

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Artériás – és vénás trombózisok és trombózishajlam
determinánsainak vizsgálata molekuláris
módszerekkel**

Pituk Dóra

Témavezető: Dr. Bereczky Zsuzsanna



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2025

**Artériás – és vénás trombózisok és trombózishajlam determinánsainak vizsgálata
molekuláris módszerekkel**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Pituk Dóra okleveles klinikai laboratóriumi kutató

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Bereczky Zsuzsanna

Az értekezés bírálói: Dr. Bárdos Helga, PhD

Dr. Gombos Katalin, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kiss Csongor, MTA doktora

tagok: Dr. Borbély Attila, MD, PhD

Dr. Földesi Imre, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet "A" épület,
tanterme, 2025. december 4., 13:30

1. BEVEZETÉS

A trombózis, vagyis a kóros vérrögképződés számos kardiovaszkuláris és tromboembóliás megbetegedés középpontjában áll. A trombózis kialakulásának klasszikus magyarázatát a XIX. században Rudolf Virchow fogalmazta meg, akiről elnevezett triász (Virchow-triász) egyes elemei, úgymint a véráramlás hiánya, vagy csökkent mértéke (sztázis), a vér fokozott alvadékonysága (hiperkoagulabilitás) és az érfal sérülése (endothél diszfunkció) együttesen játszanak szerepet. Így, a Virchow-triászban megfogalmazott tényezők nem csupán az artériás, de a vénás oldalon bekövetkező trombotikus folyamatok kialakulásában is döntő szerepet töltenek be.

A vénás tromboembólia (VTE) mind a mai napig jelentős globális egészségügyi kihívást jelent, nemcsak az akut események kialakulása és kezelése, hanem a hosszú távú következmények szempontjából is. A VTE gyakori kardiovaszkuláris betegség; az öt leggyakoribb vaszkuláris betegségek egyike. A legfrissebb beszámolók szerint a VTE incidenciája 1-2 eset/1000 fő/év közötti érték a nyugati országokban, ezzel szemben a keleti régiókban alacsonyabb, <1/1000 fő/év.

Artériás oldalon bekövetkező elzáródások, így a koronária artériákban kialakuló trombusképződés, jelentős szerepet játszanak az akut koronáriszindrómák, köztük az ST-elevációval járó miokardiális infarktus (STEMI) kialakulásában. A STEMI összesített incidenciája Európában országonként 80-370 eset/100 000 személy-év között változik, míg 33-138 eset/100 000 személy-év közötti értékek mérhetőek Ázsiában. A 2023-as ESC EuroHeart Report adatai alapján Magyarországon 5 717 STEMI esetet regisztráltak a 2022-es évben. Az Egyesült Államokban 73 eset/100 000 személy-év volt 2011-ben, azóta hospitalizációs adatok állnak rendelkezésre, 36/100 000 hospitalizációról számoltak be 2019-ben.

Az utóbbi években végzett kutatások jelentős mértékben hozzájárultak e betegségek hátterének, patomechanizmusának jobb megértéséhez, számos kérdés azonban továbbra is megválaszolatlan maradt. Ma már egyértelmű, hogy a trombózisok multifaktoriális betegségek, számos genetikai determinánssal a hátterükben. Annak ellenére, hogy mind az artériás, mind a vénás trombózisok igen jelentős heritabilitással rendelkeznek (egyed tanulmányokban akár 25-30% is lehet ez az érték), a trombózis hajlam, a visszatérő trombózisok, illetve az artériás trombózisok genetikai hátterének az ismerete még ma sem teljes. Számos nyitott kérdés merül fel egyrészt az ismert "trombofilia gének"-ben található mutációk funkcionális következményeinek vonatkozásában, az egyes trombofilia tényezők artériás trombózisokban, illetve egyéb biokémiai folyamatokban betöltött szerepével kapcsolatban, valamint még

jelenleg is vannak ismeretlen eredetű familiáris trombózisok, ahol a genetikai tényező felderítetlen. A hemosztázis elemei nyilvánvalóan szerepet játszanak e folyamatokban, habár nem minden tényezőről áll rendelkezésre kellő bizonyíték arra nézve, hogy veleszületett, vagy szerzett rendellenessége esetén milyen mértékű trombózis kockázattal kell számolni, illetve, hogy az egyes genetikai variánsok klinikailag relevánsak-e. A genetikai determinánsok vizsgálata (kandidáns gén analízisek, nagy áteresztőképességű módszerekkel történő exom vagy genom szintű vizsgálatok) mellett a trombusok összetételének mélyebb vizsgálata is segíthet a koaguláció elemeinek trombusképződésben betöltött szerepének meghatározásában. Jelen tanulmány első része koronária trombus evolúciójának mélyebb megértésére törekszik, annak friss, lítikus és organizált fázisaiban megjelenő molekuláris és sejtes alkotóelemek részletes feltérképezésével. Ezen kitűzött cél eléréséhez konfokális mikroszkópos immunfluoreszcens elemzéseket használtunk fel, melynek során mennyiségi és kolokalizációs analíziseket végeztünk, melyek a trombusképződés kulcsmolekuláira és sejtes elemekre irányult. Vizsgálatunk fő elemét képezte a fibrin, az α 2-plazmin-inhibitor (α 2-PI) és a faktor XIII (FXIII) mennyiségi változásainak nyomon követése a trombus evolúciója során. Továbbá az aktivált protein C/protein C (APC/PC), a neutrofil extracelluláris csapdákat jelző marker, a citrullinált H3 hiszton és a CD66b közötti kapcsolatot térképeztük fel az egyes trombus fejlődési fázisokban. A kutatás eredményei elősegíthetik a kardiovaszkuláris események patogenezisének és a trombusképződés dinamikájának pontosabb megismerését, mely hozzájárulhat a személyre szabott kezelési stratégiák kidolgozásához.

Az értekezés másik szerves része a PROCR gén p.Ser219Gly (rs867186) polimorfizmusának szerepét vizsgálja VTE kialakulásában és rekurrens trombózisokban eset-kontroll vizsgálat és metaanalízis módszerével. Statisztikai elemzések során arra kerestük a választ, hogy az rs867186 polimorfizmus milyen mértékű kockázatemelkedést jelent a VTE kialakulásában és a rekurrens trombózisban. Megvizsgáltuk a tradicionális trombózis kockázati faktorokat (úgy mint a FV Leiden és protrombin 20210G>A mutációk) és e genetikai tényező kölcsönhatásait, amelyek együttes jelenléte potenciálisan additív, vagy szinergista hatást gyakorolhat a VTE kockázatára. Ezenkívül, a MetaGenyo szoftverrel végzett új metaanalízisünk megbízhatóságát is vizsgáltuk, összevetve a korábbi metaanalízisek eredményeivel a módszertani reprodukálhatóság megállapítása végett. Kutatásunk eredményei hozzájárulhatnak a VTE-vel kapcsolatos rizikóstratifikáció pontosításához.

1.1 Koronária trombózis

A plakkok diszrupciója (rupturája és eróziója) és a koronária trombusképződése az akut koronária szindróma (ACS) leggyakoribb mechanizmusai. Az akut koronária szindróma egy komplex, átfogó klinikai entitás, amely különböző súlyosságú kórképeket foglal magába, úgymint az ST-elevációs miokardiális infarktust (STEMI), a nem ST-elevációs miokardiális infarktust és az instabil anginát is. Ezek közül is az ACS legsúlyosabb formája az ST-elevációs miokardiális infarktus (STEMI), melyet EKG-n megfigyelhető, perzisztáló ST-szakasz eleváció jellemez, utalva a koronária artéria teljes elzáródására.

A STEMI patofiziológiai hátterében az ateroszklerózis áll - egy lipoprotein vezérelt folyamat-amely intima gyulladás, fibrosis, kalcifikáció és nekrozis révén az artériás rendszer specifikus helyein plakk képződéshez vezet. Ezen ateroszklerotikus plakkok lipid-gazdag magjának és szubendotheliális mátrixnak a vérárammal érintkezése aktiválja azt a folyamatot, mely a vérlemezkéket és a koagulációs kaszkádot aktiválja, elindítva a koronária trombusképződést.

A 2008-as európai (ESC) és amerikai (ACC/AHA) irányelvek szerint - TAPAS vizsgálat (1071 beteg) eredményei alapján - az ST-elevációs miokardiális infarktusból a manuális trombektómiát és a trombusaspirációt korábban IIa (ésszerűen megfontolandó) ajánlási osztállyal javasolták alkalmazni. A TAPAS vizsgálat elsőként mutatott ki a miokardiális perfúzióban szignifikáns javulást és ezenkívül csökkent mortalitást is, amennyiben az elzáródott koronáriából a trombus eltávolításra került. A 2008-as TAPAS vizsgálatot követően a későbbi multicentrikus vizsgálatok azonban már nem igazolták a fentiekben taglalt előnyöket: a 2013-as TASTE (7244 beteg) tanulmány mortalitási előnyt nem tudott kimutatni, és a 2015-ös TOTAL (10732 beteg) vizsgálat pedig nemcsak, hogy nem tudott klinikai előnyt kimutatni, de ezen túlmenően a stroke fokozott kockázatát mutatta ki a trombektómián átesettek csoportjában. Így, a TASTE és a TOTAL vizsgálatok eredményei a 2008-as irányelvet követően jelentős paradigmaváltást hoztak: 2014-ben IIb (megfontolható) ajánlási osztályra minősítették vissza és 2018 óta rutinszerűen nem ajánlott, IIIa ajánlási szintet kapott a koronária trombusaspiráció.

A betegek klinikai és demográfiai jellemzői, a koronária elzáródás helye, a koronária intervenció típusa, a nekrozis mértéke és az azt követő gyulladással összefüggő tényezők — melyek jellemezhetőek az ateroszklerotikus rizikófaktorok meglétével, a trombus terhelés mértékével, a disztális embolizáció kialakulásával, a mikrovaszkuláris obstrukció mértékével („thrombolysis in myocardial infarction flow”, a koronária áramlás mértékének kifejezése, a TIMI áramlással és „myocardial blush grade”, a miokardium perfúziójának angiográfias

jellemzője, MBG-vel leírva), valamint a gyulladáshoz kapcsolódó markerek szintjével — már képezték klinikai vizsgálatok tárgyát különböző trombusaspirációs tanulmányokban.

Azonban az a kérdés továbbra is megválaszolatlan maradt, hogy miért nem mutatkozik előnyösnek a trombus eltávolítása a rövid és hosszú távú mortalitás tekintetében, ahogyan azt a legutóbbi, nagy betegszámon végzett vizsgálatok és metaanalízisek állítják. Az ugyanis ismert, hogy a miokardiális infarktus halálozása szoros összefüggést mutat a trombus terheléssel és a mikrovaszkuláris obstrukciós paraméterekkel. Azt is tudjuk, hogy a trombus aspirációja nyilvánvalóan javítja a mikrovaszkuláris perfúziót és csökkenti a trombus terhelést. Ennek ellenére még mindig nem világos, miért nem javítja a trombusaspiráció a mortalitást a klinikai vizsgálatokban. A vérrög kora, mint prediktor egy érdekes, de eddig mélyebben nem vizsgált kérdés. A mai napig megjelent trombusaspirációs tanulmányokban általában rutin laboratóriumi paramétereket nem vizsgálnak, és a betegekkel kapcsolatos klinikai paramétereket nem írják le, továbbá nem hasonlítják azokat össze a trombus korának megfelelően. Bár a legújabb irányelvek már nem támogatják a trombusaspirációt, korábban, amikor még gyakori beavatkozás volt – a terápiás célok mellett – lehetővé tette a koronária trombusok szerkezetének vizsgálatát és a trombus evolúciója során a trombus komponenseinek megjelenésében bekövetkező változások megfigyelését.

1.2 Koronária trombusban vizsgált molekulák és sejtes elemek jellemzői és trombusképződésben betöltött szerepük

A MI során keletkezett trombus kora és architektúrája közötti összefüggések, valamint a trombus különböző komponenseinek a trombus evolúció során történő megjelenése tekintetében az elmúlt évtizedben több vizsgálat is zajlott. A koronária trombusok elemzése fejlett képalkotó technikákkal jelentős kutatási fókuszterületté vált, és már néhány érdekes eredményt leírtak. A legtöbb tanulmányban a koronária trombusok szerkezetét hematoxin–eozin (H&E) festéssel vagy fibrinogén (fibrin), vérlemezkék és leukociták immunfestésével vizsgálták. Ezeknek a tanulmányoknak az eredményei szerint a koronária trombusok főként fibrinből, vérlemezkékből, eritrocitákból, koleszterinkristályokból és leukocitákból állnak, ahol a fibrin a domináns komponens. Megfigyelhető, hogy a trombusképződés egy dinamikus folyamat, amelyet az áramlás, a vérésejték és a plazmafehérjék szabályoznak. Feltételezik, hogy az iszkémiás állapotban eltöltött idő hatással van a trombus összetételére. Korábban megállapították, hogy a fibrin tartalom növekszik, míg a vérlemezke tartalom csökken az idő előrehaladtával, ami egy gyorsan fejlődő folyamatra utal akut koronária elzáródás során.

