

SEMMELWEIS EGYETEM  
DOKTORI ISKOLA

**Ph.D. értekezések**

**3003.**

**MARÓTHY<sup>NÉ</sup> TÓTH ERZSÉBET**

**Patobiokémia**  
című program

Programvezető: Dr. Csala Miklós, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Kolev Kraszimir, egyetemi tanár

# A fibrin - neutrofil extracelluláris csapda - von Willebrand-faktor tengely artériás thrombosisban

Doktori értekezés

**Maróthyiné dr. Tóth Erzsébet**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kolev Kraszimir, MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Gadó Klára, PhD, főiskolai tanár  
Dr. Gindele Réka, PhD, egyetemi tanársegéd

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Domján Gyula, PhD, professor emeritus

Tagok: Dr. Blaskó György, MTA doktora, egyetemi tanár

Dr. Bógel Gábor, PhD, egyetemi adjunktus

Budapest  
2023

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék .....	1
1. Rövidítések jegyzéke .....	5
2. Bevezetés .....	9
2.1. A thrombusok .....	9
2.1.1. A thrombusok összetétele, heterogenitása .....	9
2.1.2. Koszorúér-betegség (Coronaria arteria disease, CAD) .....	10
2.1.3. Perifériás artéria elzáródásos betegsége (PAD) .....	11
2.1.4. Artériás isémiás agyi katasztrófa (AIS, stroke).....	12
2.2. A vörösvértestek szerepe a thrombosisban és fibrinolízisben .....	14
2.3. Von Willebrand-faktor.....	15
2.3.1. A von Willebrand-faktor szerkezete és metabolizmusa.....	15
2.3.2. A von Willebrand-faktor hiánya .....	17
2.3.3. A von Willebrand-faktor funkciója .....	18
2.4. A vérlemezkék szerkezete, szerepe, immuno-thrombosis .....	20
2.5. Neutrofil granulociták és neutrofil extracelluláris csapdák (NET).....	24
2.5.1. Neutrofil granulociták, polimorfonukleáris sejtek (PMN).....	24
2.5.2. NET keletkezése és szerepe az atherothrombosisban .....	25
2.5.3. A NET fehérjekomponenseinek a hatása .....	31
2.5.4. A neutrofil granulociták eltűnése, a NET-ek emésztése, terápiai lehetőségek..	32
2.6. Peptidil-ariginin-deziminázok (PAD, PADI) és szerepük.....	34
2.6.1. A PAD enzimek által katalizált reakció .....	34

2.7.2. PAD izoenzimek, előfordulásuk, fiziológiás és patológiás szerepük .....	35
2.8. Véralvadék keletkezése patológiás állapotokban.....	38
2.8.1. Diabetes, dyslipoproteinaemia és obesitas .....	39
2.8.2. Hypertonia.....	42
2.8.3. Dohányzás .....	44
2.9. Gyulladásos jelek.....	45
2.9.1. C-reaktív protein (CRP) .....	45
2.9.2. A fibrinogén szintézise, szerepe.....	46
2.10. A fibrin biomechanikája és litikus jellemzői .....	47
3. Célkitűzések .....	50
4. Módszerek .....	51
4.1. A betegek jellemzői .....	51
4.2. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek készítése.....	55
4.3. Immunfluoreszcens felvételek készítése.....	56
4.4. Fibrinogén citrullinálása .....	58
4.5. Fibrin alvadásának turbidimetriás mérése .....	59
4.6. Fibrinogén SDS poliakrilamid gélelektroforézise .....	60
4.7. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek statisztikai értékelése .....	60
4.8. Immunfluoreszcens felvételek statisztikai analízise .....	60
4.9. Citrullinált fibrin pásztázó elektronmikroszkópos felvételeinek statisztikai értékelése .....	61
5. Eredmények .....	63
5.1. Az artériás thrombusok vWF- vagy DNS-tartalmának függése a beteg életkorától..	63
5.2. Az artériás thrombusok vWF- és DNS-tartalmának korrelációja .....	67

5.3. Az artériás thrombusok fibrinszálmérőjének függése a thrombus vWF- és DNS-tartalmától.....	68
5.4. A dohányzás hatása a fibrinszál vastagságára és a thrombus von Willebrand-faktor tartalmára.....	71
5.5. A vér, valamint a thrombus fehérvérsejttartalmának és a thrombus vWF-tartalmának korrelációja.....	71
5.6. A vér fibrinogén, valamint C-reaktív protein szintjének összefüggése a thrombus von Willebrand-faktor vagy DNS tartalmával .....	73
5.7. Citrullinált fibrinogénből képződő alvadék szerkezete.....	77
5.8. Citrullináció hatása a fibrinogén alvadási kinetikájára .....	80
6. Megbeszélés .....	82
6.1. Az artériás thrombusok von Willebrand-faktor vagy extracelluláris DNS tartalmának függése a beteg életkorától.....	82
6.2. Az artériás thrombus DNS- és von Willebrand-faktor tartalmának korrelációja .....	84
6.3. Az artériás thrombusok fibrinszálmérőjének függése a thrombus vWF- és DNS-tartalmától.....	85
6.4. A dohányzás hatása a fibrinszál vastagságára és a thrombus von Willebrand-faktor tartalmára.....	86
6.5. A vér, valamint a thrombus fehérvérsejt-tartalmának és a thrombus vWF-tartalmának korrelációja.....	87
6.6. A vér fibrinogén, valamint C-reaktív protein szintjének összefüggése a thrombus von Willebrand-faktor vagy DNS tartalmával .....	88
6.7. Citrullinált fibrinogénből képződő alvadék szerkezete.....	92
6.8. Citrullináció hatása a fibrinogén alvadási kinetikájára.....	93
7. Következtetések.....	95
8. Összefoglalás .....	96

9. Irodalomjegyzék .....	97
10. Saját publikációk jegyzéke .....	120
11. Köszönetnyilvánítás .....	121

## 1. Rövidítések jegyzéke

ADAMTS13	A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 repeat 13, egy diszintegrin és metalloproteáz 1. típusú trombospondin ismétlődéssel 13. altípusa
ADP	adenozin-difoszfát
AIS	acute ischemic stroke, heveny isémiás agyi katasztrófa
Ang-2	angiotenzin-2
ANOVA	analysis of variance, varianciaanalízis
Arg	arginin
ATP	adenozin-trifoszfát
CAD	coronaria arteria disease, koszorúér-betegség
CCL	egy szerkezeti citokintípus: 2 szomszédos cisztein által másik ciszteinekkal alkotott diszulfidhidat tartalmazó ligand
CD36	cluster of differentiation 36 protein, cluster of designation 36, classification determinant 36, zsírsav-transzlokáz, B-típusú takarítóreceptor 3. tagja
CD40	cluster of differentiation 40 protein, a TNF-receptorcsalád tagja az antigénprezentáló sejteken
CD40L	cluster of differentiation 40 ligand, a CD40 receptor ligandja a T-limfocitákon, trombocitákon
cFn/cFg	citrullinált fibrin/fibrinogén
cH1, cH2A	citrullinált hiszton-1 és 2A
cH3, cH4	citrullinált hiszton-3 és 4
CRP	C-reaktív protein
CXCL	egy szerkezeti citokintípus: 2 olyan cisztein között egy aminosavat tartalmazó ligand, amelyek másik ciszteinekkal diszulfidhidat alkotnak
Cys	cisztein
DAMP	danger-associated molecular pattern, veszélyhez társuló molekuláris mintázattal rendelkező részecskék (DNS, mikrobák, stb.)

DNase1L3	DNase-1-like-3, DNáz-1-szerű-3, dezoxiribonukleáz-1-szerű-3
DN-áz-1	dezoxiribonukleáz-1
DNS	dezoxiribonukleinsav
ER	endoplasmic reticulum, endoplazmás retikulum
ERK	extracellular signal-regulated kinase, a MAPK egyik fajtája
FN50	a thrombusmetszetek konfokális mikroszkópos képén a fibrin és extracelluláris dezoxiribonukleinsav által elfoglalt terület arányának mediánja immunfluoreszcenciás kimutatás során
FW50	a thrombusmetszetek konfokális mikroszkópos képén a fibrin és von Willebrand-faktor által elfoglalt terület arányának mediánja immunfluoreszcenciás kimutatás során
GDP	guanozin-difoszfát
Gly	glicin
GpIb-IX-V	glikoprotein-1b-9-5
GpIIb/IIIa	glikoprotein-2b-3a integrin
GpVI	glikoprotein-6
GTP	guanozin-trifoszfát
HDL	high-density lipoprotein, nagy sűrűségű lipoprotein
HMGB1	high mobility group box-1, nagy mozgékonyágú csoportdoboz-1
IL	interleukin
LDL	low-density lipoprotein, alacsony sűrűségű lipoprotein
MAPK	mitogen-activated protein kinase, mitogénaktivált protein-kináz
mCRP	monomer C-reaktív protein
MEK	<b>MAPK/ERK Kinase</b> , mitogénaktivált protein-kináz-kináz-1/2
MET	makrofág extracelluláris csapda (trap)
MMP	mátrix metalloproteáz/metalloproteináz
MPO	mieloperoxidáz
NADPH	nikotinsavamid-adenin-dinucleotid-foszfát redukált formája
NE	nemzetközi egység
NET	neutrofil extracellular trap, neutrofil sejten kívüli csapdája



NETosis	neutrofil extracelluláris csapda (trap) képződése
NOS	nitrogén-monoxid-szintáz
oxLDL	oxidized low-density lipoprotein, oxidált alacsony sűrűségű lipoprotein
PAD	peripheral artery disease, perifériásartéria-betegség
PAD/PADI	peptidil-arginin-dezimináz, protein-arginin-dezimináz
PAI-1	plasminogen activator inhibitor, plazminogénaktivátor gátlószere
pCRP	pentamer C-reaktív protein
pCRP*	pentamer C-reaktív protein aktivált formája
PI3K	foszfatidilinozit-3-kináz
PKC	protein-kináz C
PMN	polymorphonuclear neutrophil granulocyte, sokkaréjos magvú semleges festődésű fehérvérsejt
Raf	cellular Rapidly Accelerated Fibrosarcoma, a mitogénaktivált protein-kináz-kináz-kináz egyik típusa
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; CCL5; szerkezeti citokintípus, melyben szomszédos ciszteinek alkotnak diszulfidhidat másik ciszteinével, ennek 5. sz. altípusa
ROS	reactive oxygen species, reaktív oxigénszármazékok
SARS-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, súlyos heveny légzési elégtelenséget okozó koronavírus 2. típus
sdHDL	small dense high-density lipoprotein, kis méretű és sűrű nagy sűrűségű lipoprotein
sdLDL	small dense low-density lipoprotein kis méretű és sűrű alacsony sűrűségű lipoprotein
SEM	scanning electron microscopy, pásztázó elektronmikroszkóp
Ser	szerin
SOD	szuperoxid-dizmutáz
STEMI	ST-elevation myocardial infarct, ST-emelkedéssel járó szívinfarktus
fFVS%	fehérvérsejtszám a thrombusmetszetek területének százalékában a SEM képeken

TF	tissue factor, szöveti faktor
TLR	toll-like receptor
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor-alpha
tPA	tissue type plasminogen activator, szöveti típusú plazminogénaktivátor
TXA <sub>2</sub>	tromboxán-A <sub>2</sub>
uPA	urokináz típusú plazminogénaktivátor
VLA	very late antigen, nagyon késői antigén
VVT	vörösvértest
VWD	Von Willebrand factor disease, von Willebrand-faktor-betegség
vWF	von Willebrand-faktor

## **2. Bevezetés**

### **2.1. A thrombusok**

#### 2.1.1. A thrombusok összetétele, heterogenitása

A 2019. évi adatok szerint az egész földön az első két vezető halálok az isémiás szívbetegség és az akut agyi érkatasztrófa (stroke). Minden 100 000 főből 400, illetve 200 magyar ember halt meg a fenti okok következtében abban az évben [1]. Az artériában kialakuló thrombus miatt a szerv vérellátása elégtelenné válik, és ez közvetlen szervkárosodáshoz vezet [2]. Bár normális körülmények között a vér folyékony állapotban áramlik a zárt vérpályában, veleszületett és/vagy szerzett betegségek következtében a vér az érpályán belül is megalvadhat. A keletkezett véralvadék tulajdonságai, összetétele függ attól, hogy az érpálya melyik szakaszában, milyen áramlási viszonyok között keletkezett, milyen rizikótényezők és betegségek fokozták a thrombus keletkezésének valószínűségét, mennyi idősebb a thrombus [3]. A thrombus összetétele, tulajdonságai viszont meghatározzák, hogy milyen módon kezelhető a betegség műtéttel vagy gyógyszerekkel, a kezelés várhatóan sikerül-e, kialakul-e embólia, illetőleg később újabb thrombus [2].

Néhány évtizeddel ezelőtt csak kisszámú thrombus post mortem hisztológiai vizsgálatára volt lehetőség. Manapság az artériás thrombusok műtéti vagy perkután intervenciók eltávolítása gyakran megtörténik, így sokkal nagyobb mintaszám áll rendelkezésre a thrombusok összetételének vizsgálatára. Ezen kívül komputertomográfias és mágneses rezonanciavizsgálattal is próbálják a klinikusok megbecsülni, hogy mi a thrombus összetétele, milyen kezelés lenne célszerű [4].

A hagyományos patológiai osztályozás szerint a thrombusok színük, összetételük és tulajdonságaik szerint kategorizálhatók: A vörös thrombusok sok vörösvértestet tartalmaznak a kevés fibrin mellett és nagyon kevés trombocitát, lazán kötődnek a vénák falához, vagy a megrepedt plakknál akár artériában is képződnek. A fehér thrombusok vérelemezkeiben és fibrinben gazdagok, de vörösvértestben szegények, a gyors áramlású artériákban és arteriolákban, ill. az atheroscleroticus plakk eróziója során képződnek. A gyakori kevert típusban a vörös és fehér thrombus csíkjai váltogatják egymást.

A vérlemezkék fontos szerepet játszanak a fiziológiás alvadék és a patológiás thrombus kialakulásában. Aktiválódásuk során átrendeződnek a plazmamembrán foszfolipidjei, a sűrű (denz,  $\delta$ ) granulumból kis molekulák és ionok, az  $\alpha$ -granulumból pedig fehérjék ürülnek, és a granulomok membránja fuzionál a plazmamembránnal. A vérlemezkék aktiválódása fokozatosan és különbözőképpen megy végbe, ezért az alvadék egyes részein különböző vérlemezkepopulációk találhatók [5]. Az érsérülés helyén keletkező alvadék belső magjában a vérlemezkék GpVI- és  $\alpha 2\beta 1$ -receptorokkal kollagénhez, a GpIb-V-IX komplexszel pedig von Willebrand-faktorhoz (vWF) kötődnek, a kalciumszint a sejten belül a citoszolban tranziensen magas. Ennek következtében a fuzionált  $\alpha$ -granulomok degranulálódnak, a sejtadhéziós molekulák aktiválódnak, a vérlemezkék aggregálódnak, később összehúzódnak. Erős aktivátorok: kollagén, trombin és ROS (reaktív oxigénszármazékok) hatására a vérlemezkék egy másik populációjában tartósan magas citoszolikus kalciumszint lesz. Ezek prokoaguláns trombocitává alakulnak: foszfatidilszerin kerül a külső membránrétegbe, az  $\alpha$ - és  $\delta$ -granulomok degranulálódnak, a trombociták duzzadnak és felületüket alvadási faktorok fedik be, sok trombin keletkezik, ami fokozza a szomszédos vérlemezkékben a foszfatidilszerin-expozíciót, a vérlemezkék bimbóznak, extracelluláris vezikulák válnak le, melyek a vérlemezkékkel együtt felszínt biztosítanak a gyors alvadékképződéshez, ezért vékonyzálú, sűrű fibrinháló keletkezik. Az artériákban keletkező thrombusokban is megfigyelhető a fenti kétféle vérlemezkepopuláció [6]. Az alvadék peremén gyenge aktivátorok (ADP, tromboxán-A<sub>2</sub>) hatnak, a vérlemezkék aktivációja nem teljes mértékű, diszkoid alakúak, gyengébben kötődnek a vérfehérjékhez, a körülöttük levő fibrinháló lazább [7].

### 2.1.2. Koszorúér-betegség (Coronaria arteria disease, CAD)

Régóta ismert, hogy a koszorúér-betegség oka az atherosclerosis [8]. Kockázati tényezők, melyek atherosclerosisra vezetnek és megváltoztatják a thrombus tulajdonságait a: magas vérnyomás [9], cukorbetegség [10], magas LDL-koleszterinszint [11], dohányzás [12]. Ezek jelentőségével az értekezés külön fejezete foglalkozik (ld. később).

A thrombus öregedésével változik a thrombus összetétele is. Minél több idő telik el a myocardialis infarctus tüneteinek megjelenése és a thrombus eltávolítása között (amit isémiás időnek nevezünk), annál jobban nő a fibrin/vérlemezke arány a coronaria thrombusban a fibrinháló növekedése és a vérlemezke pusztulása miatt, valamint a vörösvértestek összenyomódnak az alvadék összehúzódásakor, sokszög alakú polihedrocitákká válnak, továbbá egyre több limfocita jelenik meg [13, 14].

Az atheroscleroticus plakk lehetséges típusai: stabil, vékonysapkájú, megrepedt, erodálódott. A vékonysapkájú (és nagy lipidtartalmú) plakk hajlamos a megrepedésre. A megrepedt és erodálódott plakk felszínén keletkezik thrombus. A repedés során a vér beáramlik a plakkba, ahol találkozik a főképpen a monociták membránjában levő szöveti faktoral, olyan alvadék keletkezik, amelynek nagyobb része fibrin, kisebb része pedig vérlemezke: 74%, ill. 35%, míg a vastag fibrotikus sapkájú plakk eróziójakor, a főképp kollagén kezdeményezésére keletkező thrombusban épp fordítva: 70% trombocita és 51% fibrin [15]. Az akut myocardialis infarctusos betegből a rupturált plakkok felszínéről aspirált thrombusokban a plakkok közvetlen találkozásánál levő részen nekrotikus maradványok, makrofágok és koleszterinkristályok találhatóak a legnagyobb mennyiségben, amik a vérből származó vWF-hoz és fibrinhez kötődnek, míg mátrixfehérjék és sejtek nem találhatóak a thrombus és plakk találkozási pontjában [16]. A cukorbetegség és az elhízás fokozza az atheroscleroticus plakkok sérülékenységét, könnyebben repednek vagy erodálódnak [17].

### 2.1.3. Perifériás artéria elzáródásos betegsége (PAD)

A statisztikai adatok szerint az alsó végtag artériáiban az atherosclerosis az idősök 30%-ában megtalálható, de az esetek kb. 2/3-ában tünetmentes. A perifériás érbetegségben szenvedők mintegy negyede cerebrovascularis tüneteket mutat 5 éven belül, másik 1/4 része pedig cardiovascularis tüneteket [18]. A perifériás thrombusból származó fibrinszál vastag, az alvadék pórusai kicsik, ex vivo az oldékonysága rossz, a beteg gyógyulási kilátásai kedvezőtlenek [19]. A perifériás artériák thrombusainak fibrintartalma és szálátmérője is magasabb a coronariákból származóknál. Majdnem mindegyik vizsgált PAD-beteg hypertoniás és dohányos, valamint sokféle társbetegségben is szenved. Az összes dohányos

beteg thrombusában a fibrin mennyisége magasabb (DNS-hez vagy citrullinált hisztonhoz hasonlítva) a nem dohányzóknál [20].

#### 2.1.4. Artériás isémiás agyi katasztrófa (AIS, stroke)

A Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) kritériumok szerinti kategorizálás szerint a stroke etiológiája lehet: kardioembóliás, nagyartéria atheroscleroticus, kisartéria elzáródásos, egyéb (beleértve a carotid dissectiot és paradox embóliát), valamint kriptogén [21]. Újabb az ASCOD kategorizálás használatos: atherosclerosis, kisérbetegség (small vessel disease), cardioembolia, egyebek (others) és széthasadás (dissection) [22].

Eredetileg úgy vélték, hogy a nagyartériás eredetű és agyi érelzáródást okozó thrombusok vérlemezkékben gazdagok, míg a szív eredetű, főképp pitvarfibrilláció miatt az agyi keringésbe kerülő thrombusok eritrocitákban és/vagy fibrinben gazdagok [23, 24]. Ennek megfelelően a pitvarfibrilláció miatti stroke-os beteget rendszerint antikoaguláns terápiával kezelik, hogy megakadályozzák az újabb thrombus keletkezését, míg az érelmeszesedett nagyartéria miatti stroke-os beteget vérlemezkegátlóval [25]. Ugyanakkor számos vizsgálati eredmény szerint nincs különbség a thrombusok etiológiája szerint a háromféle összetevő arányában [26], sőt, az utóbbi időben ellentétes eredményeket is publikáltak nagyobb számú betegen és a hagyományos hematoxin-eozin festést egyéb festési módokkal kiegészített vizsgálatok alapján, miszerint épp az artériás eredetűek a vörösvértestben és fibrinben gazdagok [27].

Az ellentmondásos vizsgálati eredmények alátámasztják, hogy a thrombus egyéb sejtes és nem sejtes összetevőit is érdemes figyelembe venni. Gyulladások helyszínén a neutrofil granulociták jelennek meg először. A thrombusok öregedésével egyre nagyobb a számuk [28], és a rendezett szerkezetű kardioembóliás etiológiájú agyi thrombusokban különösen sok leukocita található [29]. Rosszindulatú daganat gyakran jár együtt trombotikus betegségekkel, a daganatok gyakran okoznak kriptogén etiológiájú stroke-ot, amikor is a thrombus gazdag trombocitákban [30]. A neutrofil granulociták képesek arra, hogy a fragmentálatlan DNS-t citoplazmatikus, magi és granulumfehérjék társaságában kilökjék magukból. Ez egy ősi nem-specifikus immunreakció: a DNS-háló csapdába ejti a

baktériumokat, a neutrofil extracelluláris csapdák (NET) egyéb összetevői segítenek az elpusztításukban. Ezért a folyamatot NETosisnak nevezték el. Ezen kívül a NET-nek szerepe van a thrombosis iniciálásában, egyes összetevői aktiválják a vérlemezkéket és vörösvértesteket, valamint kölcsönhatásba lépnek a hálóképző egyéb struktúrákkal, ún. fibrinnel, vWF-ral, fibronektinnel [31, 32].

A thrombus szerkezete, összetétele változik az idő előrehaladtával. Megkülönböztetnek egy napnál fiatalabb friss thrombust, amelyben vérlemezke-, fibrin- és vörösvértestrétegek különíthetők el (Zahn-vonalak) és a granulociták még intaktak, 1-5 napos litikus thrombust, amelyben a granulociták sejtmagja felrepedt és necrosis is látható, valamint 5 napnál idősebb szervült (organizált) szerkezetű thrombust, amibe a simaizomsejtek és az erek kezdenek benőni, a kötőszövet vagy lerakódik vagy nem.

