi^2$  teszttel értékeltük. A plazma FXIII aktivitás és antigén szint többi paraméterrel történő összefüggésének mértékét Spearman korrelációs koefficiens számításával értékeltük. A FXIII aktivitását, illetve a FXIII antigén szintet függetlenül befolyásoló paramétereket többszörös lineáris regressziós modellben vizsgáltuk. A különböző betegcsoportok és a klinikai kontroll csoport FXIII aktivitás és antigén szintjét ANOVA tesztben (analysis of variance) hasonlítottuk össze. Amennyiben az ANOVA szignifikáns különbségeket jelzett, utólagos páronkénti összehasonlítást is végeztünk LSD (least significant difference) teszt segítségével. Az emelkedett FXIII szintek, valamint a FXIII-A Val34Leu genotípusok CS-ra és MI-ra jelentett kockázatfokozó hatásának vizsgálatát logisztikus regresszióval végeztük, az eredményeket esélyhányadosokkal (Odds ratio; OR) és azok 95% CI-val fejeztük ki. A logisztikus regressziós modellekbe az életkort, nemet, diabetes mellitus meglétét, dohányzást és a különböző laboratóriumi paramétereket beépítve korrigált esélyhányadosokat számoltunk. A FXIII-A Val34Leu polimorfizmus és a plazma FXIII szintek közötti összefüggést ANOVA tesztben elemeztük. A  $p < 0,05$  értéket tekintettük minden elemzés esetén statisztikailag szignifikánsnak. A fent említett statisztikai elemzéseket a Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 11.5) programmal végeztünk.

A FXIII-A Val34Leu polimorfizmusának meta-analízisét a STATA szoftver "meta" programjával végeztük. A publikációs torzítás (lásd később) vizsgálata a STATA szoftver "metabias" programjával, "funnel plot" analízissel és Egger-féle tesztel történt.

## **EREDMÉNYEK**

### *A különböző betegcsoportok főbb jellemzői:*

A tanulmányba bevont 955 coronarographiával vizsgált személy közül 302 esetben sem szignifikáns CS, sem MI nem volt, ezen személyek képezték a klinikai kontroll csoportot (CS-MI-). 312 betegnél szignifikáns CS-t találtunk, előzetes MI nélkül (CS+MI-). 307 beteg esetében mind CS, mind előzetes MI igazolható volt (CS+MI+), míg 34 betegnél szignifikáns CS hiánya ellenére az anamnézisben bizonyítható MI szerpelt (CS-MI+). Ez utóbbi betegeknek a CS-t nem okozó plaque ruptura, illetve

coronaria spasmus játszhatott fő szerepet az infarctus kialakulásában. A nemek arányát tekintve várható módon a CS+ és/vagy MI+ csoportokban szignifikáns férfi túlsúly volt, míg a klinikai kontrollok között a nők száma valamivel magasabb volt. A CS-MI- csoport átlagéletkora  $55,5 \pm 10,2$  év volt, a CS-MI+ csoport életkora ettől gyakorlatilag nem különbözött ( $55,4 \pm 10,3$  év). A CS-sal rendelkező betegek szintén várható módon szignifikánsan idősebbek voltak (CS+MI-:  $60,8 \pm 10,1$  év,  $p < 0,001$ ; CS+MI+  $58,6 \pm 10,7$  év  $p < 0,001$ ). A diabetes mellitus előfordulása gyakoribb volt a CS+ és/vagy MI+ csoportokban. A dohányzás tekintetében a csoportok között különbségek nem mutatkoztak. A laboratóriumi paraméterek közül a fibrinogén, triglicerid, HDL-koleszterin, homocisztein és Lp(a) nem mutattak Gaussi eloszlást, ezért logaritmusos transzformációt követően elemeztük azokat. A klinikai kontrollokhoz viszonyítva az éhgyomri triglicerid és homocisztein szintek szignifikánsan emelkedtek, míg a HDL-koleszterin és apoA1 szintek csökkentek a CS+MI- és CS+MI+ csoportokban. Az Lp(a) és a fibrinogén emelkedése csak a CS+MI+ csoportban érte el a szignifikancia határt. A szérum összkoleszterin, LDL-koleszterin és apoB értékek tekintetében az egyes betegcsoportok nem különböztek szignifikánsan egymástól.

*A populációs kontroll csoport jellemzői:*

Az 1146 vizsgált személy átlagéletkora 46,2 (95% CI: 45,2-47,1) év volt. A férfiak aránya 46,2%, a nők aránya 53,5% volt. A különböző betegcsoportok populációs kontroll csoporthoz (magyar általános populáció) történő hasonlításakor az esélyhányadosokat e két paraméterre (nem, életkor) korrigáltuk.

