

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Az anti- β_2 -glikoprotein-I ellenanyag véralvadásban
betöltött szerepe és kölcsönhatása ligandumával**

Dr. Szabó Gábor

Témavezető: Prof. Dr. Kappelmayer János



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola
Debrecen, 2021

Az anti- β_2 -glikoprotein-I ellenanyag véralvadásban betöltött szerepe és kölcsönhatása ligandumával

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Szabó Gábor, okleveles általános orvos

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

Témavezető: Prof. Dr. Kappelmayr János, MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Kiss Emese, MTA doktora
Dr. Csósz Éva, MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kiss Csongor, MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Bácsi Attila, MTA doktora
Dr. Nagy Tamás, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

A védés online zajlik. 2021. december 16-án 13:00 órakor

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a szildiko@med.unideb.hu e-mail-címre küldött üzenettel a vitát megelőző munkanap (2021. december 15.) 12:00 óráig.

1. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

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

1.1. Az antifoszfolipid szindróma meghatározása

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

Amikor az APS önmagában, autoimmun társbetegség(ek) nélkül jelentkezik, elsődleges APS-ről (PAPS, primary antiphospholipid syndrome) beszélünk. Az APS-t másodlagosnak (SAPS, secondary antiphospholipid syndrome) nevezzük, ha másik autoimmun betegséggel együtt jelentkezik, az APS leggyakoribb társbetegsége az SLE. Ezenkívül társulhat reumatoid artritisszel, Sjögren-szindrómával, szisztémás szklerózissal, polimiozitisszel, dermatomiozitisszel és egyéb autoimmun betegségekkel is. Az elsődleges és másodlagos APS klinikai megjelenési formái megegyeznek, viszont a kettő közötti egyértelmű különbségeket írtak le genetikai háttérükben, ami tovább bizonyítja a PAPS önálló voltát.

1.2. Az antifoszfolipid szindróma klinikai tünetei

Az APS klinikuma alapján két fő csoportra osztható: a trombotikus és a terhességi APS.

Trombotikus APS – Az APS leggyakoribb klinikai megjelenési formája a mélyvénatrombózis. Általánosságban is elmondható, hogy APS-ben a vénás trombózis gyakoribb az artériással szemben. APS-ben vérrögképződés történhet vénákban, artériákban

és kiserekekben is, így a betegség bármely vaszkularizált szövetet vagy szervet érinthet, és a szerv működésének megfelelő tüneteket okozhat. A szaporói kritériumok alapján a trombózist képző eljárással vagy szövettani módszerrel kétséget kizáróan igazolni kell. Az APS-ben kialakuló trombotikus tünetek kezelése nem különbözik az egyéb okból kialakult trombotikus esetektől, viszont később minden esetben krónikus antikoagulálásra szorul a beteg.

Terhességi APS – Az APS-ben kialakuló szülészeti szövődmények érinthetik csak a kismamát, illetve a kismamát és a magzatot egyaránt. A leggyakoribb, izoláltan a kismamát érintő forma a preeklampszia és az eklampszia, melynek prevalenciája rendre 9,5% és 4,4%. A magzatot – és így a kismamát is – érintő leggyakoribb terhességi manifesztáció a habituális vetélés, melyet a magzat 10. terhességi hét előtti halála okoz. APS-ben az élve születés aránya 47,7%.

1.3. Laboratóriumi eltérések az antifosfolipid szindrómában

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

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

- IgG vagy IgM izotípusú anti- β_2 -glikoprotein-I (anti- β_2 GPI)
- IgG vagy IgM izotípusú antikardiolipin (anti-KL)
- lupusz antikoaguláns (LA)

A fenti vizsgálatokat legalább egy alkalommal, legalább 12 hét elteltével meg kell ismételni, amivel elkülöníthető a fertőzések után gyakran megjelenő, átmeneti aPL-pozitivitás a valódi, APS-ben megjelenőtől.

Ma a klasszikus aPL-ek (IgG és IgM izotípusú anti- β_2 GPI és anti-KL) kikutatására elterjedt módszer az ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), melynek szerepét azonban ma már egyre inkább kezdi átvenni az elektrokemilumineszcencia (ECL) elvén működő automatizált módszer.

A lupusz antikoaguláns egy paradox jelenség, amely a nevét az *in vitro* tapasztalható antikoaguláns hatásáról kapta, viszont *in vivo* ezzel éppen ellentétben, protrombotikus hatást

vált ki. Az LA-teszt során két dolgot kell bizonyítanunk: (i) a plazma alvadási ideje megnyúlt, (ii) ez a megnyúlás foszfolipidfüggő.

Bár nem tartozik az APS kritériumtünetei közé, jellemző még laboratóriumi eltérésekre a trombocitopénia, amely viszonylag magas – forrásonként különböző –, 30–40%-os prevalenciával fordul elő APS-ben. Ritkábban (~10%) akár < 50 G/l, illetve visszatérő is lehet. A protrombotikus hatású immunológiai eltérések és a vézést okozó hematológiai eltérés gyakran jelentkezhet egyszerre.

1.4. Az antifoszfolipid szindróma osztályozása

Az APS-t a többi autoimmun betegséghez való viszonya alapján két típusra oszthatjuk. Amikor az APS önmagában, autoimmun társbetegség(ek) nélkül jelentkezik, elsődleges APS-ről (PAPS, primary antiphospholipid syndrome) beszélünk. Az APS-t másodlagosnak (SAPS, secondary antiphospholipid syndrome) nevezzük, ha másik autoimmun betegséggel együtt jelentkezik, az APS leggyakoribb társbetegsége az SLE. Ezenkívül társulhat reumatoid artritisszel, Sjögren-szindrómával, szisztémás szklerózissal, polimiozitisszel, dermatomiozitisszel és egyéb autoimmun betegségekkel is. Az elsődleges és másodlagos APS klinikai megjelenési formái megegyeznek, viszont a kettő közötti egyértelmű különbségeket írtak le genetikai háttérükben, ami tovább bizonyítja a PAPS önálló voltát.

1.5. Az antifoszfolipid szindróma okozta trombózis lehetséges pathomechanizmusai

Az antifoszfolipid szindróma leírása óta máig nagy kérdés, hogy az aPL-ek milyen mechanizmussal okozzák az egymásnak ellentmondó klinikai protrombotikus tüneteket és a laboratóriumi antikoaguláns eltéréseket. A tünetek kialakulásához vezető eseményeket a „két csapás” elmélet írja le, mely szerint az aPL-ek jelenléte (első csapás) szubklinikai protrombotikus állapotot, lappangó veszélyt jelent. Az aPL-ek prokoaguláns állapotot előidézve előkészítik a terepet egy esetlegesen megjelenő protrombotikus inger (második csapás) számára, amelynek már csak annyi a dolga, hogy „meghúzza a ravaszt”. A leggyakoribb, második csapásnak számító ingerek közé tartoznak a fertőzések, műtétek (átmeneti bakterémia) sebgyógyulás vagy bármely olyan folyamat, amely az immunrendszert védekezésre kényszeríti.

A hemosztázis sejtes (vérlemezké, endotél, monocita, neutrofil granulocita) és humorális (koagulációs kaskád, fibrinolitikus rendszer, komplementrendszer) alkotóira is bizonyítottan hatással vannak. Vérlemezke-aktivációs állatkísérletes eredményekkel is