Nyilvánvaló, hogy a koaguláció fontos szerepet játszik a koronária trombusképződésében. Azonban a koagulációs faktorok (a fibrinogén kivételével) jelenlétét a trombusban alig vizsgálták. A véralvadási faktorok közül a XIII-as faktor (FXIII), egy zimogén transzglutamináz, a koaguláció végső fázisában vesz részt. A plazmában fibrinogénnel komplexet alkotva kering, mint két katalitikus A alegységből és két hordozó/gátló B alegységből álló heterotetramer. Az FXIII-A alegység jelen van különböző sejtekben is, beleértve a megakariocitákat, vérlemezkéket, monocitákat, makrofágokat és oszteoblasztokat. Trombin általi aktiválás után az FXIII-B elhagyja a komplexet, míg az aktivált FXIII-A (FXIIIa) a fibrinhez kötődik és keresztkötéseket hoz létre a fibrin γ - és α -láncai között; ily módon növeli a fibrinháló merevségét és a fibrinolízissel szembeni ellenállását. Ezenkívül az FXIIIa antifibrinolitikus hatásának egy része úgy valósul meg, hogy az α 2-plazmin inhibitor (α 2-PI), egy szerin proteáz inhibitor, keresztkötésekkel kapcsolja a fibrin α -láncaihoz. Az α 2-PI, amely a plazmin fő fiziológiás inhibitora, a keresztkötések után is teljesen aktív marad, és védi a kialakuló vérrögöt a spontán fibrinolízistől. Megjelenésüket és kapcsolatukat a koronária trombusban mindeztáig nem vizsgálták. Számos tanulmány rámutatott a neutrofil extracelluláris csapdák (NET-ek) jelentős szerepére a trombus stabilizációjában és jelenlétükre a koronária trombusban. Kimutatták, hogy a trombusok NET-tartalma változik az artériás helytől függően, és a koronária erekben 2,5-szer magasabb, mint a perifériás artériákban. A NET-ek fő összetevői a dekonzenzált DNS-váz és a hisztonok, elsődleges funkciójuk pedig a baktériumok csapdába ejtése és elpusztítása gyulladás esetén. Azonban a bakteriális invázió nem az egyetlen indukálója a NET képződésnek, és a NETózist a sejthalál következményének tekintik. A NET képződés szerepet játszik steril gyulladásban is, mint például az ateroszklerózis. Korábban kimutatták, hogy a NETózis elősegítheti a koagulációt; így hozzájárulhat a trombózishoz. Megállapították, hogy a NET-ek társulnak a szöveti faktorhoz, a XII-es faktorhoz, a X-es faktorhoz, az aktivált VII-es faktorhoz, valamint egy természetes antikoaguláns fehérjéhez, az aktivált protein C-hez (APC). A protein C-t (PC) a trombin aktiválja a trombomodulin (TM) és az endotheliális protein C receptor (EPCR), egy sejtfelszíni fehérje jelenlétében, amely a PC-t Gla doménjén keresztül köti és bemutatja a trombin-TM komplexnek. Az APC inaktiválja az aktív VIII-as és V-ös faktort, így az egyik legjelentősebb fiziológiás antikoaguláns a szervezetben. Az APC/PC citoprotektív molekulaként is ismert, amely megakadályozza a sejtes és szervi vaszkuláris sérüléseket. Az extracelluláris hisztonokról—a NETózis termékeiről—kimutatták, hogy hozzájárulnak az endotheliális diszfunkcióhoz, a szervi elégtelenséghez és a szepszis során bekövetkező halálhoz, és terápiásan célozhatók, különösen az APC által. Továbbá azt is kimutatták, hogy az APC

indukálja a hem-oxigenáz-1-et a makrofágokban, ami a trombus feloldódását eredményezi. Az APC/PC megjelenése a koronária trombusban és annak kapcsolata a NET-ekkel azonban nem ismert. A CD66b (más néven CEACAM8, azaz Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 8), a karcinoembrionális antigén (CEA) család egyik tagja, használható gyulladáshoz biomarkerként is, mivel részt vesz gyulladáshoz válaszreakciókban, potenciálisan fontos szerepet játszhat a NET képződési folyamatában. A neutrofil granulociták felszínén megtalálható és kimutatták, hogy gyulladáshoz stimulust követően, (különösen von Willebrand faktor jelenlétében) emelkedik a CD66b felszíni expressziója. A neutrofil granulociták szerepe a trombusképződésben, gyulladáshoz járó állapotokban, már ismert, így hasznos markernek tekinthető a gyulladáshoz- NET képződés- trombózis összefüggéseinek vizsgálatában.

Az aspirált koronária trombus minták értékelése fejlett képalkotó technológiákat igényel, amelyek lehetővé teszik a koronária trombus összetételének és szerkezetének elemzését. A területen elsődlegesen használt fejlett technikák a spektrális hisztopatológia, a multiphoton mikroszkópia és a nagy felbontású mikroszkópia, mint például az elektronmikroszkópia (transzmissziós elektronmikroszkópia, pásztázó elektronmikroszkópia) és a konfokális mikroszkópia. A jelenlegi tanulmányban az aspirált és festett koronária trombus metszeteket konfokális lézerpásztázó mikroszkópiás analízisnek vetettük alá, ahogy mások is ezt a vizsgálati módszert választották.

1.3 Vénás tromboembólia és genetikai háttere

A vénás tromboembóliának (VTE) két lehetséges megjelenési formája a mélyvénás trombózis (DVT) és a tüdőembólia (PE). A VTE gyakori kardiovaszkuláris betegség; az öt leggyakoribb vaszkuláris betegségek egyike. Az éves incidenciája 1-2 eset per 1000 személy, sőt, a kórházban kezelt betegek között elérheti az 1 per 100 egyént is. Az American Heart Association (AHA) Heart Disease and Stroke Statistics—2023 jelentése alapján az Egyesült Államokban 2019-ben (amikor az USA lakossága 328 millió volt) hozzávetőlegesen 1 036 000 VTE-esetet regisztráltak. Az európai országokban a VTE incidenciája jellemzően 1.4–3.2/1000 fő/év között mozog. A VTE-betegek esetében intrinsic (veleszületett) és környezeti kockázati tényezők ismertek, különösen, mivel számos jól definiált patogén mutáció létezik az antitrombin (AT), a Protein C (PC) és a Protein S (PS) génjeiben (SERPINC1, PROC, illetve PROS1), amelyek befolyásolhatják a trombózis kockázatát, valamint a természetes antikoagulánsok szintjét. Noha az AT-, PC- és PS-hiány ritka, ám erős VTE-rizikófaktor, ezért ezek rutinszerűen szerepelnek a thrombophilia kivizsgálási protokolljában. Az öröklött thrombophilia kivizsgálása során – a

nemzetközi ajánlásoknak megfelelően – előbbieket mellett az V-ös alvadási faktor Leiden mutációja (FV Leiden, p.Arg506Gln) és a protrombin gén 20210A allél jelenlétét is vizsgálják. Az endothelialis Protein C receptor (EPCR), ami a PC aktiváció egyik kulcsmolekulája – legyen szó akár plazmaszintjéről, akár a PROCRCR gén genetikai variációjáról – jelenleg nem képezi a rutin kockázatértékelés részét, hiszen jelentős trombózis kockázat fokozódással járó genetikai variánsai eddig nem ismertek.

A VTE ugyanakkor tipikus példája a gyakori, komplex betegségeknek, ahol számos genetikai tényező egyszerre játszhat szerepet, és ahol gén–gén, illetve gén–környezet kölcsönhatások alakítják ki a fenotípust, azaz ebben az esetben a VTE és a rekurrens VTE kockázatának mértékét. Éppen ezért az egyéni kockázatbecslés stratégiája racionális megközelítés a beteg személyes trombózis- és kiújulási kockázatának felmérésére. Ilyen komplex betegségek esetében az egyes gének és variánsai (melyek általában gyakoriak, azaz minor allélgyakoriságuk, MAF, legalább 0.1) által képviselt kockázat önmagában nem feltétlenül jelentős, azonban együtt hatva különböző mértékben fokozhatják a VTE kialakulásának esélyét. Továbbá, a gyakori génvariációk és a VTE közötti összefüggések vizsgálata segíthet populáció szinten jellemezni a VTE háttérben álló genetikai determinánsok jelentőségét.

A Protein C (PC) egy természetes, endogén antikoaguláns fehérje gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal, amely kölcsönhatásba lép az EPCR-rel. Az EPCR elősegíti a protein C aktiválását az endothél sejtek felszínén. A transzmembrán EPCR-rel ellentétben az oldható (sEPCR) forma nem rendelkezik transzmembrán doménnel, és a transzmembrán formához képest ellentétes hatást fejt ki, azaz az sEPCR gátolja a PC aktivációját, továbbá az aktivált PC (APC) antikoaguláns hatását is.

Vannak olyan egy pontos nukleotid polimorfizmusok (SNP-k), amelyek befolyásolják a keringő protein C szintjét. Az endothelialis protein C receptor (PROCRCR) génjében (20q11) található rs867186 diallélikus SNP (NC_000020.11:g.35176751 A>G, c.655 A>G, p.Ser219Gly, MAF 0,10) p.Ser219Gly aminosavcserét eredményez, amely növeli a membránhoz kötött EPCR-hez viszonyítva az oldható sEPCR szintjét. Ez a variáció a plazma oldható, sEPCR-szintjének 75%-os változékonyságát magyarázza, és a PC-szintre is hatással van.

Újabban már genom szintű asszociációs vizsgálatok (GWAS) eredményei is rendelkezésre állnak. A MARTHA projektben szignifikáns összefüggést írtak le a PROCRCR rs867186, a PROCRCR rs6060278 (NC_000020.11:g.35165459 T>C, MAF 0.23) és a PROCRCR rs8119351 (NC_000020.11:g.35166602 G>A, MAF 0.09) polimorfizmusok, valamint a PC-szintek között VTE-betegekben, amely a variancia 20%-át magyarázza. A rs6060278 erős negatív kapcsoltságú egyensúlyban (LD) állt ($r^2 = 0.03$, $D' = -1$) a p.Ser219Gly variánsal Germain és

munkatársai tanulmánya szerint. Az ő vizsgálatukban a vénás trombózis (VT) korrigált esélyhányadosa (OR) 1.33 volt (95% megbízhatósági tartomány (CI): 1.11–1.60) az rs867186 „G” allél jelenlétében. Ugyancsak kimutatták, hogy a PROCR rs6088735 (NC_000020.11:g.35157873 C>T, MAF 0.22) növeli a VTE kockázatát. A PROCR rs8119351 G>A változat magasabb PC-szinthez vezet, de ennek mechanizmusa nem ismert.

Míg az rs867186 „A” allél a H1, H2 vagy H4 haplotípust jelezheti, addig az rs867186 „G” allél kizárólag a H3 haplotípussal társul az EPCR esetében. A p.Ser219Gly variáns fokozott oldható EPCR-szintet eredményez, ami az EPCR fokozott hasítását (shedding) tükrözi az endothél membránról. Az EPCR p.Ser219Gly variáns és a magasabb oldható EPCR- és változó plazma PC-szint közötti összefüggés mechanizmusa nem tisztázott. Számos korábbi tanulmány vizsgálta az EPCR gén p.Ser219Gly polimorfizmusának és a VTE kockázatának összefüggését, ám eredményeik heterogének voltak. Emellett két metaanalízis is készült a témában.

Az utóbbi időben továbbra sem egyértelműek a bizonyítékok az EPCR gén p.Ser219Gly polimorfizmus és a vénás trombózis közötti összefüggéssel kapcsolatban. Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy az rs6088735 és az rs867186 polimorfizmusok additív módon hathatnak a VTE kockázatára.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen kutatás elsődleges célja a trombózis események vizsgálata, különös tekintettel a koronária trombus evolúciójának (nevezetesen friss, lítikus és organizált fázisainak) mikroszkópos immunfluoreszcens elemzése, feltárva a trombusképződés során megjelenő kulcsmolekulákat és sejtes elemeket. Ezen belül:

- A fibrin, a faktor XIII (FXIII) és az α 2-plazmin-inhibitor (α 2-PI) mennyiségi változásainak nyomon követése a koronária trombusképződés során.
- Továbbá, az aktivált protein C/protein C (APC/PC), neutrofil extracelluláris csapdát jelző marker (citruinált H3 hiszton) és CD66b kapcsolatának feltérképezése, mennyiségi változásainak nyomon követése a koronária trombus evolúciójának különböző fázisaiban.

Ezenkívül, vizsgálatunk célja volt a rutin laboratóriumi paraméterek és a betegekkel kapcsolatos klinikai tényezők vizsgálata a trombus korának tükrében. Arra kerestük a választ, hogy vajon a trombus kora és tömege mutat-e összefüggést a laboratóriumi és klinikai tényezőkkel, valamint a mortalitással.

Jelen kutatás másik szervez részében a fő célunk az volt, hogy a PROCR gén p.Ser219Gly (rs867186) polimorfizmus szerepét megvizsgáljuk a vénás tromboembólia (VTE) kialakulásának és kiújulásának tükrében, mely vizsgálati kérdés megválaszolásához az általunk kivitelezett eset-kontroll vizsgálat és metaanalízis eredményeit kívántuk felhasználni. Ezen belül célunk volt:

- A statisztikai és metaanalízis módszerek használatával feltárni, hogy milyen mértékű kockázatemelkedést jelent az rs867186 polimorfizmus hordozása a VTE első előfordulásában, valamint a rekurrens trombózisban.
- A hagyományos trombózis kockázati tényezők (úgy mint FV Leiden, protrombin 20210G >A) és a rs867186 asszociációjának jellemzése.
- Az új, MetaGenyo szoftverrel végzett metaanalízis módszertan megbízhatóságának vizsgálata, reprodukálhatósági analízis.

3. BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Koronária trombusok vizsgálata akut miokardialis infarktusbán

3.1.1 Koronária trombólison átesett páciensek klinikai és rutin laboratóriumi jellemzése

A Debreceni Egyetem Klinikai Központ Kardiológiai Klinikája egy nagy betegforgalmú intézmény, évente körülbelül 700–750 primer PCI (pPCI) eljárással. A 2012 januárja és 2018 decembere között kezelt, STEMI-ben szenvedő betegeket ($n = 164$) vontuk be a tanulmányba, akiknél a tünetek kezdetétől számított 48 órán belül két vagy több szomszédos elvezetésben $\geq 0,2$ mV ST-szegment eleváció igazolta a STEMI-t, és alkalmasak voltak PCI-re. A pPCI előtt 5000 NE heparint, valamint telítő dózisban aspirint (250–500 mg) és clopidogrelt (600 mg) kaptak. Ebben az időszakban a koronária trombusaspiráció még elsővonalbeli terápiás eljárás volt. Két különböző trombusaspirációs rendszert használtunk: QuickCat (The Spectranetics Corporation/Philips Healthcare, Colorado Springs, CO, USA) és ASAP (Merit Medical Systems, Inc., South Jordan, UT, USA). Az alkalmazott aspirációs eszközök 6F-kompatibilisek voltak, a QuickCat esetében 0.86 mm^2 , az ASAP eszköz esetében 1.0 mm^2 kivonási lumen területtel. Ismert, hogy az aspiráció hatékonyságát főként a kivonási lumen területe határozza meg, amely nem mutatott jelentős különbséget a két eszköz között. Az aspirációs eszköz kiválasztása a beavatkozást végző belátására volt bízva. Az aspirált trombusokat feldolgoztuk, ha elegendő mennyiség állt rendelkezésre további elemzéshez. Minden trombus tömegét megmértük, mielőtt beágyasztuk a Thermo Scientific Shandon Cryomatrix Frozen Embedding Mediumba (Thermo Shandon, Pittsburg, PA, USA) és folyékony nitrogénnel lefagyasztottuk. Ezt követően a mintákat $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk az analízisig. A trombus minták egy másik részét fixáltuk és paraffinba ágyasztuk. A koronária embóliából ($n = 18$), véna szaféna graftból (SVG, $n = 8$) és sztent trombólisból ($n = 13$) származó koronária trombusokkal rendelkező betegeket a toborzás első lépésében kizártuk, mivel a jelen tanulmány fókuszában a natív koronária artéria plakk-ruptúrájával kapcsolatos trombusok vizsgálata állt. A mintanagyság számítása a trombus tömege és a halálzási arány (ami a nemzeti infarktuszregiszterünk alapján kalkulálva legalább 0,1; Jánosi A. *Cardiologia Hungarica* 2022;52:226-33.) alapján történt, ahol (0,05 mint I. fajú hiba és 0,80 mint statisztikai erő) a kockázati arányt 3,5-re, a lemorzsolódási arányt 15%-ra állítottuk. Az első és másodfajú hiba értékeit és a lemorzsolódási arányt az irodalom alapján, a kockázati arányt pedig klinikai tapasztalatból fakadó megfontolás alapján állítottuk be. E számítás alapján mindkét csoportban (azaz 20 mg alatti és feletti trombus tömeggel rendelkező betegek) $n = 60$ fő mintanagyság adódott. Ennek alapján tanulmányunkba bevontunk egymást követő, az aspiráció során eltávolított alacsony és magas trombus tömeggel rendelkező

betegeket, n = 65 és 60 főt. A klinikai paramétereket—mint életkor, nem, az ateroszklerózis rizikófaktora, testtömegindex (BMI), a mellkasi fájdalom és a trombusaspiráció között eltelt idő—és a beteg felvételekor meghatározott laboratóriumi paramétereket—mint vérsejtszámok, vesefunkció (glomeruláris filtrációs ráta, eGFR) és C-reaktív fehérje (CRP) szintek—a saját orvosi adatbázisunkból nyertük ki. A szérumban kreatinint (az eGFR számításához), CRP-t és kreatin-kinázt (CK) Roche reagensekkel mérték Cobas analizátoron (Roche, Mannheim, Németország). A vérképet Sysmex hematológiai analizátorral vizsgálták (Sysmex, Kobe, Japán) a Laboratóriumi Medicina Intézetben. Az angiográfiás paramétereket, mint a koszorúér-betegség kiterjedése, a beavatkozás előtti és utáni TIMI áramlás (azaz TIMI - thrombolysis in myocardial infarction flow), a lézió hossza és átmérője, a disztális embolizáció előfordulása, valamint az infarktussal érintett artéria (IRA) miokardiális blush grade (MBG) a betegekre vonatkozó elektronikus adatbázisból és a koronária angiográfiák vizuális újraértékelésével gyűjtöttük össze. A TIMI áramlás fokozata 0 volt, ha nem volt anterográd áramlás az elzáródáson túl; az 1-es fokozatot akkor definiáltuk, ha a kontrasztanyag átjutott az elzáródáson, de a disztális részek nem telítettek teljesen a koszorúeret; a 2-es fokozat részleges perfúziót és a koszorúér-ág teljes telítettségét jelentette, de a kontrasztanyag lassabban ürült ki disztálisan; a 3-as fokozat teljes perfúziót és anterográd áramlást jelentett gyors disztális kiürüléssel az elzáródás után. Az MBG=0 azt jelentette, hogy a kontrasztanyag nem jutott be a mikrokeringésbe, ami nem eredményezett "blush" jelenséget, jelezve a szöveti szintű perfúzió hiányát. Az MBG=1 akkor volt, ha a festék lassan jutott be, de nem tudott kilépni a mikrokeringésből (a festék több mint 30 másodpercig volt jelen a miokardiumban); az MBG=2 a kontrasztanyag késleltetett be- és kilépését jelentette a mikrokeringésből, és a kontrasztanyag három szívciklus után is megmaradt, de 30 másodpercen belül kiöblítődött; az MBG=3 normál be- és kilépést jelentett a festék számára a mikrokeringésből, és három szívcikluson belül teljesen kiürült a szövetből. Az MI-t akutnak osztályoztuk, és az aspirált trombus frissnek tekintettük, ha kevesebb mint 12 óra telt el a mellkasi fájdalom kezdete és a trombusaspiráció között és/vagy a felvételi kreatin-kináz (CK) szint kevesebb volt, mint a normál felső határának kétszerese. A 12 és 24 óra között, valamint a mellkasi fájdalom kezdete után több mint 24 órával aspirált trombusokat és/vagy ha a felvételi CK-szint több mint a normál felső határának kétszerese volt, vagy már a felvételi csúcsot mutatott, szubakutnak, illetve későinek osztályoztuk.

A betegektől tájékozott beleegyezést kaptunk. A munkát a Helsinki Nyilatkozatban lefektetett elveknek megfelelően végeztük, amelyet a 2008-as Szöulban, Dél-Koreában tartott Orvosi

Világszövetség közgyűlésén módosítottak. A tanulmány etikai jóváhagyását az Országos Etikai Bizottságtól szereztük meg (3166/2012/HER).

3.1.2 Koronária trombus minták immunhisztokémiai és immunfluoreszcens analízisének módszertani bemutatása

A trombusaspiráció után a trombus minták egy részét fixáltuk és paraffinba ágyaztuk. A metszeteket sorozatban 5 µm vastagságúra vágtuk (Cryostat, Leica CM1860 UV, Nussloch, Németország). Ezeket a mintákat morfológiai jellemzők vizsgálatára használtuk; ezért H&E (hematoxilin–eozin) festéssel megfestettük őket, majd független patológus vizsgálta és értékelte.

A trombus minták másik részét folyékony nitrogénben mélyfagyasztottuk és –80 °C-on tároltuk többszörös immunfluoreszcens festés és konfokális lézerpásztázó mikroszkópos analízisig. Ebben az esetben az összes trombus mintából egymást követő 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket többszörösen festettünk *fibrinogén*, *FXIII* és *α2-PI* vagy *APC/PC*, *hiszton H3* és *CD66b* ellen. Az alábbi antitesteket és hígítási arányokat használtuk: egér monoklonális anti-humán α2-PI antitest FITC-vel konjugálva, hígítási arány: 1:100 (in-house fejlesztett, minden α2-PI formával reagál); poliklonális nyúl anti-humán fibrinogén antitest (ab34269, Abcam, Cambridge, UK), hígítási arány: 1:100, melyet Alexa Fluor® 568-al jelölt kecske anti-nyúl IgG (H + L), hígítási arány: 1:500 (A11011) ellenanyaggal használtunk; egér monoklonális anti-humán FXIII-A alegység antitest Alexa Fluor® 647-tel konjugálva (in-house fejlesztett), hígítási arány: 1:500; monoklonális egér anti-humán Protein C (AHPC-5071, Haematologic Technologies/CellSystems, Troisdorf, Németország), hígítási arány: 1:500; Dylight 488 anti-egér IgG (DI-2488, Vector Laboratories, Newark, NJ, USA), hígítási arány: 1:500; poliklonális nyúl anti-hiszton H3 (citrullin R2 + R8 + R17) antitest – CHIP Grade (ab5103, Abcam, Cambridge, UK), hígítási arány: 1:400; és kecske anti-nyúl IgG Alexa Fluor® 568, valamint egér monoklonális anti-humán CD66b Alexa Fluor® 647-tel konjugálva (305109, BioLegend, San Diego, CA, USA), hígítási arány: 1:100. Minden metszetet Hydromount vízalapú fedőmédiával (NAT1324, National Diagnostics/Scientific Laboratory Supplies, Nottingham, UK) fedtünk le. A mélyfagyasztott trombus mintákat H&E festéssel is megfestettük, mely mintákat független patológus vizsgálta és értékelte.

A képeket Olympus FluoView 3000 konfokális mikroszkóppal (Olympus, Tokió, Japán) rögzítettük, és a képanalízishez annak multi-area time-lapse (MATL) szoftvermodulját használtuk. A friss, lítikus és organizált trombusok konfokális képeit ugyanazzal a lézerintenzitással és detektorszenzitivitási beállításokkal készítettük a megbízható és

következetes átlagos fluoreszcenciaintenzitás (MFI) mérések biztosítása érdekében. A H&E metszeteket Panoramic Confocal mikroszkóppal digitalizáltuk, és Panoramic SlideViewer (2.3 verzió) (3DHISTECH, Budapest, Magyarország) segítségével elemeztük (beleértve a morфомetriai méréseket is). A koronária trombus minták konfokális képeinek elemzéséhez a nyílt forráskódú Fiji (2.3 verzió) (Fiji Is Just ImageJ) szoftvert használtuk. A konfokális fluoreszcens képek különböző jellemzett elemeinek kvantifikálásához egy standardizált, korábban jól részletezett, publikált módszert adaptáltunk. A kolokalizációs analízis eredményeit Pearson korrelációs együtthatóként (PCC) határoztuk meg, mely számításhoz a Fiji JaCoP pluginjét használtuk.

3.1.3 Statisztikai analízis

A folytonos változók eloszlását Kolmogorov–Smirnov teszttel vizsgáltuk. Normál eloszlás esetén a folytonos változókat (életkor) átlag \pm SD formájában adtuk meg, míg nem normál eloszlás esetén medián és interkvartilis tartomány (IQR) formájában (BMI, ejekciós frakció (EF), fehérvérsejt-, neutrofil-, eozinofil-, monocita-, trombocitaszám, eGFR, CRP és CK). A betegek kategorikus változói közötti különbségeket χ^2 teszttel vizsgáltuk. A folytonos változók közötti különbségeket a különböző betegcsoportok között t-próbával, ANOVA-val vagy Mann–Whitney U teszttel és Kruskal–Wallis teszttel elemeztük. Pearson vagy Spearman korrelációs analízist végeztünk a paraméterek eloszlása szerint. Logisztikus regressziós modellt használtunk a klinikai és laboratóriumi tényezők trombusaspiráció utáni egyéves mortalitással való összefüggésének vizsgálatára. A statisztikai elemzést a Statistical Package for Social Sciences (SPSS 28.0 verzió) szoftverrel végeztük, Chicago, IL, USA. A 0.05 vagy annál kisebb p-értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

3.2 Metaanalízis és obszervációs eset-kontroll tanulmány vénás tromboembóliában

3.2.1 Vizsgálati populáció kiválasztása az eset-kontroll tanulmányhoz és a metaanalízishez

Vizsgálatunk populációját VTE-anamnézissel rendelkező, egymással nem rokon egyének (n = 263) és látszólag egészséges, nem rokon felnőtt kontrollszemélyek (n = 320) alkották.

A Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar, Laboratóriumi Medicina Intézet, Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszéke 2014 februárja és 2015 januárja között, egy éven keresztül, folyamatosan toborozta a VTE-eseteket. A VTE diagnózisa standard diagnosztikai eljárásokkal, úgymint color Doppler ultrahanggal vagy flebográfiával került megállapításra a

Belgyógyászati Klinikán. A trombózis meghatározása a Trombózis és Haemostasis Nemzetközi Társasága (ISTH) irányelvei szerint történt.

A VTE diagnózisát megelőző 1 hónapon belül fellépő szerzett kockázati tényezőket – úgymint trauma, műtét, akut betegség miatti kórházi kezelés, centrális vénás katéter, immobilizáció, terhesség, orális fogamzásgátló alkalmazása, hormonkezelés, elhúzódó utazás, L-aszparagináz kezelés, valamint a pozitív családi anamnézis és a szerzett kockázati tényezők jelenléte (például malignitás, paroxizmális nokturnális hemoglobinuria (PNH, Machiafava-Micheli szindróma), autoimmun betegségek, antifoszfolipid szindróma, testtömeg-index (Body Mass Index, BMI) emelkedés, visszértágulatok, nefrózis szindróma, szívelégtelenség és tartós immobilizáció) – mind rögzítésre kerültek.

A vizsgált időszakban toborzott egészséges önkéntesek esetében nem volt ismert véralvadási rendellenesség (pl. örökletes vérzékenység, trombofilia, vagy szerzett hemosztázis rendellenesség), illetve nem szedtek a véralvadást befolyásoló gyógyszereket (pl. K-vitamin-antagonistákat, heparint, új típusú orális antikoagulánsokat stb.); továbbá nem fordult elő vénás vagy artériás trombózis a kórtörténetükben (mélyvénás trombózis és tüdőembólia, szívinfarktus, iszkémiás stroke, perifériás artériás betegség).

Azokat a személyeket, akiknek antitrombin-, protein C- vagy protein S-hiánya volt, és ezt oki mutációk támasztották alá, kizártuk a teljes vizsgálati populációból. Szintén kizárásra kerültek a krónikus betegségekben szenvedők (autoimmun, daganatos, krónikus gyulladással, vese- vagy májbetegségek). A hipertónia, a cukorbetegség és ezek terápiaja engedélyezett volt a vizsgált alanyok körében. Nők, akik orális fogamzásgátlót (OAC) szedtek, szintén részt vehettek a vizsgálatban. A vizsgálatot a Helsinki Nyilatkozat elvei szerint, annak 2008-ban, a Koreai Köztársaságban, Szöulban a Nemzetközi Orvosszövetség által jóváhagyott módosításainak figyelembevételével végeztük. Az etikai jóváhagyást az Országos Etikai Tanács adta meg (3166/2012/HER)

3.2.2 Vérmintavétel és SNP-genotipizálás

A vérmintákat a könyökhajlati vénából, vakuténer csövekbe (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) vettük, melyek 1/10 térfogatnyi 0,109 M citrátot tartalmaztak antikoagulánsként. A citrátos vérminták buffy coat rétegéből a DNS-izolálást QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) felhasználásával végeztük. A FV Leiden és a protrombin (FII) 20210 G>A mutációk vizsgálatát standard molekuláris genetikai módszerekkel végeztük. A PROC, PROCR, PROS1 és SERPINC1 génekben elhelyezkedő 12

SNP-t vizsgáltunk az ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) felhasználásával, melyek közül ebben a tanulmányban kizárólag az EPCR p.Ser219Gly (rs867186) hatását elemeztük. Emellett figyelembe vettük két további PROCR polimorfizmus, az rs8119351 és az rs6088735 hatását is. A módszer lényege, hogy a termociklusos elongáció során SNP-specifikus primerekhez fluoreszcensen jelölt didezoxinukleotidokat (ddNTP-eket) építünk be, így azonosítva a vizsgált SNP-eket. A multiplex reakciókhoz használt PCR primereket és az egy pontos báziskiterjesztési (single base extension) primereket a Primer3Plus ingyenes online szoftverrel terveztük 58°C-os hibridizációs hőmérsékletre. A primereket az Integrated DNA Technologies (München, Németország) szintetizálta.