*A FXIII-A Val34Leu polimorfizmus gyakoriságának meghatározása a magyar általános populációban és a különböző betegcsoportokban, a Leu34 allél jelenlétének CS és MI kialakulásának kockázatára gyakorolt hatása, a kockázatra gyakorolt hatás vizsgálata a fibrinogén szint függvényében:*

A FXIII-A Val34Leu genotípusok megoszlása a populációs kontroll és a klinikai kontroll csoportban gyakorlatilag megegyezett. A Leu34 allél frekvenciája az általános populációban 25,9%-nak, a klinikai kontroll csoportban 25,8%-nak adódott. A Leu34 hordozó frekvencia az általános populációban 45,1%, a klinikai kontroll csoportban 44,7% volt. A CS-MI+, CS+MI- és CS+MI+ csoportokban a Leu34 allélfrekvencia 32,4%, 26,6% és 23,9%, a Leu34 karrier frekvencia pedig 55,9%,

45,9% és 42,7% volt. Az általános populációtól, vagy a klinikai kontroll csoporttól való eltérés a  $\chi^2$  tesztekben egy esetben sem bizonyult szignifikánsnak. A CS-MI+, CS+MI- és CS+MI+ csoportokat a populációs kontroll (nemre és korra korrigált OR), vagy klinikai kontroll csoportokhoz (nemre, korra, összkoleszterinre, fibrinogénre, diabetes mellitus jelenlétére, Lp(a)-ra és homociszteinre korrigált OR) hasonlítottuk. Erdményeink szerint sem a Leu34 allél hordozása, sem a Leu34 homozigótaság nem hatott szignifikánsan a CS és/vagy MI kialakulására. A Leu34 allél hordozás és a Leu34 homozigótaság hatását a CS kialakulására az összevont CS+ csoportban (CS+MI- és CS+MI+) és az összevont MI+ csoportban (CS-MI+ és CS+MI+) is megvizsgáltuk. Szignifikáns kockázatfokozó, vagy csökkentő hatás sem a CS, sem a MI vonatkozásában nem volt igazolható.

Annak vizsgálatára, hogy a Leu34 hatását befolyásolja-e a plazma fibrinogén koncentrációja, azokat a betegeket, akik fibrinogén szintje a felső negyedbe esett (4,6 g/L felett) külön is elemeztük. Az esélyhányadosokat korra, nemre, Lp(a)-ra, homociszteinre, triglicerid szintre és a dohányzásra korrigáltuk, mivel ezen paraméterek mutattak egymástól függetlenül is szignifikáns összefüggést a CS-sal és a MI-sal. Ebben az esetben a Leu34 karrier státusznak statisztikailag szignifikáns védő hatása volt a CS+MI+ kialakulásával szemben (OR 0,40, 95%CI: 0,18-0,89,  $p < 0,05$ ). Az összevont CS+ és MI+ csoportokat vizsgálva a Leu34 allél hordozása mind a CS (OR 0,46, 95%CI: 0,22-0,98) mind az MI (OR 0,41, 95%CI: 0,18-0,93) ellen protektívnek bizonyult. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a magyar populációban a Leu34 allél védő hatása csak a magasabb fibrinogén koncentrációval rendelkező egyének esetén érvényesül. Mivel a fibrinogén akut fázis fehérje, azt is vizsgáltuk, hogy a Leu34 allél protektív hatása az emelkedett CRP szinttel rendelkezőkben érvényesül-e. Sem a CS+, sem az MI+ csoportokban nem volt észlelhető a védő hatás. Mindezek alapján megállapítható, hogy a Leu34 allél protektív hatása valóban fibrinogénre és nem az akut fázis reakcióra (pl. gyulladás) specifikus.

*A FXIII-A Val34Leu polimorfizmusa és a coronaria sclerosis/myocardialis infarctus közötti összefüggés ellentmondó eredményeinek összefoglaló elemzése meta-analízissel:*

A meta-analízisbe a saját eredményeinken túlmenően olyan tanulmányokat választottunk a MEDLINE-ből, ahol a coronaria betegség definíciója a MI dokumentálásán, vagy coronarographiával igazolt CS jelenlétén alapult. A meta-

analízisbe összesen 16 közleményből származó 5346 beteg és 7053 kontroll személy került bevonásra. A 16 tanulmány döntő többsége a kaukázusi populáción történt, 11 tanulmány európai országból, 1 Dél-Amerikából és 4 Észak-Amerikából származott. Mivel a különböző tanulmányokban közölt OR értékek túl széles tartományt öleltek fel és a heterogenitás vizsgálat szignifikánsnak bizonyult, empirikus random-hatás Bayes modellt alkalmaztunk a tanulmány-specifikus OR-k kalkulálására és azok összegzésére. Ez konzervatívabb becslést tesz lehetővé a fix-hatás modellekhez viszonyítva, valamint csökkenti az extrém eredményeket tartalmazó tanulmányok zavaró hatását. A coronaria betegség, mint kimeneteli változó mellett az analízist külön a MI-ra is elvégeztük.

A coronaria betegség átlagos kockázata 18%-kal volt alacsonyabb a Val/Leu heterozigótákban a Val/Val vad típusúakhoz viszonyítva (OR: 0,82, 95%CI: 0,73-0,94). A Leu/Leu homozigóták esetén az OR 0,89 volt (95%CI: 0,69-1,13). Amennyiben a Leu allélt hordozókat (Val/Leu heterozigóták és Leu/Leu homozigóták együtt) hasonlítottuk a Val/Val vad típusúakhoz az OR 0,81 volt (95%CI: 0,70-0,92). Amennyiben a MI-t mint kimeneteli változót külön értékeltük, az eredmények érdemben nem változtak. A Leu allél hordozása a MI kockázatának 16%-os csökkenését eredményezi (OR 0,84, 95%CI: 0,76-0,94). A publikációs torzítás (egyes tanulmányok eredményeinek a nem közlése) vizsgálatára végzett Egger-teszt szignifikánsnak bizonyult ( $p=0,002$ ), a funnel-plot analízis is azt jelzi, hogy néhány kisebb tanulmány, ami nem találta protektív hatását a Leu allélnek, feltehetően hiányzik a közölt irodalomból.