sikerült alátámasztani a két csapás elméletet, miszerint az aPL jelenléte önmagában *in vivo* nem okoz trombozist, viszont egy protrombotikus hatású ágens, pl. intraperitoneálisan lipopoliszacharid és az intzvénásan aPL együttes adása után az erekben vérlemezékben dús trombusok keletkeznek. Az aPL-ek az érbelhártyát monocita-kemoattraktáns protein-1 (MCP-1) fokozott termelésére sarkallja, az MCP-1 a monocitákban közvetlenül fokozza a szövetifaktor-kifejeződést, ami végül prokoaguláns irányba billenti a hemosztatikus egyensúlyt. APS-ben a fent említett az endotélsejt általi MCP-1-termelés fokozhatja a monociták szövetifaktor-termelését, azonban számos kísérlettel igazolták, hogy az aPL-ek közvetlenül is fokozzák a monociták felszínén a szöveti faktor kifejeződését, ami közvetlenül hozzájárul a koaguláció beindításához. Egy új, többek között a véralvadást beindító működésüket nemrégiben fedezték fel, ez a neutrofil extracelluláris csapdák (NET, neutrophil extracellular trap) képződése vagy más néven NET-osis. APS-ben is megfigyelték az aPL-ek – elsősorban az anti- β_2 GPI – NET-osis kiváltó hatását is. Azonban az aPL-ek legrégebb óta ismert, koagulációra kifejtett hatása a lupusantikoaguláns-hatás, ami az alvadás *in vitro* megnyúlását jelenti, de tudjuk, hogy ez egy paradox jelenség, és a lupusantikoaguláns-pozitivitás *in vivo* fokozott trombozishajlamra utal. A pontos molekuláris mechanizmust illető kérdésre egyelőre nincs egyértelmű válasz, bár Noordermeer és mtsai. nemrégiben közölt eredményei alapján két egymástól független mechanizmus magyarázhatja az LA-hatást: az anti- β_2 GPI gátolja az V-ös véralvadási faktor (FV) aktív X-es faktor (FXa) általi aktivációját, illetve az anti-protrombin (anti-PT) az FXa-val verseng a foszfolipid felszínéért. Az utóbbi az LA laboratóriumi tesztjének elvét (alacsony és magas foszfolipid-koncentráció) is magyarázza. Szintén régebb óta ismert, és már számtalan kísérlettel igazolták, hogy az aPL-ek – az FV Leiden-mutációjában is megfigyelhető – aktivált protein C (APC) rezisztenciát okoznak, aminek a mechanizmusa egyelőre ismeretlen, azonban szoros összefüggést sikerült kimutatni a β_2 GPI I-es doménje ellen termelődött ellenanyagok (anti- β_2 GPI-DI) jelenléte és az APC-rezisztencia között. Az aPL-ek az extrinszik koagulációs útvonalat sem hagyják zavartalanul, gátolják a szövetifaktorútvonal-inhibitor (TFPI, tissue factor pathway inhibitor) működését, következésképpen egy az extrinszik útvonal működését korlátozó fontos tényező esik ki, és a koaguláció fokozódik.

1.6. Az antifoszfolipid szindróma fő autoantigénje, a β_2 -glikoprotein-I

Az APS egyik legfontosabb autoantigénje, a β_2 -glikoprotein-I-et (β_2 GPI) vagy más néven apolipoprotein H-t (apoH). A β_2 GPI egy 45–50 kDa (meghatározási módszertől függ)

méretű, erősen glikozilált szérumfehérje, amely kb. 200 mg/l koncentrációban van jelen a keringésben. A molekula öt egymás után gyöngysorszerűen kapcsolódó doménből áll, melyeket római számokkal jelölünk (I–V). Az I–IV. domén a CCP (complement control protein) szupercsaládba tartozik, és az azokra jellemző 60 aminosavas ismétlődő peptidszakaszokat tartalmaz. Az V. domén különleges felépítésű, tartalmaz egy a molekula felszínéből kinyúló, horgony szerepét betöltő peptidhurkot, a hurok közvetlen környezetében pedig egy pozitív töltésű, lizinben gazdag terület található. A β_2 GPI ezen eszközök segítségével képes stabilan rögzülni negatív töltésű foszfolipid felszíneken.

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

Egy fehérjének, génnek, vitaminnak az élettani szerepe általában annak hiány-állapotában vagy károsodása esetén ismerhető fel működésének kiesése vagy kóros működése révén. Bár a β_2 GPI genetikai hiánya nagyon ritka, egy japán felmérésben 222 egészséges egyén 6,3%-ában a β_2 GPI-et kódoló *APOH* gén kereteltolódási mutációja a fehérje heterozigóta hiányát okozta, ami miatt a β_2 GPI szérumszintje a tanulmányban mért átlagos 243 mg/l-ről 86 mg/l-re csökkent. Ugyanebben a tanulmányban azonosítottak két családot homozigóta β_2 GPI-deficienciával. Az egyének lipidprofilját és a véralvadási állapotát vizsgálva a β_2 GPI-hiánynak sem a heterozigóta sem a homozigóta formájában nem tudtak kimutatni a fehérje működésének kiesésére utaló eltérést.

A β_2 GPI eddig megismert működései:

- Különböző mechanizmusok révén gátolja a vérlemezkék – elsősorban az ADP (adenozin-difoszfát) indukálta – aggregációját, amit az anti- β_2 GPI antitestek felfüggesztenek, így a trombociták aggregációs készsége fokozódik.
- Kötődik a XI-es véralvadási faktorhoz, és gátolja annak XII-es faktor általi aktivációját.
- Gátolja a trombin prokoaguláns működését.
- Megvédi a trombint a heparin és kofaktora általi inaktivációtól.
- Kötődik a C3 komplementfaktorhoz, amelyben konformációváltozást idéz elő, és elősegíti a faktor H és I általi lebomlását, így csökkentve a komplementrendszer aktivációs készségét.

Egyre több adat gyűlik az irodalomban a β_2 GPI élettani működésével kapcsolatban, azonban a C-vitamin-hiány – skorbut, vashiány – anémia vagy a *CFTR* gén mutáció – cisztás fibrózis analógiája mentén egyelőre nem sikerült központi szerepet hozzárendelni a molekulához.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkánk fő célkitűzése az antifosfolipid szindróma molekuláris kórélettanának tanulmányozása volt a betegség központi antigénjének, a β_2 -glikoprotein-I-nek és a vele reagáló ellenanyagának, az anti- β_2 -glikoprotein-I-nek az élettani és kórélettani szerepét vizsgáló molekuláris biológiai és funkcionális vizsgálatokkal.

A következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. Az irodalomban fellelhető adatok alapján hipotézisünk az volt, hogy a β_2 GPI zárt és nyitott konformációja – az ellenanyagától függetlenül – eltérő élettani működésű, és ez a különbség megmutatkozik a véralvadásra kifejtett hatásában. Ezért célul tűztük ki, hogy vizsgáljuk a zárt és nyitott konformációjú β_2 GPI hatását az extrinszik és intrinszik koagulációs útvonalakat vizsgáló alvadási időkre és a koaguláció globális jellemzésére alkalmas trombingenerációra.
2. Ismert, hogy az anti- β_2 GPI a β_2 GPI nyitott formájához kötődik, illetve segíti annak nyitott konformációba való átalakulását. Hipotézisünk az volt, hogy felszíni plazmonrezonancia segítségével az anti- β_2 GPI és a zárt/nyitott konformációjú β_2 GPI között eltérő ellenanyag–ligandum kölcsönhatás mutatható ki.
3. Számos irodalmi adatból ismert, hogy az anti- β_2 GPI hatásai szinte kivétel nélkül β_2 GPI-függő módon valósulnak meg, a lupusantikoaguláns-hatásáról pedig ismert, hogy foszfolipidfüggő. Célunk volt az anti- β_2 GPI trombingenerációra kifejtett hatásának vizsgálata kontrollplazmában változtatva a β_2 GPI- és foszfolipid-koncentrációt, illetve VII-es, IX-es és XI-es faktorhiányos plazmában az extrinszik és intrinszik útvonalra kifejtett hatásának vizsgálata.
4. Továbbá célunk volt a „két csapás” elmélet kiterjesztéseként vizsgálni, hogy az anti- β_2 GPI mint szerzett protrombotikus ágens milyen hatással van a két leggyakoribb veleszületett protrombotikus betegségben, az V-ös véralvadási faktor heterozigóta Leiden-mutációjában és a protrombin gén G20210A heterozigóta polimorfizmusában szenvedő beteg trombingenerációjára.
5. Az anti- β_2 GPI bizonyítottan hatással van a véralvadás sejtes szereplőire is, ezért a „két csapás” elmélet vizsgálatát átemeltük sejtes kísérletekbe is. Hipotézisünk szerint az anti- β_2 GPI-nek vérlemezke-aktiváló, de legalább a vérlemezkék aktivációs ingerekre adott válaszára érzékenyítő hatása van.

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A betegek beválogatásának szempontjai, a betegek klinikai jellemzése

A kutatásunkhoz a mintagyűjtést a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság Egészségügyi Tudományos Tanács engedélyével (engedélyszám: 45368-1/2017/EKU) végeztük. A kísérleteinkbe beválogatott betegeket két csoportba oszthatjuk: (i) antifoszfolipid szindrómások, akik vérsavójából IgG anti- β_2 GPI ellenanyagot tisztítottunk, (ii) az V-ös véralvadási faktor Leiden-mutációját heterozigóta formában hordozó (FV_{Leiden}) vagy a protrombin gén G20210A polimorfizmusát heterozigóta formában hordozó (FII_{G20210A}) egyének, akik vérplazmáját trombingenerációs vizsgálatainkban használtuk.