A PCR-amplifikációt és tisztítást követően a multiplex miniszekvenálást 10 µl-es reakcióterfogóban végeztük: 3 µl tisztított PCR-terméket, 2 µl SNP-specifikus primert és 5 µl SNaPshot reakciókeveréket alkalmazva. A szekvencia-amplifikáció 40 ciklusból állt, melyek során a denaturáció 96°C-on 10 másodpercig, a primerkötés 50°C-on 5 másodpercig, a primer meghosszabbítása pedig 60°C-on 30 másodpercig tartott. A felszaporított termékeket 0,7 µl SAP (garnéla alkalikus foszfatáz, Sigma-Aldrich, Steinheim, Németország) kezeléssel inkubáltuk, hogy megakadályozzuk a ddNTP-k további kötődését. A keveréket 37°C-on 60 percig, majd 75°C-on 15 percig inkubáltuk.

A SAP-kezelést követően a termékekből 0,5 µl-t 9 µl HiDi formamiddal (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) és 0,5 µl GeneScan 120-LIZ méretjelző standarddal (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) elegyítettünk, majd 95°C-on 5 percig denaturáltuk, ezt követően legalább 1 percig jégen tartottuk. A fluoreszcensen jelölt fragmentumok szétválasztását POP7 polimerben ABI 3130 Genetic Analyzeren (Applied Biosystems) végeztük. Az adatokat GeneMapper Software v4.1-el elemeztük.

A trombofilia kivizsgálásának részeként antitrombin-, protein C- és protein S-hiányra vonatkozó plazmavizsgálatokat végeztünk Siemens reagensek (Innovance AT, Berichrom PC, Innovance free PS) felhasználásával BCS-XP automata koagulométeren (Siemens, Marburg, Németország). A plazmát 1500 g-n 20 percig történő centrifugálással szeparáltuk, majd 500 µl-es alikvótokat -70°C-on tároltuk a meghatározásig.

3.2.3 Eset-kontroll vizsgálat statisztikai elemzése

A demográfiai jellemzők és a PROCR rs867186 polimorfizmus genotípus-gyakoriságainak eloszlásában tapasztalható különbségeket a χ^2 -próbával vizsgáltuk a betegek és a kontrollok között. A PROCR rs867186 polimorfizmus és a VTE kockázata közötti összefüggések

értékeléséhez feltétel nélküli (unconditional) logisztikus regresszióval számoltuk ki a nyers OR-t 95%-os CI-vel, valamint a korrigált OR-t 95%-os CI-vel.

A folytonos változókat medián, minimum–maximum értékek és interkvartilis terjedelem (IQR) formájában fejeztük ki. Az IQR a 25. és 75. percentilis közötti tartományt jelöli. Az eset–kontroll vizsgálat statisztikai elemzését a Statistical Package for Social Sciences (SPSS 23.0, Chicago, IL, USA) és a Stata 17 (Statistical Software: Release 17; Stata Corp LLC, College Station, TX, USA) szoftverek segítségével végeztük. A $p \leq 0,05$ értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

3.2.4 Metaanalízis

A metaanalízist a magas módszertani minőség érdekében a Szisztematikus Irodalmi Áttekintések és Metaanalízisek Preferált Jelentéstételi Elemek (Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-analyses, PRISMA) ajánlásai alapján végeztük el.

3.2.4.1 Metaanalízis – irodalomkeresési stratégia

A primer irodalomkeresést a MEDLINE adatbázisban végeztük a következő keresőkifejezések kombinációjának felhasználásával: „6936A/G”, „rs867186”, „4600AG”, „thromboembolism”, „thrombosis”, „EPCR” és „PROCR”. A metaanalízisbe kizárólag azokat a tanulmányokat vontuk be, amelyek az EPCR gén polimorfizmusának és a vénás tromboembólia kockázatának összefüggését vizsgálták. A jelenlegi keresést 2023 májusáig végeztük, és a keresési stratégia nyelvi megkötés nélkül történt.

3.2.4.2 Beválasztási és kizárási kritériumok

Az alábbi kritériumoknak megfelelő tanulmányokat választottuk be:

- (1) Az elérhető vizsgálatok az EPCR gén polimorfizmusa és a vénás tromboembólia kockázata közötti összefüggést vizsgálják;
- (2) Eset–kontroll vagy kohorszvizsgálatok;
- (3) A tanulmányok megfelelő allél- és/vagy genotípus-gyakorisági adatokat tartalmaznak az esetekre és a kontrollokra vonatkozóan.

A kizárási kritériumok pedig a következők voltak:

- (1) Nincs megfelelően megadva a prediktor és a kimeneti változó;
- (2) Áttekintő közlemények, absztraktok vagy konferenciaanyag;
- (3) Duplikált adatok.

3.2.4.3 Adatok kinyerése

Két független értékelő volt felelős az irodalom szűréséért és a bevont tanulmányokból származó adatok kinyeréséért. Az alábbi adatokat gyűjtöttük ki minden bevont tanulmányból: első szerző, a megjelenés éve, a minta mérete, az esetek és kontrollok száma, etnikai hovatartozás, további információk a vizsgálati populációról (életkor, nem, illesztési stratégia), valamint a genotípus- és allélmegoszlás az esetek és a kontrollok körében.

3.2.4.4 Adatszintézis és statisztikai elemzés a metaanalízishez és a reprodukálhatósági vizsgálathoz

A PROCR rs867186 polimorfizmus és a vénás tromboembólia kockázata közötti összefüggés meghatározásához az eltérő genetikai modellek alapján számított esélyhányadosokat (OR) és a hozzájuk tartozó 95%-os CI-értékeket alkalmaztuk. A genetikai asszociációs vizsgálatok metaanalízisekor különböző statisztikai modellek alkalmazhatóak a genotípus-fenotípus kapcsolatainak feltérképezésére.

Az egyik leggyakrabban alkalmazott megközelítés az allél kontraszt modell (vagy más néven allélikus modell), amely elsődlegesen a beteg és kontroll csoportok között az egyes allélek (G és A) előfordulási gyakoriságának különbségeit vizsgálja. Az allélikus modellben a vizsgálati populációnk egyes tagjai két alléllal járulnak hozzá az elemzéshez, úgy, hogy a genotípus-frekvenciákat allél-frekvenciákra alakítjuk át. Konverziót követően esélyhányadost (odds ratio, OR) és a hozzátartozó 95%-os konfidencia intervallumot kalkulálunk a két allél összehasonlítására. Az allélkontraszt modell fő előnye - az allélhatás additív feltétele mellett - a statisztikai erő maximalizálásában rejlik. Azonban, ha a populáció a Hardy-Weinberg-egyensúly ideális feltételeitől eltér, akkor az elemzés könnyen torzított, téves következtetéshez vezethet.

A recesszív modell (GG vs. GA+AA) használatakor azt feltételezzük, hogy a vizsgált allél (G) hatása csak és kizárólag homozigóta formában nyilvánul meg, így az elemzés során a GG genotípusú egyéneket a GA és AA genotípusúak egyesített csoportjával hasonlítjuk össze.

A domináns modellben (GG + GA vs. AA) arra keressük a választ, hogy vajon már egyetlen kockázati allél megléte is elegendő-e a fenotípusos hatás kiváltásához. A domináns modellben a GG és GA genotípusúak egyesített csoportját hasonlítjuk össze az AA genotípussal.

A homozigóta kontraszt modell (GG vs. AA) megközelítés a két homozigóta genotípus közötti különbségek kimutatására fókuszál, anélkül, hogy a heterozigóta genotípusúak köztes hatásai

befolyásolnák az eredményeket. Ennek következtében, a modellben kizárólagosan a két homozigóta genotípust (GG vs. AA) hasonlítjuk össze.

A homozigóta kontraszt modell gyakran erősebb kapcsolatot mutat, összehasonlítva más modellekkel, különösen azokban az esetekben, amikor a genetikai hatás dóziszfüggő. A heterozigóta kontraszt modell (GA vs. AA) a heterozigóta (GA) genotípusúak csoportját hasonlítja össze a vad típusú homozigóta genotípussal (AA).

A tanulmányunkban az alábbi genetikai modelleket alkalmaztuk:

AG vs. AA,

GG vs. AA,

GG + AG vs. AA (domináns modell),

GG vs. AG + AA (recesszív modell) és

G vs. A (allélkontraszt).

A G allélhoz tartozó kisebb allélgyakoriságot (minor allele frequency, MAF) vettük figyelembe. A tanulmányok közötti heterogenitás értékeléséhez Cochran-féle Q-statisztikát és I^2 -statisztikát alkalmaztunk. Az I^2 értéket a tanulmányok közötti heterogenitásból fakadó variáció százalékos arányának leírására használtuk. Az I^2 értékek 25%, 50% és 75% esetén alacsony, közepes és magas tanulmányok közötti heterogenitásról beszélhetünk. A Cochran-féle Q-teszt esetén a $p > 0.1$ értéket a vizsgálatok közötti heterogenitás szempontjából nem szignifikánsnak tekintettük. Ha nem volt kimutatható szignifikáns heterogenitás, akkor az inverz variancia súlyozott hatásméret-összegzést (inverse variance-weighted effects meta-analysis) alkalmaztuk; ellenkező esetben a véletlen hatású (random effect) modellt (DerSimonian–Laird-módszer) használtuk. Szenzitivitási elemzést végeztünk annak megállapítására, hogy az egyes bevont tanulmányok milyen mértékben befolyásolják az egyesített, "poolozott" eredményt. Az Egger-tesztet alkalmaztuk a közlési (publikációs) torzítás (publication bias) értékelésére, az eredményeket tölcserplot segítségével szemléltettük. A 0.05 vagy annál kisebb p-értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A metaanalízis statisztikai elemzését a MetaGenyo webes eszköz felhasználásával végeztük.

A MetaGenyo megbízhatóságának értékelése érdekében reprodukálhatósági vizsgálatot is végeztünk, melyben a MetaGenyo eredményeit összehasonlítottuk a korábban Dennis és munkatársai által STATA statisztikai szoftverrel kapott eredményekkel. A reprodukálhatósági vizsgálat során a MetaGenyo és a STATA platformokkal kapott eredmények százalékos eltérését mutattuk ki. Az összehasonlított paraméterek a következők voltak: az eltérés a Hardy–Weinberg-egyensúlytól (HWE), az asszociáció tesztje (OR és 95%-os CI), valamint a vizsgálatok közötti heterogenitás (I^2 és Cochran Q p-érték).

4. EREDMÉNYEK

4.1 A koronária trombusaspiráción átesett vizsgálati populáció általános jellemzői

A vizsgálati időszakban $n = 164$ betegnél végeztek koronária trombus-aspirációt; közöttük férfi dominancia volt megfigyelhető: $n = 115$ férfit és $n = 49$ nőt kezeltek. A betegek átlagéletkora 61.1 ± 11.9 év volt. A betegeket a koronária elzáródás háttere szerint osztályoztuk, ahol $n = 125$ esetben ateroszklerotikus koronária plakk-ruptúrával összefüggő natív koronáriaartéria-elzáródás (artery occlusion, AC) volt, $n = 18$ esetben koronária embólia, $n = 8$ esetben véna szaféna koszorúér-graft (saphenous coronary grafts, SVG) elzáródása, és $n = 13$ esetben sztent-trombózis fordult elő. A koronária elzáródás, koronária embólia, SVG és sztent-trombózis eltérő klinikai és patofiziológiai jellege miatt ezek az esetek kizárásra kerültek a jelen tanulmányból.

4.2 Rutin klinikai, laboratóriumi és angiográfias paraméterek vizsgálata

Az ateroszklerotikus koronária plakk-ruptúrával összefüggő esetek csoportján belül nem volt különbség az életkorban, a nemben és a klasszikus rizikófaktorokban (hipertónia, diabetes mellitus, hiperlipidémia és dohányzás) az akut, szubakut és kései megjelenésű betegek között. A beavatkozás előtti ejekciós frakció, TIMI áramlás, fehérvérsejt-, neutrofil- és thrombocitaszám, valamint az eGFR is hasonló volt a három alcsoportban, míg a monocitaszám a legmagasabb volt a későn érkezők esetében. Fokozatos és fordított összefüggések voltak megfigyelhetők a beavatkozás utáni TIMI áramlásban és az MBG értékekben a koronária elzáródás után eltelt idő függvényében. A CRP-szint fokozatos növekedést mutatott a koronária elzáródás után eltelt idővel. A CK-értékek a felvételnél—a várakozásoknak megfelelően—a szubakut esetekben voltak a legmagasabbak, és csak enyhe emelkedést mutattak az akut fázisban. Míg a trombus tömege a legmagasabb volt a későn érkezőkben, a PCI és a trombusaspiráció utáni egyéves prognózis nem függött a koronária elzáródás és trombus aspiráció között eltelt időtől. Vizsgáltuk azokat a klinikai és laboratóriumi markereket, amelyek hozzájárulhatnak a PCI utáni egyéves mortalitással jelzett rossz prognózishoz.