*A FXIII szintek összefüggése a coronaria sclerosissal/myocardialis infarctussal, a nemek közötti különbségek vizsgálata:*

A korrigálatlan FXIII aktivitás és antigén értékek nem mutattak szignifikáns különbségeket egyik betegcsoportban sem a klinikai kontrollokhoz viszonyítva. A klinikai kontrollok FXIII aktivitása és antigén koncentrációja nem különbözött szignifikánsan a korábban laboratóriumunkban meghatározott egészséges személyek esetében mért értékektől. A plazma FXIII aktivitása és az A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> komplex koncentrációja jó korrelációt mutatott. A korrelációs koefficiensek 0,86 és 0,93 közé estek a különböző betegcsoportoknál, ami jelzi, hogy a két módszer (funkcionális teszt és ELISA) ugyanazon plazma komponens különböző tulajdonságát vizsgálja. A többszörös lineáris regresszió analízis azt jelezte, hogy a nem, a dohányzás, a szérum össz koleszterin és a fibrinogén szint a többi paramétertől függetlenül is szignifikáns

összefüggést mutat a FXIII aktivitással és antigén szinttel, ezért a további elemzésekkor a FXIII szinteket ezekre a paraméterekre korrigálva vizsgáltuk. Amennyiben a betegeket nemek szerint nem osztottuk további csoportokba, az egyes csoportokban mért korrigált FXIII szintek nem mutattak szignifikáns különbségeket a klinikai kontrollokhöz, ill. egymáshoz viszonyítva. Amennyiben azonban a betegcsoportokat nemek szerint tovább osztályoztuk, szignifikáns nemektől függő különbségeket észleltünk a FXIII szintekben. Férfiak esetében sem a CS, sem az MI nem befolyásolta a FXIII szinteket. A CS önmagában nőkben sem eredményezett különbségeket. Ha viszont a CS+ nők MI-ban is szenvedtek, a FXIII aktivitása és antigén koncentrációja szignifikánsan emelkedett volt a CS+, de MI- nőkhöz viszonyítva (FXIII aktivitás: 107%, 95%CI: 100-115 versus 98%, 95%CI: 92-105,  $p=0,02$ , FXIII antigén: 24,1 mg/L, 95%CI: 22,4-25,8 versus 22,1 mg/L, 95%CI: 20,6-23,5,  $p=0,02$ ). A női CS+MI+ csoport FXIII antigén szintje a klinikai kontrollokhöz viszonyítva is szignifikánsan emelkedett volt. Ugyanez a különbség a FXIII aktivitás vonatkozásában nem érte el a szignifikancia határt. A CS-MI+ nők FXIII aktivitás és antigén értékei bár a legmagasabbak voltak az összes betegcsoport között (FXIII aktivitás: 112%, 95%CI: 97-126; FXIII antigén: 25,1 mg/L, 95%CI: 21,7-28,5) de a csoport kis létszáma miatt az emelkedés statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak. Az összevont női MI+ csoport (CS-MI+ és CS+MI+ együtt) szintén szignifikánsan emelkedett FXIII szinteket mutatott a klinikai kontrollokhöz viszonyítva. A FXIII aktivitása az összevont MI+ csoportban 108% (95%CI: 101-115), a klinikai kontrollokban 101% (95%CI: 96-107) volt,  $p=0,04$ . A FXIII antigén szintje az összevont MI+ csoportban 24,2 mg/L (95%CI: 22,6-25,5), a klinikai kontrollokban 22,6 mg/L (95%CI: 21,4-23,7) volt,  $p=0,02$ .

A tanulmány során azt is vizsgáltuk, hogy az emelkedett FXIII szintek CS-ra és MI-ra jelentenek-e fokozott kockázatot. A felső harmadba eső FXIII aktivitás (>110%) és FXIII antigén (>24,1 mg/L) szintekkel rendelkezők CS és MI kockázatát viszonyítottuk az ennél alacsonyabb FXIII szintekkel rendelkezőkhöz az egyes betegcsoportokban logisztikus regressziós modellben. Férfiak esetén az emelkedett FXIII aktivitás és antigén szint nem fokozta sem a CS, sem az MI kockázatát. A férfi CS-MI+, CS+MI- és CS+MI+ alcsoportokat a férfi klinikai kontroll csoporthoz viszonyítva az OR értékek minden esetben 1,0 körüliek voltak. Hasonlóképpen, a nők között az emelkedett FXIII szintek nem jelentettek fokozott rizikót a CS-ra önmagában (CS+MI- versus CS-MI-). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az emelkedett FXIII szintek nem jelentenek fokozott kockázatot a súlyos atherosclerosis kialakulására egyik nemből sem. Ezzel ellentétben, ha a CS-ben szenvedő és MI-on

átesett női populációt vizsgáltuk, magas OR értéket kaptunk, mely erős statisztikai szignifikanciát mutatott (emelkedett FXIII aktivitás: CS+MI+ versus CS-MI-: OR 3,091, 95%CI: 1,648-5,798,  $p < 0,001$  és emelkedett FXIII antigén: CS+MI+ versus CS-MI-: OR 2,346, 95%CI: 1,269-4,336,  $p = 0,007$ ). Annak érdekében, hogy az emelkedett FXIII szintek CS-ra és MI-ra jelentett kockázatfokozó hatását jobban különválaszthassuk, a CS-ban szenvedő nők között (CS+) külön vizsgáltuk az emelkedett FXIII szintek MI-ra jelentett rizikó mértékét (CS+MI+ versus CS+MI-). Az emelkedett FXIII szintek ebben a vizsgálati rendszerben is szignifikáns kockázatfokozó hatást jelentettek a MI-ra nézve. Az emelkedett FXIII aktivitásra nézve az OR 1,873 (95%CI: 1,015-3,458),  $p = 0,04$ , míg az emelkedett FXIII antigénre nézve az OR 1,999 (95%CI: 1,051-3,765),  $p = 0,03$  volt. Az eredmények alapján megállapítható, hogy az emelkedett FXIII szintek fokozott kockázatot jelentenek a MI kialakulására CS-ban szenvedő nők esetén, ugyanez a hatás férfiak esetében nem érvényesül.