Az IgG anti- β_2 GPI ellenanyagok tisztításához az APS-es betegek beválogatási szempontjai a következők voltak: LA-pozitivitás, anti-KL-pozitivitás és anti- β_2 GPI-pozitivitás – az utóbbi szintje meghaladja a szeropozitivitási referenciahatár (20 U/ml) 25-szörösét. A TG-mérésekhez hemosztazeológiai diagnosztikai laboratóriumból olyan betegektől gyűjtöttünk Na-citráttal alvadásgátolt plazmát, akiknél molekuláris genetikai módszerrel megerősítették, hogy vagy az FV Leiden-mutációját vagy a protrombin gén G20210A polimorfizmusát heterozigóta formában hordozzák, viszont a másakra nézve vad genotípusúak.

3.2. A β_2 GPI ligandum és az anti- β_2 GPI ellenanyag tisztítása

3.2.1. Emberi β_2 GPI tisztítása plazmából

A β_2 GPI tisztítását egy Artenjak és mtsai. által már leírt módszer alapján végeztük, melyet egy a molekula konformációját nyitottá és zárttá alakító lépéssel egészítettünk ki. A fehérjetisztítási folyamatot egészséges donoroktól származó, Na-citráttal alvadásgátolt plazmából végeztük, és három lépésből állt: (i) fehérjekicsapás perklórsavval, (ii) heparin-affinitáskromatográfia, (iii) kationcserélő kromatográfia.

3.2.2. A β_2 GPI-preparátum tisztasági vizsgálata Western-blottal és MALDI-TOF-fal

Western-blot – A β_2 GPI-tisztítási módszer utolsó lépése, a kationcserélő kromatográfia során keletkezett eluátumsorból mintát vettünk. A fehérjéket 10%-os nátrium-dodecil-szulfát–poliakrilamid gélen redukáló körülmények között választottuk szét, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra vittük át. A membránt TBS-ben (tris-buffered saline, trisz

pufferelte sóoldat; 20 mM trisz/HCl, 500 mM NaCl) oldott 3%-os gelatinnal (BioRad, USA) 1 órán át blokkoltuk. A membránra kötött fehérjéket antihumán- β_2 GPI (kecskében termeltetett; Novus Biologicals, USA, Colorado, Littleton) elsődleges és HRP-vel (horseradish peroxidase, tormaperoxidáz) konjugált antikecske-IgG (nyúlban termeltetett; Sigma-Aldrich, USA) másodlagos ellenanyaggal jelöltük. A jelölést a HRP egy kemilumineszcens szubsztrátumával (Immobilon Western, Millipore, USA, Massachusetts, Billerica) hívtuk elő. Ezt követően a membránt a nemfajlagos fehérjekimutatásra alkalmas Coomassie brilliant blue R250 (Sigma-Aldrich) festékekkel festettük.

MALDI-TOF – A β_2 GPI-oldatot tömegspektrometriás vizsgálatához C18 kromatográfiás módosított pipettahegygel (Pierce Biotechnology, Thermo Scientific, USA, Illinois, Rockford) töményítettük. A tömegspektrometriát 96 férőhelyes csiszolt acéllemez segítségével MicroFlex LT MALDI-TOF tömegspektrométeren (Bruker Daltonics GmbH) végeztük. Matrikként mustársavat (etanolban oldott transz-3,5-dimetoxi-4-hidroxi-fahéjsav; Merck) használtunk. Először a mintát, majd a mátrixot vittük fel a lemezre 1-1 μ l térfogatban.

3.2.3. *A β_2 GPI konformációjának nyitottá és zárttá alakítása*

Az irodalomban már korábban leírták, hogy a β_2 GPI konformációja zártból nyitottá – és vice versa – alakítható a fehérjét tartalmazó oldószer pH-értékének és NaCl-koncentrációjának különböző irányú és mértékű változtatásával. Körülbelül 2-2 mg tisztított β_2 GPI-et megfelelő Na^+ -koncentrációjú és pH-értékű pufferrel szemben 48 órán át dializáltunk. A dialízist minden esetben 4–8 °C-on végeztük. A konformációátalakítás hatásosságát és hatékonyságát strukturális tekintetben transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével negatív kontrasztosítással, funkcionális tekintetben pedig 100×-os hígítású aktivált parciális tromboplasztinidővel és 500×-os hígítású protrombinidővel ellenőriztük.

3.2.4. *IgG izotípusú anti- β_2 GPI ellenanyag tisztítása vérsavóból*

Az IgG anti- β_2 GPI ellenanyagot antifoszfolipid szindrómás betegek vérsavójából kétlépéses affinitáskromatográfiás módszerrel tisztítottuk. Az első lépésben a betegvérsavóból ligandumként Protein G-t tartalmazó affinitáskromatográfiás oszloppal (HiTrap Protein G [5 ml], GE Healthcare, Svédország, Uppsala) kinyertük az össz-IgG-t. Az IgG-eluátumot tovább tisztítottuk egy ligandumként β_2 GPI-et tartalmazó oszloppal, majd az oszlop által kötött fajlagos anti- β_2 GPI-et eluáltuk.

3.3. Az anti- β_2 GPI és a β_2 GPI funkcionális vizsgálatai

3.3.1. Trombingeneráció-teszt

A trombingeneráció-tesztekben minden esetben vérlemezkeszegény plazmát használtunk, amelyhez a plazma térfogatának 10%-ában β_2 GPI-et és/vagy anti- β_2 GPI-et különböző végkoncentrációban adtunk hozzá, a teszthez használt reagensek 1 vagy 5 pM TF-et (szöveti faktor) és 4 μ M FL-t (foszfolipid) tartalmaztak. A trombingeneráció-tesztekben hét különböző plazmát használtunk: (i) egészséges egyénektől származó kevert kontrollplazmát (KK), (ii) az V-ös véralvadási faktor Leiden-mutációját heterozigóta formában hordozó egyénektől származó kevert plazma (FV_{Leiden}), (iii) a protrombin gén G20210A polimorfizmusát heterozigóta formában hordozó egyénektől származó individuális plazmát (FII_{G20210A}), (iv) FVII-, (v) FIX-, (vi) FXI-hiányos plazmát (Siemens Healthcare, Németország, Marburg) és (vii) egészséges egyénektől származó mikropartikula-depletált plazmát (MDP).

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

3.3.2. Az anti- β_2 GPI és liganduma közötti kölcsönhatás vizsgálata felszíni plazmonrezonanciával

A felszíni plazmonrezonanciát (SPR, surface plasmon resonance) Biacore X készüléken (GE Healthcare, Svédország, Uppsala) végeztük. Az antifoszfolipid szindrómás betegektől származó anti- β_2 GPI-preparátumokból kiválasztottunk 5-öt, melyeket primer aminocsoportokon keresztül a gyártó használati utasítását követve külön-külön SPR érzékelőcsipre (500 nm, közepes sűrűségű karboximetildextrán hidrogéllal bevont csip, XanTec bioanalytics GmbH, Düsseldorf) kötöttünk fel. A β_2 GPI-heparin kölcsönhatás tanulmányozásához heparinnal fedett SPR-csipet (Heparin, 50 nm hidrogéllal bevont csip, XanTec bioanalytics GmbH, Düsseldorf) használtunk. Nyitott és zárt konformációjú β_2 GPI-et hat különböző koncentrációban (50, 100, 150, 300, 500 és 750 nM) fecskendeztük be a műszer mikroáramlási cellájába. A rendszer áramlási sebessége 10 μ l/min, hőmérséklete 37 °C volt a teljes kísérlet ideje alatt. A görbeillesztéshez a Langmuir-féle 1:1 arányú

kötődési modellt használtuk. Az egyensúlyi disszociációs állandót (K_d) és az asszociációs sebességi állandót (k_a) a BIAevaluation szoftver (GE Healthcare, Svédország, Uppsala) segítségével számítottuk és elemeztük.

3.3.3. *A mikropartikulák befolyása az anti- β_2 GPI trombingenerációra kifejtett hatására*

Ahhoz, hogy a mikropartikulák (MP) véralvadásra kifejtett hatását az anti- β_2 GPI trombingenerációra kifejtett hatásának vonatkozásában vizsgáljuk, MP-k kevert kontroll-plazmából való elválasztásával mikropartikula-depletált plazmát (MDP) készítettünk. Ehhez öt egészséges donortól vett, Na-citráttal alvadásgátolt teljes vért nagy sebességű centrifugálással (16.000 g, 30 min, 20 °C) eltávolítottuk az MP-eket, amit áramlási citometriai vizsgálattal erősítettünk meg. Az MP-eket méretük, foszfatidil-szerin- és a CD41-pozitivitásuk (vérlemezkére jellemző sejt felszíni molekula) alapján azonosítottuk. A KK-ból kivont MP-k mennyiségét a mintaelőkészítés során alkalmazott hígulási arányok és a mérés során alkalmazott térfogatáram alapján számoltuk.