A pitvarfibrilláció miatt keletkezett thrombusok heterogén képet mutatnak, a vérlemezkék és vörösvértestek rétegei váltogatják egymást fibrinnel összeragasztva, mert gyors és állandó véráramlás során keletkeznek [33]. Ezzel szemben a nagy artériákban, pl. carotis bifurkációnál keletkező thrombusban a vérlemezkék aggregálódnak a beszűkült érrészben, kitapadnak az endothel integrinjeihez és vWF-hoz, ami a nagy nyíróerő miatt aktiválódott [34]. A posztstenotikus szakaszon nagy eritrocitátömegek aggregálódnak a turbulens és lassú áramlás miatt. Az atheroscleroticus plakkokban szöveti faktor is jelen van.

A vörösvértestekben gazdag thrombusok kevesebb számú manővert igényelnek az endovascularis thrombectomy során, ezért rövidebb ideig tart az eltávolításuk, a rekanalizáció sikeresebb [35-38], az 1. és 2. thrombuskivétel során a minta gazdagabb vörösvértestekben, míg a későbbiekben inkább fibrinben. A mechanikai thrombectomy során a thrombus fragmentálódhat és különböző szervekben távoli embolusok keletkezhetnek. A nagy mennyiségű neutrofil granulocitát tartalmazó, valamint a fibringazdag thrombusok hajlamosabbak a fragmentációra, mint a vörösvértestben gazdag típusok [35].

Sok beteg az endovascularis thrombectomy előtt bridging (intravénás + intraartériás) tPA (tissue type plasminogen activator) kezelésben részesül, illetőleg műtét nélkül a tPA-val való az egyetlen elfogadott kezelés a klinikumban. A thrombusban a fibrin elkezd oldódni, így a vörösvértest/fibrin aránya nő. Ugyanakkor a tPA-kezelés paradox thrombosit okozhat,

mert a PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) és  $\alpha_2$ -antiplazmin is felszabadul a thrombus oldódása során, amik a fibrinolízis gátlása révén újabb elzáródást, rethrombosiszt okozhatnak a betegek 22-34%-ában [39].

## **2.2. A vörösvértestek szerepe a thrombosisban és fibrinolízisben**

A vörösvértestekről (VVT) sokáig azt gondolták, hogy csak passzív résztvevői a véralvadás folyamatának, a legnagyobb számban jelen levő vörösvérsejtek lévén foglyul ejtődnek a véralvadékban. A VVT-eknek jelentős protrombotikus szerepük van [40], mert 1) növelik a vér viszkozitását a hematokrit emelése révén (a hematokrit 99%-ban a VVT-számtól függ), és tovább emelik, amikor sok VVT időlegesen aggregálódik, amit a megnövekedett nyíróerő még fokozni is tud [41]. A VVT-ek jelenléte a pangó vérben, pl. a vénás billentyűk zsebében fokozza a vénás thrombosis kockázatát. 2) A VVT-ek szintén a hematokrittől és nyíróerőtől függő mértékben marginalizálják (az érfalhoz szorítják) a trombocitákat, melyek így könnyebben kötődnek az érsejtülékhez, érfalhoz [41]. 3) A VVT-ek adhezív membránmolekuláik révén képesek kötődni az érendothelhez és vérlemezkéhez, amit aktiválnak is [42]. 4) Nagy nyíróerő, komplementaktiválás, oxidatív stressz hatására és apoptózis során a scramblase aktiválódása miatt a VVT-ek külső membránrétegében foszfatidilserin jelenik meg, ami köti és aktiválja a véralvadási komplexeket, a trombin akár 40%-a is képződhet a VVT felszínén patológiás állapotban. Mikrovezikulák is keletkezhetnek a membránátrendeződés után. Alacsony hematokritű betegek vérzési ideje megnyúlt, de korrigálható VVT-transzfúzió adásával alacsony trombocitaszám esetén is, viszont polycytemia vera [41] vagy eritropoietin-dopping miatti túl magas VVT-szám fokozza a thrombosis hajlamot.

5) A VVT-ek a nagy erekben 7-8  $\mu\text{m}$  átmérőjű biconkáv korongokként keringenek, sejtorganelumot nem tartalmaznak. Könnyen deformálhatók, az 1-2  $\mu\text{m}$ -es kapillárisokban töltény formává torzulnak. Viszont a citoskeletális és membránfehérjék szerkezeti, valamint a sejtmembrán foszfolipidek összetételének változása miatt merevvé válnak, könnyen eltömik a kapillárisokat [43]. Fokozott merevség figyelhető meg többek között



koronáriaartéria-betegség, diabetes, magas vérnyomás, mélyvénás thrombosis állapotokban. 6) A VVT-ek jelenléte az alvadékban csökkenti a fibrinszál átmérőjét és gátolja a tPA-indukált fibrinolízist, a fehérjék, pl. a plazmin nehezebben tudnak penetrálni a tömörebb hálóban [44]. A VVT-ek integrinje közvetlenül kötődik a fibrinogénhez és fibrinhez, valamint a VVT kötődik a vWF-hoz is [45-47]. 7) Az alvadék öregedése során kontrahálódik, a zsugorodó thrombocyták a fibrinhálót megnyújtják, miáltal a hozzá kötődő VVT-ek polihedrocitákká nyomódnak össze az alvadék közepén, ezért csökken az alvadék permeabilitása, viszont átjárhatóbbá válhat az ér [48]. Meglepetésre, akut isémiás stroke, mélyvénás thrombosis, szisztémás lupus erythematosus állapotokban az alvadék kontrakciója csökkent mértékű, és ez éppen hogy rontja a klinikai képet [49-51].

A VVT-eknek ugyanakkor van antitrombotikus hatásuk is, pl. deformálhatóságuk révén csökkentik a vér sűrűlódását, lehetővé teszik protrombinból meizotrombin keletkezését, ami a trombitól eltérően kizárólag a protein C-t aktiválja, és így gátolja a véralvadási kaszkádot [52].

### **2.3. Von Willebrand-faktor**

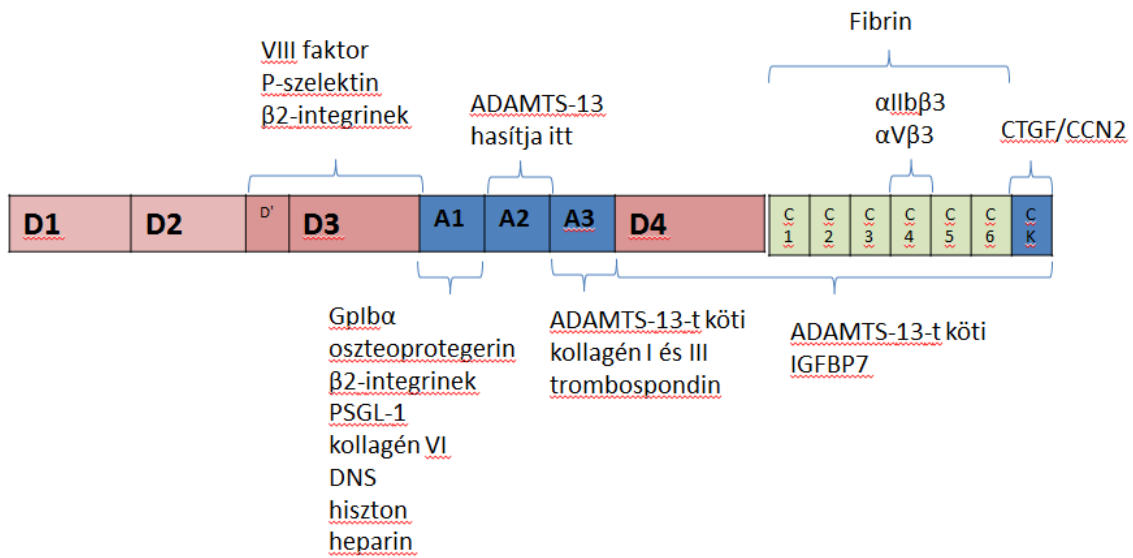
#### 2.3.1. A von Willebrand-faktor szerkezete és metabolizmusa

A vWF multimer glikoprotein, amely az endotheliális sejtek Weibel-Palade-testeiből folyamatosan felszabadul a vérbe és részben a szövetközi térbe, valamint szekretálódik a sejtek aktiválódása során az endothelsejtekből és elhanyagolható mennyiség a vérlemezkék  $\alpha$ -granulumaiból [53]. A vWF szintézisekor a 2813 aminosavból álló pre-pro-proteinből először a 22 aminosavból álló szignálpeptid hasad le az endoplazmás reticulumban, majd két monomernek a CK (cysteine knot) nevű legutolsó doménje között jön létre 3 diszulfidhíd, aztán a keletkezett dimerek D3-doménjei között újabb 4-4 diszulfidhíd keletkezik a D1-D2-domének katalitikus aktivitása révén, miáltal akár 60 tagú multimerré válik [54]. A Golgi-apparátusban a propeptid D1-D2-doménjeit furin hasítja le, és a 2050 aminosavból álló monomerekből létrejövő multimerek jobb-menetes csövecskét alkotva 100-ad részre tömörödve töltik ki a Weibel-Palade-testeket [55]. Az érett fehérjében 13 N-glikozidos és 10

O-glikozidos kötésű oligoszacharidrészt kapcsolódik monomerenként, melyek szerkezete nagy egyéni változatosságot mutat a populációban.

A Weibel-Palade-testek mennyiségileg legfontosabb fehérjéje a vWF, olyannyira, hogy annak hiányában maga az organelum sem keletkezik [56]. Számos fehérje kötődik a Weibel-Palade-testekben a vWF-hoz: VIII-as faktor, P-szelektin, galektinek, oszteoprotegerin, amik a keringésben is komplexben maradhatnak és a vWF védi őket a lebontástól. A VIII faktor felezési idejét 2 órától 12 órára növeli. A vérbe került vWF a nagy nyíróerő hatására konformációváltozáson megy át, az A2 globuláris domén szállá nyúlik, és a máj csillagsejtek, valamint endothelsejtek által szekretált, a vérben a vWF-hez kötődve keringő ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin type 1 repeat 13) metalloproteáz, szintén konformációváltozáson átmenve, véletlenszerűen hasítja a multimerben valamelyik A2-domént, miáltal kisebb molekulatömegű frakciók jönnek létre [57]. A normál esetben 0,5-2 IU/ml (átlag 1) koncentrációban keringő vWF a vérben betölti funkcióját, "öregszik", vagyis deszializálódik, folyamatosan hasítódik és kisebbedik, majd 4-26 óra felezési idejű keringés után az endothelsejtek, hepatociták és főképp a makrofágok felveszik. A makrofágok különböző receptoraikkal képesek kötni a vWF-t: Siglec-5-tel (sziálsavkötő immunoglobulinszerű lektin 5. típusú jelfogó) a natív [58], LRP-1-gyel (low-density lipoprotein receptor-related protein-1) a kitekeredett, ún. aktív térszerkezetű [59], ASGPR (aszialoglikoprotein-receptor, scavenger receptor class A member 5) és MGL (makrofág galaktóz típusú lektin) receptorokkal deszializált öreg vWF-t. Mind az N-, mind az O-glikozidos oligoszacharidok egy része hordozza a fő vércsoportantigéneket. A 0 vércsoportúakban a vWF életideje rövidebb, ezért a fehérje vérszintje kb. 25%-kal alacsonyabb [60]. Bármely vércsoportú egyedben az öregedés során a vWF vérszintje nő, 80 évesben a 40 éves kori vérszint 1,5-2-szeresére.

Az 1. ábra mutatja, hogy a vWF melyik doménje milyen molekulákhoz tud kötődni [61] és az ADAMTS13 hol hasítja. A domének ábrázolt hossza arányos a nagyságukkal.



1. ábra A monomer von Willebrand-faktor proprotein szerkezete, hasítási helye, a domének által kötött molekulák

Gplb $\alpha$ : glikoprotein 1b-alfa; DNS: dezoxiribonukleinsav; PSGL-1: P-szelektin glikoproteinligand; ADAMTS13: a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeat 13; IGFBP7: insulin-like growth factor-binding protein 7, inzulinszerű növekedési faktort kötő fehérje; CTGF: connective tissue growth factor, kötőszöveti növekedési faktor; integrinek:  $\alpha$ IIb $\beta$ 3,  $\alpha$ V $\beta$ 3 és  $\beta$ 2-tartalmú  $\alpha$ M $\beta$ 2,  $\alpha$ L $\beta$ 2,  $\alpha$ X $\beta$ 2

### 2.3.2. A von Willebrand-faktor hiánya

A von Willebrand-faktor-betegség (VW disease, VWD) a leggyakoribb vérzékenységet okozó veleszületett rendellenesség. Három fő típusát különböztetik meg. A betegek 70-80%-a az 1., <1%-a a 3., a többi a 2. típusba tartozik. Az 1. típusban mintegy 150-féle mutáció lehet az oka annak, hogy a vWF fehérje mennyisége kevesebb a normálnál, <20-50 IU/dl vérkoncentrációjú, míg a 3. típusban teljesen hiányzik, ami rendkívül súlyos állapotot okoz, a 2. típusban pedig abnormális funkciójú, de normális koncentrációjú, 50-200 IU/dl. A 2A-típusban az A1 vagy A2-domén mutációja miatt a bioszintézis, multimerizáció, szekréció zavart szenved, vagy a hasítás fokozott mértékű és kevés nagy molekulású multimer van. A 2M-típusban a vérlemezkéhez vagy kollagénhez való kötődés csökkent mértékű, a 2N-

típusban pedig a VIII-as faktorhoz való kötődés nem megfelelő, ezért az alvadási faktor hamarabb lebomlik, látszólagos hemofília-A-t okozva. Csak a betegek kb. 5-8%-át érintő 2B-típus jár együtt thrombocytopeniával. A 2B típust az A1-domén funkciónyerő mutációja okozza, miáltal a vWF szorosabban kötődik a trombocita GpIb-IX-V receptorához [61].

### 2.3.3. A von Willebrand-faktor funkciója

A vWF közvetlenül is kötődik a fibrinhez, az alvadék fő hálóképző polimerjéhez, valamint képes kötődni az összes véresejt-típushoz, az aktivált endothelhez, a fő NET-komponensekhez, azaz a DNS-hez és hisztonhoz is [62-64], ezért szükség van olyan mechanizmusra, amely megakadályozza a vWF kötődését az endothelsejtekhez és a véresejtekhez, amikor arra nincs szükség. In vitro kísérletek szerint az oszteoprotegerin részben lefedi a vWF multimer A1-doménjeit, amivel megakadályozza, hogy a Weibel-Palade-testekből való felszabadulást követően a vWF-szál minden lehetséges helyéhez vérelemekre kötődjön. Egy másik kísérletben azt mérték, hogy egér gyulladásban levő májából sokkal több oszteoprotegerin szabadul fel, mint nem gyulladtból, az oszteoprotegerin/vWF arány nő és eléri a 30-szoros moláris arányt, ezzel védve a szervezetet attól, hogy a vWF szekréciója után azonnal véralvadást indukáljon [65]. A vWF csak akkor kezd kipányvázódni, ha érsérülés miatt érintkezik a kollagénnel, vagy a nagy nyíróerő hatására a vWF A1-doménjének térszerkezete megváltozik, szabaddá válik a kötőhely a vérelemezken levő glikoprotein  $(Ib\alpha-Ib\beta-IX)_2-V$  heteroheptamer komplex  $Ib\alpha$ -alegysége számára [66], vagy az aktivált endothel P-szelektinjehez [67], esetleg glycocalyxához [68] kötődik. A kipányvázott vWF-t könnyebben hasítja az ADAMTS13, másrészt az aktivált vWF képes neutrofil granulocitákhoz, makrofágokhoz is kötődni, azok PSGL-1 (P-szelektin glikoproteinligand) membránfehérjéje révén, így a leukocitákat az érfalhoz vonzani, a NETosist fokozni [69], vérelemezkekkel keresztbe kötni. A következő lépés a kötődött sejtekben levő integrinek belülről kifelé történő aktiválása, miáltal a sejtek erősen aktivált állapotba kerülnek, és a kiegyenesedett integrinek további és erős sejt-fehérje kölcsönhatásokra képesek. A vWF-hoz kötődnek az endothel  $\alpha V\beta 3$  [70], a vérelemezke  $\alpha IIb\beta 3$ , a fehérvérsejtek  $\alpha M\beta 2$ ,  $\alpha L\beta 2$ ,  $\alpha X\beta 2$  integrinjei [71]. További védekezés a spontán

véralvadástól, hogy nyugalomban a sejtadhéziós molekulák, integrinek és szelektinek a sejteken belül tárolódnak, és csak a vérlemezke, endothel, leukocita aktivációja során kerülnek ki a plazmamembránba nagy mennyiségben, vagy akkor képződnek.

Az artéria belső rétege és a kapillárisendothel képes a vWF kipányvázására, ezáltal az ADAMTS13 működésének elősegítésére. Az artéria középső rétege (media) viszont nem aterogén. Ha érsérülés vagy atheroscleroticus plakk miatt a neutrofil granulociták elasztázt és metalloproteázokat ürítenek a környezetükbe, az enzimek emésztik az extracelluláris mátrix proteoglikánjait, miáltal szabaddá válik a kollagénen a kötőhely a vWF számára (a kollagén korábban proteoglikánt kötött), ezért a kollagén, a vérlemezkek és egyéb sejtek is gyorsan fognak kötődni a vWF multimerhez, beindulhat a véralvadás folyamata, a media is aterogénné válik [72].

Évtizedek óta ismert, hogy az endothelből felszabaduló ultranagy és kötegekbe rendeződő vWF igen aterogén [73]. Az aktív konformációjú vWF vérlemezkéket köt, melyek aktiválódnak és beindítják a véralvadás képződését [57]. A vWF nem csak a nagy áramlási sebességű artériákban és kapillárisokban esszenciális, hanem a vérpálya minden pontján, fiziológiás és patológiás körülmények között egyaránt van szerepe a véralvadásban. A fehérje fontosságát mutatja, hogy az ADAMTS13 veleszületett hiánya esetén thromboticus thrombocytopeniás purpura (TTP) betegségben az ultranagy vWF molekulákat semmi sem hasítja, hanem a kapcsolódó vérlemezkével mikrothrombusokat hoznak létre fibrinháló nélkül [57]. A vWF képes ép, de aktivált endothel membránjában levő P-szelektinhez [67],  $\alpha V\beta 3$ -integrinhez [70] és glyocalyxhoz [68] kötődni és pl. vénás thrombosiszt okozni.

Gyulladásos állapotban a Weibel-Palade-testek szekréciója fokozódik, a vWF vérszintje nő [74] és gyulladásos markernek tekinthető. A cardioemboliás és nagyér típusú stroke biomarkerének javasolják a vWF-t, egyéb biomarkerekkel kombinációban, hogy lehetővé váljon a stroke korai kimutatása és súlyosságának megítélése [75]. Ellentmondó eredmények születtek a vWF vérszintje és a klinikai állapot súlyosságának viszonyában. A vWF/ADAMTS13 szintjének aránya valószínűleg megbízhatóbb marker, mint önmagában a vWF vérszintje, mert különböző daganatok, szívbetegségek, autoimmun betegségek, egyes gyógyszerek használata esetén az arány eltolódik szerzett von Willebrand-betegséget okozva: ha a vWF kerül túlsúlyba, akkor thrombosis, ha a metalloproteáz, akkor vérzés a

szövődmény [76]. Aorta stenosis, coronaria bypass műtét stb. miatt a hatalmas nyíróerő megváltoztatja a vWF konformációját és az ADAMTS13 metalloproteáz gyorsan feldarabolja. Az ADAMTS13 aktivitása is változhat, pl. a PAD4 enzim, ami neutrofil granulocitákból szabadul fel, egyes arginineket citrullinná deziminál, miáltal csökkenti az enzim aktivitását. Öregedéssel és gyulladásos állapotokban, diabetes és daganat miatt magasabb citrullinált metalloproteázszint mérhető a vérplazmában, ami fokozza a thrombosis kockázatát [77]. Mivel az ADAMTS13 antigén mennyisége és a metalloproteáz aktivitása is csökken a 65 évesnél idősebbekben az annál az életkornál fiatalabbakhoz képest, ez magyarázhatja, hogy nem csak a vWF antigén mennyisége nő az idősokban, hanem aktivitása is, hiszen nem hasítódik a metalloproteáz által. A COVID-19 betegekben a vWF mennyiségének és aktivitásának változása még kifejezettebb, mint a nem vírusfertőzöttekben. Érdekesség, hogy míg a 65 évesnél fiatalabb COVID-19 betegekben nő az ADAMTS13 mennyisége és aktivitása a nem fertőzöttekhez képest, addig az idősokban nem nő [78].

#### **2.4. A vérlemezkék szerkezete, szerepe, immuno-thrombosis**

A gerinctelenekben egyfajta a sejtípus, a hematociták játszanak szerepet a hemosztázis, valamint a veleszületett humorális és sejtes immunitás folyamataiban. Gerincesekben eltérő szereppel bíró sokféle sejtípus fejlődött ki, valamint a veleszületett immunitás mellett megjelent az adaptív immunválasz is.

A vérlemezkék hagyományosan a véralvadék képződésében játszott szerepük által ismertek, de ezen kívül fontosak az immunreakciókban játszott szerepük révén is. Mintázatfelismerő (pattern-recognition) receptoraikkal, pl. TLR1,2,4,5,6 (toll-like receptor) kötik a kórokozót, komplementreceptorok révén a veleszületett immunválasz részei, az immunoglobulin kristályosítható fragmensét kötő receptorral (FcR) az adaptív válaszbán vesznek részt [79, 80]. CD40 és annak ligandja, vagyis citokin és receptora egyaránt megtalálható a membránjukban [81].

A vérlemezkék  $\alpha$ -granuluma fehérjét tartalmaz a belsejében és membránjában is [82]: szolubilisak a vérből felvett fibrinogén, a megakariocitában termelt V és XI véralvadási faktorok, protein S; adhéziós molekulák a vWF, fibronectin és trombospondin; antifibrinolitikusak az  $\alpha$ 2-plazmininhibitor és PAI-1; növekedési faktorok a PDGF (platelet-derived growth factor), TGF $\beta$  (transforming growth factor beta ) és EGF (epidermal growth factor); számtalan citokin, melyek leukocitákat vonzanak, úm. a CXCL csoportból a 4 (PF4, platelet factor 4), 7, 1, 5, és a CCL csoportból az 5 (RANTES) és 3, valamint  $\beta$ -tromboglobulin. A granulum membránfehérjéi részben már megtalálhatók a plazmamembránban, részben a granulum exocitózisakor fuzionálnak a sejthártyával. Ilyenek a P-szelektin, PSGL-1 (P-szelektin glikoproteinligand), mintegy 15000 glikoprotein-VI granulumonként és számos integrin:  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 (VLA-5),  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 (GpIa/IIa, VLA-2, CD49b/CD29),  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 (VLA-6), valamint legnagyobb mennyiségben, akár 80 000  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (GpIIb/IIIa) granulumonként.