*A coronaria sclerosis/myocardialis infarctus hatása a plazma FXIII szintekre a FXIII-A Val34Leu polimorfizmus különböző genotípusaiban.*

Korábbi vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy az egészséges kontroll személyek FXIII aktivitása és antigén koncentrációja nem különbözik szignifikánsan az egyes Val34Leu genotípusokban. Hasonlóképpen a klinikai kontroll csoportban, bár enyhe tendencia mutatkozott a Leu34 allélek növekvő számával párhuzamosan a FXIII szintek csökkenésének irányába, de ezek a különbségek igen távol voltak a statisztikai szignifikanciától. A CS+ betegekben azonban a FXIII-A Leu34 homozigóták FXIII aktivitás és antigén szintje szignifikánsan (10%-kal) alacsonyabb volt mint az ugyanezen csoport Val/Val genotípusú egyéneké ( $p < 0,05$ ). Az összesen 619 főből álló CS+ csoportban a FXIII aktivitása a Val/Val, Val/Leu és Leu/Leu alcsoportokban 104% (95%CI: 100-107), 103% (95%CI: 99-107) és 94% (95%CI: 86-103) volt. A FXIII antigén koncentráció a Val/Val, Val/Leu és Leu/Leu alcsoportokban 23,2 mg/L (95%CI: 22,4-24,1), 22,7 mg/L (95%CI: 21,8-23,6) és 20,9 (95%CI: 19,0-22,9) volt. A MI-on átesett betegcsoportban (MI+, 341 fő) a Leu/Leu homozigóták még kifejezettebb FXIII csökkenést mutattak. Ebben a csoportban a Leu/Leu homozigóták FXIII szintjei nemcsak a Val/Val genotípusúakéhoz viszonyítva, de a Val/Leu heterozigóták FXIII szintjeihez képest is szignifikánsan csökkentek voltak. A FXIII aktivitása a Val/Val, Val/Leu és Leu/Leu alcsoportokban 107% (95%CI: 102-112), 106% (95%CI: 101-111) és 88% (95%CI: 76-99) volt. A FXIII antigén koncentráció a

Val/Val, Val/Leu és Leu/Leu alcsoportokban 24,0 mg/L (95%CI: 22,8-25,1), 23,2 mg/L (95%CI: 22,0-24,5) és 20,3 (95%CI: 17,6-23,0) volt. Természetesen a CS+ csoportba tartozó betegek egy részének az anamnesisében szerepel MI, másoknak nem. Annak vizsgálatára, hogy a Leu/Leu homozigóták csökkent FXIII szintje a CS+ betegeknel a MI-n átesettek hiányában is érvényesül-e, ezt a csoportot (CS+MI-) külön is elemeztük. Bár a csökkenő tendencia a Leu allélek számának emelkedésével párhuzamosan egyértelmű volt, a statisztikai szignifikancia határt egy esetben sem érte el.

Elméletileg a FXIII aktivitás csökkenés a FXIII molekulák csökkenő koncentrációja miatt, vagy adott mennyiségű FXIII fehérje csökkent aktivitása miatt is létrejöhet. A FXIII aktivitás és antigén koncentráció párhuzamos csökkenése az előbbi lehetőséget támogatja. Annak érdekében, hogy ezt a feltevést teljes mértékben igazolhassuk, meghatároztuk az egyes betegcsoportok különböző FXIII-A Val34Leu genotípusaihoz tartozó specifikus FXIII aktivitás értékeket, vagyis az adott FXIII koncentrációhoz tartozó aktivitást és az eredményeket Unit/mg-ban fejeztük ki. Gyakorlatilag minden betegcsoport minden Val34Leu genotípusú alcsoportjában azonos specifikus aktivitás értékeket kaptunk (7,00-7,32 Unit/mg). Ez arra utal, hogy a Leu/Leu homozigótáknál a FXIII aktivitás csökkenésének hátterében valóban a FXIII fehérje csökkent koncentrációja áll.