Egy APS-es beteg vérsavójából tisztított anti- β_2 GPI-et adtunk mind KK-hoz, mind MDP-hez 500 U/ml végkoncentrációban. A trombingenerációhoz alacsony (4 μ M FL + 0,5 pM TF) és magas (4 μ M FL + 1 pM TF) TF-tartalmú indítóreagenst használtunk.

3.3.4. *Az anti- β_2 GPI vérlemezke-aktivációs hatásának vizsgálata a sejtaktivációt közvetlen és közvetett módon kimutató áramlási citometriás módszerekkel*

Az általunk használt, vérlemezke-aktivációt közvetlenül kimutató áramlási citometriai módszer a sejt felszíni P-szelektin-kifejeződés (PSE, P-szelektin-expresszió) vizsgálata, a közvetett módszer pedig a vérlemezke–fehérvérsejt heterotipikus aggregátumok képződésének kimutatása. A mintákat FC500 Beckman Coulter áramlási citométeren mértük.

A P-szelektin-kifejeződés vizsgálatához egészséges egyénektől vett, Na-citráttal alvadásgátolt teljes vérből, alacsony fordulatszámú centrifugálással (170 g, 15 min, 20 °C) vérlemezkedús plazmát (PRP, platelet-rich plasma) nyertünk, melyben a vérlemezkeszámot 250 G/l-re állítottuk be. A PRP-hez 10 μ M végkoncentrációjú TRAP-ot (trombinreceptor-aktiváló peptid), illetve 5 μ g/ml és 10 μ g/ml végkoncentrációjú anti- β_2 GPI-et adtunk. Az aktivációval egyidőben a vérlemezke azonosítására alkalmas sejt felszíni fehérjét, a glikoprotein IX-et (CD42a) és az aktivációját jelző P-szelektint (CD62P) a megfelelő, fluoreszcein-izotiocianáttal és fikoeritrinnel konjugált ellenanyaggal (anti-CD42a-FITC, anti-CD62P-PE) jelöltük. A vérlemezkéket 37 °C-os vízfürdőn inkubáltuk 5 percig. Ezen

mérésekben két szempont szerint kapuztuk a sejtpopulációkat: (i) méret és granuláltság és (ii) CD42a- és CD62P-pozitivitás alapján. A méret–granuláltság alapú kapuzással meg tudtuk állapítani a vérlemezkékből származó mikropartikulák, a sejtfelszíni fehérjék pozitivitása alapján történővel pedig az aktiválódott vérlemezkék arányát.

A vérlemezke–fehérvérsejt heterotipikus aggregátumok vizsgálatában a vérlemezke–monocita és vérlemezke–granulocita aggregátumokat azonosítottuk. Ehhez egészséges egyénektől vett, Na-citráttal alvadásgátolt teljes vért használtunk. Teljes vér 100 μ l-éhez 10 μ M végkoncentrációjú TRAP-ot, illetve 5 μ g/ml és 10 μ g/ml végkoncentrációjú anti- β_2 GPI-et adtunk. Az aktivációval egyidőben a vérlemezkék (CD42a) és a monociták (CD14) azonosítására alkalmas sejtfelszíni fehérjét a megfelelő ellenanyaggal (anti-CD42a-FITC, anti-CD14-PE) jelöltük. A mintákat 37 °C-os vízfürdőn 15 percig inkubáltuk. Az vérlemezke–fehérvérsejt aggregátumok azonosításához a monocitákat CD14-pozitivitás alapján kapuztuk, a granulociták méret és granuláltság alapján biztonságosan elkülöníthetők voltak. A fehérvérsejtek és vérlemezkék együttes jelenlétét az egyes fehérvérsejtpopulációkon belül az események CD42a-pozitivitásának arányával vizsgáltuk.

3.4. Statisztika

A statisztikai elemzést GraphPad Prism szoftverrel végeztük. Az egyes csoportok normális eloszlását Kolmogorov–Smirnov-teszttel vizsgáltuk. A normális eloszlást mutató csoportokat egyutas varianciaanalízissel (one-way ANOVA), a normális eloszlást nem mutató csoportokat Kruskal–Wallis-teszttel hasonlítottuk össze. Az SPR-vizsgálatokban a nyitott/zárt β_2 GPI eredményeit párosított t-próbával hasonlítottuk össze. A csoportok közötti statisztikai különbséget $P < 0,05$ esetében tekintettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A β_2 GPI véralvadásban betöltött élettani és kórélettani szerepe

4.1.1. A nyitott/zárt konformációjú β_2 GPI preparálása

β_2 GPI-preparátum minőségi vizsgálata – A különböző konformációjú β_2 GPI koagulációs kaszkádra kifejtett hatásának vizsgálatához humán vérplazmából natív β_2 GPI-et tisztítottunk. Western-blottal összfehérjefestés során egyetlen sáv rajzolódott ki a membránon körülbelül az 55 kDa-os molekulaméretnek megfelelő magasságban, amely megfelelt az ellenanyag-jelöléssel fajlagosan kimutatott fehérjének. A MALDI–TOF-eredmények szintén azt mutatták, hogy a mintánkban csak egy ~45,2 kDa méretű molekula volt jelen. A Western blot és a MALDI–TOF eredménye bár ellentmondásosnak tűnhet, külön-külön mindkettő megfelel az irodalomban közölt adatoknak. A kettő közötti különbségre a magyarázatot a β_2 GPI erősen glikozilált jellege adja (a cukor oldalláncok kölcsönhatásba lépve a poliakrilamid géllal csökkentik a molekulák elektroforetikus futási sebességét). Western-blottal és MALDI–TOF-fal végzett ellenőrző kísérleteinkkel sikerült igazolnunk, hogy a fehérjetisztítási folyamat során kinyert molekula β_2 GPI, és hogy a preparátum kísérleteink szempontjából jelentékeny szennyeződést nem tartalmazott.

β_2 GPI konformációjának átalakítása – A zárt és nyitott konformációjú molekulát negatív kontrasztoszással láthatóvá tettük, amivel sikerült bizonyítanunk a záró- és nyitópufferes kezelés hatásosságát. Az elektronmikroszkópiás felvételeken egyértelműen tudtuk azonosítani a gyűrű alakú zárt és a pálcika alakú nyitott konformációjú β_2 GPI-et. A kezelés hatékonyságának számszerűsítéséhez a β_2 GPI_{zárt} és a β_2 GPI_{nyitott} mintában 3-3 látótérben megszámláltuk a zárt molekulákat. A β_2 GPI_{zárt} mintában összesen 103, a β_2 GPI_{nyitott}-ban 3 db zárt konformációjú β_2 GPI-et találtunk, ez alapján ezt a módszert igen hatékonyak ítéltük.

4.1.2. A β_2 GPI késlelteti a fibrinképződést mind az intrinszik, mind az extrinszik útvonalon

A kísérleteink során elvégzett alvadásiidő-tesztek kettős szerepet töltek be: első sorban a β_2 GPI két konformációjának fibrinképződésre kifejtett hatását szerettük volna velük vizsgálni, másodsorban a konformációátalakítás hatásosságát megerősítő tesztként is szolgáltak. Két alvadási szűrőtesztet használtunk: az aPTI egy a mindennapi gyakorlatban használt alvadási szűrőteszt, amelyben kontaktaktivátort, foszfolipideket és Ca^{2+} -t használnak az

alvadás beindítására, míg a PI egy olyan szűrőteszt, melyben a fibrinképződést kontaktaktivátor helyett szöveti faktorral váltják ki; ennek megfelelően az aPTI-vel az intrinszik, míg a PI-vel az extrinszik koagulációs útvonalat vizsgáljuk.

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

4.1.3. *A $\beta_2\text{GPI}$ elhanyagolható hatást fejt ki a trombingenerációra*

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

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

4.1.4. *A $\beta_2\text{GPI}$ auto-ellenanyagához és heparinhoz való kötődésének jellemzése*

Vizsgálatainkban először anti- $\beta_2\text{GPI}$ -et kötöttünk SPR-csip felszínére, és $\beta_2\text{GPI}_{\text{zárt}}$ -at és $\beta_2\text{GPI}_{\text{nyitott}}$ -at injektáltunk a mikroáramlási cellába hat különböző koncentrációban.