Az elektronenz  $\delta$ -granulumok kis molekulákat és ionokat tartalmaznak: szerotonin, hisztamin, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, ADP, ATP, GDP, GTP, polifoszfát, melyek jellemzően serkentik az alvadék képződését, a szerotonin és az ADP a vérlemezkét aktiválják.

A lizozómák savas körülmények között ható enzimeket tartalmaznak. Közülük proteázok a karboxipeptidáz A és B, katepszin D és E, kollagenáz; egyéb enzimek a foszfatáz, valamint az extracelluláris mátrixot/glycocalyxot bontó heparináz és glikozidázok.

Oldható mediátorok is felszabadulnak a vérlemezkékből: a tromboxán A2 és PAF (vérlemezkeaktiváló faktor) autokrin vagy parakrin módon aktiválják a trombocitákat, a defenzinek a mikrobákat pusztítják, az IL-1 $\beta$ , HMGB1 (high mobility group box 1) és sCD40L (szolubilis CD40-ligand) a leukocitákat aktiválja. A felszabadult sCD40L az endothelsejteket is aktiválja, rábírja arra, hogy sejtadhéziós molekulákat, citokineket és kemokineket termeljenek, vagyis az alap állapotban antitrombotikus belső érfalréteget trombotikussá változtatja.

A vérlemezke válasza az őt egyszerre és egymás után érő serkentő és gátló hatások eredője lesz. Azokat a hatásokat, amelyek elkezdik aktiválni a vérlemezkét, serkentő előkészítésnek (positive priming) hívják. Ilyen szignálok az adrenalin  $\alpha$ 2-receptoron hatva, trombopoietin, IGF1 (inzulinszerű növekedési faktor), CD40L, ill. patológiás állapotokban a

nagy nyíróerő stenosisnál, diabetes és hypercholesterolaemia. Negatív priming hatása van a PGI<sub>2</sub>-nek, a NO-nak, az ektoATP/ADP/AMP-ázoknak. Utóbbiak adenzint hoznak létre, a prosztaciklin és az adenzin cAMP-szintet emelnek sejten belül, a NO pedig cGMP-t. [5].

A vérlemezkék 7-10 nap keringés után főképp apoptózissal pusztulnak el. Naponta 10<sup>11</sup> vérlemezke hal meg és keletkezik. A FXIII a vérlemezke pusztulása során szabadul fel a citoplazmából.

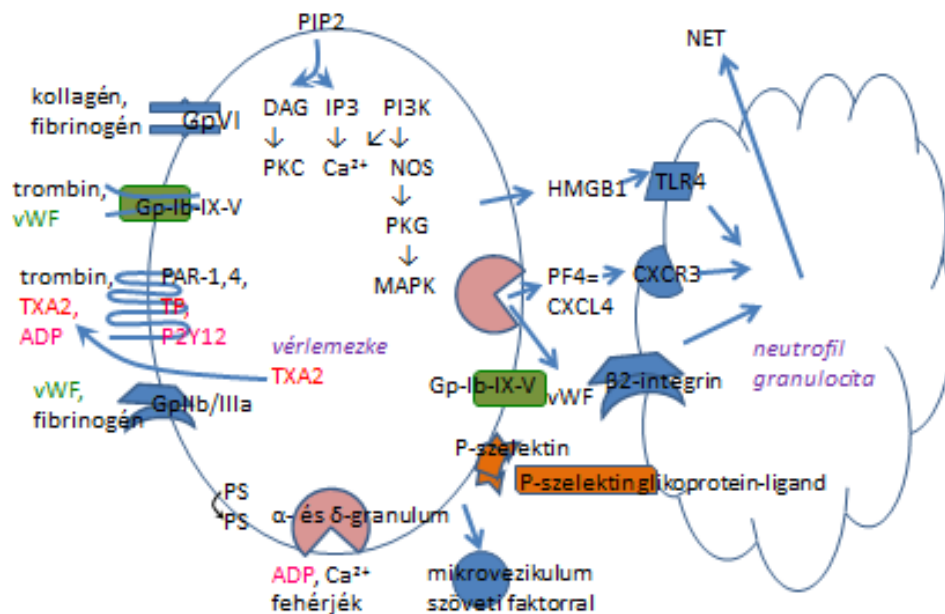
A véralvadék, benne a vérlemezkék, körülzárják a baktériumcsoportokat, gátolják szétszóródásukat. A vérlemezkék bizonyos baktériumokat és vírusokat internalizálni is képesek, de nem fagocitózissal, hanem eltérő mechanizmussal, aztán a keletkező vakuólumok az  $\alpha$ -granulumokkal fuzionálnak, de a mikroba előlése nem történik meg ROS és baktericid enzimek hiányában. [83].

Bizonyos fertőzésekben, pl. influenzában, SARS-2 fertőzésben a túlhajtott gyulladás mikrovaszkuláris vérlemezke-leukocita aggregátumokkal, véralvadék képződésével jár, ami szervkárosodást, akár halált okoz [84]. A COVID-19 betegekben fokozott a GpIb-IX-V komplex, GpIIb/IIIa komplex, CD9 és CD40 expressziója [81], az aktivált vérlemezkék sok IL-1-et és mikrovezikulában levő TF-t ürítenek. A fibrinogén és a lebontási terméke, a D-dimer a monomer, a kollagén pedig a dimer GPVI-hoz kötődve aktiválja a vérlemezkét a sejten belül a PKC utat aktiválva és a kalciumion szintjét emelve, a kation pedig a vérlemezke aktivációjakor történő minden változást stimulál. A scramblase aktiválása miatt foszfatidil-szerin jelenik meg a külső membránrétegben. A trombin a PAR-1, nagyobb koncentrációban pedig a PAR-4 hasításával több jelátviteli úton is aktiválja a vérlemezkét. A trombin és a vWF a GpIb $\alpha$ -hoz kötődve a sejten belül a PI3K-NOS-PKG-MAPK úton a granulumok szekrécióját és a tromboxán szintézisét fokozzák. Mind a GpIb, mind a PKC belülről kifelé aktiválják a GpIIb/IIIa integrint, ami konformációváltozás után köti a vWF-t és erősen aktiválja a vérlemezkét.

Különbség van egérben és emberben a vérlemezke és neutrofil granulocita közötti kölcsönhatásban [85]. Közös, hogy a mikroba a TLR4-et (Toll-like receptor) aktiválva kemokinfelszabadulást okoz, a 4. típusú vérlemezkefaktor (PF4) és RANTES pedig G-fehérjéhez kötött receptorok révén, valamint a HMGB1 a TLR4-hez kötődve aktiválja a neutrofil granulocitát, sőt, NETosist vált ki. Bár a vérlemezke aktiválása mindkét fajban



megtörténik a GpIb $\alpha$ -hoz kötött ligandok által, de emberben az ide kötődő vWF keresztbe köti a granulocita  $\beta$ 2-integrinjét, és ez a fő aktiválási mechanizmus, viszont egérben a fibrin teremti meg a kapcsolatot a két sejt integrinje, az  $\alpha$ Iib $\beta$ 3 és valamelyik  $\beta$ 2-integrin között, de csak azután, hogy a vérlemezke P-szelektinje kötődött a ligandjához a leukocita membránjában és aktiválta azt. A P-szelektinnek és az  $\alpha$ Iib $\beta$ 3-integrinhez kötött fibrinnek emberben nincs jelentősége.



2. ábra A vérlemezke aktiválódása és neutrofil granulocitát aktiváló hatása

A vérlemezke bal oldalán a fő aktiváló szignálok és receptorok láthatók, felül vannak a sejten belül aktivált jelátviteli utak, alul az aktiválás miatt bekövetkező változások, jobb oldalt pedig a mechanizmusok, ahogyan a vérlemezke aktiválja a neutrofil granulocitát emberben.

DAG: diacil-glicerid, IP3: inozit-triszfoszfát, PAR: proteáz által aktivált receptor, PIP2: foszfadil-inozit-biszfoszfát, PKG: protein-kináz G, PS: foszfadil-szerin, P2Y12: 2.

típusú purinerg receptor Y12 altípus, TXA<sub>2</sub>: tromboxán-A<sub>2</sub>, TP: tromboxán prosztanoidreceptor. A többi rövidítés a szövegben és a rövidítések jegyzékében.

## **2.5. Neutrofil granulociták és neutrofil extracelluláris csapdák (NET)**

### **2.5.1. Neutrofil granulociták, polimorfonukleáris sejtek (PMN)**

Az emberi vérben legnagyobb számban keringő, a fehérvérsejtek 45-70%-át kitevő neutrofil granulociták a csontvelőben keletkeznek citokinek által szabályozott folyamatban. Számuk a vérben megnő főként bakteriális fertőzések, gyulladások (szöveti necrosis, szívinfarktus, égés, arthritis), valamint stressz (izgalom, görcsök), gyógyszerek (kortikoszteroidok, lítium, béta-agonisták), trauma, hemolitikus anémia és malignus csontvelőbetegségek miatt [86]. Ezen kívül, ha a vér LDL-koleszterinszintje magas, a koleszterin nem tudja az ABC-transzportereken át elegendő mértékben elhagyni a hematopoietikus ős- és progenitorsejteket, felhalmozódik, ami a sejtek proliferációját fokozza, vagyis leukocitózist okoz [87, 88].

A PMN érkezik először a fertőzés helyére, mivel érzékeli a citokinstimulust. A helyszínen aktiválódik, professzionális fagocita lévén jellemzően fagocitálja a kórokozót, a fagolizozómában elpusztítja, emészti, majd a sejt apoptózissal elhal. A sejtmaradványokat a makrofágok fagocitálják. Négyféle granulumból erős hatású, és nem csak a fertőző ágenseket, hanem a környező szöveteket és magát a granulocitát is károsító anyagok szabadulnak fel: reaktív oxigénszármazékok, proteázok, extracelluláris mátrixot bontó enzimek. A granulumok felszabadulásának sorrendje ellentétes a képződésük sorrendjével: 1) plazmafehérjéket tartalmazó szekretoros, 2) zselatináz és heparináz tartalmú terciér, 3) laktoferrin és kollagenáz tartalmú specifikus szekunder granulumok ürülnek [89]. A plazmamembránnal fuzionáló mindhárom típusú granulummembránban különböző receptorok és a NADPH-oxidáz oxidáló alegysége megtalálhatók, tehát szuperoxidation és belőle hidrogén-peroxid mindig keletkezik az aktivált granulocita környezetében. Az azurofil primer granulociták tartalma nem mindig szabadul fel, inkább a fagoszómával fuzionálva hat a mieloperoxidáz, tudniillik hipoklórossavat termel; a defenzinek, azurocitin, katepszin G,

neutrofil elasztáz proteázok, melyek a mikrobák és a saját szervezet fehérjéit is emésztik; a proteináz 3-nak és a TRAIL-nak (Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand) az apoptózisban van szerepe [89]. A granulocita érzékeli a kórokozó méretét. Ha a kórokozó elég kicsi, a granulocita általi fagocitózis és a többi immunsejt odavonzása citokinek termelése által elegendő védelmet biztosít. Ha a kórokozó nagy, pl. gombafonális gomba, vagy jellemzően megszökik a fagoszómából, pl. *Streptococcus species*, akkor sok IL-1 $\beta$  termelődik és NETosis történik a fagocitózis egyidejű gátlásával [90].

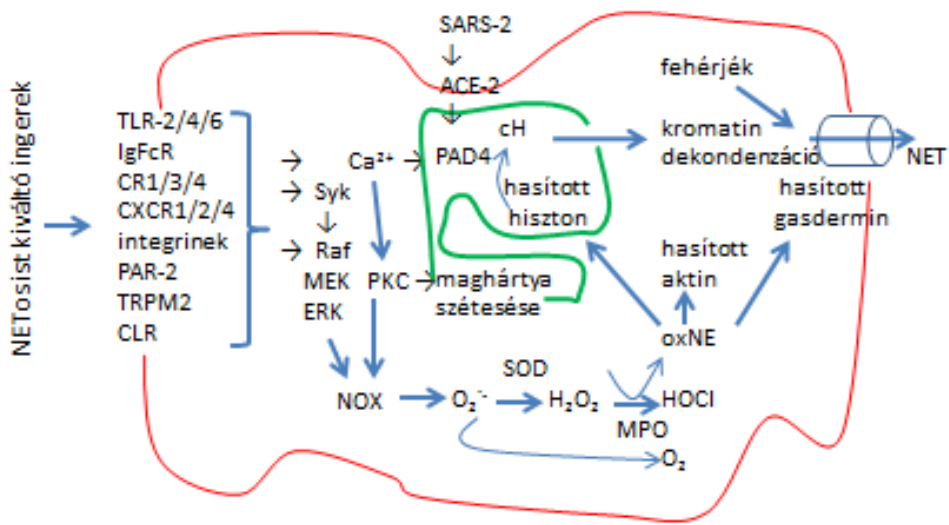
### 2.5.2. NET keletkezése és szerepe az atherothrombosisban

Már 1996-ban megfigyelték, hogy a leukociták egy, az apoptózistól és nekrozistól különböző sejthalállal pusztulnak el, de csak 2004-ben írták le a háromdimenziós térhálót, a neutrofil extracelluláris csapdát (NET, neutrophil extracellular trap) [91], ami a fehérvérsejtekből forbol-mirisztát-acetát, IL-8 vagy baktériumsejttel lipopoliszacharid hatására szabadult fel, és bizonyítást nyert a NET-ek baktériumölő sajátsága. A vázat a fragmentálatlan DNS adja, melyhez főképp reverzibilis, ionos kölcsönhatással granuláris, citoplazmatikus és magi fehérjék kapcsolódnak, összességében mintegy 70-150 féle fehérjét detektáltak. Később kimutatták egyéb szignálok NETosist kiváltó hatását is: gombák [92], aktivált vérlemezke [93], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [94], komplementszármazék peptid [95], autoantitestek [96], protozoonok [97], urátkristály [98], vírusok [99], cigarettafüst [100], koleszterinkristály [101].

A fenti mikrobák és molekulák a neutrofil granulociták Toll-like-, IgFc- (immunoglobulin konstans fragmentum), komplement- és citokinreceptoraihoz kötődve aktiválják a sejteket, a citoplazmában a kalciumion szintje emelkedik az ER-ből való kiáramlás miatt, a Raf-MEK-ERK vagy PKC jelátviteli úton hatva a NADPH-oxidáz komplex összeáll, aktiválódik és szuperoxid-aniont (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) termel, ami szuperoxid-dizmutáz által H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vé alakul át, ez utóbbi aktiválja a mieloperoxidázt (MPO), ami oxidálja, aktiválja és felszabadítja a neutrofil elasztázt az azurofil granulumból membránszakadás nélkül, a neutrofil elasztáz emészteti az aktinfilamentumot majd a sejtmagba kerül, ott a hisztonokat hasítja. A kalciumion aktiválja a peptidil-arginil-dezimináz-4-t (PAD4) is, ami fehérjék, pl.

hisztonok argininjének oldalláncát deziminálja, citrullint létrehozva és csökkentve a pozitív töltést. Mindezen változások miatt a kromoszóma dekondenzálódik, a maganyag megduzzad, a maghártya szétesik, a citoplazma tartalma keveredik a karioplazmával, majd kilökődik a sejtből, ahol a DNS szétterül, hálót képez, amihez kötődnek a hisztonok, valamint citoplazmatikus és granuláris fehérjék is, melyek tényleges mennyisége a jeltől függ. A suicid NETosis a jel megjelenésétől számított 2-3 óra múlva történik, eredményeképpen a fehérvérsejt elpusztul [90] (3. ábra).

Staphylococcus aureus vagy Candida albicans fertőzéskor, ill. aktivált vérlemezke vagy komplementfehérjék hatására a neutrofil granulocita TLR2 vagy komplement-C3 receptorának aktiválódása révén az elasztáz és PAD4 közreműködésével, de NADPH-oxidáz nélkül történik a vitális NETosis. A maganyag a magmembrán bimbózásával lépésenként vakuólumokba záródik, majd a citoplazmával való keveredés nélkül a plazmamembránnal fuzionálva exocitózissal kerül a DNS egy része, vagy akár a teljes DNS-állomány. A granulomok egy része exocitózissal ürül, tartalmuk a DNS-hez tapad. A granulocita még egy darabig életben marad, plazmamembránja ép és képes fagocitózissal. A vitális NETosis gyors, mintegy fél órát igényel.



3. ábra A suicid NETosis mechanizmusa. Egyes baktériumok, vírusok, HMGB1, oxLDL a Toll-like receptorokhoz (TLR), immunoglobulinok és opszonizált baktériumok a kristályosítható konstans régiót kötő IgG-receptorhoz (IgFcR), mikrobák által indított komplementaktiváláskor a komplement a receptorához (CR), IL-8, vérlemezkefaktor-4 és egyéb citokinek a receptorukhoz (CXCR), vWF integrinhez, Porphyromonas gingivalis a proteázaktivált receptorhoz (PAR), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a tranziens receptorpotenciál melasztin-2 (TRPM) kalciumcsatornához; gombák, baktériumok és vírusok a C-típusú lektinreceptorhoz (CLR) kötődve aktiválják a neutrofil granulocitát. A sejten belül kalciumionszintet emelnek és/vagy beindítják a mitogénaktivált protein-kináz kaskádát (Raf-MEK-ERK), ami a protein-kináz C-vel együtt foszforilálva aktiválja a NADPH-oxidázt (NOX), amely NADPH és O<sub>2</sub> felhasználásával szuperoxidgyököt állít elő. Ezt a szuperoxid-dizmutáz (SOD) alakítja hidrogén-peroxiddá vagy a mieloperoxidáz (MPO) oxigénné, ill. az MPO hipoklórossavat is hoz létre, miközben a neutrofil elasztázt oxidálja (oxNE). Az aktív enzim a citoplazmában az aktint és a gasdermint hasítja, utóbbi pórusokat képez a plazmamembránban. A

sejtmagban a neutrofil elasztáz hasítja a hisztonokat, a kalcium által aktivált peptidil-arginin-dezimináz (PAD4) citrullinálja a hisztonokat (cH), a PKC a maghártya lamininját foszforilálja és szétesésre készíti. A kromatin dekonzenzáció, fellazul, a magi, citoplazmatikus és granuláris fehérjék társaságában kiürül a sejtéből (NET). A SARS-2 koronavírus az angiotenzin-2-receptorhoz (ACE-2) kötődve képes aktiválni a PAD4 enzimet.

Egy ritkább NETosis változatban az ionofórokkal kezelt vagy immunkomplexek által aktivált granulocitában a mitokondrium által generált ROS elegendő a NETosis elindításához a NADPH-oxidáz aktivitása nélkül, s ilyenkor a mitokondrium DNS-e is kibocsátásra kerül.

A NET-ben aktív molekulák nagy helyi koncentrációban vannak jelen elég szoros kötésben, ami megakadályozza, hogy a szomszédos szövetekbe diffundáljanak. Ha a NET mennyisége, helyszíne vagy lebontásának ideje nem megfelelően szabályozott, akkor annak súlyos következményei lehetnek számos patológiás folyamat során [102].

Vérpangás miatt hypoxia alakul ki, az endothelből ürülnek a Weibel-Palade-testek, a felszabaduló vWF és a membránba kerülő P-szelektin odavonzzák a leukocitákat, sőt NETosist is provokálnak, ugyanakkor megindul a véralvadás folyamata is, minek következtében pl. vénás thrombosis lesz. A háromféle térhálóba mindenféle vérsejt beleragad [69]. Az állatkísérletben kezelésként adott DN-áz-1 a vérbeli enzim helyett hasítja a DNS-t, a heparin pedig köti a hisztonokat a DNS helyett. Bármilyen hosszúságú heparin rendelkezik ilyen hatással, sőt a részlegesen deszulfatált és antitrombint nem kötő heparin is, miáltal a heparinok alkalmasak a sepsis, az ahhoz asszociált disszeminált intravasculáris coagulopathia és COVID-19 fertőzések kezelésére, különösen a heparinnak vérzékenységet nem okozó, nem antikoaguláns változata [103, 104].

A NET-ek lényeges szereplői az atherothrombosis folyamatának [32]. Ha valahol az érpályában apoptózist okozó sérülés éri az endothelt, a simaizmot, akkor az apoptotizáló sejtekhez odavonzott neutrofil granulocitákból felszabaduló NET aktiválja a környező endothelt, ami citokineket felszabadítva további NETosist okoz egy öngerjesztő folyamat révén. A korábban felsorolt szignálok az infekció helyszínén szintén NETosist okoznak. A sérült endothelrétegen át még több LDL áramlik az endothel alá, ahol mind a fehérje, mind a lipid része NADPH-oxidáz által termelt ROS-sal reagálva oxidálódik, a makrofágok

scavenger receptorok segítségével – a sejt koleszterinszintjétől függetlenül – felveszik az oxLDL-t, koleszterinészterként tárolják, és a csökkent mértékű koleszterinleadás miatt koleszterinnel tele levő habsejtekké alakulnak. A felszabaduló sok citokin odavonz és aktivál még több neutrofil, monocitát, limfocitát. A félresikerült gyulladásos folyamatban növekszik az atheroscleroticus plakk. A plakkban az efferocitózis, az apoptotikus testecskék gyulladás nélküli fagocitózisa csökkent mértékű, mert a helyileg keletkező gyulladásos mediátor TNF $\alpha$ , peroxinitrit, valamint a felhalmozódó oxLDL gátolják az efferocitózist, az 'egyél meg' szignálok jelátvitelét megzavarják, a 'ne egyél meg' szignálokat viszont felerősítik [105]. A koleszterinkristályok is NETosist okoznak ismeretlen receptorhoz kötődve, talán CD36 általi aktiválással inflammoszóma keletkezését okozva [106]. Az atheroscleroticus plakk makrofágjaiban a lizoszómák diszfunkciósan működnek, csökken az autofágia, de fokozódik az inflammoszómák képződése [107]. Az immunrendszer és az érfal sejtjei elhalnak, egy belső nektorikus mag alakul ki. Szűkül az ér, merevedik a fala. A T-limfociták CD40-ligandja és a PMN CD40-receptora kölcsönhatásba lép, a makrofág MMP1, 8, 13 enzimeket szekretál, amik bontják a kollagént, a plakk fibrózus sapkája vékonyodik. Az aktiválódó makrofág membránjában a szöveti faktor is aktiválódik [108]. A NETosis során felszabaduló erősen pozitív töltésű hiszton-4 nem csak az epiteliális és endotheliális sejtek számára toxikus, hanem a simaizomsejtek halálát is okozza, tovább vékonyítva a fibrózus sapkát [109]. A NETosis fokozza a szöveti faktor transzlokációját a PMN sejtek plazmamembránjába [110]. Amikor a plakk megreped, vagy a nagy nyíróerő miatt a vWF aktiválódik, a keletkező thrombus teljesen elzárja a vér útját, a mögöttes területek szövetei elhalnak [109, 111]. A neutrofil extracelluláris csapdákat kimutatták thrombusokból, melyek akut szívinfarktusos [112, 113], akut isémiás agyérelzáródásos [114] és perifériás nagyartéria thrombosisos betegekből [115] származtak. A NET nagyobb mennyiségben volt jelen a thrombus külső részén, mint a belsejében [114], és a NET jelenléte rezisztenssé tette az alvadékot a szokásos fibrinolitikus kezelésre [116], miattuk az AIS-betegekben a thrombectomia többszöri beavatkozást igényelt [114], és a kezelést követően egy évig vizsgált prognózis rosszabbodott [117].