## **MEGBESZÉLÉS**

A FXIII-A Leu34 allél frekvenciája a kaukázusi populációban 24,5-28,8% között, igen szűk tartományban változik. Az általunk vizsgált populációs kontroll csoport (25,9%) és klinikai kontroll csoport (25,8%) allélfrekvencia adatai igen jól illeszkednek ebbe a tartományba. A feketék és az ázsiaiak Leu34 allélfrekvenciája jóval alacsonyabb, a japánokban a polimorfizmus extrém ritka. Az első eset-kontroll tanulmányban, ami a FXIII-A Val34Leu polimorfizmusa és a MI közötti összefüggést vizsgálta, a Leu34 allél protektív hatását vetették fel. Ezt később finn, brazil, északolasz és török tanulmányok megerősítették. Ezzel szemben kisebb francia és spanyol tanulmányok, valamint egy nagy, 1210 beteg és ugyanennyi kontroll személy bevonásával készült olasz tanulmány nem tudta megerősíteni a Leu34 allél védő hatását. Ezen tanulmányok szerint a FXIII-A Val34Leu polimorfizmusa semleges a MI kockázata szempontjából. Saját eredményeink, egybehangzóan két korábbi észak-amerikai tanulmányhoz hasonlóan azt mutatják, hogy a korábbi feltevessel ellentétben a Leu34 allél protektív hatásának elmaradása nem kizárólag a mediterrán



populációban, illetve az alacsony coronariabetegség incidenciával jellemezhető népcsoportokban fordul elő.

Feltehető, hogy a FXIII-A Val34Leu polimorfizmusával kapcsolatban született eltérő eredmények háttérében gén-gén, illetve gén-környezet kölcsönhatások állnak, melyek befolyásolják a Leu34 allél protektív hatását. Korábbi közlések szerint a polimorfizmus cardio-protektív hatása inzulin rezisztenciában elvész, különösen magas PAI-1 szinttel rendelkezőkben. A fibrinogén, mint cardiovascularis kockázati tényező és a FXIII-A Val34Leu polimorfizmus összefüggésének vizsgálata több korábbi biokémiai megfigyelés alapján érdekesnek tűnik. A FXIII-A Val34Leu polimorfizmusának következménye a mutáns FXIII trombin által történő aktivációjának megnövekedett sebessége és a fibrin háló szerkezetének megváltozása. Az alvadék permeabilitásának fibrinogén koncentráció emelkedésével párhuzamos csökkenését a Leu34 allél jelenléte elfedi. Szkenning elektronmikroszkóppal kimutatták, hogy magas fibrinogén koncentráció esetén a Leu/Leu homozigóták fibrin alvadéka lazább szerkezetű és vastagabb rostokból áll. Az ilyen szerkezetű fibrinháló gyorsabban degradálódik a fibrinolízis által, mint a vékonyabb rostokból álló, kompaktabb szerkezetű. Saját eredményünk, mely szerint a Leu34 allél protektív hatása csak magasabb fibrinogén koncentráció esetén érvényesül, teljes összhangban áll az in vitro kísérleti eredményekkel és arra utal, hogy a Leu34 allél védő hatásának háttérében a fibrinháló gyorsabb fibrinolízis általi degradációja áll. Mindezek alapján a cardiovascularis rizikó szempontjából a FXIII-A Val34Leu polimorfizmusát és a fibrinogén koncentrációt mindenképpen együtt kell értékelni.

A CS kifejlődése és az acut coronaria thrombosis két különböző, de az esetek döntő többségében egymással oki összefüggésben lévő esemény. A Leu34 variáns CS-ra és MI-ra gyakorolt hatását igen nehéz különválasztani. Amennyiben a magas fibrinogén szinttel rendelkező CS+MI- betegcsoportot a klinikai kontrollokhoz hasonlítottuk, alacsony OR értéket kaptunk (0,79), azonban a protektív hatás nem bizonyult szignifikánsnak. Amennyiben a CS+ összevont csoportot értékeltük, az OR szignifikánsan alacsonynak bizonyult (OR: 0,46), azonban ebbe a csoportba esik az MI+ betegek nagy többsége. Ha az MI-n átesetteket külön vizsgáltuk, szintén szignifikáns védőhatást (OR: 0,41) észleltünk. Ennek alapján feltételezhetjük, hogy a Leu34 allél védő hatása elsősorban a coronaria thrombosis kialakulásának a rizikóját csökkenti a magas fibrinogén koncentrációval rendelkező betegekben. Annak eldöntésére, hogy magát az atherosclerosis folyamatát befolyásolja-e a polimorfizmus, további kutatásokra van szükség.

A FXIII-A Val34Leu polimorfizmusa és a CS/MI közötti összefüggés ellentmondó eredményeinek összefoglaló értékelése céljából elvégeztük az idevonatkozó irodalmi adatok meta-analízisét. A meta-analízisbe bevont tanulmányokban közölt esélyhányados értékek meglehetősen heterogénnek bizonyultak. Az OR értékek 0,31-1,11 között változtak. A tanulmányok alapján nem vonhatunk le következtetést arra vonatkozólag, hogy létezik-e olyan determináns, ami magyarázhatja ezt a heterogenitást. Nyilvánvaló, hogy a polimorfizmus (fentebb már tárgyalt) biokémiai hatása minden populációban azonos, azonban az adott populációra jellemző környezeti faktorok, melyek befolyásolhatják a genotípus által meghatározott tulajdonságot, nagymértékben különböznek. A mediterrán országokból származó negatív közléseket magyarázhatja, hogy ezekben az országokban az ún. környezeti kockázati tényezők előfordulása ritkább, mint Közép-, és Észak-Európában, s a Leu34 allél jelenléte az amúgy is alacsony rizikójú populációkban további védő hatást már nem fejt ki. Másrészt viszont saját tanulmányunk, melyben az egyébként is magas cardiovascularis kockázattal rendelkező magyar populációt vizsgáltuk, szintén negatív eredménnyel zárult, ami ellentétben az előzőekkel a számos rizikótényező ellenében kevésbé hatékony védelemnek köszönhető. Emellett az előbbieken már utaltunk arra, hogy a védőhatás a populáció egy jól meghatározott részében, a magas fibrinogén koncentrációval rendelkező egyéneken, itt is érvényesül.