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

A $\beta_2\text{GPI}$ és heparin közötti kölcsönhatás vizsgálatához a felszínén heparint kötött SPR-csippet használtunk, majd $\beta_2\text{GPI}_{\text{zárt}}$ -at és $\beta_2\text{GPI}_{\text{nyitott}}$ -at 6-6 különböző koncentrációban injektáltunk a mikroáramlási cellába. Várakozásainknak megfelelően a $\beta_2\text{GPI}$ jelentős affinitást mutatott a heparinhoz, és bár statisztikailag szignifikáns különbség nélkül, a nyitott konformációnál egy nagyságrenddel erősebb ($K_d = 2,98 \times 10^{-7}$) affinitást találtunk a zárthoz ($K_d = 3,50 \times 10^{-6}$) képest.

4.2. Az IgG anti- β_2 GPI véralvadásban betöltött kórélettani szerepe

4.2.1. Az anti- β_2 GPI egyszerre anti- és prokoaguláns hatást fejt ki a kontrollplazma trombingenerációjára

Az anti- β_2 GPI kevert kontrollplazma trombingenerációjára kifejtett hatását alacsony (15–125 U/ml) és magas (125–500 U/ml) koncentrációtartományban is vizsgáltuk. A reakciót 1 pM TF-fel és 4 μ M FL-lel indítottuk be.

Alacsony koncentrációtartományban a lupusz antikoaguláns alvadási időt nyújtó hatásának megfelelően az anti- β_2 GPI a látenciaidőt már 62 U/ml-nél szignifikánsan nyújtotta (6,54 min-ről 7,55 min-re; $P < 0,01$), ami 125 U/ml-nél még tovább fokozódott (8,13 min; $P < 0,001$). Ezzel ellentmondásos módon viszont az ellenanyag a mennyiségi paraméterekben növekedést okozott: bár a csúcsertékben is láttunk némi emelkedés, 31 U/ml anti- β_2 GPI szignifikánsan, 1496 nM \times min-ről 1619 nM \times min-re ($P < 0,01$) növelte a teljes reakció alatt keletkezett trombin össz mennyiségét.

A magasabb koncentrációtartományban végzett kísérletben az időparaméterre való hatásban az előző méréshez hasonló eredményeket kaptunk: 125 U/ml anti- β_2 GPI már szignifikánsan nyújtotta a látenciaidőt ($P < 0,01$), amely hatás 500 U/ml-nél még erősebbnek mutatkozott ($P < 0,001$). Az anti- β_2 GPI mennyiségi paramétereket növelő hatását magasabb koncentrációknál is sikerült kimutatni, azonban itt az ellenanyag az ETP-re nem volt hatással, viszont a csúcserteket 500 U/ml-nél szignifikánsan növelte ($P < 0,05$).

4.2.2. Az anti- β_2 GPI trombingenerációra kifejtett hatása függ a plazma foszfolipid-tartalmától és β_2 GPI-szintjétől

Kevert kontrollplazmából többszörös centrifugálással eltávolítottuk az MP-eket, amit áramlási citometriai vizsgálattal erősítettünk meg. A kísérletben először hagyományos módon 4 μ M FL-t használtunk, így az eddigiekhez hasonlóan az anti- β_2 GPI az időparamétert 11%-kal nyújtotta, a csúcserteket és az ETP-t pedig rendre 27%-kal és 19%-kal növelte. A kísérlet második felében a reagens FL-tartalmát 0,5 μ M-ra csökkentettük, hogy az ellenanyag hatását minél inkább függővé tegyük a rendszer FL- és MP-tartalmától. Ezen körülmények felfüggesztették az ellenanyag látenciaidőt nyújtó hatását (a látenciaidő megközelítőleg 10%-kal csökkent a kontrollhoz képest), viszont a csúcserték sokkal kifejezettebb, 73%-os emelkedést mutatott. Az MP-k eltávolításának önmagában sem 4, sem 0,5 μ M FL-koncentráció mellett nem volt hatása a látenciaidőre, viszont az MP-k eltávolításával az

anti- β_2 GPI-nek eltűnt az a markáns, csúcsértéket emelő hatása, amelyet $4\ \mu\text{M}$ FL-koncentráció mellett láttunk. Ugyanezt a jelenséget, kisebb különbséggel bár, az ETP esetében is megfigyelhettük.

Megvizsgáltuk, hogy a β_2 GPI koncentrációjának változása hogyan befolyásolja az anti- β_2 GPI trombingenerációra kifejtett hatását. β_2 GPI-et $200\text{--}1000\ \mu\text{g/ml}$ végkoncentrációban és anti- β_2 GPI-et $15\text{--}125\ \text{U/ml}$ végkoncentrációban kevert kontrollplazmához adtunk, majd a trombingenerációt $1\ \text{pM}$ TF-fel és $4\ \mu\text{M}$ FL-lel indítottuk be.

A β_2 GPI befolyásoló hatását leginkább az ETP-re való hatásában láttuk. A korábbi eredményekhez hasonlóan az ellenanyag növelte az ETP-t, ami a $31\ \text{U/ml}$ -nél volt a legkifejezettebb, viszont a β_2 GPI koncentrációjának egyidejű növekedésével az anti- β_2 GPI ETP-növelő hatása csökkenni látszott, $1000\ \mu\text{g/ml}$ esetében már minden ellenanyag-koncentrációnál.

4.2.3. Az anti- β_2 GPI eltérő hatást fejt ki a trombingenerációra az FV_{Leiden} - és $FII_{G20210A}$ - plazmában

Megvizsgáltuk, hogy az anti- β_2 GPI a kontrollplazmában tapasztalt paradox hatását ki tudja-e fejteni a két leggyakoribb öröklött trombofiliában, tovább fokozza-e a protrombotikus állapotot az V-ös véralvadási faktor Leiden-mutációjának és a protrombin gén $G20210A$ polimorfizmusának heterozigóta formájában. FV_{Leiden} - és $FII_{G20210A}$ -plazmához anti- β_2 GPI-et $125\text{--}500\ \text{U/ml}$ végkoncentrációban adtunk, majd a trombingenerációt $1\ \text{pM}$ TF-fel és $4\ \mu\text{M}$ FL-lel indítottuk be.

Az anti- β_2 GPI FV_{Leiden} -plazmában az LA-hatást a kontrollplazmában tapasztaltakhoz hasonlóan mutatta, már a legalacsonyabb koncentrációban is szignifikánsan nyújtotta a látenciaidőt ($P < 0,001$). Az anti- β_2 GPI $500\ \text{U/ml}$ koncentrációja az FV_{Leiden} -plazmában is képes volt fokozni a mennyiségi paraméterek közül a csúcsértéket $189\ \text{nM}$ -ról $243\ \text{nM}$ -ra ($P < 0,05$), azonban ez a hatás nem volt jelentősebb a kontrollplazmában tapasztaltnál.

A kísérletet a $FII_{G20210A}$ -plazmával is elvégezve azt kaptuk, hogy az anti- β_2 GPI a látenciaidőt még erősebben nyújtotta ($P < 0,0001$), viszont a korábbi kísérletekben tapasztaltakhoz képest a $FII_{G20210A}$ esetében a mennyiségi paramétereket (csúcsérték, ETP) nem emelte.

4.2.4. *Az anti- β_2 GPI anti- és prokoaguláns hatását eltérő koagulációs útvonalakon fejtí ki*

Az eddig bemutatott hatásokért felelős mechanizmus(oka)t is vizsgáltuk, amihez FVII-, FIX- és FXI-hiányos plazmát használtunk. A plazmákhoz 500 U/ml végkoncentrációban anti- β_2 GPI-et adtunk. A faktorhiányos plazmáknak a trombingenerációja jelentősen gyengébb az egészséges plazmához képest, 1 pM TF-fel nem kaptunk reprodukálható trombogramot, ezért ebben a kísérletsorozatban magasabb koncentrációjú, 5 pM TF-fel és 4 μ M FL-lel indítottuk be a trombingenerációt.

A látenciaidő a KK-ban, a FIX- és FXI-hiányos plazmában kontrolljaiban hasonlóak voltak, viszont a FVII-hiányos plazmában érthető módon (mivel szöveti faktorról indítjuk be a reakciót) látványosan hosszabb időt vett igénybe, hogy elinduljon a trombingeneráció. A FIX és a FXI hiánya nem befolyásolta az anti- β_2 GPI látenciaidőt nyújtó hatását, viszont a FVII-hiányos plazmában az időnyújtó hatás teljesen elmaradt.

A csúcsérték mindhárom faktorhiányos plazmában jelentősen alacsonyabb a KK-hoz képest. Az anti- β_2 GPI a KK-ban egy igen kifejezett emelkedést okozott a csúcsértékben, amit részben a FVII-hiányos plazmában is látunk, ellenben az intrinszik útvonalhoz tartozó faktorok hiányában ez a csúcsértéket fokozó hatás elmaradt, sőt enyhe csökkenés volt megfigyelhető.