A neutrofil granulociták degranulációja során felszabadult enzimek emésztik az extracelluláris mátrixot, ezzel az atheroscleroticus plakk erózióját vagy repedését okozzák.

A NET-ek vázat szolgáltatnak a keletkező thrombus növekedéséhez, megkötik a vörösvértesteket, vérlemezkéket, vWF-t, egyéb fehérjéket. Mind az erodált, mind a repedt, mind az éppen a vizsgálat idején bevérző coronaria plakkokban nagy mennyiségű mieloperoxidázt és citrullinált hiszton 3-t mutattak ki, míg az intakt, thrombosis nélküli és a már régebben hemorrhagiássá vált plakkokban MPO és citrullinált hiszton 3 alig volt detektálható. A PMN sejtek és csapdáik mennyisége csökken, ahogy a thrombus egyre öregebbé válik [118]. Amikor a thrombectomia során litikus thrombust távolítottak el a coronáriából, a betegek mortalitása magasabb volt a szervült típusú thrombusúakhoz képest, mert a litikus, sok granulocitát tartalmazó thrombus törékenyebb, hajlamosabb embolus képzésére [119].

A neutrofil granulocitákon kívül a makrofágok, hízósejtek (mastocyták), eozinofil és bazofil granulociták is képesek magállományukat kilökni fehérjék társaságában és extracelluláris csapdákat létrehozni. Feltételezhető, hogy a DNS és a fehérjék felszabadulása a NETosishoz hasonló módon valósul meg. Immunhisztokémiai vizsgálatokkal igazolták, hogy a bazofilokon kívül (amit nem vizsgáltak) mindegyik említett sejtípus és extracelluláris csapda megtalálható az atheroscleroticus plakkokban és az ér adventitiájában. Míg a cadaverből származó nem thrombotikus coronaria plakkokban a makrofágok nagyobb mennyiségben találhatók, mint a neutrofilek és a mastocyták, addig a trombotikus plakkokban kétszer annyi neutrofil van, mint makrofág, és kb. 3-szor több NET, mint makrofág extracelluláris csapda (MET), továbbá kb. 26-szor több NET, mint mastocyta extracelluláris csapda (MCET) [120]. Az eozinofilek és extracelluláris csapdájuk (EET) mennyisége elhanyagolható. A betegekből kioperált friss thrombusokban sokkal több a neutrofil és a NET, mint bármely másik típus, a litikus thrombusokban majdnem annyi a makrofág és MET, mint a neutrofil és NET, a szervült thrombusokban több a makrofág és MET, mint a neutrofil és NET. A MCET és EET elhanyagolható mennyiségű a thrombus korától függetlenül [120].

A NETosis vérből való kimutatására használt egyes biomarkerek nem specifikusak a neutrofilekre: extracelluláris DNS, kettősszalú DNS, nukleosómák, citrullinált hiszton 3 és 4 fehérjék. A thrombusokból a fentieken kívül neutrofilokból felszabaduló elasztázt és mieloperoxidázt, valamint vérlemezkékből származó HMGB1-et mutattak ki [121].



### 2.5.3. A NET fehérjekomponenseinek a hatása

A neutrofil extracelluláris csapdák fehérjekomponenseinek is fontos szerepe van a véralvadék képződésében. A hisztonok, neutrofil elasztáz és mieloperoxidáz vannak a legnagyobb mennyiségben jelen a NET-ekben. A lizinben vagy argininben gazdag bázikus hisztonfehérjék a DNS-ben levő negatív töltésű foszfáthoz, a membránok foszfolipidjeihez és számos membránfehérjéhez képesek kötődni, miáltal a thrombosis keletkezését többféle mechanizmussal tudják fokozni [122]. Az endothelsejt aktiválása révén mind a Weibel-Palade-testek ürülését [62], mind hidrogén-peroxid keletkezését stimulálják. A hisztonok a neutrofil granulociták NETosisát indukálják. Sokféle sejttípusban, beleértve a vérlemezkét is, pórusképzés vagy csatornanyitás révén fokozzák a sejten belüli kalciumszintet, vagyis aktiválják a sejtet, és ezt teszik a TLR2 és 4 fehérjékhez kötődve is. A vörösvértesteken membránátrendeződést generálnak, foszfatidil-szerin jelenik meg a külső membránrétegben, miáltal a véralvadási faktorok komplexei keletkezhetnek. A hisztonok gátolják a trombinnek antitrombin általi inaktivációját [123], a fibrinhez vagy fibrinogénhez kötődve fokozzák a molekulák mechanikai és kémiai stabilitását [116], a trombin-trombomodulin interakció akadályozása révén gátolják az aktivált protein C (APC) keletkezését, miáltal gátlódik a trombin keletkezésének visszacsatolt gátlása, illetőleg az APC hiányában nem aktiválódik a trombin által aktivált fibrinolízis inhibitor (TAFI), ezért nem gátlódik a fibrinolízis.

A neutrofil elasztáz hasítja és inaktiválja a trombomodulint, miáltal gátolja a trombinnek a protein C-t és a TAFI-t aktiváló hatását is. A neutrofil elasztáz hasítja és inaktiválja a szöveti faktor út inhibitorát (TFPI), megszüntetve annak FXa-t és FVIIa-t gátló hatását; az antitrombint, ami miatt a trombin legfőbb gátlója tűnik el; az érfalban különböző fehérjéket; a fibrinolízist aktiváló tPA-t és uPA-t. A neutrofil elasztáznak in vitro vannak fibrinolitikus és antitrombotikus hatásai is, amelyek in vivo is valamennyire érvényesülhetnek: hasítja az  $\alpha_2$ -plazmininhibitort, a von Willebrand-faktort, a trombint és a X faktort, a plazminogénből pedig miniplazminogént készít, amely miniplazminná aktiválódva hatékonyan emészt a keresztkötött fibrint is [122].

#### 2.5.4. A neutrofil granulociták eltűnése, a NET-ek emésztése, terápiás lehetőségek

A neutrofil granulociták felezési ideje a vérben 6-12 óra. Ha infiltrálódnak a szövetközi térbe és aktiválódnak, akkor életük meghosszabbodik, a proinflammatorikus citokinek gátolják apoptózisukat. Számos patológias állapotban a leukocitaszám emelkedik, míg szisztémás lupus erythematosus (SLE) betegségben szenvedőkben, immunszuppresszív állapotokban és bizonyos vírusfertőzésekben pedig csökken. SLE betegekben, szisztémás gyulladásos állapotban, daganatos betegekben nem csak teljesen érett, hanem ún. alacsony sűrűségű neutrofilek (LDN, low-density neutrophil) is nagy mennyiségben keringenek, amelyeknek csökkent fagocitáló képességük, fokozott NET-képzésük és daganatképződést elősegítő aktivitásuk van. Léteznek terápiás lehetőségek a protumor-aktivitások gátlására, illetőleg arra, hogy a LDN sejtek érett, tumorelles granulocitákká, nagy sűrűségű neutrofilekké (HDN, high-density neutrophil) alakuljanak [89].

A NET-ek sokáig, akár napokig megmaradnak a thrombusban, miközben lassan emésztődnek. A NET DNS-tartalmát a vérben állandóan keringő (és feltehetőleg bármely sejtől származó, de sejtelhaláskor fokozottan felszabaduló) DNáz-1 és a makrofágból, valamint dendritikus sejtől felszabaduló DNáz-1-szerű-3 (DNase1L3) enzimek hidrolizálják [124]. A betegek vérében abnormálisan csökkent DNáz-1 mennyiség mikroangiopátiát okoz [125]. A keletkező oligonukleotidokat feltehetőleg más enzimek tovább bontják, a fehérjéhez kötött DNS-fragmentumokat pedig a makrofágok és dendritikus sejtek a fehérjéket felismerő TLR4, komplement-, Fc és egyéb receptoraik segítségével fagocitálják. Bármelyik hiszton képes kötődni a Clec2d (C-típusú lektin) receptorhoz, a későbbi endoszómában pedig TLR9-et aktivál és proinflammatorikus citokinfelszabadulást okoz. A citrullinált hiszton a korai endoszómában kötődik a TLR4-hez és IL-1 $\beta$  felszabadulását eredményezi [124]. Potenciálisan bármely NET-komponens azonosítható veszélyjelként (DAMP), amit a makrofágok receptorai ismernek fel. Egyes NET-komponensek elősegítik, mások gátolják a fagocitózist. Serkentik a hipercitrullinált hiszton, LL37 (cathelicidin, 2 leucinnal kezdődő 37 aminosavból álló antimikrobiális peptid), ubikvitinált mieloperoxidáz, viszont gátolja a HMGB1, ami egyébként a vérlemezkéből felszabadulva serkenti a

NETosist. Ha a DNázok általi emésztés elégtelen enzimhiány, inhibitor vagy NET-elleni antitest jelenléte miatt pl. szisztémás lupus erythematosusban, akkor a NET-komponensek a glycocalyxhoz kötődnek és a NET sokáig fennmarad. Ilyenkor a fagociták apoptózissal elhalnak, vagy a makrofág METosissal (macrophage extracellular trap formation) kilöki saját DNS-állományát, így növelve az emésztetlen extracelluláris DNS-t [124].

Terápiás cél lehet a NET mennyiségének csökkentése, de nem teljes blokkolása, hiszen az védtelenné tenné a beteget a fertőzésekkel szemben. A NET keletkezésének gátlása profilaktikusan vagy a súlyosbodás gátlásaként jöhet szóba. Egérben gátolja a NET keletkezését a köldökzsinórvérben levő NIF (neonatal NET-inhibitory factor), valamint a felnőtt vérplazmában keringő hozzá hasonló peptidek (nNIF-related peptides), melyek PAD4 gátló hatással bírnak. A specifikus neutrofil granulumból felszabaduló laktoferrin valamelyest gátolja a további NETosist [124]. A PAD4 enzimnek léteznek ígéretes mesterséges gátlószerei, de még csak állatmodellekben próbálták őket: Cl-amidine, GSK 484, BB-Cl-Amidine, TDFA, F-amidine, YW3-56, Paclitaxel. A PAD-gátlószereket osztályozhatjuk a következőképpen: reverzibilis/irreverzibilis, specifikus/nem specifikus az izoenzimre, hatékony/kevésbé hatékony. Terápiás felhasználása a NETosis gátló PAD4-specifikus és hatékony gátlószereknek lehet, amilyen a GSK-484 és GSK-199 [126]. Amikor egér egyik coronariájának ligálásával infarktust indukálnak, a GSK-484 gátolja a hiszton-3 citrullinációját, csökkenti a neutrofil infiltrációját és a NET képződését, gátolja a szívizom apoptózisát és csökkenti az infarktus méretét [127].

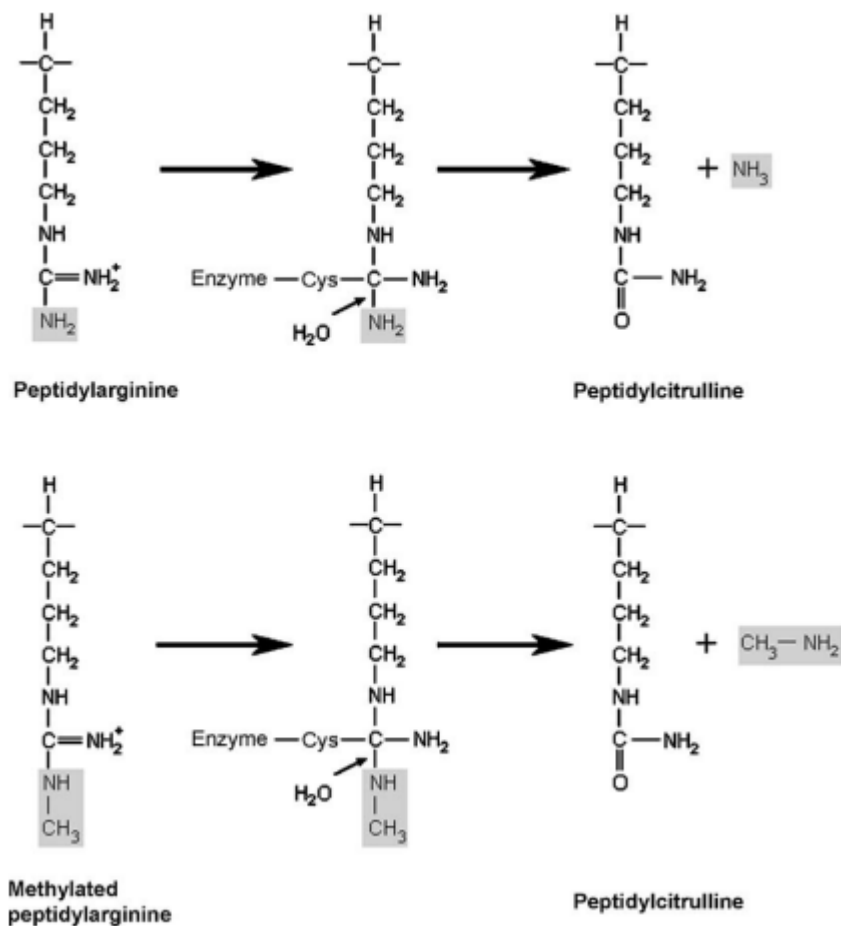
A már meglevő véralvadék, benne a NET és vWF emésztését lehet gyorsítani. Elméletileg elképzelhető lenne a vWF hasításának elősegítésére ADAMTS13 adagolása, de vérzést okoz a nagy molekulásúlyú vWF frakciók eltűnése, a metalloproteáz használatára nincs adat. Amikor az ADAMTS13 immunmediált hiányát a metalloproteáz elleni antitestet létrehozó B-sejteket depletáló rituximabbal vagy a vWF-vérlemezke interakcióját gátló caplacizumab nanotesttel kezelik, a mellékhatás vérzés a kezelték mintegy felében [128]. A heparin adagolásának is van veszélye, mert a DNS helyett köti a NET-fehérjéket, a fehérjék nélküli DNS ugyan gyorsan emészthető, de a fehérjék még mindig veszélyszignálként hatnak. A heparin serkenti a trombin-antitrombin interakciót, tehát gátolja a véralvadást. A

DNáz-1 nem tudja a DNS-t a hozzá kötődő fehérje mellett hasítani, talán a DNáz-1-szerű-3 jobban képes a glycocalyxhoz kötődött NET-et bontani [124].

## 2.6. Peptidil-arginin-deziminázok (PAD, PADI) és szerepük

### 2.6.1. A PAD enzimek által katalizált reakció

Mivel a peptidil-arginin-deziminázok fontos szerepet játszanak a NETosis iniciálásában és hatásában, érdemes áttekinteni működésüket. A PAD enzimek reakciómechanizmusát mutatja a 4. ábra [129].



4. ábra Peptidil-arginin-dezimináz enzimek reakciómechanizmusa

A citrullinálási folyamat magában foglalja az arginin enzimes átalakulását citrullinná. A reakciót katalizáló enzim a peptidil-arginin-dezimináz (PAD). A reakció során az arginint vagy monometil-arginint az enzim Cys oldallánca támadja meg, tetraéderes adduktot hozva létre, amit ezután egy vízmolekula nukleofil támadása hasít, ammónia vagy metilamin szabadul fel, ketocsoport jön létre a fehérjében és regenerálódik a Cys az enzimben.

A PAD enzim a metiltranszferázok antagonistájaként működik, mert a citrullin nem metilálható és nem aminálódik argininné. Ennek az irreverzibilis poszttranszlációs változásnak szerepe van a génexpresszió szabályozásában. A dimetilált Arg nem citrullinálható PAD enzimekkel. Az Arg → citrullin átalakulás miatti töltésvesztés megváltoztatja a fehérje térszerkezetét, a lazább harmadlagos szerkezet a korábbiaktól eltérő fehérje-fehérje kölcsönhatásokat tesz lehetővé. Az arginint körülvevő aminosavak milyensége és az Arg-t tartalmazó régió másodlagos szerkezete befolyásolja a citrullinálás lehetőségét. Az Asp/Gly-Arg-Asp/Ser szekvencia (a perjel vagylagosságot jelent,) rendezetlen struktúrában vagy  $\beta$ -kanyarban könnyen és teljes mértékben citrullinálódik, legalábbis a filaggrin és trichohialin fehérjékben, míg a prolinal körülvevő Arg sohasem citrullinálódik, a fehérje végeihez közel vagy  $\alpha$ -hélixben levő Arg pedig alig [129, 130].

#### 2.7.2. PAD izoenzimek, előfordulásuk, fiziológias és patológias szerepük

A PAD izoenzimek génjei egymás mellett található az 1. sz. kromoszómán. Emberben a PAD 1-4 izoenzimek különböző sejt típusokban fejeződnek ki [131], amelyek a citoplazmában, sejtmagban és felszabadulásuk után extracellulárisan is működnek [132]. Izoenzimenként eltérő kalciumszint és pH kell a PAD enzimek működéséhez, a fiziológias  $10^{-8}$ - $10^{-6}$  M intracelluláris kalciumkoncentráció nem elegendő az in vitro kísérletekben, hanem kb. 0,1 mM-t igényelnek [133]. Mivel több izoenzim részt vesz génexpressziós regulációban a sejtmagban, valószínűleg létezik olyan szabályozás, ami lehetővé teszi a PAD izoenzimek működését fiziológias kalciumszintnél, pl. fehérje-fehérje vagy fehérje-fosfolipid interakció révén [129]. A citrullinált fehérjék mennyisége nem korrelál a PAD enzimek expressziójával szinte egyik szövetben sem, de az agyban van a legtöbb citrullinált

fehérje, és ott a legmagasabb a PAD aktivitás is. Csak PAD2 működik ott, ami a legmagasabb aktivitással előforduló izoenzim, és máshol is fellelhető: vázizomban, lépben, szekréciós mirigyekben, gyomor-béltraktusban, vesében, ivarszervekben, tüdőben, neutrofil és eozinofil granulocitákban, monocitákban. A PAD3 az epidermiszben és hajhagymákban működik. A PAD1 részt vesz a korai embriogenezis génexpressziós szabályozásában, később főképp az epidermiszben és uterusban működik. A PAD4 mindenféle fehérvérsejt jellemző izoenzime [130] és csak ennek az izoenzimnek van nukleáris lokalizációs szignálja. PAD2-t a sejtek több sejtorganelumában is detektálták a citoplazmán kívül, többek között a sejtmagban, a PAD4 feltehetőleg a citoplazmában és a sejtmagban működik, valamint a PAD-ok gyorsan aktiválódnak az extracellulárisan magas kalciumszint által, ha NETosis, necrosis, pyroptosis során felszabadulnak.

Bizonyított, hogy a neutrofil granulocitákban a PAD4 deziminálja az 1, 2a, 3, és 4 hiszton argininjeit (cH1, cH2A, cH3 és cH4), minek következtében a hisztonok kevésbé szorosan kötődnek a DNS-hez, a kromatin fellazul. Bizonyos fehérjék citrullinációja a magot körülvevő lamina szétesését segíti elő apoptosissal [129] és NETosis során.

Egyes fehérjék citrullinációja fiziológiás folyamat, a hiper- vagy hipocitrullináció viszont betegségek okozója vagy következménye. A citoskeletális fehérjék közül a citokeratin, profilaggrin és trichohyalin citrullinációja az epidermis megfelelő szerkezetének kialakulásában és hidratáltságának fenntartásában fontos. Az asztrociták intermedier filamentumának, a gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) deziminációjának szerepe nem ismert, de megtörténik, fokozódása mérhető Alzheimer-kórban és autoimmun encephalitisben. Az oligodendrocita mielinhüvelyében a mielin bázikus fehérje citrullinációja is szabályozza a fehérje-foszfolipid kölcsönhatás erősségét. A mielin bázikus fehérje hipercitrullinációja 2 évesnél fiatalabb gyerekekben az agy plaszticitását teszi lehetővé, viszont felnőttben, talán a metiltranszferáz csökkent aktivitása miatt bekövetkező fokozott citrullináció autoimmun reakció megindulását eredményezi multiple sclerosisban szenvedő betegekben, és megfigyelhető Alzheimer-kórban is [129].

A sejtmagban a specifikus génekhez kötődő hisztonfehérjék, a citrullinált RNS-kötő motívumot tartalmazó fehérje-X és a TATA-kötő fehérjéhez asszociált faktor 2N citrullinációja a génexpressziót képes fokozni a kromatin fellazítása révén [130]. Apoptosis

és NETosis során a magi fehérjék aspecifikus és nagyfokú deziminációja következik be, a kromatin dekonzenzáció. A PAD4 enzimek egymást is citrullinálják, a térszerkezet változása csökkenti az enzim kötődésének erősségét a cH3-hoz, protein-arginin-metiltransferáz-1-hez, hiszton-dezacetilázhoz [126]. A NETosis során felszabadult PAD4, és feltehetőleg a PAD2 is, számos vérfehérjét citrullinál. Az ADAMTS13 citrullinálása a metalloproteáz aktivitásának elvesztését eredményezi, nem hasítja a nagyon nagy molekulású vWF-t kevésbé aterogén kisebb molekulává. Ez az egyik lehetséges mechanizmus, ahogyan a NETosis elősegíti a thrombosit [77].

A rheumatoid arthritis (RA) a népesség 1%-át érinti. Izületeik szinoviális folyadékában citrullinált fibrinogén  $\alpha$ -láncot [134], filaggrint, 2. típusú kollagént,  $\alpha$ -enolázt (a glikolízis enzime a citoplazmában és plazminogénreceptor a membránban) és vimentint találtak. A betegekben a PAD2 expresszió és aktivitás fokozott, valamint olyan HLA2 (human leukocyte antigen) izotípusuk van, ami jól köti a részlegesen emésztett citrullinált fehérjedarabokat és beindítja az autoimmunválaszt [129]. A rheumatoid arthritisben szenvedő betegek 70%-ában citrullinált vimentin,  $\alpha$ -enoláz és fibrinogén elleni antitest mutatható ki.