A fent említett heterogenitás miatt a meta-analízist empirikus Bayes modellel végeztük, ez a hagyományos statisztikai módszerben előforduló torzítást, melyet az extrém eredményeket tartalmazó tanulmányok okoznak, csökkenti. A meta-analízis eredményeként kimondhatjuk, hogy nagy nemzetközi, döntően kaukázusi populációban a Leu34 allél, ill. az allél hordozása szignifikánsan véd a coronaria betegség ellen, bár ennek a védőhatásnak az érvényre jutása környezeti tényezők, esetleg genetikai konstellációk függvénye. Az analízis során felvetődött a publikációs torzítás lehetősége is. Nyilvánvaló, hogy a kisebb tanulmányok eredményei a nagyobb mintavételi hiba miatt a valós érték körül nagyobb szórással helyezkednek el, mint a nagyobb tanulmányok eredményei, ahol a bevont személyek nagy száma miatt a mintavételi hiba lényegesen kisebb. Ennek ellenére mindössze egyetlen olyan kis tanulmány jelent meg, amelyben a meta-analízisünk eredményeképpen kalkulált értéknél kisebb mértékű védő hatást találtak. Amennyiben a hasonló, negatív eredménnyel záruló kis tanulmányok valóban léteznek és nem kerültek közlésre, a FXIII-A Val34Leu polimorfizmus védő hatásának általunk kalkulált mértéke a valósnál valamivel nagyobb.

A cardiovascularis betegségek és a plazma FXIII szintek közötti összefüggést mindössze néhány tanulmány vizsgálta. E tanulmányokban azonban a bevezetésben már tárgyalt mikrolemez amin inkorporációs módszerrel végezték az aktivitás meghatározásokat, s a mért eredmények nagy mértékben függnék a FXIII-A Val34Leu genotípustól. Tekintettel arra, hogy e tanulmányokban genotípus függő referencia tartományokkal nem rendelkeztek, továbbá a kontrollok és betegek összehasonlítása nem genotípus szerint történt, csak az antigén meghatározások eredményeivel tudjuk összevetni saját eredményeinket. Az említett tanulmányokban a bevont betegek száma igen alacsony volt. 276, a kaukázusi rasszhoz tartozó egyén vizsgálatakor csak a súlyos CS-ban szenvedő betegek FXIII-A antigén koncentrációját találták emelkedettnek. Egy, a saját tanulmányunkhoz hasonló beválasztási kritériumokat alkalmazó közlésben 362 szignifikáns CS-ban szenvedő beteg plazma FXIII antigén szintjét vetették össze 134 normál coronarographiás lelettel rendelkező személyével, a FXIII szintek és a CS között nem találtak összefüggést. Néhány, MI-on átesett beteggel foglalkozó tanulmányban nem találtak különbséget az MI+ és MI- személyek között a FXIII szintek tekintetében, csak egy kis prospektív tanulmányban találtak csökkent FXIII-A antigén szintet 63 MI-on átesett férfi beteg esetében. Összességében tehát a kizárólag, vagy döntő többségében férfiakon végzett tanulmányok negatív eredménnyel zárultak. Ez alapvetően jó összhangban van a nemek szerint nem osztályozott, illetve férfi populációban általunk kapott negatív eredménnyel. A fenti tanulmányok a bevont személyek alacsony száma miatt nemek szerint már nem voltak tovább csoportosíthatók. Saját tanulmányunk közel 1000 fő bevonásával azonban lehetővé tette ezt a felosztást. Eredményeink alapján a női populációban a MI előfordulása emelkedett FXIII aktivitás és antigén szintekkel járt, függetlenül a CS jelenlététől, vagy hiányától. Ezek szerint a FXIII szint emelkedés és a MI között nemre specifikus összefüggés mutatható ki.

A férfi populációban a felső harmadba eső FXIII aktivitás és antigén koncentráció nem jelentett szignifikáns kockázat fokozó hatást sem a MI sem a CS vonatkozásában. Ezzel éles ellentétben, a CS+MI+ női populációt a női klinikai kontroll csoporthoz viszonyítva 2,5-3,0-szoros rizikót állapítottunk meg emelkedett FXIII szintek esetén. Az emelkedett FXIII szintek – a férfiakhoz hasonlóan – nőkben sem fokozták a CS kockázatát a MI- személyek esetén, azonban a CS+ nőkben a FXIII emelkedett szintje a MI szignifikáns kockázatfokozó tényezőjének bizonyult. Ezek alapján a FXIII szint emelkedése a MI rizikóját nem az atheroscleroticus plaque növekedésének elősegítése, hanem a thrombotikus történések szintjén befolyásolja.

Eredményeink szerint az emelkedett FXIII a MI nemre specifikus kockázati tényezője és vizsgálatát érdemes bevonni a MI kockázatának felmérésébe a női populációban.

A fibrin alvadék kialakulásával párhuzamosan aktiválódó fibrinolitikus rendszer gátlásával, a fibrin prompt lebontásának megakadályozásával az emelkedett FXIII fontos szerepet játszhat a coronariákat elzáró thrombus fenntartásában és növekedésében. Annak kiderítése, hogy ez a mechanizmus miért kizárólag nőkben érvényesül, még várat magára. Eredményeink mindenesetre megerősítik azt a feltételezést, mely szerint a coronaria betegség kifejlődésében a véralvadási rendszer nőkben hangsúlyozottabb szerephez jut, mint férfiakban.