A teljes populációból $n = 121$ betegnél volt adatunk az egyéves túlélésről, akik közül $n = 17$ nem élte túl az egy évet a PCI után. Az idősebb életkor, a diabetes mellitus, az alacsonyabb felvételi ejekciós frakció, a gyenge beavatkozás utáni TIMI áramlás és MBG, a felvételnél magasabb fehérvérsejt-, neutrofil- és thrombocitaszám, az alacsonyabb eGFR, a magasabb CK-érték, valamint az aspirált trombus nagyobb tömege összefüggést mutatott az egyéves

mortalitással. Ezek közül az aspirált trombus nagy tömege (azaz 20 mg felett), a diabetes mellitus és a magasabb neutrofil sejtszám független prediktorai voltak a mortalitásnak a korrigált modellben. A magasabb egekciós frakció a felvételnél a jobb prognózis független prediktora volt.

A 20 mg alatti trombus tömeg jó negatív prediktív értéket mutatott az egyéves mortalitásra (NPV = 0.95), míg a pozitív prediktív érték alacsony volt (PPV = 0.23), és a ROC analízis 0.732 AUC értéket eredményezett (95% CI 0.600–0.863, $p = 0.002$).

Ezzel szemben az infarktussal érintett artéria (azaz LAD, CX vagy RCA) és az érintett erek száma (azaz egy-, két- vagy háromér-betegség) nem mutatott szignifikáns korrelációt a prognózissal. Az eljárás során bekövetkező disztális embolizáció gyakoribb volt azoknál a betegeknél, akik nem éltek túl, azonban a gyakorisági különbség statisztikailag nem volt szignifikáns. A beültetett sztent hossza és átmérője, a LAD hossza, valamint a proximális vagy disztális trombus lokalizáció nem mutatott szignifikáns összefüggést az egyéves mortalitással. Az aspirált trombus tömegének és a különböző klinikai és laboratóriumi tényezők közötti összefüggések vizsgálata során a trombus életkora (azaz akut-szubakut-késői), a felvételnél CK-szint és az infarktussal érintett artéria (IRA) szignifikáns korrelációt mutatott ($r = 0.278$, $p = 0.002$ a trombus életkorára; $r = 0.288$, $p = 0.001$ a CK-ra; és $r = 0.227$, $p = 0.011$ az IRA-ra). Magasabb aspirált trombus tömeg esetén tendencia mutatkozott a magasabb CRP-szintek felé ($r = 0.175$, $p = 0.059$).

4.3 A trombus életkorának meghatározása klasszikus hisztopatológiával

A koronária trombózis jól ismert dinamikus fejlődési folyamatát alapul véve, az aspirált trombusok életkorát H&E (hematoxilin-eozin) festéssel vizsgáltuk, és friss, lítikus vagy organizált kategóriákba soroltuk őket. A trombusok életkorát a korábban leírt kritériumok alapján osztályoztuk. A különböző életkorú trombusok közül kiválasztottunk 8 friss, 8 lítikus és 8 organizált trombus a további, konfokális mikroszkópiás vizsgálatokhoz.

Az H&E festéssel friss, lítikus és organizált kategóriába sorolt trombusok minden esetben megfeleltek a klinikai és laboratóriumi indexek alapján történt előzetes besorolásuknak.

A friss trombusban ép sejtes elemek és réteges struktúrák voltak megfigyelhetők. Ezek intracoronáriás masszák voltak heterogén szerkezettel, amely fibrinhálóból és ép vérsejtekből állt, úgymint granulociták, vérlemezkék és eritrocita aggregátumok.

A lítikus fázisban lévő trombusban a granulociták kollikvációja és karyorrhexise volt észlelhető. Ezeket a sejtek apoptózisa és a koagulációs nekrozis területei jellemzik, amelyek a sejtes elemek újraeloszlásával társulnak. Megfigyeltük a makrofágok megjelenését és a granulociták polarizációs hajlamát lítikus aktivitással a fibrinháló felszínén.

Az organizált trombusban a magas fokú szerveződés, a simaizomsejtek belső növekedése, a kötőszövet lerakódása és proliferációja voltak a fő hisztopatológiai jellemzők. A fibroblasztok belső felhalmozódása és a laza kötőszövet lerakódása volt megfigyelhető. A trombusok azonban nem voltak homogének, mivel gyakran az organizált, a lítikus változások és a friss trombus elemeinek jellemzőit mutatták ugyanazon mintákban egyidejűleg. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a hemosztázis faktorok jelenlétét a trombusokban és összehasonlítsuk megjelenésüket a trombus életkora szerint, az elemzés során kor-specifikus területeket (ROI, Region of Interest) határoztunk meg.

4.4 A hemosztázis fehérjék és a NET-ek markereinek megjelenése a koronária trombusokban az evolúció különböző szakaszaiban

Az $n = 164$ betegminta kezdeti feldolgozása után részletes elemzést végeztünk $n = 24$ férfi beteg koronária trombusán, akik ateroszklerotikus koronária plakk-ruptúrával összefüggő natív koronáriaartéria-elzáródásban (AC) szenvedtek, immunfluoreszcens festés és konfokális mikroszkópos analízis segítségével. A kizárólag férfi betegek bevonásával a jelenlegi tanulmány hatékonyan kiküszöböli az esetleges, nemhez kapcsolódó változókat, ezáltal növelve eredményeinek megbízhatóságát.

Az $n = 8$ betegtől származó friss trombusok egységes, réteges szerkezetet mutattak, amelyekben csak nagyon kis mértékben volt jelen a NET marker (citrullinált H3 hiszton) és a CD66b marker. Pontosabban, a friss trombusokban volt a legkisebb arányban jelen a NET marker, átlagos fluoreszcenciaintenzitás (MFI) értéke 8.176 ± 0.72 (átlag \pm SEM).

Hasonlóképpen, a friss koronária trombusok alacsony szintű $\alpha 2$ -PI-t mutattak; ennek a markernek az MFI értéke 12.31 ± 1.22 volt. A PC/APC, CD66b, fibrinogén és FXIII MFI értékei sorrendben 34.3 ± 2.26 , 16.1 ± 2.28 , 26.5 ± 2.24 és 33.4 ± 3.68 voltak. Morfológiai megjelenés szempontjából az $\alpha 2$ -PI pontszerű struktúrát mutatott, ami megfigyelhető volt a NET és a CD66b esetében is.

Ahogy várható volt, a fibrin már a trombusképződés korai fázisában jól felismerhető struktúrákat mutatott. Az APC/PC és az FXIII markerek szintje is jelentős volt a friss trombusokban. A fibrinszálak, mint egy vázként töltötték ki az egész trombust. Az FXIII ugyanazon a helyen volt detektálható, nem pontszerű, hanem inkább egy folytonos struktúraként jelent meg a fibrin mellett, továbbá a kolokalizáció elemzése erős korrelációt mutatott a fibrinnel (Pearson korrelációs együttható (PCC) 0.65 ± 0.01 volt). Az APC/PC az egész trombus területét elfoglalta, és nem pontszerű struktúraként jelent meg.

A vizsgált markerek intenzitása jelentősen megváltozott a trombus evolúciójának következő szakaszában (lítikus fázis). A NET marker MFI értékei (25.8 ± 3.72), a CD66b (27.0 ± 3.56) és az $\alpha 2$ -PI (22.6 ± 2.41) növekedtek, és az $\alpha 2$ -PI esetében a különbség statisztikailag szignifikáns volt az előző (friss) fázisban mért mennyiségéhez képest. A fibrin mennyisége (43.15 ± 3.36) szintén jelentősen megnövekedett a friss trombusok esetében mért mennyiséghez képest. Az FXIII mennyisége (42.1 ± 4.6) enyhén emelkedett a lítikus trombusokban, míg az APC/PC intenzitása (32.3 ± 3.36) állandó maradt. Az $\alpha 2$ -PI és a NET megjelenése hasonló volt a friss trombusokban megfigyelthez, pontszerű módon, nem homogén eloszlással. Az APC/PC ebben a trombus fázisban méhsejtszerű struktúrákat mutatott, és a CD66b is hasonló módon jelent meg a trombusok nagy területén, ami arra utal, hogy körülölelik a NET-et. Az APC/PC és a NET kolokalizációja jelentős volt (PCC értéke 0.49 ± 0.02). A fibrin és az FXIII kolokalizációja állandó és erős korrelációt mutatott (PCC értéke 0.69 ± 0.01) a lítikus trombusokban.

Az organizált trombusokban a NET (9.96 ± 2.76) és a CD66b (14.0 ± 1.84) mennyisége jelentősen csökkent az előző fázishoz képest a NET marker esetében, és az MFI értékek csökkenése statisztikailag szignifikáns volt ($p = 0.0007$). A vizsgált hemosztázis markerek mennyisége hasonló maradt a lítikus fázisban mértékekhez. A PC/APC, $\alpha 2$ -PI, fibrinogén és FXIII MFI értékei sorrendben 30.8 ± 2.68 ; 21.2 ± 1.74 ; 37.0 ± 4.35 és 41.2 ± 5.37 voltak. Az $\alpha 2$ -PI és a NET megjelenése hasonló volt a trombus evolúció korábbi fázisaihoz, pontszerű módon és nem homogén eloszlással. Az APC/PC és a CD66b méhsejtszerű struktúrában jelentek meg; azonban ahogy a trombusok egész szerkezete lazábbá vált, az immunpozitív terület is csökkent. Mivel mind a NET, mind a CD66b mennyisége jelentősen csökkent, az APC/PC-vel való kolokalizációjuk vizsgálata nem volt konklúzív. A fibrin szerkezete—ahogy várható volt—töredezetté vált az organizált trombusban. Az FXIII továbbra is erősen társult a fibrinnel, és a PCC értéke 0.63 ± 0.01 volt.

4.5 A PROCR p.Ser219Gly polimorfizmus szerepe vénás tromboembóliában. Az Eset-kontroll tanulmány eredményeinek ismertetése

Miután a résztvevők beleegyező nyilatkozatot adtak, $n = 263$ VTE-s esetet és $n = 320$, egymással nem rokon, egészséges kontrollszemélyt vontunk be a vizsgálatba.

A VTE-esetek és a kontrollok egyaránt a 18–85 éves korcsoportba tartoztak; a VTE-s esetek medián életkora szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrolloké. A nemek eloszlásában nem volt különbség a két csoport között. A testtömegindex (BMI), valamint a trombózisra vonatkozóan pozitív családi anamnézis előfordulása szignifikánsan magasabb volt a VTE-csoportban. Az aktív dohányosok aránya szignifikánsan alacsonyabb volt az esetek között.

A szájon át szedhető fogamzásgátlót (OAC) szedő nők száma az esetek csoportjában $n = 18$, a kontroll csoportban $n = 17$ volt; ez a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns.

A VTE-csoportban az esetek 23%-ánál állt fenn valamilyen provokáló tényező a trombózis kapcsán. Ezek között 30%-ban OAC-használat fordult elő, 23.3%-ban trauma és/vagy gipszrögzítés szerepelt a kórtörténetben, 16.6%-ban műtét, 11.7%-ban szülés utáni időszakban jelentkezett trombózis, 5%-ban hosszú utazás előzte meg a trombózist, 5%-nál immobilizációt regisztráltak, 3.3%-ban terhességgel összefüggő trombózis fordult elő, 1.7%-ban hormonpótlás, 1.7%-ban visszérbetegség, 1.6%-ban intravénás kanülhöz köthető trombózis volt jelen. A provokáló tényezővel rendelkező esetek szignifikánsan fiatalabbak voltak, és a nők aránya szignifikánsan magasabb volt, mint a provokáló tényező nélkül kialakult VTE-esetekben.

A két csoport között nem volt különbség a dohányzás, a BMI, a pozitív családi anamnézis gyakorisága, valamint a rekurrens VT és PE tekintetében. A VTE csoportban a rekurrens VT aránya 28%, a PE gyakorisága 27% volt. A diabetes mellitus és a hipertónia előfordulása szignifikánsan magasabb volt az esetek körében; ugyanakkor e két tényező tekintetében nem mutatkozott különbség a provokált és nem provokált VTE-esetek között.

A FV Leiden mutáció gyakoribb volt a VTE csoportban ($p < 0.001$), míg a protrombin 20210G>A polimorfizmus mutációs gyakoriságában nem volt különbség a két csoport között. Nem mutatkozott eltérés a FV Leiden és a protrombin 20210G>A mutáció gyakoriságában a provokált és nem provokált VTE-esetek összehasonlításakor sem.

A vizsgált populációban a p.Ser219Gly polimorfizmus, valamint az rs6088735 és az rs8119351 is megfelelt a Hardy–Weinberg-egyensúly követelményeinek ($p = 0.7687$; $p = 0.5521$; $p = 0.6701$). A három SNP között erős kapcsoltsági egyensúly (LD) állt fenn. A három SNP kombinációját vizsgálva a leggyakoribb haplotípus az „ACG” volt (gyakoriság 0.659), ezt követte az „ATG” (gyakoriság 0.232), míg a „GCA” (gyakoriság 0.094) és a „GCG” (gyakoriság 0.014) ritka variánsoknak bizonyultak.

A teljes vizsgálati populációban, bármiféle korrekció és alcsoportelemzés nélkül, nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni az rs867186 genotípus gyakoriságai között sem a VTE-esetek és a kontrollcsoport, sem a provokált és nem provokált VTE-esetek között. A nemek és a dohányzás szerinti alcsoportelemzés sem mutatott szignifikáns különbséget az rs867186 genotípusgyakoriságokban. A BMI <30 kg/m²-es vagy a 60 év alatti (a VTE-esetek 75. percentilise alatti életkorú) egyének alcsoportjaiban sem volt szignifikáns eltérés az rs867186 vad típusú és mutációhordozó genotípusainak megoszlása között. Amennyiben csak az rs6025 (FV Leiden) vagy az rs1799963 (FII20210G>A) vad típusú, illetve hordozó személyeket vettük figyelembe, az rs867186 genotípusgyakoriságában akkor sem mutatkozott szignifikáns különbség.

Vizsgálatunkban elemeztük a VTE kiújulását is a PROCR rs867186 kapcsán, és OR = 1.72 (95% CI: 0.95–3.13; p = 0.075) értéket kaptunk, amely a korrigált modellben is hasonló maradt. Az FV Leiden és a FII 20210A sem befolyásolta a VTE kiújulásának kockázatát elemzésünkben.