4.2.5. *Az anti- β_2 GPI fokozza a vérlemezkék aktivációs készségét*

A vérlemezkék anti- β_2 GPI kiváltotta aktivációjának vizsgálatához közvetlen és közvetett vizsgálómódszereket használtunk. A „két csapás” elméletet alátámasztandó, a vérlemezkéket egyszerre inkubáltuk anti- β_2 GPI-vel és egy már ismert aktiváló ágnessel, TRAP-pal, amely a trombin receptoron keresztül erős aktivációs ingerként jelent a vérlemezkéknek. A TRAP-ot olyan (szupraminimális) koncentrációban alkalmaztuk, amely túllépi az aktivációhoz szükséges küszöbkoncentrációt, de a lehető legkisebb mértékű vérlemezke-aktivációt váltja ki, ez előkísérletek alapján 10 μ M-nak adódott.

Amikor a vérlemezkéket csak anti- β_2 GPI-vel inkubáltuk, a P-szelektin-kifejeződés nagyon hasonló volt a kontroll értékhez (1,3%), hasonlóan a vérlemezkéknek a monocitákkal (5%) és a granulocitákkal (9%) képzett heterotipikus aggregátumainak aránya jelentéktelen különbséget mutatott kontrollértékhez képest. A szupraminimális TRAP-koncentráció, ahogyan ez várható volt, a P-szelektin-pozitív vérlemezkék arányát enyhén növelte (7,9%), hasonlóan a vérlemezke–monocita aggregátumok arányát (16%). Annak ellenére, hogy az ellenanyag önmagában nem váltott ki aktivációt, a TRAP hatását elősegíteni látszik, az

anti- β_2 GPI koncentrációjának növelésével a TRAP-hatás is fokozódik mind a P-szelektin-kifejeződésben (5 μ g/ml anti- β_2 GPI: 20%, 10 μ g/ml anti- β_2 GPI: 25%), mind a vérlemezke-monocita (5 μ g/ml anti- β_2 GPI: 35%, 10 μ g/ml anti- β_2 GPI: 46%), illetve a vérlemezke-granulocita aggregátumok (5 μ g/ml anti- β_2 GPI: 16%, 10 μ g/ml anti- β_2 GPI: 24%) képződésében.

5. MEGBESZÉLÉS

A β_2 -glikoprotein-I már 60 éve ismert, kapcsolatáról az antifosfolipid szindrómával pedig már több mint 30 éve tudunk. A fehérje élettani sokoldalúságát mutatja, hogy többek között anti- és prokoaguláns tulajdonságai is vannak, ilyen pl. a XI-es véralvadási faktor aktiválódásának gátlása, vagy a trombin lebomlásának gátlása. A β_2 GPI jelenléte szükséges az auto-ellenanyaga által kifejtett kóros hatások kiváltásához is. Genetikai hiánya nagyon ritka, így nehezen vizsgálható élettani szerepe is, és mivel részleges és teljes β_2 GPI-hiányban nem sikerült működésbeli kiesést leírni sem a véralvadásban sem a zsíryanycserében, a β_2 GPI eddig talált hatásai vagy mellékesebb szerepet tölthetnek be az élettanában, vagy az az eddig megismertnél sokkal összetettebb.

A β_2 GPI működésének megértéséhez figyelembe kell venni azt is, hogy két szélsőséges konformációját írták le: a zárt (cirkuláris) és a nyitott („J” alakú) formát. Mivel a keringésben főleg a zárt forma fordul elő, és az anti- β_2 GPI hozzájárul a molekula felnyílásához, inkább a nyitott forma tekinthető a biológiailag működőnek. Kísérleteinkben β_2 GPI-et tisztítottunk, amelyet MALDI–TOF-fal 41,5 kDa molekulaméretűnek találtunk, és a pufferkörülmények változtatásával zárt és nyitott konformációjúvá alakítottunk. Elektronmikroszkópos módszer segítségével sikerült azonosítanunk a zárt és a nyitott konformációjú molekulát. A nyitott forma jelentős mértékben nyújtotta a foszfolipidfüggő alvadási időket. A hPI-tesztben a nyitott forma látványos nyúlást okozott, míg a zárt a kontrollhoz nagyon hasonló eredményt adott, ami alapján a hPI-teszt alkalmasnak tűnik a biológiailag aktív és inaktív forma elkülönítésére. Trombingeneráció-tesztben is vizsgáltuk a β_2 GPI hatását, amihez a gyártó ajánlása alapján az alapértelmezett összetételű indítóreagenst (5 pM szöveti faktor és 4 μ M foszfolipid) használtuk, ebben a vizsgálatban azonban még a nyitott konformációjú β_2 GPI-gyel sem kaptunk szignifikáns eredményt. Ezek az eredmények megfelelnek az irodalomban találhatóakkal, Ninivaggi és mtsai. hasonló mérési körülmények között ennek megfelelő eredményeket kaptak, a β_2 GPI nem volt hatással a trombingenerációra, illetve a gátló hatás csak alacsony koncentrációjú foszfolipid mellett volt megfigyelhető a hPI-tesztben talált eredményeinkhez hasonlóan.

A β_2 GPI V. doménje különleges abból a szempontból, hogy foszfolipidek kötésére alkalmas részek találhatóak a felszínén, viszont a molekula nemcsak foszfolipidekhez, hanem heparinhoz is képes kötődni. A β_2 GPI sokoldalúságát példázza az is, hogy képes megkötni és

megvédeni a trombint a heparinkofaktor II általi gátlástól. A β_2 GPI és a heparin közötti kölcsönhatást vizsgálva SPR-rel azt kaptuk, hogy bár mindkét konformációjú β_2 GPI kötődött a heparinhoz, a nyitott egy nagyságrenddel nagyobb affinitást mutatott a heparin iránt. Kolyada és mtsai. kimutatták, hogy a heparin bár kötődik a β_2 GPI-hez, a kötődés nem a foszfolipidkötő lizinoldallancokon keresztül valósul meg, így ezek működésére nincs hatással. Elképzelhető, hogy ez a körülmény befolyásolja az APS-ben adott heparin- vagy LMWH-terápia hatásosságát és így azok optimális terápiás dózisát is. Ez a kérdés azonban további vizsgálatokat igényel, mivel a heparin a β_2 GPI-nek a véralvadási faktorokkal a foszfolipid felszínéért való versengését, és az ilyen módon megvalósuló antikoaguláns hatását nem akadályozza meg, ugyanakkor a β_2 GPI a trombinlebomlás megakadályozásával protrombotikus hatást fejt ki, így nehéz lenne megjósolni, hogy a heparin dózisának változtatásával melyik hatás érvényesül jelentősebben.

Vizsgáltuk a β_2 GPI két konformációjának auto-ellenanyagához való kötődésének erősségét SPR-rel. Az vizsgálat szempontjából irreleváns ellenanyagokkal is elvégeztük a kísérletet a nemfajlagos kötődések kizárása céljából, ezekkel az ellenanyagokkal nem kaptunk értékelhető szenzorgramokat, ami arra utal, hogy a nemfajlagos kötődés elhanyagolható mértékű. Mindkét konformáció kötődött az ellenanyagához, a megfigyelt kötődések erőssége a 10^{-8} M tartományba esett mindkét konformáció esetében, amit fordított orientációjú kísérlettel is megerősítettünk. Nem minden anti- β_2 GPI ellenanyag idéz elő kóros állapotot, a legerősebb összefüggést a β_2 GPI I-es doménje ellen termelődött anti- β_2 GPI-nek tulajdonítják, amely kötődéséhez szükséges az antigén nyitott konformációja. Mivel az SPR-csipek felszínén minden vizsgálat esetében ugyanannyi ligandum (anti- β_2 GPI) volt, illetve ugyanolyan koncentrációban fecskendeztük be az analitikumot (zárt/nyitott β_2 GPI) a mikroáramlási cellákba, a szenzorgramok RU-értékeiből levonható az a következtetés, hogy az ellenanyagok nagyobb mennyiségű nyitott β_2 GPI-et tudtak megkötni, mint zártat. Eredményeinket tovább finomította volna az anti- β_2 GPI-DI arányának meghatározása a mintáinkban, ezek az eredmények azonban segíthetnek még alaposabban megérteni a β_2 GPI működésének részleteit.