Citrullinált fibrinogénláncot nem csak arthritises betegekben mutattak ki, hanem egészséges emberek sok szövetében is [130]. A fibrinogén (Fg) az egyéb véralvadási fehérjékkel együtt képes az intersztíciumba penetrálni, ott hálót is képezhet, amelyet a plazmin hasít, a makrofágok bekebeleznek. A citrullináció miatt a fibrin (Fn) elveszíti a plazmin egyes hasítóhelyeit, miáltal az emésztés lassul, a fibrinogén pedig elveszíti a trombin hasítóhelyét, minek következtében in vitro kísérletekben a fibrinháló képződése lassul [135]. Viszont ha az extracellulárisan aktív PAD az antitrombint is citrullinálja és inaktíválja, a trombin emelkedett aktivitása fokozza a fibrinháló keletkezését.

PAD enzim nem csak emberben expresszálódik. A *Porphyromonas gingivalis* baktériumból felszabaduló PAD fehérjéket (fibrinogént is) citrullinál a szájban, periodontitist okoz, és a fehérjéken megjelenő új epitópok ellen antitestek képződhetnek autoimmun reakciót generálva [136].

Vastagbélfekélyes és Crohn-betegek belében fokozott a PAD4 aktivitás, a citrullinált fehérjék ellen antitestek képződnek és krónikus gyulladást tartanak fenn [137].

A COVID-19 betegek szérumában a citrullinált hiszton-3 és mieloperoxidáz, a két NETosis marker szintje magas és korrelál a leukociták, valamint az IL-8 szintjével. NET képződik a tüdő epitélben, megtalálható az aspirált folyadékban. A citrullinált fehérjék szintje korrelál a betegség súlyosságával, sőt összefüggésbe hozható a poszt-COVID-szindrómával is [138].

A PAD2 vagy 4 izoenzim túlzott működése megfigyelhető rosszindulatú daganatokban [139]. Ebből következően a PAD2 és PAD4 specifikus gátlószerei majd a tumorok terápiájában lehetnek felhasználhatók. A cH3 szintjének emelkedése több daganattípusban az állapot súlyosbodásának, a közeli halálnak a markere. A NETosis beindításához csak PAD4 enzimre van szükség, de az érett extracelluláris csapdákból PAD2 is citrullinálja a fehérjéket [140]. A NET-ek elősegítik a tumormetastasisok létrejöttét. A NET-ekkel felszabaduló HMGB1 aktiválja a TLR9-et, aminek szerepe van a tumorok növekedésében, valamint a neutrofil elasztáz és MMP9 szabaddá teszi a teret a daganatsejtek számára [141].

A PAD2 enzim szintje megemelkedett a vérben koszorúér bypass beültetés után 2 órával, és szintje korrelált a neutrofil granulocita marker mieloperoxidáz szintjével [142]. A korábban szívinfarktuson átesett betegeken glukóztolerancia-teszt végzésének következtében a PAD4 expressziója és a kettősálú DNS szintje nő meg, ami NETosisra utal. A jelenség hátterében feltehetőleg az áll, hogy a hirtelen magas cukorszint miatt fokozódik a glukózlebontás, a poliol-út és a ROS-termelés is, utóbbi pedig NETosist provokál [143]. Diabetes betegeknél a PAD4 expressziója fokozódik, ami fokozott NET-képződési hajlamot okoz [144].

## **2.8. Véralvadék keletkezése patológiai állapotokban**

A cardiovascularis betegségek bizonyított kockázati tényezői a visceralis vagy generalizált kövérség, magas vérnyomás, dyslipoproteinaemia, diabetes, melyek együtt a metabolikus szindróma tünetegyüttesét alkotják, és a dohányzás. Közös bennük, hogy mind szisztémás gyulladással járnak együtt. Az egyes tényezők kölcsönhatása révén lassan



rosszabbodik a beteg állapota, de akut esemény, pl. koronavírus-fertőzés hatására a beteg azonnal életveszélybe kerülhet.

### 2.8.1. Diabetes, dyslipoproteinaemia és obesitas

A cukorbetegség az inzulin abszolút vagy relatív hiánya miatt alakul ki. Az esetek 90-95%-át kitevő II. típusú diabetes mellitusban az inzulin jelátvitele nem megfelelő, és/vagy az inzulinantagonista hormonok túlsúlyba kerülnek. Mivel az inzulin léte és megfelelő jelátvitele kell a pancreas  $\beta$ -sejtek túléléséhez és szaporodásához is, cukorbetegekben csökken a funkcióképes sejtek száma. Az International Diabetes Federation adatai szerint 2021-ben 537 millió felnőtt volt cukorbeteg a földön, várhatóan 643 millióan lesznek 2030-ban, és 783 millióan 2045-ben [145]. A diabetes miatti halálozás 80%-a trombotikus események következménye. Az inzulinreceptorok megtalálhatók minden sejttypuson, legkevésbé az immunsejteken, mégis, a diabetes szövődményeit eredményező gyulladós és trombotikus folyamatokban meghatározó szerepük van a fehérvérsejteknek és trombocitáknak.

Inzulin(hatás) hiányában a GLUT4 (glukóztranszporter-4) nem transzlokálódik a szív, vázizom, zsírszövet sejtjeinek plazmamembránjába, valamint az inzulinreceptorral rendelkező sejtekben nem serkentődik a szőlőcukor lebomlása és tárolása glikogénként. Ennek következtében a vércukorszint tartósan, és a diabetes kezelése esetén is fluktuálón magas. Hormonként az inzulin az egyetlen, amely a zsírszövetben gátolja a trigliceridek hidrolízisét. Inzulin(hatás) hiányában a vér zsírsavszintje tartósan magas. Mind a glukóz, mind a zsírsavak fokozott lebomlása növeli a reaktív oxigénszármazékok keletkezését a mitokondriális légzési láncban [146]. A ROS szétkapcsolja a nitrogén-monoxid-szintáz (NOS), ami ezáltal NO helyett  $O_2^{\cdot-}$ -t termel. A ROS permanensen aktivál PKC $\beta$  és  $\delta$  izoenzimeket, melyek számtalan folyamatot regulálnak több sejttypusban, pl. proinflammatorikus citokinek felszabadulását fokozzák, és a szívben fibrózist, hipertrófiát, apoptózist okoznak [147]. A ROS miatt nő az intracelluláris kalciumionszint, az aktiválódó kalpain bontja a NF $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

inhibitorát, a felszabaduló transzkripciós faktor proinflammatorikus citokinek expresszióját fokozza sokféle sejt típusban, valamint aktiválja a renin-angiotenzin rendszert, miáltal vérnyomás-emelkedést okoz. A  $\text{Ca}^{2+}$  PAD4-et is tud aktiválni a neutrofil granulocitában, ami a már ismertetett mechanizmussal NET-ot eredményez, annak thrombosiszt okozó következményével együtt. A ROS a DNS károsítása révén poli-(ADP-ribóz)-polimerázt (PARP) is aktivál, ami a glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenázt (GAPDH) poli-ADP-ribozilálva inaktiválja pl. az endothelben.

Mind a szőlőcukor, mind lebontási termékei, különösen a triózból keletkező metilglioxál, spontán reagálnak fehérjékkel és egyrészt endoplazmás retikulum stresszt okoznak, másrészt az adduktok, a fokozottan glikált végtermékek (AGE, advanced glycation end-products) receptoruk jeltávitele révén gyulladáskeltő citokinek keletkezését serkentik [148]. A GAPDH inaktiválódása a glikolízis felhalmozódó előző köztitermékeit egyéb metabolikus utakra tereli: a poliolútra (ozmotikusan aktív, az idegekben, vesében, retinában tovább nem alakuló szorbitol felhalmozódását okozva), a hexózaminútra (fehérjék, pl. SERCA [sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase] abnormális glikációját és csökkent aktivitását, ezáltal megnyúlt repolarizációt eredményezve a szívben), a DAG szintéziséhez (ami a PKC klasszikus és új izoenzimeit aktiválja), valamint metilglioxál, abból fokozottan glikált végtermékek (AGE) keletkezéséhez. Ezen hatások miatt az ér endothelben az értágító és vérlemezkéggátló NO, valamint a  $\text{PGI}_2$  képződése csökken, viszont az érösszehúzó endothelin-1 és angiotenzin-2 termelődése nő, ami hipertóniát okoz és emeli a thrombosis kockázatát [149]. Az endothel protrombotikussá aktiválódik, felszínén a vérsejteket kötni képes sejtadhéziós molekulák jelennek meg és aktiválódnak, a Weibel-Palade-testekből exocitózissal vWF és sok egyéb fehérje ürül a vérbe, a citoplazmából PAI-1 szabadul fel. A diabetesben tapasztalható endotheliális diszfunkció az eddig részletezett sokféle hatás eredője [150]. A szőlőcukor és zsírsavak lebomlásakor hő, ATP és acetyl-KoA keletkezik a sejtekben.

A zsírsavtúlkínálat és fokozott oxidáció miatti emelkedett acetyl-KoA-szint következtében fokozódik a fehérjék spontán és enzimátikus acetylációja [151]. Hisztonok acetylációja sok gén expresszióját fokozza, ami felelőssé tehető a diabetes, hypertonia, cardiovascularis tünetek kialakulásáért. A hyperglycaemia miatti fokozott DNS-metiláció

következtében viszont számtalan gén szuppresszálódik [152]. A sejteken belül a fokozott zsírsavszint emeli a digliceridszintet, ami PKC-izoenzimeket aktivál, valamint a ceramidszintet, ami pedig gátolja az inzulin jelátvitelét, sőt gyulladást, apoptosist idéz elő az endothelben, szívben stb. Diabeteses és/vagy kövér emberben a vérlemezkék érzékenyített állapotba kerülnek, a felszíni fehérjék glikációja merevebbé teszi őket, a hyperglycaemia ozmotikus hatása miatt a sejtadhéziós fehérjék aktiválódnak, a csökkent NO és PGI<sub>2</sub>-szint miatt a vérlemezkék aktiválása nem gátolt, bennük a PKC enzimek aktiválódnak. Az ebben és az előző bekezdésben tárgyalt folyamatok tekinthetők a diabetesben tapasztalható glukotoxikus és lipotoxikus hatásoknak [149].

Cukorbetegekben dyslipoproteinaemia alakul ki [153]: jellemzően magas a VLDL, túltáplálás esetén a kilomikron trigliceridszintje is, sok triglicerid adódik át a koleszterinészter-transzfer-fehérje (CETP) által LDL-nek, HDL-nek, amelyekből a májlipáz hatékonyan kiemészt a trigliceridet, kis méretű, nagy sűrűségű lipoproteineket hozva létre (sdHDL, sdLDL). A sdHDL a vesében kiszűrődik és lebomlik, ezáltal csökken a vérben a HDL-szint, a sdLDL nem vevődik fel az LDL-receptor által a sejtekbe, hanem a meghosszabbodott keringési idő alatt és az interszticiális térbe kerülve számtalan változáson megy át a lipid- és fehérjerésze egyaránt, ún. oxidált LDL-lé alakul. Az oxLDL-t lektinszerű oxidált LDL-receptor (LOX1), A típusú takarítóreceptor (SRA, scavenger receptor type A), és CD36 takarítóreceptorok segítségével az atheroscleroticus plakkokban levő makrofágok veszik fel, és a lizoszómákban sikertelenül emésztik, ti. a fagolizozómába felvett oxLDL gátolja a proteázokat és a savas koleszterin-észterázt, a lizoszóma membránjában felgyűlő koleszterin gátolja a proton-ATP-ázt, miáltal belül kevésbé savas lesz a részecske, a kicsapódó koleszterinkristályok kilyukasztják a membránt. Mindezek következtében csökken az autofágia és a lizoszómák diszfunkcióssá válnak, a koleszterint leadni sem tudják, hanem a makrofágok lipiddel teli habsejtekké alakulnak [107]. A felvétel és szintézis miatti emelkedett koleszterinszint NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3, [nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1, leucine-rich repeat]) inflammoszómát aktivál. Az inflammoszóma a kaspáz-1-et aktiválja, ami proteolitikus hasítással aktív IL-1 $\beta$  és IL-18 fehérjéket hoz létre. E citokinek a piroptózis folyamatában ürülnek, és a környező neutrofil granulocitákat aktiválják: NETosisra, fagocitózisra vagy

piroptózisra bírják. Az oxLDL TLR4-hez kötődve, egyéb veszélyjelek (DAMP), ill. mikrobák a mintázatfelismerő receptorokhoz kötődve a citokinek és inflammoszómafehérjék génexpresszióját fokozzák [154].

Az inzulinantagonista hormonok hatása ellensúly hiányában felerősödik, kövér emberekben az adipocita hormonok egyensúlya az aterogének felé billen, a zsírsejtek között felgyűlő makrofágok proinflammatorikus citokineket termelnek, szisztémás gyulladást eredményeznek. Helyileg és a vérben a gyulladási markerek szintje nő: C-reaktív protein (CRP) és fibrinogén a májból, interleukinok és TNF- $\alpha$  főleg a fehérvérsejtekből, PAI-1 és vWF az endothelből szabadulnak fel, DNS és hisztonok a NETosis jelei. Az említett molekulák vérsejteket aktiválnak, egyes fehérjék (CRP, vWF) térszerkezete megváltozik, poszttranszlációs módosulások következnek be (hisztonok, fibrinogén citrullinálása).

Diabetes betegekben nem csak hyperfibrinogenemia tapasztalható a fokozott szintézis miatt a májban, hanem a fibrinháló tömörebb, pórusai kisebbek, gyakoribbak az elágazások, a fibrinszálak vékonyabbak, mint a nem cukorbeteg thrombusaié vagy a fiziológiás véralvadéké. A szerkezeti változás nem egyszerűen a hiperglikémiától függ, hanem az inzulinhatás hiányának sokrétű anyagcserehatása okozza. A diabetes betegek thrombusa rezisztens a fibrinolitikus hatásokra [10].

A hiperglikémiás inzulinfüggő cukorbetegségben, akiknek koszorúér-betegsége is van, a neutrofil granulocitákból sok calprotectin szabadul fel, ami a csontvelőben serkenti a monociták és neutrofil granulociták képződését, ezzel emeli a fehérvérsejtek számát a vérben, és lehetővé teszi ezen sejtek részvételét az atherosclerosis kialakulásában [155].

### 2.8.2. Hypertonia

A hypertonia morfológiai elváltozásokat okoz az erekben: hipertrófiát és rugalmatlanodást, az atherosclerosis fokozódását és fibroid necrosist [156]. A lumen felé növekvő simaizmok nemcsak vastagítják az érfalat, hanem szűkítik a belső átmérőjét. Az artériák és arteriolák érfalának szerkezeti átalakulása védi az általuk ellátott vékonyabb falú érszakaszt a magas vérnyomástól. Tartós hypertonia a kollagén felhalmozódása és az elasztin csökkenése révén teszi kevésbé rugalmassá az érfalakat.

Az agyerek tágulnak az éppen fokozott működésű agyterületeken. A funkcionális hiperémiát okozó molekulák közül a nitrogén-monoxid (NO) és a prosztaciklin (PGI<sub>2</sub>) főképp az endothelsejtekből származik. A hipertonia funkcionális változásokat is okoz az érfalban [156]. Hipertóniában bármely érszakaszon kevesebb NO keletkezhet a ROS-nak a nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) szétkapcsoló hatása miatt, valamint a NO a szuperoxidanionnal (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) reagálva peroxinitritet (ONNO<sup>•-</sup>) képez, vagyis csökken az értágító és vérlemezkegátló NO mennyisége. A ROS szintje több ok miatt is nő különböző sejtekben. A vérlemezkéken az érsérüléskor szabaddá váló kollagén aktiválja a glikoprotein-6 (GpVI)-receptort, ami a NADPH-oxidáz (NOX2) enzimet aktiválva a O<sub>2</sub><sup>•-</sup> szintjének emelkedését eredményezi, valamint ROS keletkezik a COX-1 működése, a TXA<sub>2</sub> keletkezése során is [157]. A mitokondriális elektrontranszportlánc, a citokróm P450-enzimrendszer, a xantin-oxidáz általános ROS-források. A többszörösen telítetlen zsírsavakból ROS hatására F-típusú prostanoidok keletkeznek, amik szintén aktiválják a vérlemezkéket. Az angiotenzin-2 (Ang-2) a NOX egyik fehérjéjének foszforilálása révén serkenti a NOX-komplex összeszerelődését, ezáltal O<sub>2</sub><sup>•-</sup> keletkezését okozza az érfal sejtjeiben [158]. A keletkező peroxinitrit nitrálja az érfal egyes fehérjéinek tirozin-oldalláncát és vasculáris diszfunkciót okoz. Az Ang-2 a PAI-1 indukciója révén gátolja a szöveti típusú plazminogénaktivátor (tPA) működését, a ONNO<sup>•-</sup> pedig közvetlenül csökkenti a tPA proteolitikus hatását, következésképpen lassul a fibrinolízis. A ROS gátolja az endothelsejt felszínén az ektonukleotidázt, miáltal a vérlemezkeaktiváló ADP kevésbé alakul át vérlemezkegátló adenosinná.

Az agyerek 60-150 Hgmm artériás vérnyomástartományban állandó szinten tartják az agyi véráramlást. Hipertóniában a hipertrófia miatt nő az agyerek rezisztenciája és szűkül a lumene, ami miatt főképp a kevésbé jó vérellátású agyterületeken a vérnyomáscsökkentő gyógyszerek hatása miatti alacsony vérnyomás hypoxiát okozhat. Ezek a területek a legérzékenyebben az isémia-reperfúzió általi károsodásra. Ha a vérnyomás-ingadozás nagy mértékű és meghaladja a hipertrófiás erek tűrőképességét, akkor nő a haemorrhagiás stroke kockázata.

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszernek nem csak a normális vérnyomás fenntartásában van szerepe, hanem túlzott aktiválódása felelős a hipertonia kialakulásáért és

annak szövődményeiért is [159]. Az angiotenzinogén-1-et nem csak a tüdőkapillárisok angiotenzinkonvertáló enzime, hanem az aktiválódó makrofágok, neutrofil granulociták és dendritikus sejtek katepszin-D és -G, valamint kimáz enzime is tudja hasítani aktív angiotenzin-2-vé az agyban, szívben, vesében, gyulladás helyszínén [160]. Az Ang-2 indukálja a transzformáló és kötőszöveti növekedési faktorokat (TGF- $\beta$  és CTGF), amelyek fibrózist, hypertrophiát okoznak a szívben és érfalban [161]. Egy káros körfolyamat alakul ki: a gyulladás, a ROS fokozzák az Ang-2 keletkezését, az pedig az 1. típusú angiotenzinreceptorhoz kötődve NF $\kappa$ B utat aktivál, IL-6, IL-1, MCP-1 (monocita kemoattraktans protein) citokinek, valamint MMP-2 és -9 (mátrix-metalloproteáz) expresszóját fokozza, amik immunsejteket vonzanak oda, ill. bontják az extracelluláris mátrixot [162].

Aktív konformációjú szöveti faktor (TF) az IL-6, IL-1 és TNF $\alpha$  általi aktiváció miatt jelenik meg a monociták/makrofágok membránjában. A neutrofil granulociták szintén aktivációjuk során termelik a TF-t, ami a NETosis során felszabadul. Az endothel is csak aktivációjakor expresszálja a TF-t. A vérlemezkék  $\alpha$ -granulumából a sejt aktivációjakor felszabadul és az akkor keletkező mikropartikulumok is tartalmazzák. A különböző gyulladásos jelek: IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , CRP, sőt az előzőleg említett Ang-2 is képesek aktiválni az endothelt és a vérsejteket, ezáltal aktív TF jelenik meg a plazmamembránban, ami a vérben mindig jelen levő VIIa faktorhoz kötődve és azt kofaktorként aktiválva beindítja a vérárvadás extrinsic útját, akár érsérülés vagy az atheroscleroticus plakk megrepedése nélkül is [163].

### 2.8.3. Dohányzás

A cigarettában és a dohánytermékek modern változataiban több száz szerves és szervetlen vegyület van, melyek közül egyre sincs szüksége az emberi szervezetnek, de soknak van káros hatása: bizonyítottan fokozzák a cardiovascularis megbetegedések és bizonyos daganatok kialakulásának kockázatát. A diabeteshez hasonlóan egy káros körfolyamat jön létre: a szervezetbe jutó molekulák ismétlődő oxidatív stresszt okoznak, aktiválják az immunsejteket, endothelt és vérlemezkét is, amelyek proinflammatorikus

citokineket termelnek, sejtadhéziós molekulákat aktiválnak és thrombózist generálnak. A gyulladás fennmarad, hiszen az expozíció ismétlődik. A dohányzással szervezetbe jutó káros anyagok hatását külön-külön nehéz megbecsülni, de állatkísérletekben azt találták, hogy a nikotin vérlemezkéaggregációt segít elő, az apró részecskék főképp endothelt aktiválva okoznak thrombózist, a szén-monoxid a koagulációs kaszkádot aktiválja, a policiklusos aromás szénhidrogének rákkeltők és oxidatív stresszt okoznak, a nehézfémek proinflammatorikus citokinek keletkezését segítik elő, a dohányspecifikus nitrózaminok rákkeltők [164]. A dohányos emberek vérlemezkészáma rendszerint valamivel magasabb a nemdohányzókénál (az eltérés nem feltétlenül szignifikáns), és bennük a keringő vérlemezkék hajlamosabbak aggregálódni, mint az egészséges nemdohányzó emberekben, mert aktiváltabb állapotban vannak [165].

## **2.9. Gyulladásos jelek**

### **2.9.1. C-reaktív protein (CRP)**

A rutin klinikai gyakorlatban vizsgált gyulladásos markerek közül a betegek CRP- és fibrinogénszintjét vettük figyelembe a fehérvérsejtszámon kívül.

Az 1930-ban felfedezett CRP tipikus akutfázisfehérje, melyet legnagyobb mennyiségben a máj termel gyulladásos citokinek, főképp IL-6, részben IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  hatására [166]. A leukociták, neuronok, adipociták, vesetubulussejtek, légzőhám által termelt CRP nem változtatja meg az egészséges felnőtt vérében mérhető 3-10 mg/l szintet, ami viszont akut gyulladás, infekció, trauma hatására akár 1000-szeresre is nőhet 1-3 nap alatt, de koncentrációja emelkedett krónikus gyulladásos állapotokban is. Vérszintjének mérése gyulladásos markerként szolgál a klinikai gyakorlatban [167]. A CRP és fibrinogén vérszintjének mérése használható a cardiovascularis megbetegedések kockázatának predikciójára is [168].