Mivel a pácienseink döntő többsége K-vitamin-antagonista terápiában részesült a bevonás idején, és a vizsgálat során nem engedélyeztünk terápiamódosítást, a protein C (PC) antikoaguláns aktivitását esetükben nem lehetett értelmezni. Azonban az antikoaguláns terápiában nem részesülő egészséges egyéneknél kimutattuk, hogy az rs867186 jelenléte szignifikánsan növelte a PC aktivitást, a homozigóta mutánsoknál különösen magas plazma PC aktivitási szintet eredményezve. A vad típusú egyének esetében a medián PC aktivitás 112% (IQR 24) volt, a heterozigótáknál a medián PC aktivitás 128.5% (IQR 32), míg a homozigótáknál (n = 3) a medián PC aktivitás 160% volt.

4.6 A PROCR p.Ser219Gly polimorfizmus szerepe vénás tromboembóliában. Metaanalízis

Összességében 53 potenciálisan releváns publikációt azonosítottunk az irodalmi adatbázisban végzett keresés során. A jelenlegi metaanalízishez végül 11 tanulmányt választottunk ki.

Az „Identification”, avagy Azonosítás fázisban n = 19 tanulmányt zártunk ki duplikáció miatt. A „Screening”, avagy Szűrés fázisban n = 20 tanulmány került kizárásra. A kizárt tanulmányok között volt két in vitro sejtvonalas kísérlet, egy állatkísérletes vizsgálat, három metaanalízis, egy olyan tanulmány, amelyből nem lehetett primer adatokat kinyerni, négy egyéb génmutációt vizsgáló tanulmány, valamint kilenc olyan vizsgálat, amelyek eltérő kimenetet tanulmányoztak

(akut mieloid leukémia, cerebrális trombózis, koszorúér-betegségben szenvedő (CHD) betegek, myeloma multiplex, petefészekrákos betegek és nem provokált VTE).

Az „Eligibility”, avagy Alkalmazhatósági fázisban további négy tanulmányt zártunk ki. Közülük kettő nem felelt meg a Hardy–Weinberg-egyensúly (HWE) kritériumainak, egy tanulmány pedig a korábban publikáltakhoz hasonló vizsgálati populációval és mintavételi tervvel rendelkezett. Egy tanulmányt publikációs torzítás kimutatása miatt zártunk ki. A minőségértékelést és az adatextrakciót követően a bevont tanulmányokban összesen 5768 eset és 30 017 kontroll szerepelt.

Az összes kiválasztott tanulmány adatait összevonva, metaanalízisünk szignifikáns összefüggést mutatott ki az EPCR p.Ser219Gly polimorfizmusa és a VTE között minden vizsgált genetikai modell esetében (domináns modell: OR = 1.27, 95% CI: 1.11–1.46; recesszív modell: OR = 1.60, 95% CI: 1.26–2.04; GG vs. AA kontraszt: OR = 1.64, 95% CI: 1.28–2.09; GA vs. AA kontraszt: OR = 1.24, 95% CI: 1.08–1.43).

A vizsgálatok közötti heterogenitás minden vizsgált genetikai modell esetében alacsony volt. Ugyanakkor ez a kis számú GG genotípusú személy miatt torzulhat, ami elfedheti a valós, vizsgálatok közötti heterogenitást, ahogy azt korábbi közlemények is felvetették már.

A bevont tanulmányok között nem mutatkozott szignifikáns különbség az Egger-teszt alapján az allélkontraszt (G vs. A) ($p = 0.07$), a recesszív modell (GG vs. GA + AA) ($p = 0.58$), a domináns modell (GG + GA vs. AA) ($p = 0.05$) és a GG vs. AA kontrasztmodell ($p = 0.43$) esetében. A tölcserdiagram – amely a log-odds rátát ábrázolja a standard hiba reciprokának függvényében – sem mutatott publikációs torzítást ezekben a genetikai modellekben. Az Egger-féle regressziós aszimmetria-teszt azonban szignifikáns eltérést jelzett a GA vs. AA kontrasztmodell esetében ($p = 0.04$), és a tölcserdiagram publikációs torzításra utalt.

A szenzitivitási elemzés szerint az egyes tanulmányok kihagyása nem eredményezett szignifikáns változást az egyesített OR-értékben.

4.7 Reprodukálhatósági vizsgálat

A reprodukálhatóság definíció szerint a mérési eredmények hasonlóságának a mértékét jelenti különböző kutatócsoportok és eltérő kísérleti beállítások összevetésében. Reprodukálhatósági vizsgálatunkban arra kerestük a választ, hogy a metaanalízis eredményei változatlanok maradnak-e, ha eltérő statisztikai szoftvert alkalmazunk. Az általunk alkalmazott (MetaGenyo online statisztikai elemző rendszer) módszerrel nyert adatokat összehasonlítottuk a Dennis és munkatársai által, a STATA 11-es verziójú szoftverrel kapott és közölt eredményekkel.

Az összehasonlító vizsgálatba csak azokat a tanulmányokat vontuk be, amelyeket Dennis és munkatársai is elemeztek. Összevetettük a Hardy–Weinberg-egyensúly (HWE) eltérését, az asszociációs teszt eredményeit (OR és 95%-os CI), valamint a vizsgálatok közötti heterogenitást (I^2 és Cochran Q p-érték). A STATA és a MetaGenyo által szolgáltatott metaanalízis-eredmények között nem találtunk eltérést és a százalékos eltérés 0% volt.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1 A hemosztázis elemeinek megjelenése a koronária trombusban, és azok változásai a trombus evolúció során; a különböző klinikai és laboratóriumi paraméterek összefüggése a trombus korával, illetve a trombusaspirációt követő klinikai kimenetellel

E tanulmányunkban a laboratóriumi és betegekkel kapcsolatos klinikai tényezőket vizsgáltuk olyan betegek esetében, akiknél STEMI zajlott és a koronária trombusok aspirációra kerültek. A betegeket osztályoztuk az infarktus kora szerint (akut-szubakut-késői). A legmagasabb CK-értékeket—ahogy az várható volt—a STEMI szubakut fázisában regisztráltuk, míg a CRP és a fehérvérsejt-szám, különösen a monocitaszám, fokozatosan növekedett a STEMI fázisai során, jelezve a gyulladásos reakció kialakulását. A trombus terhelés és a mikrovaszkuláris reperfüziós paraméterek legkedvezőtlenebbek voltak a későn érkezőknél. Azonban az egyéves mortalitás a három csoport között nem mutatott jelentős különbséget a vizsgált betegpopulációban.

Korábban kimutatták, hogy a magas trombus terhelés jelentős prediktora a disztális embolizációnak, amely rossz prognózissal társult PCI után. Azonban a teljes vizsgálati csoportban nem találtunk jelentős prediktorokat a disztális embolizációra a vizsgált indexeink között. A legvalószínűbb változó, amely várhatóan, előre feltételezett módon összefüggést mutat a disztális embolizációval, a trombus tömege volt tanulmányunkban; azonban ez sem mutatott szignifikáns korrelációt a disztális embolizációval ($r = 0.132$, $p = 0.148$). Nem volt szignifikáns korreláció az akut, szubakut vagy későn érkezők és a disztális embolizáció között sem.

Az eljárás utáni TIMI és MBG értékek—ahogy várható volt—kedvezőtlenebbek voltak a disztális embolizációval rendelkező betegeinknél ($r = -0.183$, $p = 0.041$ a TIMI esetében és $r = -0.181$, $p = 0.044$ az MBG esetében). A disztális embolizáció gyakorisága magasabb volt azon betegeinknél, akik egyéves utánkövetés során elhunytak, de a gyakoriság különbsége nem érte el a statisztikai szignifikanciát. Ez valószínűleg a nem túlélő csoportunk kis mintaméretének köszönhető. A nagyobb trombus tömeg (azaz 20 mg felett) azonban szignifikánsan összefüggött betegeinknél az egyéves mortalitással, és—a diabetes mellitus, az alacsony felvételi ejekciós frakció (EF) és a magasabb fehérvérsejt (neutrofil) szám mellett—független rizikófaktornak bizonyult az egyéves mortalitásra.

Ebben a vizsgálatban az ateroszklerotikus koronária plakk-ruptúrával összefüggő miokardiális infarktuszban szenvedő betegek aspirált koronária trombusainak szerkezetét is vizsgáltuk. A klasszikus hisztopatológiai jellemzők alapján a trombusokat friss, lítikus és organizált kategóriákba soroltuk.

Megfigyeltük a XIII-as faktor (FXIII), az α 2-plazmin inhibitor (α 2-PI) és az aktivált protein C/protein C (APC/PC) megjelenését a trombus evolúciójának különböző szakaszaiban, amelyeket korábban még nem írtak le, bár ezek alapvető fontosságú tényezők a trombus szilárdsága és a fibrinolízis szempontjából. Az APC/PC továbbá nemcsak a koaguláció–antikoagulációban játszik fontos szerepet, hanem gyulladásgátló és citoprotektív folyamatokban is. Meghatároztuk az FXIII és az α 2-PI egymással való kapcsolatát, valamint a fibrinnel—a koronária trombus jól tanulmányozott komponensével—való összefüggésüket. Ezenkívül tanulmányoztuk az APC/PC kapcsolatát a NET (neutrofil extracelluláris csapdák) elemeivel és az aktivált granulocitákkal is.

A fibrin a koronária trombusokban a korábbi tanulmányokban leírtakhoz hasonló szokásos szerkezetet mutatott. Jól ismert, hogy a keresztkötött fibrinrostok a trombusok egyik fő komponensei, és a fibrin mennyisége idővel növekszik a trombus evolúciója során a lítikus fázisig; majd az organizált fázis során mennyisége kissé, de nem jelentősen csökken. Ez megfigyelhető volt eseteinkben is. Az FXIII szorosan kapcsolódik a fibrinhez, mivel kulcsszerepet játszik a keresztkötési folyamatban transzglutaminázként. Az általunk vizsgált koronária trombusokban az FXIII mennyisége magas volt, és evolúciójuk során nem változott jelentősen. Ismert biokémiai szerepével összhangban az FXIII és a fibrin kolokalizációja volt a legmagasabb az összes vizsgált marker között a trombus evolúciójának minden szakaszában, és az FXIII vizuális megjelenése szorosan és folyamatosan követte a fibrin szerkezetét.

Nem csak az FXIII, hanem az α 2-PI is alapvető szerepet játszik a fibrinolízis szabályozásában. Az α 2-PI, egy szerin proteáz inhibitor, az FXIII által keresztkötődik a fibrinhez, stabilizálva a fibrinrögöt és gátolva a fibrinolízist. Valójában az α 2-PI jelentősége a koronária trombózis kontextusában nagyrészt feltáratlan. Eddig az α 2-PI megjelenését és kapcsolatát a koronária trombusban nem vizsgálták. In vitro alvadási tanulmányokban, amelyek tisztított fibrinogént, FXIII-at és α 2-PI-t használtak trombin aktiválás után, az α 2-PI fibrin α -lánchoz való keresztkötése nagyon gyorsan zajlik, és majdnem befejeződik, mielőtt a fibrinogén γ -lánc dimerjei és α -lánc polimerei kialakulnának. Azonban az in vivo keresztkötési folyamathoz kapcsolódóan még sok megválaszolatlan kérdés van. Tanulmányunkban az α 2-PI mennyisége alacsony volt a friss trombusokban, és statisztikailag szignifikáns növekedést figyeltünk meg a friss és a lítikus fázis között, ami párhuzamos volt a fibrin mennyiségének növekedésével. Az α 2-PI MFI értékei nem növekedtek tovább az organizált fázisban. Az FXIII szerkezetével ellentétben az α 2-PI megjelenése inkább diszkrét volt, de egyenletesen eloszlott és következetesen társult a fibrinnel.

Ez a diszkrét eloszlás magyarázható azzal az *in vitro* megfigyeléssel, mely szerint a plazma α 2-PI körülbelül 30–50%-a kötődik az alvadékhoz, ami azt jelenti, hogy minden 15–25 fibrin molekulára egy α 2-PI molekula jut az alvadékban. Alternatív lehetőségként az is felmerül, hogy a FXIII csak meghatározott pontokon köti az α 2-PI-t a fibrinhez, de ezt eddig még nem vizsgálták.

Megfigyeléseink és az FXIII és az α 2-PI trombus képződésében és stabilizálásában betöltött biológiai szerepei alapján előnyösnek tűnik ezen faktorok tesztelése, mint potenciális terápiás célpontok a koronária arterioszklerózisban a STEMI megelőzése és kezelése érdekében, a standard kezelési módok mellett.

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az APC kulcsfontosságú szabályozója a fibrinolízisnek és a koagulációnak, és nemcsak antikoaguláns, hanem gyulladásgátló és citoprotektív tulajdonságokkal is rendelkezik különböző sejtípusokon, beleértve a monocitákat és a neutrofileket is. Feltételezték, hogy az APC citoprotektív és gyulladásgátló hatásai magukban foglalhatják a neutrofil funkció és a NET képződés szabályozását azon megállapítások alapján, hogy az APC képes hasítani az extracelluláris hisztonokat állatmodellekben. A NET jelenlétét különböző eredetű trombusokban—beleértve az aspirált koronária trombusokat is—már leírták. Yunoki és munkatársai jelentős mennyiségű CD66b immunpozitív területet figyeltek meg egy aspirált trombusban, ami összefügghet a károsodott koronária mikrocirkulációval. A thromboinflammáció koncepcióját több évvel ezelőtt vetették fel, és kimutatták a két alapvető mechanizmus közötti kölcsönhatást a szív- és érrendszeri betegségek - beleértve a miokardiális infarktust is - kialakulásában. A neutrofilek és a NET-ek minden típusú komplikált lézióban lokalizálódnak, ami arra utal, hogy jelenlétük összefügg az ateroszklerózis akut komplikációival. Kimutatták, hogy az APC kulcsszerepet játszik kardioprotektív faktorként nemcsak antikoaguláns, hanem gyulladásgátló és citoprotektív tulajdonságai révén is. Az APC és a NET elemek közötti kapcsolatot először vizsgáltuk aspirált koronária trombusban tanulmányunkban. Kísérleteinkben viszonylag magas mennyiségű APC/PC-t észleltünk a trombus evolúciójának minden szakaszában, ami arra utal, hogy az APC/PC nagyon korai stádiumban megjelenik a trombusképződés során. A PC trombin általi aktiválása alapvető lépés a természetes antikoaguláns folyamatokban, és az APC hatása az aktivált FVIII és FV inaktiválásával korlátozza a trombingenerációt, ezáltal a fibrinképződést. Az APC elősegítheti a fibrinolízist is, tovább korlátozva a trombus növekedését. A NET-ek hisztonjainak hasításával az APC csökkentheti az akut ateroszklerotikus plakk-ruptúrával összefüggő gyulladást és citotoxikus reakciókat. Ezeket a folyamatokat összevetve, az APC jelenléte a koronária

trombusképződésében védőfaktornak tekinthető, amely érdemes további in vitro és klinikai vizsgálatokra, hogy potenciális terápia alkalmazásként figyelembe vehessük.