A β_2 GPI élettani működésével kapcsolatban bár még számtalan tisztázandó kérdés van, a legtöbbet mégis az antifoszfolipid szindrómában betöltött kórélettani hatásáról tudunk, mivel többek között az ellene termelődő és vele reagáló auto-ellenanyagokhoz és az általuk kiváltott hatásokhoz köthetők az APS kórélettani folyamatai. Már az APS 1983-as leírása előtt ismerték azt az önellentmondó jelenséget, hogy ha egy beteg plazmája inkorrigábilis,

foszfolipidfüggő megnyúlást mutat az alvadási tesztekben, akkor abban a betegben nem vérzésre, épp ellenkezőleg trombózisra lehet számítani. A lupusz antikoaguláns jelenségét az antifoszfolipid ellenanyagok okozzák, viszont mivel azok egy heterogén csoportot képeznek, nem egyértelmű, hogy melyik ellenanyag(ok) és milyen molekuláris mechanizmus(ok) felelős(ek) ezért az összetett hatásért. Számos klinikai és kísérletes eredmény utal arra, hogy a β_2 GPI I-es doménjével reagáló anti- β_2 GPI a kóros antitest, és ez tehető felelőssé a trombózis fokozott kockázatáért.

APS-ben már régóta megfigyelték, hogy fokozott trombingeneráció jellemző a betegségre, a protrombin F_{1+2} fragmentuma és a fibrinopeptid A szintjének együttes emelkedését írták le anti-KL-pozitív APS-es betegekben. Ezek a klinikai eredmények azonban nem voltak elég meggyőzőek, mert fokozott trombingenerációt csak alkalmasszerűen tudtak kimutatni APS-ben. Kísérletes körülmények között azonban már sikerült bizonyítani, hogy az APS-es betegekből származó anti- β_2 GPI dózisfüggő módon képes fokozni a lézer kiváltotta artériás trombózist egérmodellben. Az aPL-ek *in vivo* hatását egyéb állatkísérletekben is bizonyították már, ahol szintén trombózist fokozó hatását írták le. Kísérleteinkben az anti- β_2 GPI koagulációra kifejtett hatását vizsgáltuk, hogy jobban megértsük a trombózist okozó hatásuk mechanizmusát. Ehhez APS-es betegek vérsavójából IgG izotípusú anti- β_2 GPI-et tisztítottunk, és egészséges plazma trombingenerációját mértük az ellenanyagok hozzáadása után. A tesztben 1 pM szöveti faktort használtunk, mert a trombingeneráció-teszt ismertén érzékenyebb, amikor alacsonyabb mennyiségű szöveti faktort alkalmazunk. Ezen körülmények között jobban vizsgálhattuk az anti- β_2 GPI jól ismert *in vitro* időnyújtó hatását. Az LA-hatás mellett az anti- β_2 GPI trombinképződést fokozó hatását is megfigyeltük.

Retrospektív tanulmány alapján az V-ös véralvadási faktor Leiden-mutációját (FV_{Leiden}) hordozókban a tünetmentes egyének ETP-je nem különbözik az egészségesekétől. Vizsgálatinkban azt találtuk, hogy a magas anti- β_2 GPI a heterozigóta FV_{Leiden} -plazmában is növelte a trombin csúcskoncentrációját a KK-ban találtakhoz hasonlóan, ami azt jelenti, hogy a leggyakoribb öröklött trombózishajlamban az aPL-ek jelenléte tovább növelheti a trombózis kockázatát. Az anti- β_2 GPI egy másik, gyakori öröklött trombózishajlamban, a protrombint kódoló gén G20210A polimorfizmusában ($FII_{G20210A}$) is késleltette a trombingenerációt. Bár azt figyeltük meg, hogy a csúcsérték és az ETP növekedni kezdett az anti- β_2 GPI hatására, statisztikailag szignifikáns hatást nem sikerült kimutatnunk még a legmagasabb ellenanyag-koncentrációban (500 U/ml) sem. Ezt magyarázhatja, hogy a

FII_{G20210A}-plazmában találtuk a legerőteljesebb, 79%-os látenciaidőt nyújtó hatást, ami a prokoaguláns hatást ellensúlyozza, szemben a FV_{Leiden}- és KK-ban talált 34%-os és 21%-os késleltető hatással.

Az APS-ben tapasztalható aPL-szintek és a hozzájuk tartozó klinikai kép nagyon változó, akár 100 U/ml ellenanyagszint mellett is alakulhatnak ki trombotikus szövődmények, illetve kiugróan magas értékekkel is lehetnek a betegek tünetmentesek. Emiatt megvizsgáltuk, hogy az anti- β_2 GPI képes-e kifejtetni az eddig tapasztalt hatásokat alacsonyabb koncentrációtartományban is. Azt találtuk, hogy a laboratóriumi pozitívítási határt (20 U/ml) csupán 2–3-szor meghaladó aPL-értékek is képesek voltak a látenciaidőt szignifikánsan nyújtani, és emellett még az ETP-t is szignifikánsan növelni, ami megegyezik az *in vivo* tapasztaltakkal, miszerint az aPL koncentrációja nem feltétlenül függ össze a klinikai állapot súlyosságával.

Az aPL-ek koagulációs rendszerre kifejtett hatásának magyarázatára több, egymást kiegészítő elmélet és kísérletes eredmény született. Az egyik legrégebb óta ismert mechanizmus, az APC-rezisztencia. Ezzel azonban az általunk is használt, sejtmentes körülmények között feltételezhetően nem kell számolni – hacsak mesterségesen hozzá nem adjuk a rendszerhez az aktivált protein C-t vagy az annak aktivációját elősegítő trombomodulint – mivel a trombin szubsztrátumfajlagosságának megváltozását és így az antikoaguláns működését az endotélsejtek felszínén kifejeződő trombomodulin segíti elő. Egyéb mechanizmusok, melyek viszont sejtmentes környezetben is számításba jöhetnek, a véralvadási faktorokat, illetve az azokat szabályozó rendszereket érintik. Ilyen lehet az annexin-A5-rezisztencia, a fibrinolízis gyengítése vagy a szövetifaktorútvonal-inhibitor (TFPI) működésének gátlása. Vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy a TG-kísérleteinkben tapasztalt pro- és antikoaguláns hatást az anti- β_2 GPI milyen útvonalakon fejti ki, amihez KK-t és véralvadásifaktor-hiányos plazmát használtunk. A faktorhiány miatt alacsonyabb TF-koncentrációval (1 pM) sok esetben nem kaptunk értékelhető trombogramot, ezért ezekben a kísérletekben a korábbiaktól eltérően magasabb, 5 pM szövetifaktor-koncentrációval indítottuk be a reakciót. Ebből kifolyólag a KK csúcsértéke is jelentősen magasabb lett. Önmagában a faktorhiányok is erőteljesen befolyásolták a trombingeneráció paramétereit. Az indítóreagens összetételéből (TF + FL) érthető, hogy a FVII-hiányos plazma látenciaideje volt a leghosszabb és a csúcsértéke a legalacsonyabb. A FIX- és a FXI-hiányban a látenciaidők hasonlóak voltak a KK-ban mértékéhez. A csúcsértékek a FVII-től távolodva nőttek, a legmagasabb, a KK-éhoz közeli volt a FXI-, majd következett a FIX-, és a

legalacsonyabb a FVII-hiányban volt. A hiányplazmákban az IgG anti- β_2 GPI ellenanyag hatása az időparaméterekre és a mennyiségi paraméterekre elkülönülni látszott annak megfelelően, hogy az extrinszik vagy az intrinszik útvonal maradt ép a plazmában. Az extrinszik út károsításakor az anti- β_2 GPI képes volt emelni a trombin mennyiségét, de a látenciaidőt nem tudta nyújtani, nem úgy az intrinszik út károsodásakor, ahol az ellenanyag képes volt késleltetni, de a trombin mennyiségi növekedése elmaradt. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az anti- β_2 GPI által kifejtett lupusantikoaguláns-hatás paradoxonja egymástól független, a koagulációs kaszkád különböző pontjain megvalósuló, párhuzamosan zajló folyamatok eredménye, amelyek elképzelhető, hogy állandó „kötélhúzásban” vannak egymással, és a trombózt véglegesen kiváltó hatás (második csapás) ezt a feszülő kötelet rántja meg pro irányba.

Több kísérlettel is igazolták, hogy az anti- β_2 GPI hatásának kialakulásához szükséges maga a ligandum, a β_2 GPI is. Banzato és Pengo kimutatta, hogy a tripla pozitív (LA, IgG anti-KL, IgG anti- β_2 GPI) APS-es betegekben a β_2 GPI szintje szignifikánsan magasabb. Ezen eredmények mentén elindulva terveztük meg kísérleteinket, melyekben a β_2 GPI szintjét emelve vizsgáltuk a ligandum befolyásoló hatását az anti- β_2 GPI TGT-ben kifejtett hatására. Azt kaptuk, hogy a β_2 GPI magasabb koncentrációi képesek mérsékelni az anti- β_2 GPI hatását, ami mögött feltételezhető egy „hígulási” mechanizmus, melynek lényege, hogy az összes ellenanyag β_2 GPI-hez kötött formában van, emellett nagy arányban van jelen olyan β_2 GPI, melyhez nem kötődik ellenanyag, így a szabad β_2 GPI és a β_2 GPI/anti- β_2 GPI komplex között versengés alakul ki a koagulációban betöltött szerepért.