A termelt CRP vízoldékony homopentamerként (pCRP) kering a vérben és ilyen szerkezetű formában ártalmatlan. Amikor az alegységek egyik felszíne kötődik az aktiválódó sejtek felszínén a foszfatidilkolinhoz (kalciumionon keresztül a foszfáthoz, glutamáttal a

kvaterner N-hez, illetve fenilalaninnal a metilcsoporthoz), a középső üreg megnagyobbodik, neoepitópok kerülnek felszínre, amikkel képes a C1q komplementet megkötni és a veleszületett immunválasz klasszikus útját megindítani [169]. Savas környezet, hőmérsékletemelkedés és ROS hatására konformációváltozás következik be: az addigi  $\beta$ -redős szerkezetű pCRP\* oldhatatlan,  $\alpha$ -hélixet tartalmazó monomerekké (mCRP) esik szét. A pCRP\* leukocitákat vonz és aktivál, fokozza a Mac-1-kifejező (macrophage antigen-1) és ROS-termelő képességüket [170]. A mCRP aktiválja az érendothelt és a vérlemezkéket, melyek membránjában sejtadhéziós molekulák jelennek meg, lehetővé téve leukociták, vérlemezkék, fibrinogén, egyéb vérfehérjék kötődését. Ily módon a CRP aktív szerepet játszik a szervek isémiás/reperfúziós károsodásában [171], hiszen az érelzáródás után meginduló véráramlás hatására a reaktív oxigénszármazékok keletkezése fokozott mértékű. Probléma, hogy a standard kimutatások nem képesek különbséget tenni a vérben levő CRP izoformák között. Megemlítendő, hogy a mCRP vonzza az alternatív komplementaktiváló út gátlószerét is, ami a C3b kötésével gátolja az immunválaszt. Szívinfarktusos betegek vérében pCRP\* tartalmú mikrovezikulák keringenek. Az atheroscleroticus plakkokban, ahová feltehetőleg a vándorló neutrofil granulocitákkal együtt kerülnek, a proinflammatorikus CRP-izoformák együttesen találhatóak a makrofágokkal, oxidált LDL-lel, komplementfaktorokkal, és plakkruptúra során onnan fel is szabadulnak, további, a plaktól távolabbi területeken gyulladást okozva [170]. Natív CRP nincs a plakkokban. A krónikus fertőzések, a diabétesz, dyslipoproteinemiával, hasi kövérséggel, dohányzással együtt járó szisztémás gyulladást okozó állapotok mind atherothrombotikus hatásúak [172].

Gyulladást és trombotikus állapotokban a CRP-rendszer befolyásolása terápiás célpont lehet. Gyógyszeranalóggal blokkolható a pCRP-nek a foszfatidilkolin-kötő helye, antisense nukleotiddal gátolható a CRP mRNS-e, a fehérje ellenanyag segítségével kiszűrhető a vérből [173].

### 2.9.2. A fibrinogén szintézise, szerepe

A fibrinogén a véralvadék fő hálóképző fehérjéje, amely az alvadást okozó faktorok közül a legnagyobb koncentrációban kering a vérben. A heterohexamer vízdékony fehérje ( $A\alpha$ - $B\beta$ -



$\gamma_2$  láncokból áll, molekulásúlya 340 kDa. Növeli a vér viszkozitását, megtalálható az extracelluláris mátrixban is. A trombin hidrolizálja a fibrinopeptid A és B aminoterminális részeket a fibrinogénről, miáltal új kötőhelyek jelennek meg az így keletkező fibrin monomerben, ami spontán módon polimerizálódik. A fibrin számtalan fehérjéhez képes kötődni az alvadékképződés során, és keresztbe köti az aktivált vérlemezkéket. A 2 alfa-, valamint 2 gammalánc Lys és Gln oldalláncai között az aktivált XIII faktor hoz létre izopeptidkötést, miáltal stabilizálja az alvadékot.

A fibrinogén láncai 3 külön génjének bazális expresszióját a májban a HNF1 (hepatic nuclear factor-1) és C/EBP (CCAAT-enhancer-binding protein) transzkripciós faktorok indukálják. Gyulladás esetén az IL-6 a STAT3 (signal transducer and activator of transcription protein 3) transzkripciós faktort foszforilálással aktiválja, ami az IL-6RE-hez (IL-6 response element) kötődve fokozza mindhárom gén kifejeződését. Hasonlóan induktív hatása van a kortizolnak, amikor a ligandkötött glukokortikoid hormonreceptor a megfelelő elemhez kötődik a DNS-en [174]. A fibrinogén ezáltal akutfázis-fehérjének is tekinthető, vérszintje 4 g/l (12  $\mu$ M) fölé emelkedik gyulladás során, és megnő a cardiovascularis thrombosis kockázata is, mert megváltozhat az alvadékképződés kinetikája, növekszik a vér viszkozitása, és hatással lehet a fibrinolízisre [175]. Diabetes betegekben – akikben egyébként rendszerint emelkedett a vér fibrinogénszintje és a thrombus fibrinhálója tömörebb, szálai finomabbak, ezáltal rezisztensebb a fibrinolízisre [10] – akut isémiás agyérelzáródást követően szoros összefüggést találtak a vér fibrinogénszintje és a neurológiai állapot korai rosszabbodása között [176]. A 2 g/l alatti vérszintet tekintik túl alacsonynak, ami genetikai defektus miatt fordul elő. Számtalan polimorfizmus, ill. mutáció lehetséges a génekben, amelyek hatással vannak a génexpresszióra [174].

## **2.10. A fibrin biomechanikája és litikus jellemzői**

A fibrinogén és fibrin rugalmas fehérjék. A 35 nm hosszú 6 láncból álló fibrinmonomer akár 7-szeresre képes nyúlni a centrális és  $\gamma$ -nodulusok hosszú láncú nyúlása, valamint a közbülső, egymásra is csavarodott  $\alpha$ -hélixek kitekeredése és  $\beta$ -redővé alakulása révén [177].

Amikor a zsugorodó thrombocyták és a véráramlás nyíróereje miatt a fibrin feltekeredett 'coiled coil' régiója kitekeredik, a hidrofób aminosavak felszínre bukkannak, a láncok közelebb kerülnek egymáshoz és a folyadék kipréselődik az alvadékból vagy thrombusból, valamint a FXIIIa által létrehozott izopeptid keresztkötések is közelebb húzzák a szálakat [178]. Az áramló vér longitudinális irányba rendezi a fibrinszálakat a thrombus keletkezésekor, ezért a felszínéről alkotott SEM felvételen a fibrinszálak azonos irányba rendeződnek, míg ugyanazon thrombus belsejéről készült képen random térhálót alkotnak. In vitro modellben a fibrinháló nyújtása szintén egy irányba történő rendeződést eredményez, és a nyújtott fibrinalvadéokra rétegzett tPA nehezebben penetrál a nem nyújtottnál, lassul a fibrinolízis [179]. A zsugorodott thrombusban a retrakción átesett thrombocyták melletti megnyúlt fibrinszálakat szintén nehezebb emészteni.

Von Willebrand-faktor hozzáadása nem befolyásolja a fibrinnek plazmin általi emésztését, de megvédi a fibrinogént az emésztődéstől, ami ezáltal később felhasználhatóvá válik alvadékképzésre [180].

Általánosságban a vékonyszálú és tömör, kis pórusú fibrinháló rezisztens a fibrinolízisre [181]. A magasabb trombin-koncentrációval létrehozott vékonyabb szálú fibrinháló jobb aktivátora a tPA-nak, mint a vastag szálú, mert utóbbi esetben a részlegesen emésztett fibrin és a tPA aggregálódnak. Ugyanakkor a plazmin általi emésztés a vastagabb szálakon hatékonyabb, mert a plazminnak alig kell elmozdulnia, hogy a fibrinszálakat ugyanabban a keresztmetszetben szétvágja, nem kell laterálisan elcsúsznia a fibrinszálon vagy diffundálni a pórusokban [182].

A DNS annak ellenére csökkenti az alvadék permeabilitását, hogy vastagítja a fibrinszálakat. A tPA általi plazminogén-aktiváció hiába gyorsul a fibrinalvadék felszínén (modellezve a tPA gyógyszerkénti adását), de a plazmin penetrációja lassul, a lízisidő megnyúlik, a DNS és hiszton kötődik a keletkező fibrin-degradációs termékekhez [116]. A hiszton megvédi a trombin-t az antitrombin általi inaktivációtól. A DNS lassítja a plazmaalvadéknak plazmin általi emésztését. A neutrofil granulociták forbol-12-mirisztát-13-acetáttal (PMA) által indukált NETosis lassítja a fibrinháló tPA-val indukált lízisét, amely hatást a hozzáadott DNS-emésztő sztreptodornáz kivéd [123]. A hisztonok DNS-sel vagy anélkül is csökkentik a frakcionálatlan heparinnak és a kis molekulású heparinnak a

trombin-antitrombin interakciót gyorsító hatását, mert a hisztonok kötődnek a heparinhoz, akár a DNS-sel hármass komplexet is létrehozva. A NET jelenléte magyarázhatja a heparinkezelés gyenge terápiás hatékonyságát egyes esetekben [183].

PAD előzetes hozzáadásával létrehozott citrullinált fibrinnek csökkent a rugalmassága, kisebb erőhatásra szétesik a mikroeológiai mérés során. Ez magyarázhatja a fibringazdag thrombusok nagyobb embóliát okozó hajlamát. Az egérben vénalekötéssel létrehozott thrombusban citrullinált fibrin ellenes antitesttel kimutatható a citrullinált fibrin/fibrinogén  $\alpha$ -lánc jelenléte, tehát nem csak in vitro történik meg a fibrinnek PAD általi citrullinálása [184].

A fibrin(ogén) egyéb poszttranszlációs módosítása is lehetséges, ami hatással van a fehérje szerkezetére és az alvadék stabilitására: oxidáció, glioxiláció, karbamiláció és glikáció [185-188]. A tüdőembóliás beteg plazmájából képzett in vitro alvadék oldékonysága nagyobb, viszkozitása és elaszticitása pedig kisebb a mélyvénás thrombotikus beteg alvadékánál, tehát a fibrinháló szerkezete befolyásolja az embolusképzésre való hajlamot [189].

### 3. Célkitűzések

- ✓ Von Willebrand-faktor, extracelluláris DNS és fibrin kölcsönhatásának mennyiségi immunhisztokémiai jellemzése eltérő lokalizációjú (koszorúér, agyi és perifériás) thrombusokban.
- ✓ Artériás thrombusok összetétele (fibrin, vWF, DNS) és a betegek klinikai, valamint laboratóriumi jellemzői közötti összefüggések vizsgálata.
- ✓ A thrombusok fibrinszerkezetének jellemzése a thrombusösszetétel (vWF, DNS, sejtes elemek) függvényében.
- ✓ A fibrinogén citrullinációja hatásának vizsgálata a belőle keletkező fibrin szerkezetére.

## 4. Módszerek

### 4.1. A betegek jellemzői

Munkacsoportunk által 2014-ban indított vizsgálatok során 3 év alatt 208 beteg (CAD, PAD, AIS) akut intervenciós terápia alatt nyert thrombusainak összetételét elemezték, különös tekintettel a NET komponensek jelenlétére [115]. Ezt a kezdeti vizsgálatot követően, ha a visszamaradó thrombusminta kellően nagy volt a további immunfluoreszcens feldolgozáshoz, a mintát bevontuk a jelenlegi vizsgálatba. Ennek a kritériumnak 18 CAD-beteg, 19 PAD-beteg és 17 AIS-beteg thrombusa felelt meg. Klinikai jellemzőiket és alapvető laboratóriumi leleteiket az 1. táblázat és az 5. ábra foglalja össze. Érelmeszesedést akkor diagnosztizáltunk, ha diagnosztikus képalkotó vizsgálattal vagy a beavatkozás során atheroscleroticus plakkokat észleltünk. A betegek akkor minősültek dyslipidaemiásnak, ha emelkedett éhomi vér koleszterin- vagy trigliceridszintjük volt, vagy lipidcsökkentő kezelésben részesültek.

A szívkoszorúér-betegeket a STEMI (ST-elevation myocardial infarction) tüneteinek megjelenése után elsődleges percutan coronaria intervencióra utalták (bevételi kritériumok: akut szívinfarktusz biztos diagnózisa, PCI-re való alkalmasság, korábbi trombolitikus terápiás megközelítés hiánya és TIMI [thrombolysis in myocardial infarction] thrombus fokozat  $\geq 3$ ). Az angiográfiát és a thromboaspirációt radiális vagy femorális hozzáférésből végezték QuickCat (Spectranectics Int., Leusden, Hollandia), Export (Medtronic Inc, Minneapolis, MN) vagy Eliminate (Terumo, Gifu, Japán) aspirációs katéterekkel. Közvetlenül a revaszkularizáció előtt minden beteget előzetesen kezeltek aszpirinnel (250, 300 vagy 500 mg), intravénásan frakcionálatlan heparinnal (5000 NE), abciximabbal (hacsak nem volt abszolút ellenjavallat) és clopidogrellel (600 mg). Azok a betegek, akik már rendszeresen szedtek bármilyen trombotikaaggregációt gátló szert, csökkentett adagot kaptak. Az akut tünetekkel jelentkező perifériás artériás thrombosisos betegeket Fogarty katéteres thrombendarterectomiával és Vollmar gyűrűs tripperrel félig zárt endarterectomiával kezelték lokális vagy általános érzéstelenítésben (bevételi kritériumok: artériás elzáródás definiált röntgen és klinikai diagnózisa, műtétre való alkalmasság). A perifériás artériás

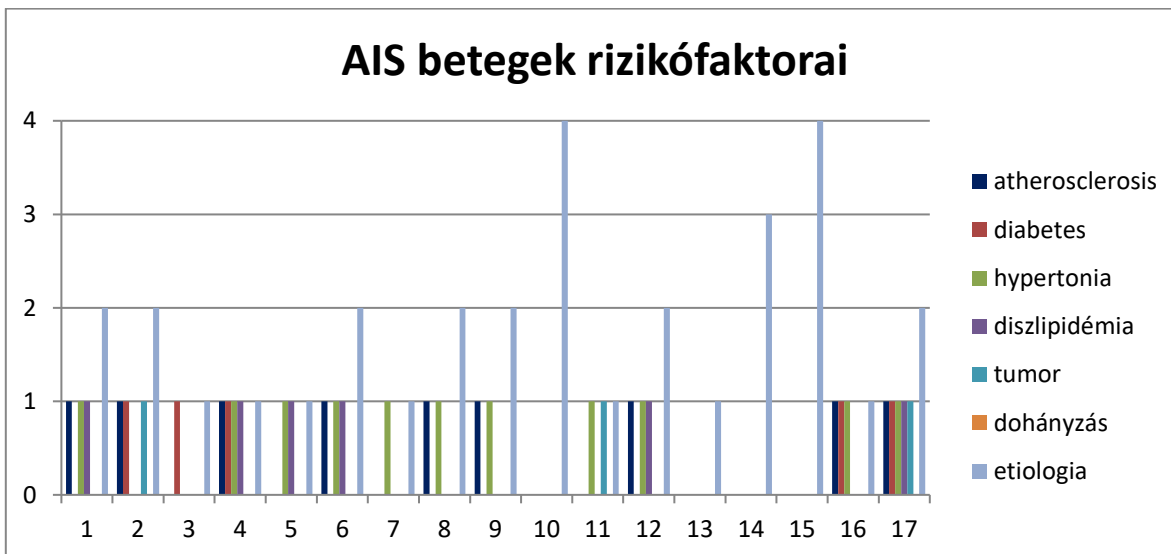
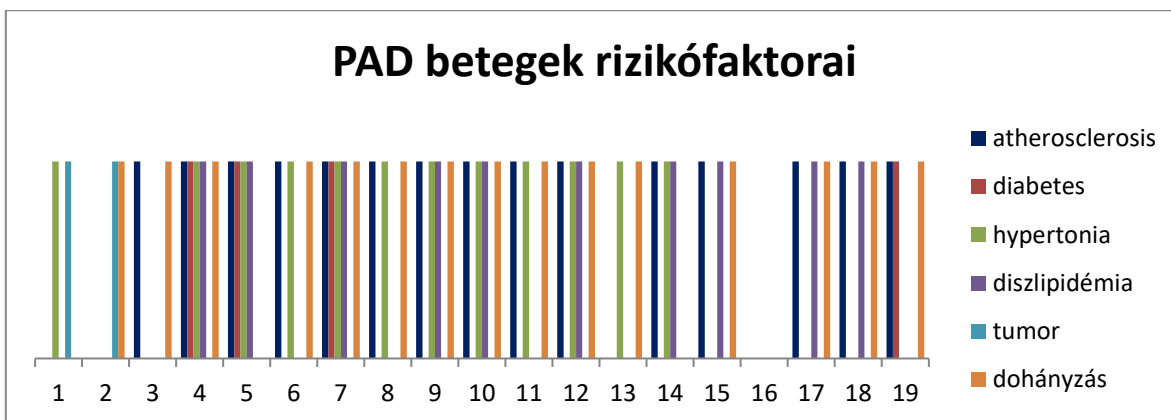
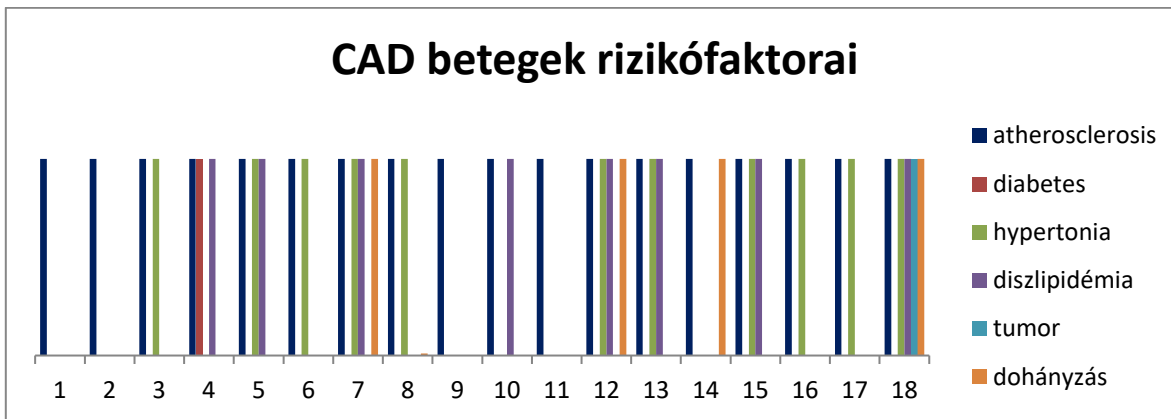
betegségek korábbi beavatkozásaiból származó bypass-graftokban képződött thrombusokat vagy az okklúzió helyéhez közeli elváltozásokból származó embóliákat ebben a vizsgálatban nem kezelték külön. A vascularis rekonstrukció alatt szisztémás heparint (150 NE/kg) adtak a szorítás előtt [20]. A tanulmányt az intézményi és regionális etikai testület hagyta jóvá (Ref.#2014/2014.09.18.), és minden résztvevőtől vagy törvényes gyámjától megkapták a tájékoztatott írásos beleegyezést. A kutatás a Helsinki Nyilatkozatban megfogalmazott elveknek is megfelel.

1. táblázat A betegek laboratóriumi paramétereit, egyéb jellemzőit

Az értékeket átlag  $\pm$  szórás vagy százalékban adjuk meg az elemzésbe bevont alanyok száma szerint. Zárójelben a betegek száma, a perjel után az össz betegszám. FVS = fehérvérsejtszám, Thc = trombocitaszám, CRP = C-reaktív protein, Hgb = haemoglobin, rtPA = recombinant tissue-type plasminogen activator = rekombináns szöveti típusú plazminogénaktivátor, NA = nincs adat

	<b>CAD (18)</b>	<b>PAD (19)</b>	<b>AIS (17)</b>	<b>Mind (54)</b>
Férfi	66,6% (12/18)	68,4% (13/19)	64,7% (11/17)	66,6% (36/54)
Beteg életkora	60,4 $\pm$ 14,9 (18)	65,9 $\pm$ 16,4 (19)	58,8 $\pm$ 10,9 (17)	61,8 $\pm$ 12,3 (54)
<b>Laboratóriumi értékek</b>				
FVS (10 <sup>3</sup> / $\mu$ L)	13,3 $\pm$ 4,4 (18)	9,3 $\pm$ 1,8 (17)	10,0 $\pm$ 3,6 (17)	10,9 $\pm$ 4,1 (52)
Thc (10 <sup>3</sup> / $\mu$ L)	235 $\pm$ 50,7 (18)	197,8 $\pm$ 25,4 (17)	204,2 $\pm$ 58,6 (17)	212,9 $\pm$ 67 (52)
CRP (mg/L)	10,7 $\pm$ 15,7 (18)	26,1 $\pm$ 22,1 (6)	9,1 $\pm$ 8,6 (17)	12,5 $\pm$ 15,4 (41)
Hgb (mmol/L)	8,1 $\pm$ 1,0 (18)	7,7 $\pm$ 1,9 (17)	8,4 $\pm$ 0,9 (17)	8,1 $\pm$ 1,3 (52)
Fibrinogén (g/L)	3,2 $\pm$ 1,0 (14)	3,9 $\pm$ 0,9 (7)	2,2 $\pm$ 0,9 (9)	3,1 $\pm$ 1,1 (30)
<b>Etiológia</b>				
Thrombophilia	0% (0/18)	0% (0/18)	0% (0/17)	0% (0/53)
Cardialis embolizáció	NA	NA	41,1% (7/17)	-

Atherosclerosis	100% (18/18)	83,3% (15/18)	41,1% (7/17)	75,4% (40/53)
Dissectio	NA	NA	5,9% (1/17)	-
Cryptogen	NA	NA	11,8% (2/17)	-
<b><i>Thrombus helyének adatai</i></b>				
Érátmérő (mm)	3,2±0,5 (18)	7,4±5,0 (18)	2,8±0,7 (17)	4,5±36 (54)
<b><i>A beavatkozást megelőző gyógyszerelés</i></b>				
Acetilszalicilsav	100% (16/16)	55,5% (10/18)	40,0% (6/15)	64,6% (31/48)
Clopidogrel	100% (16/16)	33,3% (6/18)	20,0% (3/15)	54,3% (25/46)
Oralis anticoagulans	NA	5,2% (1/19)	23,5% (4/17)	-
rtPA	NA	NA	47,0% (8/17)	-
Heparin	100% (18/18)	100% (19/19)	100% (17/17)	100% (54/54)
Statin	21,4% (3/14)	53,3% (8/15)	10,0% (1/10)	30,8% (12/39)
<b><i>Társbetegségek és rizikófaktorok</i></b>				
Atherosclerosis	100% (18/18)	83,3% (15/18)	56,6% (9/16)	55,8% (29/52)
Diabetes	5,5% (1/18)	22,2% (4/18)	3,1% (5/16)	19,2% (10/52)
Hypertonia	61,1% (11/18)	66,6% (12/18)	68,6% (11/16)	65,4% (34/52)
Dyslipidaemia	44,4% (8/18)	55,6% (10/18)	37,5% (6/16)	45,3% (24/53)
Uraemia	22,2% (4/18)	0% (0/17)	0% (0/16)	7,8% (4/51)
Malignus daganat	5,5% (1/18)	11,1% (2/18)	18,8% (3/16)	11,5% (6/52)
Nemdohányzó	72,2% (13/18)	16,6% (3/18)	33,3% (1/3)	46,1% (18/39)
Korábbi dohányos	5,5% (1/18)	0% (0/18)	0% (0/3)	2,5% (1/39)
Vizsgálatkor dohányzik	27,7% (4/18)	88,7% (15/18)	66,6% (2/3)	43,6% (17/39)