Nagyon kis mennyiségű NET markert találtunk a friss trombusokban és evolúciójuk során; a NET-ek intenzitási értékei a lítikus fázisban azonban jelentősen növekedtek. Eredményeink azt mutatják, hogy a friss trombusokban lassan induló NETózis folyamat zajlik, ami összhangban van a trombusképződéssel kapcsolatos jelenlegi ismereteinkkel. Az organizált stádiumban a NET mennyisége jelentősen csökkent. A lítikus fázisban, ahol magasabb mennyiségű NET marker volt jelen, nem elhanyagolható mértékű kolokalizációt figyeltünk meg az APC/PC és a NET marker citrullinált H3 hiszton között (PCC 0.49 ± 0.02 volt). Ez a megfigyelés felveti azt a hipotézist, hogy a NET képződése után az APC részt vesz a hisztonok degradációjában, ami a NET csökkenéséhez vezet, így próbálva megszüntetni annak káros következményeit. A CD66b mennyisége követte a citrullinált H3 hisztonok megjelenésének dinamikáját, azaz csak kis mennyiség volt ebből a markerből a friss trombusban, ami a lítikus fázisban jelentősen megnövekedett, majd ezt követően csökkent. Feltételezhető, hogy a granulociták megjelenése a plakk-ruptúrát követően NET képződéséhez vezet a növekvő trombusban. A NET jelenlétének korlátozása a szervezett trombusban az ebben a stádiumban jelen lévő alacsonyabb granulocitaszámmal magyarázható. Megfigyeléseinket összegezve arra a következtetésre juthatunk, hogy a koronária trombus lítikus stádiumában a lassú NETózis vezet a NET-ek legmagasabb mennyiségéhez, majd a NET-ek mennyisége csökken, részben a kevesebb granulocita miatt, amelyek termelik őket, különösen az APC által legalább részben végzett hisztondegradáció hatására. Ezt a hipotézist alátámasztja e markerek vizuális megjelenése a lítikus fázisban. Az APC/PC fészek-szerű struktúrát képez, amely körülveszi a NET elemeket.

Azonban nehéz egyértelmű következtetést levonni a trombus evolúciójának különböző stádiumaiban zajló eseményekről, mert nehéz az ex vivo kísérletekben elkülöníteni a trombus evolúciójának különböző stádiumait egymástól, mivel a STEMI során aspirált intrakoronáriás trombusok gyakran több érési stádiumot mutatnak egyszerre. Ez a leíró tanulmány azonban alapvető kiindulópontot jelenthet a jövőbeni transzlációs kutatások számára az alapvető mechanizmusok és kulcsfontosságú változók azonosítása révén, így ezek az eredmények fontosak lehetnek a koronária trombózis területén végzett további klinikai kutatások irányainak meghatározásában.

A trombus aspirációja a primer PCI során már nem része a klinikai rutinnak, ami megnehezíti a jövőbeli kísérleteket. A mai napig végzett tanulmányokban az aspirált trombus tömegét általában nem mérték, és csak meglehetősen szubjektív, szemi-kvantitatív értékelést végeztek a koronária angiogram alapján. Tanulmányunkban az aspirált trombusok tömegét mértük, és

azt találtuk, hogy a koronária elzáródás után eltelt idő függvényében az fokozatosan növekedett. A nagyobb trombus tömeg szignifikánsan korrelált az egyéves mortalitással.

Tanulmányunknak vannak olyan korlátai, amelyeket el kell ismernünk. Ez egy egyközpontú elemzés volt korlátozott mintanagysággal, bár a mintanagyság összehasonlítható volt hasonló patológiai tanulmányok mintáival. A trombus aspirációja során a szerkezet torzulhat, és a trombus felszínét és magját, farok- és fejrészeit nem lehetett megkülönböztetni. Nem vizsgáltuk a trombus összetételének és a klinikai prognózisnak a kapcsolatát a primer PCI után a korlátozott mintanagyság és az azonos életkori kategóriába tartozó trombusok hasonló megjelenése miatt. A jövőbeni tanulmányok, amelyek különböző módszereket, például nagy felbontású mágneses rezonancia képalkotást (NMR), tömegspektrometriát és szöveti mikroarray-eket (TMA-k) használnak, részletesebb térbeli eloszlást nyújthatnak a fehérje expresszióról a trombus mikrokörnyezetében. Ezek a technikák lehetővé teszik a mélyreható kvantitatív szöveti térképezést az aspirált koronária trombusok közötti és mintán belüli különbségek vizsgálatához. Nem tudtuk továbbá vizsgálni a korábbi antitrombotikus vagy antikoaguláns gyógyszerekkel végzett kezelés potenciális szerepét a trombus összetételében, mivel a betegek csak egy kisebb csoportja szedett aszpirint a STEMI diagnózisa előtt, és semmilyen más antitrombotikus terápiát nem alkalmaztak náluk primer profilaxisként.

5.2 A PROCR p.Ser219Gly polimorfizmus szerepe vénás tromboembóliában. Az eset-kontroll tanulmány és a metaanalízis diszkussziója

Mivel maga a thrombophilia egy összetett állapot, az első trombózis vagy a trombózist követő kiújulás kockázatát egyénileg kell meghatározni számos bizonyíték alapján. Össze kell gyűjteni az adatokat a véralvadási és antikoagulációs folyamatban részt vevő tényezőkről, valamint a környezeti és szerzett kockázati tényezőkről; miután az összes részlet a helyére kerül, személyre szabott következtetés vonható le a trombózis kockázat mértékéről. A trombofiliák egy részénél jelenleg nem határozható meg pontosan a rekurrens trombózis kockázata, így nehéz eldönteni, hogy mely betegek részesüljenek tartós antikoaguláns terápiában. Vizsgálatunk eredményei arra utalnak, hogy az rs867186 variáns emelkedett – bár statisztikailag nem szignifikáns – VTE kiújulási kockázatot jelenthet, amelyet érdemes lenne nagyobb betegszámú vizsgálatokban tovább elemezni.

Rendkívül nehéz a számos különböző alvadási tényező szintjét mérni és számos, az alvadás/antikoagulációs egyensúlyban részt vevő fehérje funkcionális vizsgálatát elvégezni, mivel ezek időigényesek és költségesek. Manapság a next-generation sequencing (NGS) technológia alkalmazásával a genetikai vizsgálatok egyre ésszerűbbé és szélesebb körben

elérhetővé válnak. A teljes genom vagy exom szekvenálás jelenleg még nem realitás – és nem is feltétlenül szükséges trombofiliában –, ha megfelelően meghatározott kandidáns gének paneljét hozzuk létre. Az idő- és költségmegtakarítás, valamint a téves pozitív értelmezések elkerülése érdekében az úgynevezett „trombofilia génpanelnek” azonban csak olyan géneket kell tartalmaznia, amelyekben az eltéréseknek bizonyított biológiai következményei vannak és szerepük a trombózisban meghatározott. A PROCR rs867186 esetében a sEPCR szint emelkedése több tanulmányban igazolódott, és in vitro vizsgálatok is megerősítették ezt. Qu és munkatársai kimutatták, hogy azokban a stabil sejtvonalakban, amelyek az EPCR p.219Gly variánsát expresszálták, az EPCR sejtmembránról való leválása ötször-hétszer nagyobb volt a p.219Ser variánshoz képest PMA (phorbol-12-mirisztát-13-acetát) stimulációt követően. Ez magasabb sEPCR-szintet eredményezett a p.219Gly sejt kondicionált tápfolyadékában. Azt is megállapították, hogy az A3 haplotípus (amely magában foglalja a minor p.219Gly variánst) nemcsak a magasabb sEPCR-szinttel, hanem csökkent PC aktivációval is összefüggést mutatott. Ireland és munkatársai azt mutatták ki, hogy a p.219Gly sEPCR fokozott bazális felszabadulása fokozott trombingenerációval párosul, ami arra utal, hogy kevesebb membránhoz kötött EPCR áll rendelkezésre a hatékony PC aktivációhoz.

Klinikai tanulmányokban p.219Gly allélt hordozó egyéneknél magasabb sEPCR-szinteket észleltek, és ez magasabb trombózis kockázattal társult. Anastasiou és munkatársai vizsgálata szerint a sEPCR-szintje nemcsak általánosan a p.219Gly variánst hordozók esetében volt emelkedett, hanem ha összehasonlították a vénás trombózisban szenvedők és kontroll személyek sEPCR szintjét a p.219Gly variánst hordozó csoportban, akkor a vénás trombózisban szenvedő hordozóknál szignifikánsan magasabb sEPCR szintet találtak, mint a kontroll hordozók esetében. Ugyanakkor nem találtak összefüggést a p.Ser219Gly génpolimorfizmus és a trombózis kockázata között egy görög populációban. A Dennis és munkatársai által publikált metaanalízisbe bevont nyolc tanulmány közül több esetben is szignifikáns sEPCR-szint emelkedést figyeltek meg a p.Ser219Gly génpolimorfizmussal összefüggésben. A PROCR rs867186 és rs8119351 variánsok a PC-szintre is hatást gyakorolnak. Athanasiadis és munkatársai kimutatták, hogy ezek a variánsok a PC plazmaszint variációjának 10.27%-áért, illetve 9.56%-áért felelősek.

Az EPCR p.Ser219Gly polimorfizmus genotípusgyakorisága eset-kontroll vizsgálatunkban 75% (AA), 24% (AG) és 1% (GG) volt az eseteknél, valamint 81% (AA), 18% (AG) és 1% (GG) a kontrolloknál. A „G” allél hordozása nem eredményezett szignifikáns hatást a VTE kockázatára (OR 1,339; 95% CI: 0,904–1,984). Ugyanakkor a metaanalízisünkbe bevont, más

kutatók által végzett eset–kontroll vizsgálatok többsége kockázatemelő hatást írt le az rs867186-ra a teljes vizsgált populációban (nemcsak alcsoport-elemzésekben).

Chen és munkatársai kis esetszámú vizsgálatukban (n = 65 eset, n = 71 kontroll) a kínai populációban szignifikánsan magasabb kockázatot találtak az rs867186 variánsra a „GA” vs. „AA” modellben (OR 2.75; 95% CI: 1.04–7.30). Egy másik kínai tanulmányban szintén szignifikáns kockázatemelő hatást figyeltek meg (OR 1.912; 95% CI: 1.064–2.818 a domináns modellben). Francia populációban (n = 338 eset, n = 338 kontroll) az rs867186 még akkor is növelte a VTE kockázatát a többváltozós elemzésben – ahol az életkort, nemet, FV Leiden-t és FII20210A-t is figyelembe vették – (OR 1.8; 95% CI: 1.2–2.6). Egy egyiptomi populációban, 90 eset és 90 kontroll bevonásával, a „G” allél hordozása a domináns modellben négyszeresére növelte a VTE kockázatát.

Ezzel szemben egy kis török vizsgálatban (n = 111 eset, n = 73 kontroll) az rs867186 nem mutatott szignifikáns VTE kockázatemelő hatást, noha a „GG” homozigóta egyénekben magasabb sEPCR-szintet figyeltek meg. Hasonlóan, a Pecheniuk és munkatársai által végzett vizsgálatban, amely fehér és nem fehér résztvevőket is magában foglalt (n = 114 eset, n = 114 kontroll), nem írtak le semmilyen hatást a polimorfizmusra a VTE kockázatát illetően. Uitte de Willige és munkatársai sem találtak szignifikáns összefüggést a polimorfizmus és a VTE kockázata között egy holland populációban, amelyben n = 474 esetet és n = 474, nem és életkor alapján illesztett kontrollt vizsgáltak.

Ugyanakkor ők azt is megjegyezték, hogy a populációjukban az alacsony sEPCR-szint védő hatású volt a VTE-vel szemben. Egy nem fehér és fehér személyeket is magában foglaló beágyazott eset–kontroll vizsgálatban az rs867186 nem mutatott hatást a VTE kockázatára (OR 0,93; 95% CI: 0,70–1,25). Ugyanebben a vizsgálatban a polimorfizmus megemelte ugyan az sEPCR-szintet, de ez nem állt összefüggésben a VTE kockázatával. Ezekben a tanulmányokban alcsoport-elemzéseket nem végeztek.

Egy spanyol vizsgálatban, melyben n = 95 VTE-esetet és n = 181 kontrollt elemeztek, Medina és munkatársai kizárólag FV Leiden-hordozókat vizsgáltak, és az rs867186 nem befolyásolta a VTE kockázatát. Még a nem, életkor, FII20210A, valamint a másik EPCR polimorfizmus (rs9574) jelenlétére való kiigazítás sem módosította az OR értékeket. Ezzel ellentétben, bár a görög populációban az rs867186 nem volt hatással a VTE kockázatára, a „G” allél hordozása gyakoribb volt azoknál a betegeknél, akik 35 éves kor alatt kaptak VTE-t. Egy újabb, nagy esetszámú svéd vizsgálatban, amely középkorú és idősebb felnőtteket foglalt magában, az rs867186 növelte a VTE kockázatát (HR = 1,5; 95% CI: 1,1–1,9) „GG” homozigótákban (n = 2 584 VTE-eset és n = 26 201 VTE nélküli személy).

Saposnik és munkatársai kimutatták, hogy az rs867186 VTE kockázatnövelő hatása a férfi alcsoportban jelentkezett. Saját vizsgálatunkban az rs867186 növelte a VTE kockázatát azoknál, akik az rs8119351 tekintetében vad típusúak voltak (OR 3,2; 95% CI: 1,372–7,465), és ez a többváltozós modellben is szignifikáns maradt.