A trombingenerációs vizsgálati rendszerünk bár sejtmentes volt, a TGT mintaelőkészítése olyan volt, hogy mikropartikulák maradhattak a plazmában, melyek szintén hozzájárulhattak az észlelt hatásokhoz. Annak vizsgálatára, hogy az MP-k milyen arányban járulnak hozzá az anti- β_2 GPI hatásához, mikropartikulákat távolítottunk el a KK-ból, és a mikropartikula-depletált plazmához adtuk hozzá az anti- β_2 GPI-et. A reagens-összetétel megfelelt a KK-ban használtéval (1 pM TF, 4 μ M PL), ekkor azonban nem kaptunk különbséget a KK-ban és az MDP-ben tapasztalt anti- β_2 GPI-hatások között. Azért, hogy a rendszer érzékenyebb legyen az FL-koncentrációra és az MP-k jelenlétére, csökkentettük a reagens FL-koncentrációját 0,5 μ M-ra. Ekkor már a reagens viszonylag magas foszfolipid-tartalma nem fedte el a KK és az MDP foszfolipid-koncentrációja közötti különbséget, és MP-k jelenlétében az anti- β_2 GPI sokkal magasabb csúcserték-emelkedést váltott ki, mint

azok hiányában. Ez a kísérlet is megerősíti azt az elképzelést, hogy az anti- β_2 GPI egyszerre, egymástól független, pro- és antikoaguláns hatást fejt ki; magasabb FL-koncentráció mellett az antikoaguláns hatás elnyomja a prokoagulánst, alacsony FL-koncentráció mellett azonban a prokoaguláns tud érvényesülni, és TGT-ben a csúcserték drasztikusan megemelkedik.

A keringésben található mikropartikulák legnagyobb mennyisége sejtaktivációból, elsősorban vérlemezke-aktivációból származik. Úgy tűnik, hogy az aPL-ek hemosztázisra gyakorolt hatása és az MP-k befolyásoló hatása két egymásba szövődő folyamat, mivelhogy az aPL-ek sejtaktivációs készségét már számos közlemény közvetlen és közvetett módon is bizonyította mind *in vivo*, mind *in vitro*. Vizsgálatainkban szintén megpróbáltuk bizonyítani az anti- β_2 GPI vérlemezkeaktiváló hatását, egyben a „két csapás” elméletet, miszerint az aPL-ek jelenléte önmagában csak megengedő tényezője a fokozott trombózishajlamnak. Mind a vérlemezkék aktivációját közvetlenül kimutató P-szelektin-kifejeződési vizsgálatban, mind az aktivációt közvetetten, a vérlemezke-fehérvérsejt aggregátumokat meghatározó vizsgálatban azt tapasztaltuk, hogy az anti- β_2 GPI jelenléte önmagában nem elegendő inger a sejtaktivációhoz, azonban egy közvetlen aktivációs ágens hatását, a TRAP-ét képes volt fokozni koncentrációfüggő módon. Állatkísérletek, *in vivo* eredményei is alátámasztják a „két csapás” elméletet, miszerint az aPL-ek intravénás befecskendezése nem közvetlen kiváltója, hanem fokozó tényezője a trombosishoz.

Kísérleteinkkel bemutattuk és igazoltuk a β_2 GPI véralvadásban kifejtett különböző élettani hatásait. Sikerült kimutatnunk az aPL-ek által kifejtett paradox hatást, miszerint egyszerre anti- és prokoaguláns hatással is bírnak, ami a trombin képződésének időbeliségében és mennyiségében mutatkozott meg. Ezt a kettős hatást sikerült elkülönítve is bemutatnunk, külön koagulációs útvonalakhoz rendelve a két eltérő működést. Ezekkel az eredményekkel egy újabb képkockája rajzolódott ki az β_2 -glikoprotein-I élettani hatásainak és az antifosfolipid szindróma kórélettanának. Még ma is számos alapvető kérdés megválaszolatlan az antifosfolipid szindrómával kapcsolatban. A PubMed adatbázisa alapján az *antiphospholipid syndrome* keresőszó alatt több mint 14.400 közlemény jelent meg 1977 és 2021 között, ami tetemes mennyiségű ismeretet feltételez. Ez azonban valószínűleg csak a jéghegy csúcsa, amit jól jellemez az is, hogy a 2018-as dublini ISTH SSC konferencia Lupus Anticoagulant vitafórumán Vittorio Pengo, az antifosfolipid szindróma egyik neves kutatója azt mondta hallgatóságának: „Ha most feltenném önöknek a kérdést, hogy mi az a lupusz antikoaguláns, nem tudnák megválaszolni, mert ezt ma még senki nem tudja!”

6. ÖSSZEFOGLALÁS

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

Célul tűztük ki az LA-jelenség vizsgálatát, illetve az anti- β_2 GPI (anti- β_2 -glikoprotein-I) kórélettani és az antifoszfolipid szindróma központi molekulája, a β_2 GPI élettani működésének vizsgálatát. Ehhez az ellenanyagot, illetve a ligandumát tisztítottuk, és vizsgáltuk, hogyan viselkednek kevert kontroll, öröklött protrombotikus, illetve mesterségesen előállított faktorhiány plazmákban.

Eredményeink rávilágítottak arra, hogy az anti- β_2 GPI-nek szerepe van az LA-hatás kialakulásában, melynek mind az antikoaguláns, mind a protrombotikus összetevőit ki tudtuk mutatni trombingenerációs vizsgálattal. A trombingeneráció-tesztekből nyert eredményeink arra engednek következtetni, hogy a két ellentétes hatás két különböző koagulációs útvonalon keresztül valósul meg. A β_2 GPI hatásait sikerült összefüggésbe hoznunk a molekula már eddig is ismert konformációváltozásaival, amiből arra következtethetünk, hogy a nyitott konformációt tekinthetjük a biológiailag aktívnak.

7. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ EREDMÉNYEI, MEGÁLLAPÍTÁSAI, KLINIKAI JELENTŐSÉGE

A β_2 -glikoprotein-I (β_2 GPI) élettani és kórélettani hatására vonatkozó új megállapítások:

- A β_2 GPI nyitott konformációja statisztikailag szignifikánsan nyújtja a foszfolipidfüggő alvadási időket, melyek közül a protrombinidő alkalmas a biológiailag aktív (nyitott) és inaktív (zárt) konformáció elkülönítésére.
- A β_2 GPI konformációtól függetlenül kötődik a heparinhoz, azonban a nyitott konformáció egy nagyságrenddel nagyobb affinitást mutat a heparin iránt.
- A β_2 GPI mindkét konformációjában kötődik az auto-ellenanyagához (anti- β_2 GPI), amelyek nagyobb mennyiségű nyitott β_2 GPI-et képesek megkötni.

Az anti- β_2 -glikoprotein-I (anti- β_2 GPI) kórélettani hatására vonatkozó új megállapítások:

- Az anti- β_2 GPI szerepet játszik a lupusz antikoaguláns paradox hatásának kialakulásában. Az ellenanyag egyszerre fejt ki a trombinképződést késleltető és a trombinképződést fokozó hatást.
- Az anti- β_2 GPI a prokoaguláns hatását az intrinszik, az antikoaguláns hatását az extrinszik útvonalon fejt ki.
- Az anti- β_2 GPI pro- és antitrombotikus hatását egészséges plazmán kívül az V-ös véralvadási faktor Leiden-mutációját heterozigóta formában hordozó plazmában és a protrombin gén G20210A polimorfizmusát heterozigóta formában hordozó plazmában is ki tudja fejteni, amivel a trombofiliát képes tovább fokozni.
- Az anti- β_2 GPI által kifejtett hatást befolyásolja a plazma foszfolipid-koncentrációja. Alacsony foszfolipid-koncentráció mellett erősebben érvényesül az anti- β_2 GPI protrombotikus hatása.
- Az anti- β_2 GPI által kifejtett vérlemezke-aktivációs hatás megfelel a két csapás elméletnek, miszerint a vérlemezkek fokozott aktivációjához az ellenanyag jelenléte csak megengedő tényező, a fokozott aktiváció kialakulásához szükséges valamilyen közvetlen aktiváló ágens.



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

Jelölt: Szabó Gábor

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10,427

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

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

Debrecen, 2021.08.31.



8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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

A kutatómunkát támogatta:

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