5. ábra Az artériás thrombotikus betegek kockázati tényezői az egyes betegcsoportokban  
 A vízszintes tengelyen a számok egy-egy beteget jelölnek, a színes sávok a kockázati tényezőket. (A) Minden koszorúér-thrombotikus (CAD) beteg atheroscleroticus, 11 magas vérnyomásos, 8 dyslipidaemiás, 1-1 diabeteses vagy tumoros, 4 dohányzott a thrombus

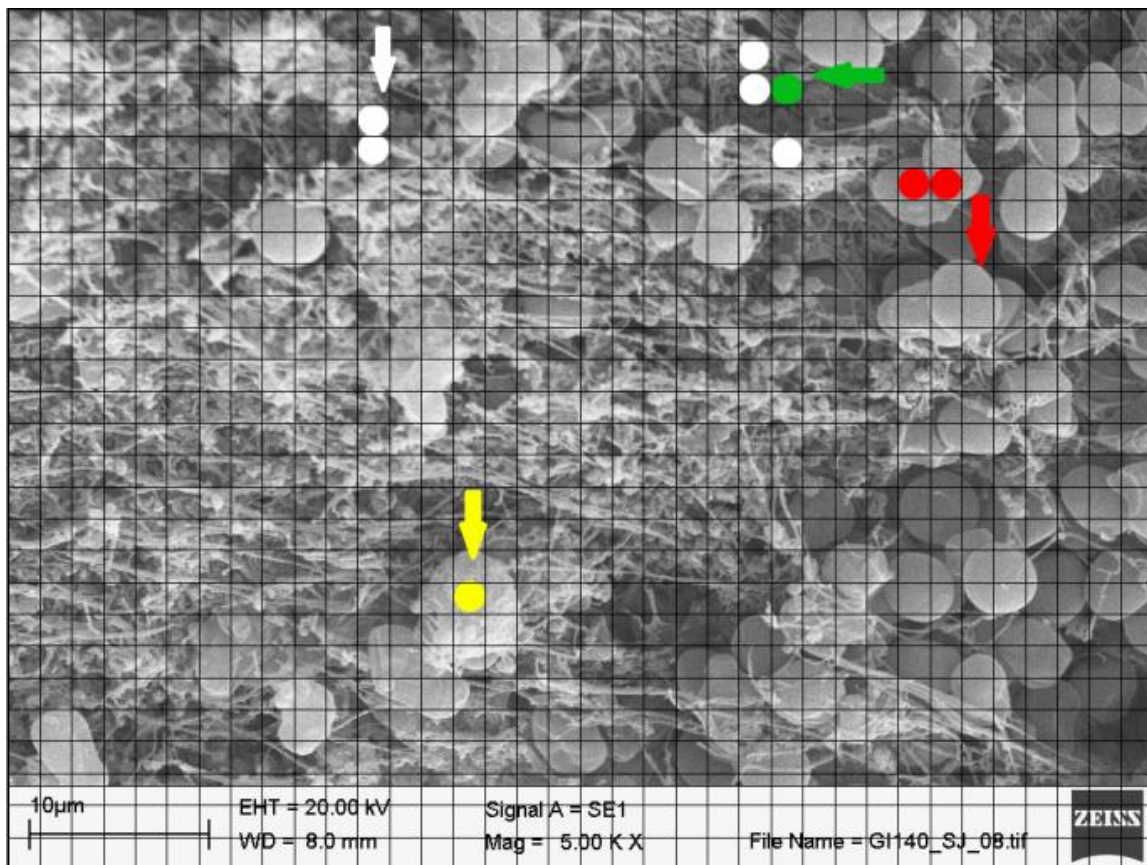


keletkezésének idején, 1 pedig korábban leszokott. (B) A 19 perifériás artériás betegségben (PAD) szenvedő beteg közül 14 atheroscleroticus, 15 dohányos, 12 hypertoniás, 9 dyslipidaemiás, 3 diabeteses, 2 tumoros, egy betegről nincs adatunk. (C) A 17 agyérthrombosisos betegből (AIS) 11 hypertoniás, 9 atheroscleroticus, 6 dyslipidaemiás, 5 diabeteses, 3 tumoros. A függőleges tengelyen az etiológiát jelképező kék csík 1-es magassága a szívből származó embolizációt jelképezi 7 betegnél, a 2-es magasság az atherosclerosist 7 betegnél, a 3-as magasság jelentése dissectio, a 4-es magasságé kriptogén etiológia.

#### **4.2. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek készítése**

A mintákat az extrakció után azonnal rögzítettük és feldolgoztuk. Közvetlenül (5 percen belül) a mütét vagy a fibrin előállítás után 5\*5\*10 mm-es thrombusdarabokat vagy 100 µl térfogatú fibrinrögöket helyeztünk 10 ml 100 mM Na-kakodilát pH 7,2 pufferbe 24 órára 4 °C-on. A mintákat ismételten mostuk ugyanazzal a pufferrel, majd fixáltuk 1% (v/v) glutáraldehiddel 16 órán át. A fixált mintákat etanolos hígítások sorozatával [20-96% (v/v)], végül 96% (v/v) etanol/aceton és tiszta aceton 1:1 arányú keverékével dehidratáltuk, majd kritikus pontig szárítottuk CO<sub>2</sub>-vel E3000 Critical Point Drying Apparatusban (Quorum Technologies, Newhaven, Egyesült Királyság). A mintákat öntapadó szénkorongokra helyeztük fel, SC7620 Sputter Coaterben (Quorum Technologies) arannyal bevontuk. Ezután a képeket a thrombusok különböző részeiről készítettük, hogy ellenőrizzük az összetétel heterogenitását. Összesen 10 kép készült minden thrombusról SEM EVO40-nel (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Németország), két különböző nagyítással (5000x, 20000x). A sejttösztevők és a fibrinhálózat felületi foglaltságát jellemzően 5 különböző képen határoztuk meg minden thrombusról kisebb nagyítás mellett, miután a képeket 864 egyenlő méretű négyzetes területre osztottuk Photoshop 7.0.1 CE (Adobe, San José, CA. USA) segítségével. Az egyes régiókat a vizsgáló morfológiai jellemzők alapján a következőképpen osztályozta: fibrin, vérlemezkék, egyéb vérsejtek vagy ezek kombinációi. A thrombus

összetételét ezután kiszámítottuk az egyes komponensek által elfoglalt régiók százalékában a kép teljes területén [179] (6. ábra) [190].

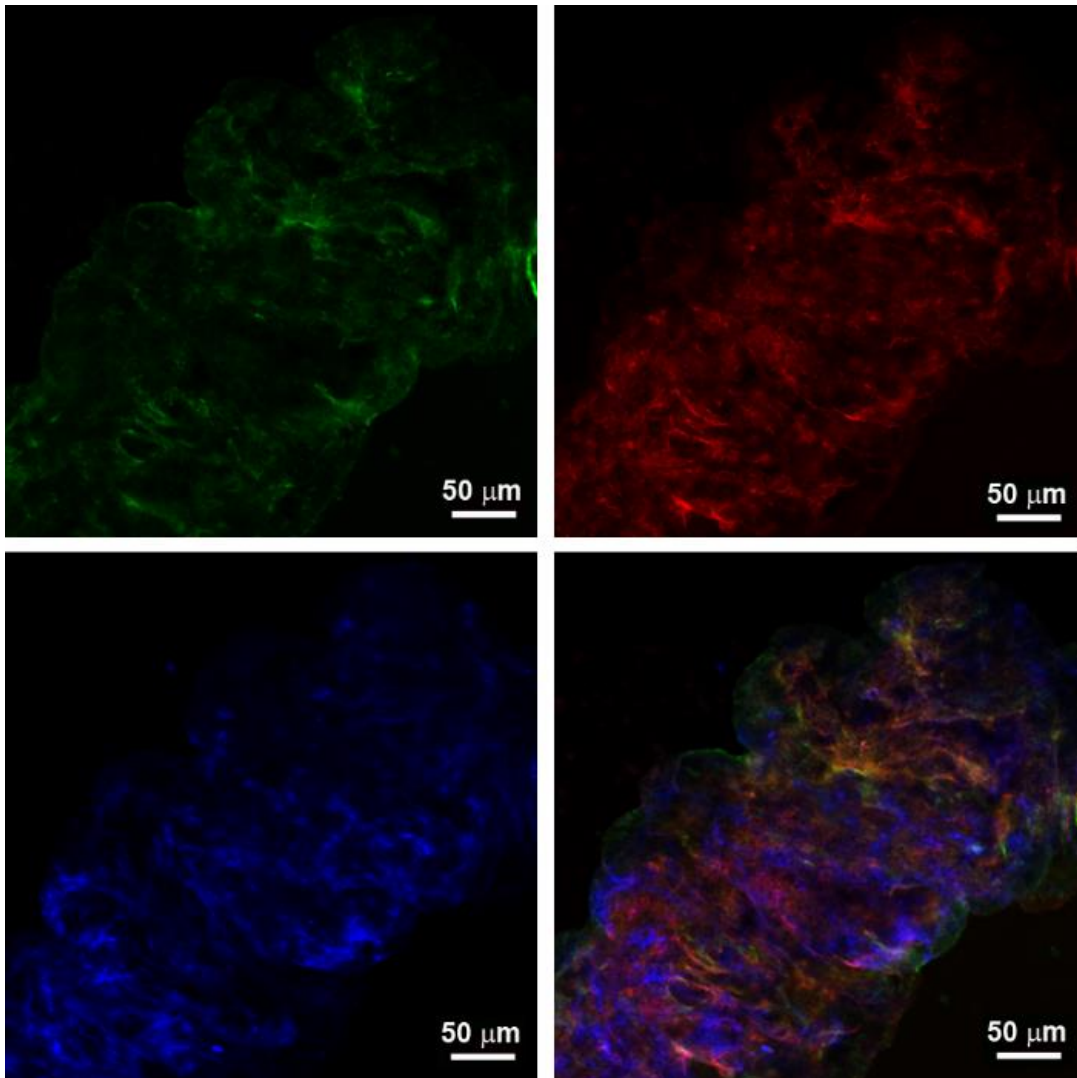


6. ábra A fibrin, vérlemezkék, fehérvérsejtek vagy vörösvértestek által elfoglalt thrombust alkotó területek meghatározása SEM képanalízissel. Ez egy reprezentatív SEM-kép, amely szemlélteti a teljes thrombust terület különböző összetevők általi foglaltságát. Szimbólumok: fehér: csak fibrin; vörös: vörösvértest; sárga: fehérvérsejt; zöld: vérlemezke+fibrin.

### 4.3. Immunfluoreszcens felvételek készítése

A thrombusmintákat közvetlenül a beavatkozás után izopentánba helyezték, és a további feldolgozásig  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolták. A thrombusok 6-15 különböző területéről  $6\text{ }\mu\text{m}$  vastagságú kriometszetek készültek, a minta méretétől függően. Az extracelluláris DNS-t, a vWF-et és

a fibrin TOTO-3 dimer cianin nukleinsav festékkel (T-3604, Life Technologies, Budapest, Magyarország), nyúl anti-humán vWF antitesttel (F3520, Sigma) és egér anti-humán fibrinogén antitesttel (sc-166968, Santa Cruz) azonosítottuk. Másodlagos antitestként a fibrin megjelenítéséhez Alexa Fluor Plus 555 kecske anti-egér IgG antitestet (Thermo Fisher, USA), a vWF vizualizálásához Alexa Fluor Plus 488 kecske anti-nyúl IgG (Thermo Fisher, USA) antitestet használtunk. 12-15 kép készült mindegyik thrombusról konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (Zeiss LSM 710, EC Plan-Neofluar 20x/0,50 M27 objektív, Carl Zeiss, Jena, Németország) a következő gerjesztési/emissziós hullámhosszokkal: fibrin-543/585, vWF-488/516, DNS-633/670 (7. ábra) [190]. A különböző fluoreszcens jelek területének számszerűsítésére Image J szoftvert (NIH, Bethesda, MD, USA) használtunk. Kiválasztottuk az érdeklődésre számot tartó régiókat, kiszámítottuk a felületét pixelben, és beállítottuk a vWF, DNS és fibrin intenzitásának küszöbértékeit a lefedett területek azonosításához. A másodlagos antitestek keresztabszorpciója miatt a két fluoreszcens jel közötti enyhe térbeli átfedés ellensúlyozására a két százalékos lefedettség érték arányát kiszámítottuk, és ezt követően fibrin/vWF és fibrin/DNS arányként használtuk, majd meghatároztuk a fibrin/DNS (FN50) és a fibrin/vWF (FW50) arány eloszlásának medián értékét [20].



7. ábra A thrombus alkotóelemei arányának meghatározása fluoreszcens jelintenzitás méréssel immunfestéssel. Ezek reprezentatív képek a vWF, a fibrin és a DNS indirekt immunfluoreszcens kimutatására ugyanabban a thrombusmetszetben. Zöld: von Willebrand-fakt; piros: fibrin; kék: extracelluláris DNS; az utolsó a három egyesített képe.

#### 4.4. Fibrinogén citrullinálása

A méréshez használt reagensek: fibrinogén (human, plazminogéntől depletált, Merck Kft.-től, Budapest, Hungary), trombin (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany), tovább tisztítva ioncserélő kromatográfiával sulfopropyl-Sephadex oszlopon, a termék

specifikus aktivitása 2100 IU/mg. PAD4 (GST tagged, Merck, Budapest, Hungary), FXIIIa inhibitor ZED1301 (Zedira GmbH, Darmstadt, Germany), Cl-amidine panPAD inhibitor (Sigma-Aldrich, Germany).

Három különböző minta mindegyike tartalmaz 8  $\mu\text{M}$  végkoncentrációjú fibrinogént, 0,02 mM XIII-as faktor gátlószer Zed1301-et és citrullináló puffert, aminek összetétele: 100 mM Tris-HCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM ditiotritol és pH 7,5. A XIII-as faktor inhibitora gátolja a fibrinogénben szennyezésként esetlegesen jelen levő véralvadási faktort, másrészt maga a XIII-as faktor is citrullinálódhat, ami befolyásolná az eredményt. Az egyik mintához nem adunk PAD4 enzimet, a másik kettőhöz adunk 1,15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  koncentrációban, míg a 3. kontroll rendszer 0,06 mg/ml Cl-amidin PAD4 gátlószert is tartalmaz az enzim hozzáadás előtt. 4 h  $37^\circ\text{C}$ -on való inkubáció után a citrullinációt 0,06 mg/ml Cl-amidin gátlószerezrel leállítjuk. Az így készült mintákat használtuk a SEM, turbidimetriás és PAGE vizsgálatokhoz.

#### **4.5. Fibrin alvadásának turbidimetriás mérése**

Fibrinogént (8  $\mu\text{M}$ ) 1,15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PAD4-geyel inkubáltunk 4 órán át  $37^\circ\text{C}$  hőmérsékleten. A keletkezett cFg-t a kontroll fibrinogénhez (amely ekvivalens mennyiségű Cl-amidinnel inaktivált PAD4-et tartalmazott) adtunk növekvő arányban (az összes fibrinogénnek 0, 25, 50, 75 és 100%-ában), majd 4  $\mu\text{M}$  fibrinogénkeveréket 7,5 nM trombinnal  $37^\circ\text{C}$ -on alvasztottunk. Az alvadás előrehaladását 96 lyukú mikrotiterlemezeken követtük az abszorbancia mérésével 340 nm-en CLARIOstar spektrofotométerrel (BMG Labtech, Ortenberg, Németország). Az alvadás végén mért maximális abszorbanciát ( $A_{\text{max}}$ ) a fibrinszerkezet indikátoraként (a fibrinrostok tömeg-hosszúsága aránya) rögzítettük, míg a 10%-os  $A_{\text{max}}$  eléréséig eltelt időt a fibrinogén citrullináció okozta alvaszthatóság-változásának indikátoraként [191].

#### **4.6. Fibrinogén SDS poliakrilamid gélelektroforézise**

A háromféle - nem citrullinált, citrullinált és PAD4-inhibitor Cl-amidint tartalmazó – fibrinogén minta a 4.4. fejezetben leírtak szerint készült. Mindegyik minta tartalmazott XIII-as faktor gátlószer Zed1301-et (ZEDIRA GmbH, Darmstadt, Németország) 0,02 mM koncentrációban.

A mintát nátrium-dodecil-szulfáttal kezeltük elő, ditiotreitollal redukáltuk és 95°C-on hőkezeltük. A futtatás PhastSystem készülékben (Pharmacia) 4-15 % gradiens mini poliakrilamid gélen, a fehérjék kimutatása ezüsfestéssel történt.

#### **4.7. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek statisztikai értékelése**

A thrombusokról és a fibrinről készült SEM-képeket elemeztük a fibrinszálak átmérőjének és a fibrinhálózat pórusai területének meghatározásához saját tervezésű szkriptek segítségével, amelyek a Matlab 7.10.0.499 (R2010a) Image Processing TOOLBOX v. 7.0-s verziójában futnak (The Mathworks, Natick, MA, USA). Az átmérőméréshez egy rácst rajzoltunk a képre 10-15 egyenlő távolságra lévő vízszintes vonallal, és az összes általuk keresztezett szálát bevontuk az elemzésbe. Az átmérőket úgy mértük meg, hogy a Távolság eszköz mutatóját manuálisan helyeztük az egyes képeken 300 szál keresztirányú keresztmetszete végpontjaira (mindig a szálak hossz tengelyére merőlegesen). A rostok átmérőjére vonatkozó adatok eloszlását a korábban ismertetett algoritmussal elemeztük [192]: az elméleti eloszlásokat illesztettük az empirikus adatsorokra, majd Kuiper teszttel hasonlítottuk össze.

#### **4.8. Immunfluoreszcens felvételek statisztikai analízise**

Kuiper statisztikai tesztet az eloszlás egyenlőségére [192] és Bootstrap egyoldali statisztikai tesztet a medián egyenlőségre [193] használtunk a folytonos adathalmazok párjainak jellemzői közötti különbségek azonosítására, amelyekben a megfigyelések mintái

crisp (bináris) halmazúak vagy fuzzy (tagsági függvénnyel jellemzett) halmazúak. Annak érdekében, hogy a viszonylag kis méretű mintákon belüli nagy szórást mutató adatok különbségeinek statisztikai szignifikanciájára vonatkozó becsléseket kapjunk, egy olyan Bootstrap eljárást valósítottunk meg, amely nem használ paraméteres feltevéseket, hanem 10.000 elemszámú szimulált mintát [194], és egyenlő méreteket az empirikus kumulatív eloszlásfüggvényekhez képest, a korábban leírtak szerint [195].

Az egy vagy két független változó és a függő változó közötti összefüggéseket másodfokú egyenletekkel írtuk le, amelyek paramétereit lineáris regressziós modellekkel határoztuk meg. A fuzzy minták esetében szereplő megfigyeléseket tagsági fokával megegyező súlyozott együtthatóbecsléssel és a kiugró érték kizárására korábban bevezetett algoritmus felhasználásával alkalmaztuk [196]. A tévkövetkeztetési arányt (false discovery rate) 10%-osnak feltételeztük [197]. Minden statisztikai tesztnél a 0,05-ös kritikus P-értéket alkalmaztuk.

#### **4.9. Citrullinált fibrin pásztázó elektronmikroszkópos felvételeinek statisztikai értékelése**

A SEM-ből származó fibrinszál átmérő adatainak eloszlását a korábban ismertetett algoritmus segítségével elemeztük: 30 elméleti eloszlást illesztettünk az empirikus adatsorokhoz, Kuiper teszttel és Bootstrap szimulációs eljárásokkal hasonlítottuk össze. Más, három vagy több összehasonlított részhalmazt tartalmazó adathalmazokon ANOVA-t végeztünk. Azoknál az adathalmazoknál, ahol az adatok normál eloszlását nem lehetett megerősíteni a Shapiro-Wilk teszttel, nem parametrikus statisztikai teszteket alkalmaztunk. A Kolmogorov-Smirnov tesztet azért választottuk, mert robusztus a képessége két adathalmaz eloszlásának összehasonlítására az eloszlás típusától függetlenül. Három vagy több adathalmaz összehasonlításához Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk. Minden statisztikai tesztet a GraphPad Prism 6.00 (GraphPad Software, La Jolla California USA) és a Matlab Statistical Toolbox 7.3 szoftverével végeztünk. Az adatok az átlag  $\pm$  standard hibájaként vannak megadva, kivéve a fibrinszál átmérőjét, ahol a SEM medián és alsó-felső

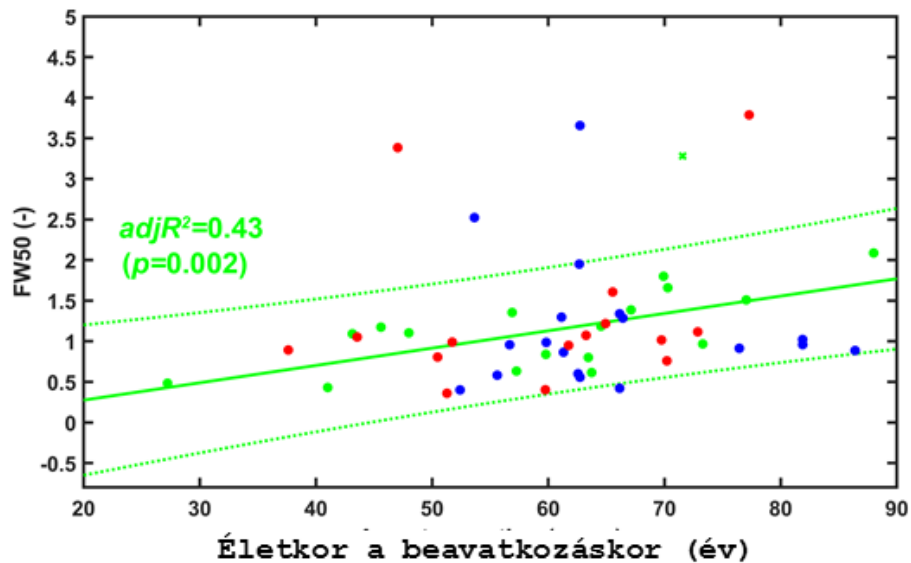
kvartilis értéként van megadva. A csoportok közötti különbségeket  $P < 0,05$  valószínűségi érték mellett tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.