A korábbiakban már említett methodológiai problémák miatt az irodalom meglehetősen ellentmondásos abban a tekintetben, hogy a FXIII-A Val34Leu polimorfizmusa befolyásolja-e a plazma FXIII aktivitását. Ma már egyértelmű, hogy ha az aktivitás meghatározás első lépéseként a plazmában a trombin teljes mértékben aktiváljuk, nincs különbség az egyes genotípusok FXIII specifikus aktivitásában. Vizsgálatainkban olyan funkcionális tesztet alkalmaztunk, ahol a teljes mértékben aktiválódott FXIII aktivitását detektáltuk, így az eredmények valóban a FXIII katalitikus koncentrációját mutatják és jól korrelálnak a FXIII antigén koncentráció értékekkel. Saját eredményeink azt mutatták, hogy mind a plazma FXIII aktivitása, mind az antigén szint statisztikailag szignifikánsan csökkent a Leu/Leu homoizotópokban a CS+ és a MI+ betegcsoportokban. A FXIII aktivitás és antigén koncentráció párhuzamos csökkenése és a specifikus aktivitás identikus volta arra enged következtetni, hogy a Val34Leu polimorfizmus nem magát a FXIII aktivitását befolyásolja (ellentétben a korábbi közlésekkel), hanem alapvetően a FXIII koncentráció csökkenését idézi elő. Arra, hogy ez a genotípus-függés miért csak a coronaria betegekben érvényesül és miért nem jelentkezik egészséges egyéneknél, jelenleg csak feltevéseink vannak. Elképzelhető, hogy a betegekben, különösen a MI+ esetekben, egy folyamatos, vagy alkalmankénti alacsony szintű véralvadás aktiváció történik, mely során limitált mértékben a FXIII is aktiválódik. A Leu34 FXIII gyorsabb aktiválódása és keringésből való kiürülése vezethet a csökkent FXIII szintekhez.

## **ÖSSZEFOGLALÁS**

A véralvadás XIII-as faktora (FXIII) egy tetramer struktúrájú ( $A_2B_2$ ) protranszglutamináz. A trombin lehasítja a 37 aminosavból álló aktivációs peptidet a FXIII-A-ról, majd  $Ca^{2+}$  jelenlétében a hordozó/gátló FXIII-B disszociál, így

kialakítva a hasított és szabaddá váló enzimatikusan aktív FXIII-A-t. A FXIII a koaguláció utolsó fázisában játszik fontos szerepet, fő funkciója a normál hemosztázisban a képződő fibrin láncok kovalens keresztbe kötése, valamint a fibrinolízis szabályozásában részt vevő proteinek fibrin hálózathoz történő kapcsolása. A FXIII-A génje meglehetősen polimorf, a Val34Leu polimorfizmus a legkiterjedtebben tanulmányozott, ugyanis thrombo-protéktív hatását feltételezték.

Adekvát laboratóriumi módszerekkel vizsgáltuk a plazma FXIII szintek összefüggését a CS/MI-sal, az emelkedett FXIII szintek CS-ra és MI-ra jelentett kockázat fokozó hatását, valamint a FXIII-A Val34Leu polimorfizmusának összefüggését ezen betegségekkel.

A FXIII-A Leu34 allél hordozása, vagy a Leu/Leu homozigótaság önmagában nem bizonyult protektívnek a magyar populációban a CS-sal, illetve MI-sal szemben. Emelkedett fibrinogén szint esetében azonban a Leu34 allél védő hatása MI-sal szemben kimutatható volt. A fibrinogén koncentráció befolyásolja a Leu34 allél hatását, a protektív tulajdonság a fibrinogén szint emelkedésével párhuzamosan fokozódik.

Az eddig publikált 16 tanulmány meta-analízisével igazoltuk, hogy a kaukázusi populációban a FXIII-A Val34Leu polimorfizmusa generálisan protektív hatású a coronaria betegséggel szemben. E hatás érvényesülése azonban környezeti tényezők, esetleg gén-gén kölcsönhatások függvénye.

Az irodalomban elsőként mutattunk rá arra, hogy az emelkedett FXIII szint a MI független kockázati tényezője a nőknél, és ajánlatot tettünk a FXIII szint meghatározás felvételére a nemre specifikus rizikó felmérési profilba. Eredményeink támogatják azt az álláspontot, mely szerint a coronaria betegség kifejlődésében a véralvadási rendszer nőknél hangsúlyozottabb szerephez jut, mint férfiakban.

Kimutattuk, hogy a CS+ és MI+ betegekben a FXIII-A Val34Leu polimorfizmusa befolyásolja a plazma FXIII aktivitását és antigén koncentrációját. A Leu/Leu homozigóta MI+ betegek FXIII szintjei szignifikánsan alacsonyabbak voltak a Val/Leu heterozigóták és Val/Val betegkéhez viszonyítva. A CS jelenlétében, de MI hiányában ez a jelenség kevésbé volt kifejezett. A FXIII specifikus aktivitása független volt a FXIII-A Val34Leu polimorfizmusától. Valószínű, hogy az MI+ Leu34 homozigóta betegekben a Leu34 FXIII gyorsabb aktiválódása kombinálódik az MI+ betegekben észlelhető kis mértékű, de állandó trombin képződéssel, ennek következtében több aktív FXIII keletkezik, ami a keringésből eliminálódva vezet a csökkent FXIII szintekhez.

## AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

**Bereczky Z**, Katona É, Muszbek L: Fibrin stabilization (Factor XIII), fibrin structure and thrombosis

Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis 2003/2004; 33: 430-437.

**Impakt faktor: 0.799**

**Bereczky Z**, Balogh E, Katona É, Czuriga I, Édes I, Muszbek L: Elevated factor XIII level and the risk of myocardial infarction in women

Haematologica 2007; 92: 287-288.

**Impakt faktor: 4,575**

**Bereczky Z**, Balogh E, Katona É, Pocsai Z, Czuriga I, Széles G, Kárpáti L, Ádány R, Édes I, Muszbek L: Modulation of the risk of coronary sclerosis/myocardial infarction by the interaction between factor XIII subunit A Val34Leu polymorphism and fibrinogen concentration in the high risk Hungarian population.

Thrombosis Research 2007; doi: 10.1016/j.thromres.2006.12.013

**Impakt faktor: 2,012**

Vokó Z, **Bereczky Z**, Katona É, Ádány R, Muszbek L: Factor XIII Val34Leu variant protects against coronary artery disease. A meta-analysis.

Thrombosis Haemostasis 2007; 97: 458-463.

**Impakt faktor: 3,056**

**Bereczky Z**, Balogh E, Katona É, Czuriga I, Kárpáti L, Édes I, Muszbek L: The effect of coronary artery disease on factor XIII levels in patients with different Factor XIII-A subunit Val34Leu genotype

Thrombosis Research (under revision)

**Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 10,043**

## AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖNYVFEJEZET

Muszbek L, **Bereczky Z**, Katona É: Blood coagulation factor XIII: involvement in fibrinolysis and thrombosis

In: Arnout J, de Gaetano G, Hoylaerts M, Peerlinck K, Van Geet C, Verhaeghe R, eds. Thrombosis. Fundamental and Clinical Aspects. Leuven, Belgium: Leuven University Press; 2003: 197-224.

### **AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM SZOROSAN KAPCSOLÓDÓ, NEMZETKÖZI FOLYÓIRATBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK**

Szűk T, Nagy B, **Bereczky Z**, Kőszegi Z, Édes I, Kappelmayer J: Effects of ad hoc clopidogrel loading versus pre-treatment on P-selectin expression after coronary stent implantation.

Platelets 2006; 17: 344-346.

**Impakt faktor: 1,451**

Schlamadinger Á, Vanhoorelbeke K, László P, **Bereczky Z**, Muszbek L, Deckmyn H, Boda Z: Von Willebrand factor antigen latex immunoassays are affected to a different extent by rheumatoid factor.

Clinical and Applied in Thrombosis/Hemostasis 2006; 12: 242-243.

**Impakt faktor: 1,183**

Nagy V, Steiber Z, Takács L, Vereb G, Berta A, **Bereczky Z**, Pfliegler G: Thrombophilic screening for nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy.

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2006; 244: 3-8.

**Impakt faktor: 1,498**

Losonczy G, Rosenberg N, Boda Z, Vereb G, Kappelmayer J, Hauschner H, **Bereczky Z**, Muszbek L: Three novel mutations in the glycoprotein IIb gene in a patient with type II Glanzmann thrombasthenia

Haematologica 2007 (in press)

**Impakt faktor: 4,575**

### **AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM SZOROSAN KAPCSOLÓDÓ, HAZAI FOLYÓIRATBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK**

Szőke G, Balogh I, **Bereczky Zs**, Muszbek L: Homocisztein anyagcsere laboratóriumi vizsgálata és klinikai jelentősége a thrombosis hajlam megítélésére

szempontjából I. Homocisztein metabolizmus és a plazma homocisztein szintjének a meghatározása.

Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina 1999; 26: 8-14.

**Bereczky Zs**, Szőke G, Balogh I, Muszbek L: Homocisztein anyagcsere laboratóriumi vizsgálata és klinikai jelentősége a thrombosis hajlam megítélése szempontjából II. Öröklött és szerzett hyperhomocysteinaemiák.

Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina 1999; 26: 54-63.

Kárpáti I, Balla J, Szőke G, **Bereczky Zs**, Páll D, Ben T, Toma K, Katona E, Mohácsi A, Paragh Gy, Varga Zs, Kakuk Gy, Muszbek L: A hyperhomocysteinaemia gyakorisága folsavpótlásban részesülő hemodializált betegekből.

Orvosi Hetilap 2002; 143: 1635-1640.

Oláh L, Csépany T, **Bereczky Z**, Kerényi A, Mész M, Kappelmayer J, Csiba L: Activity of natural coagulation inhibitor proteins in the acute phase of ischaemic stroke

Ideggyógyászati Szemle 2005; 58: 33-39.

Balogh E, Czuriga I, **Bereczky Zs**, Boda K, Kőszegi Zs, Kónya C, Császár A, Muszbek L, Édes I, Ferdinándy P: Increase of homocysteine in cardiovascular diseases in Hungary

Orvosi Hetilap 2006; 3147: 1685-90.

**Bereczky Z**, Komáromi I, Bárdos H, Kiss C, Balogh I, Haramura G, Ajzner É, Ádány R, Muszbek L: Factor Xdebrecen: Gly204Arg mutation in factor X causes the synthesis of a non-secretable protein and severe factor X deficiency

J Thromb Haemost 2007 (submitted)

Összes impakt faktor: 19,149