E tanulmányok alapján továbbra is nyitott kérdés, hogy a sEPCR-szint mérésére vagy inkább a PROCR rs867186 genotípus meghatározására lenne-e célszerű támaszkodni az első VTE vagy a VTE-kiújulás kockázatának megítélése szempontjából. A sEPCR szintjét nemcsak a PROCR genotípusa, hanem számos egyéb genetikai és környezeti tényező is befolyásolhatja. A különböző vizsgálatok eredményeinek heterogenitása a populációk közötti eltérésekből adódhat. Hasznos lenne tehát azon genetikai és környezeti tényezők azonosítása, amelyek hatnak az sEPCR-szintre. Figyelembe kell azonban venni, hogy a megváltozott sEPCR-szint lehet akár következmény is különféle kórállapotok, például thrombotikus megbetegedések esetén, és nem feltétlenül előzményként, kockázati tényezőként jelenik meg. Nagyméretű, prospektív tanulmányok adhatnának választ arra, hogy a PROCR genotípus vagy az sEPCR-szint jobb fokmérője a VTE kockázatának.

Az egyes tanulmányok eredményeinek heterogenitása miatt metaanalízist végeztünk az rs867186 VTE kockázatára gyakorolt hatásának tisztázása érdekében. Jelen metaanalízisünk ($n = 5\,768$ VTE-eset és $n = 30\,017$ kontroll) szignifikáns összefüggést talált az EPCR p.Ser219Gly polimorfizmusa és a VTE között mind a domináns modellben (OR = 1,27; 95% CI: 1,11–1,46; $p = 0,0006$), mind a recesszív modellben (OR = 1,60; 95% CI: 1,26–2,04; $p = 0,0001$), továbbá a GG vs. AA (OR = 1,64; 95% CI: 1,28–2,09; $p = 0,0001$) és a GA vs. AA (OR = 1,24; 95% CI: 1,08–1,43; $p = 0,002$) kontrasztmodellekben is. A Dennis és munkatársai által korábban végzett, kisebb esetszámot felölelő metaanalízis ($n = 4\,821$ eset és $n = 6\,070$ kontroll) hasonló fő üzenetet közvetített (OR 1,22; 95% CI: 1,11–1,33). A Li és munkatársai által végzett második metaanalízisben ($n = 4\,440$ eset és $n = 5\,054$ kontroll) szintén szignifikánsan emelkedett VTE kockázatot találtak az rs867186 „G” allél hordozóinál (OR 1,63; 95% CI: 1,30–2,04). Jelen vizsgálatunk megerősítette e két korábbi metaanalízis eredményeit. Emellett reprodukálhatósági vizsgálattal validáltuk az új, online, ingyenesen elérhető MetaGenyo Statisztikai Elemzőrendszer szoftvert. Eredményeink alapján ez az online platform alkalmas metaanalízis elvégzésére genetikai epidemiológiai tanulmányok esetén.

Az rs867186 által jelentett kockázat mindegyik, így a mi metaanalízisünkben is szignifikánsan emelkedett volt, ám a trombózis rizikó enyhe mértékűnek tűnt. Ugyanakkor a személyre szabott orvoslás, beleértve a személyre szabott kockázatbecslést is, azon a megközelítésen alapul, hogy minden tényezőnek lehet jelentősége. Minél több információ – legyen az környezeti vagy

genetikai – összegyűjtése a személyre szabott VTE-kockázatkezelés alapját képezheti. A nagy áteresztőképességű genetikai módszerek, mint például az új generációs szekvenálás (NGS) technológiája, támogatják a nagyléptékű genetikai adatok megszerzését a páciensektől. A génpanel szekvenálás során lehetőség nyílik a kandidáns gének egyidejű vizsgálatára. A PROCR jelenleg nem része a Thrombogenomics platform paneljének, és hiányzik az ISTH SSC Genomics in Thrombosis and Hemostasis Tier 1 génlistájáról is (https://www.isth.org/page/GinTh_GeneLists). A PROCR felvétele e génpanelekbe hozzájárulhat ahhoz, hogy több tapasztalat gyűljön össze a variánsainak szerepéről a VTE kialakulásában – nem csak az abszolút VTE-kockázat, hanem a kiújulás és a protein C-hiányos egyének VTE kockázatának módosítása szempontjából is.

A vizsgálati időszak alatt mindössze két öröklött protein C (PC) hiányos esetet azonosítottunk a mintánkban. Az első betegnél c.811C>T (p.Arg271Trp), a másodiknál c.169C>T (p.Arg57Trp) heterozigóta mutációt találtunk. E mutációk számos adatbázisban patogén/valószínűleg patogén variánsként szerepelnek, és PC-hiánnyal, valamint trombotikus fenotípussal hozhatók összefüggésbe. Mindkét betegnél heterozigóta formában hordozott rs867186 variánst is kimutattunk. Az első beteg 29 éves korában szenvedte el az első trombotikus epizódot; eddig nem regisztráltunk rekurrens trombózt. A második beteg szintén 29 éves korban kapott először vénás trombózt, majd 33 évesen, orális antikoaguláns terápia alatt egy rekurrens eseményt is elszenvedett. E két PC-hiányos beteg bevonása a statisztikai elemzésbe nem okozott változást az eredményekben.

A PROCR polimorfizmusok PC-szintre és a VTE kockázatára gyakorolt módosító hatásának vizsgálatához hasznos lenne egy olyan tanulmány, amely közvetlenül PC-hiányos egyéneket toboroz. Egy korábbi vizsgálatban Fidalgo és munkatársai portugál PC-hiányos családokat tanulmányozva arra utaltak, hogy az rs867186 magyarázhatja a PC-plazmaszintek különbségét azonos PROC genotípussal rendelkező személyek között, és nagyon magas PC-szinteket mutattak ki Pintao és munkatársai rs867186 homozigóta egyéneknél. Egy nagy francia kohorszban pedig felmerült a feltételezés, hogy az rs867186 homozigóta formája lehet az extrém magas PC-szintek hátterében. Ezek a vizsgálatok azonban nem tárgyalták az EPCR polimorfizmusok VTE kockázatot módosító hatását PC-hiány esetén.

A jelen metaanalízis erőssége, hogy frissítette a korábbi eredményeket egy nagy léptékű vizsgálattal, és hozzáadta a magyar eset–kontroll vizsgálat eredményeit is. Emellett reprodukálhatósági vizsgálatot is végeztünk, hogy biztosítsuk eredményeink validitását.

Tanulmányunknak vannak korlátai, amelyeket érdemes megemlíteni. Az eset–kontroll vizsgálatunk általánosíthatósága korlátozott lehet a kontrollcsoport kiválasztására vonatkozó

szigorú kizárási kritériumok miatt. Ennek következtében nem vagyunk biztosak abban, hogy a krónikus betegségek és az artériás trombózis hiánya milyen mértékben befolyásolja az EPCR polimorfizmus VTE kockázatára vonatkozó eredményeket.

Metaanalízisünk a GA vs. AA kontrasztmodell esetében potenciális közlési (publikációs) torzítást jelez. Továbbá számításba kell vennünk a lehetséges szelekciós torzítást és a genotípus-, valamint fenotípus-meghatározással kapcsolatos esetleges téves osztályozást az egyes tanulmányok eredményei tekintetében. A metaanalízisben nem tudtunk további alcsoport-elemzéseket végezni, mivel nem állt rendelkezésre elegendő, hasonló etnikumhoz tartozó csoport. Másrészt a metaanalízisünkbe bevont tanulmányok nem szabványosított adatközlésének következtében nem volt lehetőségünk kor, nem, dohányzás, alkoholfogyasztás vagy egyéb környezeti és életmódbeli tényezők szerinti elemzésre.

6. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1, Az ST-elevációs miokardiális infarktus (STEMI) során képződő koronária trombusok szerkezetének és evolúciójának konfokális mikroszkóppal történő vizsgálata során elsőként elemeztük a fibrin stabilizációban és lízisben fontos szerepet játszó FXIII és α 2-PI, valamint az esszenciális antikoaguláns APC megjelenését a trombusban és asszociációját a NET elemeihez

- Kimutattuk, hogy a FXIII a fibrinnel figyelemreméltó mértékű kolokalizációt mutat a trombus evolúció minden szakaszában és emelkedett mennyisége figyelhető meg a friss, lítikus és az organizált szakaszban is. Szintén kimutattuk, hogy az α 2-plazmin inhibitor (α 2-PI) mennyisége a trombusban a friss és lítikus fázis között növekszik jelentősen és hogy az α 2-PI megjelenése inkább diszkrét, de következetesen egyenletesen helyezkedik el a fibrinháló mentén.
- Kimutattuk, hogy az APC/PC korán, már a friss koronária trombusban megjelenik, és mennyisége szignifikánsan nem változik a trombus érésének későbbi fázisaiban sem.
- A NET marker (citH3 hiszton) és a CD66b legdominánsabb jelenlétét a lítikus fázisban észleltük és mind a NET marker, mind pedig a CD66b esetében markáns csökkenést írtunk le az organizált fázisban.
- Kimutattuk az APC/PC és a NET marker, a citrullinált H3 hiszton kolokalizációját a trombus lítikus fázisában, és felvetettük az APC szerepét a NET (hiszton) degradációban, mely szerint a NET-ek hisztonjainak hasításával az APC csökkentheti az akut ateroszklerotikus plakk-ruptúrával összefüggő gyulladós és citotoxikus reakciókat.
- Megállapítottuk, hogy a trombus kora önmagában nem, de a trombus tömeg (20 mg feletti), a diabetes mellitus, és a magasabb neutrofil-szám független rizikófaktorai a STEMI betegek trombus aspirációt követő egyéves mortalitásának.

2, A PROCR p.Ser219Gly polimorfizmus vénás tromboembólia kockázatára gyakorolt hatásának vizsgálatát végeztük el hazai populációban eset-kontroll tanulmányban és nemzetközi metaanalízisben.

Eset-kontroll vizsgálatunkban kimutattuk, hogy az rs867186 "G" allél (p.Ser219Gly) hordozás nem befolyásolta szignifikánsan az első vénás tromboembóliás esemény kockázatát, de

tendenciára utaló összefüggést detektáltunk a rekurrens VTE tekintetében, ami új irányt adhat a rekurrens VTE kockázati tényezőinek további kutatásában.

- Az eset-kontroll tanulmányunk eredményeivel bővített, új metaanalízisünk eredményei alapján az EPCR p.Ser219Gly polimorfizmus mind a domináns, mind a recesszív modellben, továbbá a GG vs. AA és GA vs. AA kontrasztmodellekben is szignifikáns trombózis kockázatfokozó hatással bír.
- Tanulmányunkban elsőként validáltuk a MetaGenyo Statisztikai Elemző Szoftver genetikai, epidemiológiai vizsgálatok metaanalízisére történő felhasználását, mintegy a jövőbeni, hasonló genetikai kutatásokhoz új módszertani eszközt kínálva.

7. PUBLIKÁCIÓK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK//2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Pítuk Dóra
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Pítuk, D.**, Balogh, L., Horváth, E., Hegyi, Z., Baráth, B., Kissné Bogáti, R., Szűcs, P., Papp, Z., Katona, É., Bereczky, Z.: Localization of Hemostasis Elements in Aspirated Coronary Thrombi at Different Stages of Evolution.
Int. J. Mol. Sci. 25 (21), 1-19, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms252111746>
IF: 4.9 (2023)
2. **Pítuk, D.**, Miklós, T., Schlamadinger, Á., Molnárné Rázsó, K., Bereczky, Z.: The association between EPCR gene p.Ser219Gly polymorphism and venous thromboembolism risk: a case-control study, meta-analysis, and a reproducibility study.
Front. Cardiovasc. Med. 10, 1-14, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2023.1270093>
IF: 2.8



További közlemények

3. Zilinyi, R., Czompa, A., Czeglédi, A., Gajtókó, A., **Pituk, D.**, Lekli, I., Tósaki, Á.: The Cardioprotective Effect of Metformin in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: the Role of Autophagy. *Molecules*. 23 (5), 1-12, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23051184>
IF: 3.06

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10,76

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,7

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, 2024.11.06.

8. TÁRGYSZAVAK

aktivált Protein C/PC

α 2-plazmin inhibitor

koronária trombus

fibrin/fibrinogen

FXIII

immunfluoreszcens festés

metaanalízis

neutrofil extracelluláris csapdák

ST-elevációs miokardiális infarktus

vénás tromboembólia

activated Protein C/PC

α 2-plasmin inhibitor

coronary thrombus

fibrin/fibrinogen

FXIII

immunofluorescence staining

metaanalysis

neutrophil extracellular traps

ST-elevation myocardial infarctus

venous thromboembolism

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálásan köszönöm Dr. Bereczky Zsuzsanna témavezetőmnek, akinek rendíthetetlen szakmai támogatása, bölcs iránymutatása és fáradhatatlan biztatása nélkülözhetetlen volt a kutatás sikeréhez. Továbbá, köszönetemet fejezem ki Dr. Katona Éva tanárnőnek a közös munkában nyújtott értékes szakmai támogatásáért, valamint Dr. Horváth Emőke patológus főorvosasszonynak a koronária trombusok precíz klasszifikációjáért és a festési protokolloknál, kiértékeléseknél nyújtott nélkülözhetetlen szakértelméért.

Külön köszönet illeti Dr. Szűcs Pétert és Dr. Hegyi Zoltánt a konfokális mikroszkópos elemzések során végzett kiváló munkájukért, amely nélkül a részletes strukturális vizsgálatok nem valósulhattak volna meg.

Hálám fejezem ki Bana Ágnes munkatársamnak a trombuspreparátumok gondos előkészítéséért, valamint Mányi Siket Ivett kolléganőmnek a mintatárolás és az analitikai előmunkálatok során végzett precíz munkájáért. Hálás vagyok közleményeim társszerzőinek a kreatív hozzájárulásukért, konstruktív kritikájukért és a tudományos szigorúságukért.

Végül, de nem utolsósorban, köszönetemet mondom családomnak a türelmükért, lelkesítő támogatásukért.