## 5. Eredmények

### 5.1. Az artériás thrombusok vWF- vagy DNS-tartalmának függése a beteg életkorától

A vizsgált betegek átlagéletkora  $61,8 \pm 12$  év. Az összes CAD és az AIS férfi betegek thrombusaiban a fibrin/vWF arány mediánja (FW50) szignifikánsan emelkedik a betegek életkorának előrehaladtával ( $\text{adj}R^2=0,66$  és ANOVA P-érték = 0,017,  $n=10$ ), vagyis minél idősebb a beteg, annál kevesebb vWF-t találtunk a vérrögben (8. ábra, 2. táblázat). Az összes AIS-beteg, ill. az összes vizsgált beteg esetén a tendencia hasonló, de az összefüggés nem erős,  $\text{adj}R^2 < 0,3$ . A fibrin/DNS arány (FN50) szintén nő az 50 évnél idősebbek thrombusaiban a korábbi vizsgálatunkhoz hasonlóan [115]. Minél idősebb a beteg, annál kisebb a vérrög DNS-tartalma.



8. ábra Artériás thrombusok FW50 értékének függése a beteg életkorától

FW50: a thrombusmetszetek konfokális mikroszkópos képén a fibrin és von Willebrand-faktor által elfoglalt terület arányának mediánja immunfluoreszcens kimutatása során. Zöld: CAD, piros: AIS, kék: PAD-betegek. Zöld pontozott vonal: a regressziós egyenes 95%-os

konfidencia intervalluma a CAD-betegek esetén.  $\text{adj}R^2 =$  korrigált korrelációs koefficiens  
p-value = probability value = a varianciaanalízis valószínűségi értéke.

A különböző eredetű, vagyis agyi, perifériás és coronaria artériás thrombusok FN50 és FW50 értékében nem mutattunk ki statisztikailag értékelhető különbséget, szignifikáns eredmények csak egyéb változók figyelembevételkor láthatók.

A statisztikai értékelés során kapott azon szignifikáns eredményeket, ahol két változó egymástól való függését vizsgáltam, a 2. táblázatban foglaltam össze. A későbbiekben csak utalok az itt található értékekre.

2. táblázat A fibrin/von Willebrand faktor arány és a fibrin/extracelluláris DNS arány alakulása néhány klinikai és laboratóriumi paraméter függvényében. Az  $y = A_0 + A_1 \cdot x + A_2 \cdot x^2 + e$  egyenlet együtthatói két folytonos  $x$  és  $y$  változó regressziós modelljére. Az egyes bemutatott együtthatók szimmetrikus 95%-os konfidencia intervalluma zárójelben van megadva az együttható értéke alatt.

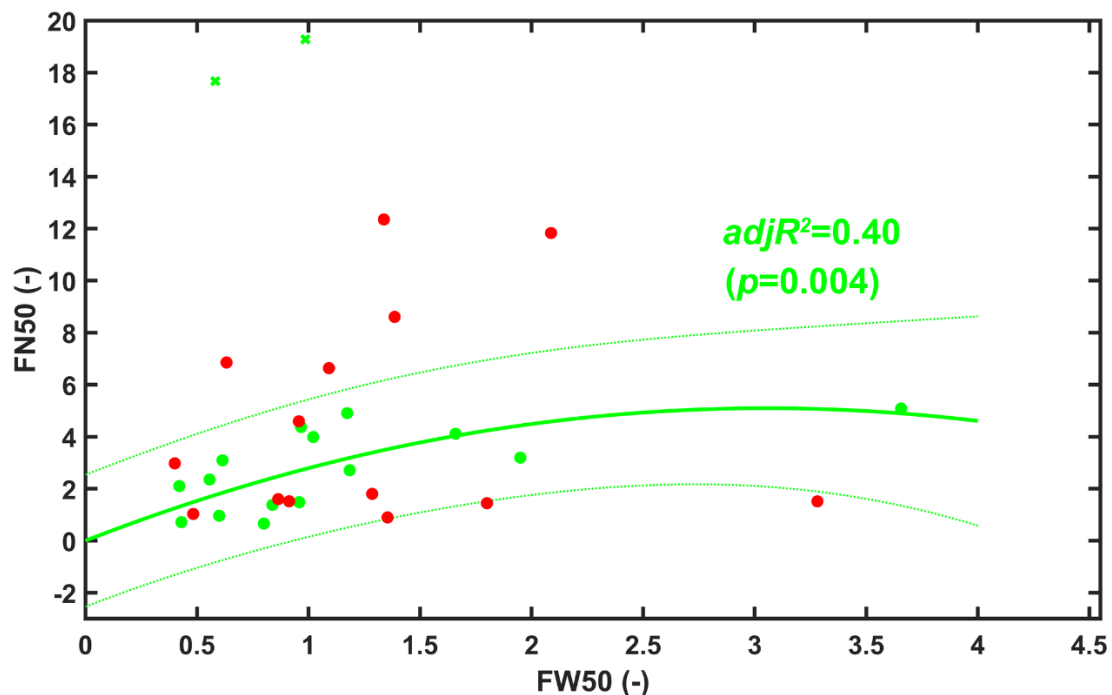
Rövidítések: medián fibrin/von Willebrand faktor arány (FW50); medián fibrin/extracelluláris DNS arány (FN50); koszorúér-betegség (CAD); perifériás artériás betegség (PAD); akut isémiás stroke (AIS); vér fehérvérsejtszáma (FVS); C-reaktív fehérje (CRP); felszíni fehérvérsejtszám a SEM képeken (fFVS%); független változó ( $x$ ); függő változó ( $y$ ); mintanagyság ( $n$ ); korrigált korrelációs együttható ( $R^2_{\text{adj}}$ , adjusted residual sum of squares = adjusted R squared); a varianciaanalízis ( $P_{\text{ANOVA}}$ ) p-értéke. A regressziós modell együtthatóinak ( $A_0, A_1, A_2$ ) és a korrelációs együtthatónak ( $R^2_{\text{adj}}$ ) értékei csak a szignifikáns modelleknél ( $P_{\text{ANOVA}} \leq 0,05$ ) láthatók. Együtthatók számértékének, pl.  $1,5 \cdot 10^{-1}$ .

Főcsoport	Megszorítások	y	x	n	R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>	P <sub>ANOVA</sub>	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
CAD	nincs	FW50	életkor	18	0,43	0,0025	1,5e-1 (-9,2e-1, 6,2e-1)	2,1e-2 (8,8e-3, 3,4e-2)	-
AIS	férfi	FW50	életkor	10	0,66	0,0171	1,65e1 (9,2e-1, 3,2e1)	-5,8e-1 (-1,1e0, -5,3e-2)	5,2e-3 (9,1e-4, 9,5e-3)
CAD+PAD+AIS	nincs	FW50	életkor	54	0,11	0,0120	2,7e-1 (-3,3e-1, 8,6e-1)	1,2e-2 (2,8e-3, 2,2e-2)	-
CAD+ PAD	dyslipidaemia	FN50	FW50	18	0,40	0,0042	-	3,3e0 (2,3e0, 4,4e0)	-5,4e-1 (-9,4e-1, -1,5e-1)
CAD+ PAD	nincs dyslipidaemia	FN50	FW50	18	-	0,2304	-	-	-
AIS	nincs	FN50	FW50	16	0,32	0,0332	2,9e0 (3,7e-1, 5,4e0)	9,2e-1 (9,2e-2, 1,7e0)	-
CAD+ AIS	hypertonia	FW50	FVS	22	0,34	0,0074	1,7e0 (1,3e0, 2,1e0)	-4,5e-2 (-7,6e-2, -1,4e-2)	-
CAD+ AIS	nincs hypertonia	FW50	FVS	12	-	0,3200	-	-	-
CAD	hypertonia	FW50	FVS	11	0,38	0,0261	2,1e0 (1,3e0, 2,9e0)	-6,6e-2 (-1,2e-1, -9,8e-3)	-
PAD	nincs	FW50	FVS	17	-	0,3704	-	-	-
CAD	hypertonia	FW50	fFVS%	11	0,12	0,0061	1,3e0 (1,2e0, 1,4e0)	-4,9e-2 (-8,4e-2, -1,5e-2)	-
CAD	nincs hypertonia	FW50	fFVS%	7	-	0,3404	-	-	-

CAD+ AIS	atherosclerosis	FW50	CRP	25	0,34	0,0092	1,4e0 (1,1e0, 1,7e0)	-7,6e-2 (-1,2e-1, -2,9e-2)	1,2e-3 (4,0e-4, 2,0e-3)
CAD+ AIS	nincs atherosclerosis	FW50	CRP	6	-	0,1104	-	-	-
CAD+ AIS	atherosclerosis	FW50	fibrinogén	19	0,57	0,0025	3,3e0 (2,1e0, 4,4e0)	-1,2e0 (-1,9e0, -6,1e-1)	1,7e-1 (8,8e-2, 2,5e-1)
CAD	nincs	FW50	fibrinogén	14	0,44	0,0212	1,3e-3 (1,9e0, 5,9e0)	e-2 (-2,6e0, -4,5e-1)	7e-3 (6,6e-2, 3,3e-1)
mind	nincs diabetes	FW50	fibrinogén	24	0,52	0,0005	4,2e-6 (3,2e0, 6,3e0)	1,9e-4 (-3e0, -1,1e0)	5e-4 (1,3e-1, 4e-1)
mind	hypertonia	FW50	fibrinogén	18	0,52	0,0015	1,7e-5 (3,1e0, 6,4e0)	5,9e-4 (-3e0, -e0)	1,3e-3 (1,2e-1, 4e-1)
mind	dyslipidaemia	FW50	fibrinogén	12	0,72	0,0049	3,7e-3 (4,9e0)	7,3e-3 (-8,7e0, -1,9e0)	9,4e-3 (2,2e-1, 1,1e0)
mind	dyslipidaemia	FN50	fibrinogén	12	0,87	0,0001	2,5e-3 (2,3e1, 7,5e1)	1,7e-3 (-4,7e1, -1,6e1)	5,9e-4 (3,2e0, 7,8e0)
mind	nincs hypertonia	FN50	fibrinogén	10	0,86	0,0010	6e-4 (7,2e1, 1,6e2)	1,7e-3 (-9,5e1, -3,5e1)	3,4e-3 (4,4e0, 1,4e1)

## 5.2. Az artériás thrombusok vWF- és DNS-tartalmának korrelációja

Az artériás thrombusok FN50 és FW50 értéke között szignifikáns korrelációt figyeltünk meg a dyslipidaemiás CAD és PAD-betegek esetén (9. ábra) [190]. AIS-betegekben a két paraméter között a korreláció fennáll, de kevésbé erős a dyslipidaemia lététől vagy hiányától függetlenül (2. táblázat).



9. ábra A CAD és PAD thrombusok medián fibrin/von Willebrand faktor aránya (FW50) és medián fibrin/extracelluláris DNS aránya (FN50) közötti összefüggés. Zöld: dyslipidaemiás betegek; piros: dyslipidaemia nélküli betegek. Az FW50 és FN50 medián értékét a fibrin-, vWF- és DNS-specifikus immunfluoreszcens festődés relatív területéből határoztuk meg thrombusmetszetek konfokális mikroszkópos felvételein. A dyslipidaemiás betegekre jellemző regressziós görbe (az egyenlet paramétereivel a 2. táblázatában található) 95%-os konfidencia intervallumokkal (szaggatott vonalak). Az x szimbólumok a [196] közleményben leírtak szerint azonosított kiugró értékeket mutatják.

### **5.3. Az artériás thrombusok fibrinszálmérőjének függése a thrombus vWF- és DNS-tartalmától**

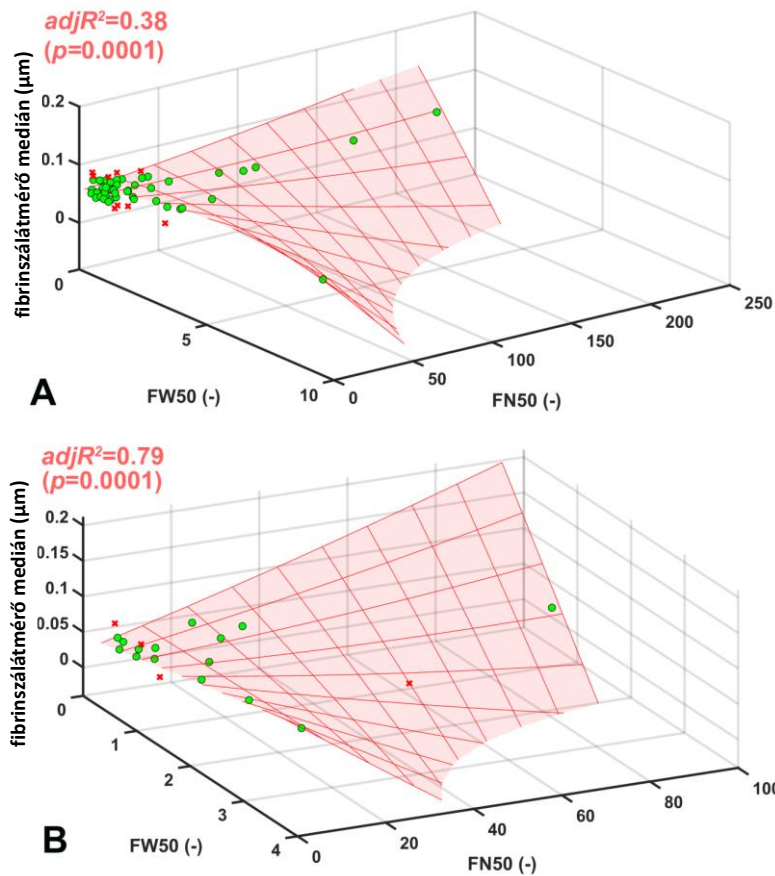
Bár a teljes vizsgált populációban külön-külön nincs szignifikáns hatása a vWF vagy az extracelluláris DNS mennyiségi változásának a fibrinszál átmérőjére, együttes hatásuk már szignifikáns. Minél kisebb az FN50 és FW50 együttesen, annál finomabb szálú fibrin alkotja az alvadékot. Ha mind a vWF, mind a DNS nagyobb mennyiségben van jelen a thrombusban a fibrinhez képest, akkor a fibrinszál átmérője kisebb (10A ábra, 3. táblázat) [190].

Egyes betegcsoportokban az előzőektől eltérő összefüggést detektáltunk. Azokban a PAD és AIS-betegekben, akiket nem kezeltek acetilszalicilsavval vagy clopidogrellel, valamint a nem diabetes vagy nem hypertoniás CAD és PAD-betegekben a FW50 vs. fibrin szálvastagsága grafikon egy minimumot mutató parabola. Vizsgáltuk a nemek közötti esetleges különbséget. Csak a férfiakban volt korreláció a FW50 érték és a fibrinszál vastagsága között, nőkben nem, és az acetilszalicilsavnak csak a férfiakban volt szálvastagító hatása. Nem találtunk korrelációt a CAD-betegek thrombusában a fibrinszál átmérője és a vér CRP- vagy fibrinogéntartalma, tehát a gyulladásos markerek között.

3. táblázat A fibrin/von Willebrand-faktor és a fibrin/extracelluláris DNS arány együttes hatása a fibrinszál átmérőjére.

Az  $y = A_0 + A_{10} * x_1 + A_{01} * x_2 + A_{20} * x_1^2 + A_{11} * x_1 * x_2 + A_{02} * x_2^2 + e$  egyenlet együtthatói három folytonos,  $x_1$ ,  $x_2$  és  $y$  változóból álló regressziós modellre. Rövidítések: medián fibrin/von Willebrand-faktor arány (FW50); medián fibrin/extracelluláris DNS arány (FN50); koszorúér-betegség (CAD); perifériás artériás betegség (PAD); akut isémiás stroke (AIS); C-reaktív protein (CRP); fibrinszál átmérőjének mediánja nm-ben (szál median); független változók ( $x_1$ ,  $x_2$ ); függő változó ( $y$ ); korrigált korrelációs együttható ( $R^2_{adj}$ ); varianciaanalízis p-értéke ( $p_{ANOVA}$ ).

Megszorítások	y	$x_1$	$x_2$	n	$R^2_{adj}$	$P_{ANOVA}$	$A_0$	$A_{10}$	$A_{01}$	$A_{20}$	$A_{11}$	$A_{02}$
nincs	szál median	FW50	FN50	45	0,364	$3 \times 10^{-4}$	$10^{-19}$	$10^{-5}$	0,17	$10^{-3}$	0,03	0,78
PAD	szál median	FW50	FN50	15	0,788	$10^{-4}$	$10^{-7}$	$10^{-5}$	$10^{-3}$	0	$10^{-3}$	0
nincs	FW50	FN50	fibrinogén	24	0,876	$10^{-8}$	$10^{-12}$	$10^{-6}$	$10^{-9}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-7}$
nincs	FW50	FN50	CRP	32	0,196	0,055	$10^{-10}$	0,16	0,01	0,38	0,91	0,1
atherosclerosis	FW50	FN50	CRP	22	0,356	0,012	$10^{-5}$	0,034	0,007	0	0	0,016



10. ábra A medián fibrin/extracelluláris DNS (FN50) és a fibrin/von Willebrand-faktor (FW50) arányának együttes hatása az artériás thrombusok fibrinrost vastagságára mindhárom (CAD, PAD, AIS) betegcsoportban (A) és perifériás artériás betegségben (B). Az FW50 és FN50 medián értékét a fibrin-, vWF- és DNS-specifikus immunfluoreszcens festődés relatív területéből határoztuk meg thrombusmetszetek konfokális mikroszkópos felvételein. A fibrinszál átmérőjét thrombusok pásztázó elektronmikroszkópos felvételein mértük. A regressziós felület a 3. táblázatban található egyenlet alapján, a mérési pontok zöld színnel jelennek meg a kiugró értékeknek, a piros szimbólummal jelzett mérési pontoknak a [196] közlemény szerinti kizárása után.



#### **5.4. A dohányzás hatása a fibrinszál vastagságára és a thrombus von Willebrand-faktor tartalmára**

A vizsgált agyérthrombosisos betegek dohányzási szokásairól nem állt rendelkezésünkre információ. A 19 perifériás artériás thrombosisban szenvedő betegből 15-en dohányoztak. Az összes vizsgált 21 dohányzó betegben a fibrinszál átmérője szignifikánsan kisebb: 0,0658  $\mu\text{m}$  mediánú, mint a 17 nemdohányzóéban: 0,0744  $\mu\text{m}$  mediánú ( $p=0,046$ ).

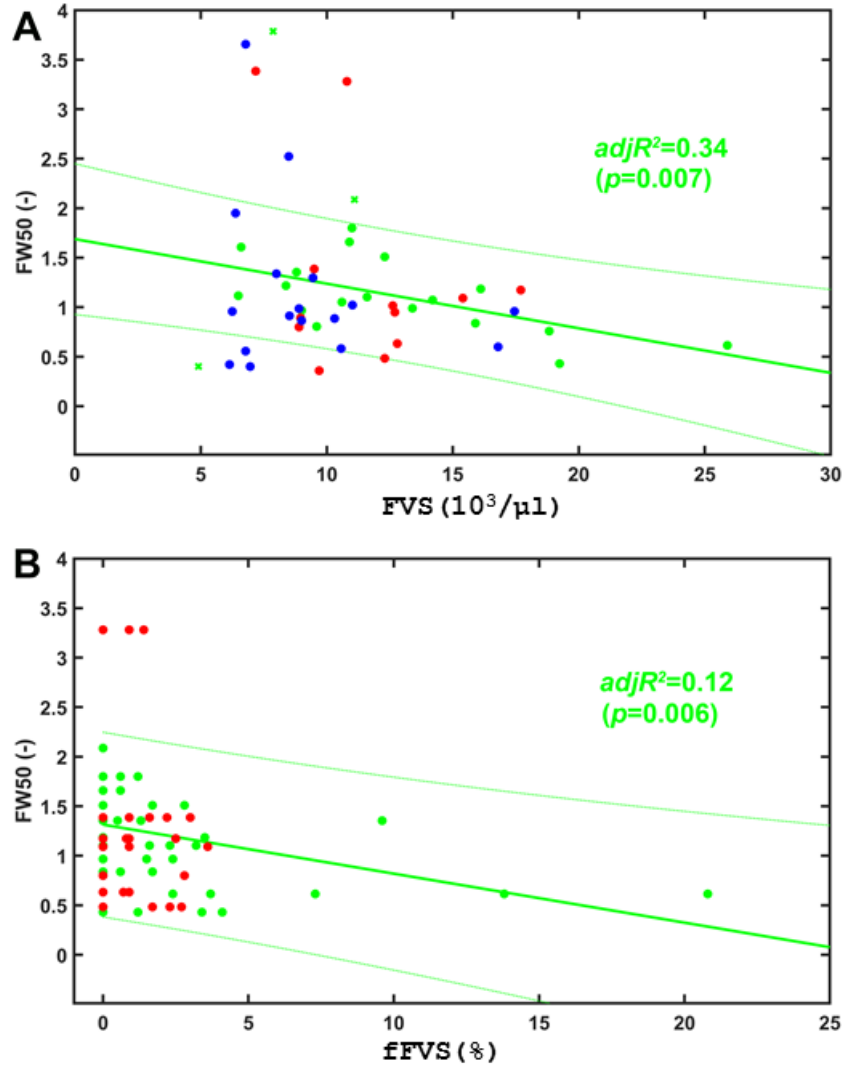
A vWF és extracelluláris DNS együttes jelenléte és a fibrinszál átmérője erős korrelációt mutat a PAD-betegekben:  $\text{adj}R^2=0,79$  és  $p_{\text{ANOVA}}=0,0001$ . Amikor a fibrin/vWF és ugyanakkor a fibrin/DNS arány mediánja kisebb értéket mutat, a fibrin vékonyabb szálú a perifériás artériás thrombusokban (10B ábra, 3. táblázat) [190].

A perifériás artériás thrombosisos betegek vérének vérlemezkeszáma is alacsonyabb a többi betegénél, 14 betegnek  $<210\,000/\mu\text{l}$ , közülük 5-nek kifejezetten alacsony, 150 000-nél kisebb, és köztük az anémia is gyakori. Ezzel szemben a CAD-betegek vérlemezkeszáma 160.000-340.000/ $\mu\text{l}$ , és az összes nemdohányzó között sincs kifejezetten alacsony vérlemezkeszám (betegek adatai).

#### **5.5. A vér, valamint a thrombus fehérvérsejttartalmának és a thrombus vWF-tartalmának korrelációja**

A magas vérnyomással kezelt koszorúér- és agyérthrombosisos betegekben a keringő fehérvérsejtek számának emelkedésével egyenes arányban csökken a thrombus fibrin/vWF arányának mediánja, vagyis egyre több von Willebrand-faktor alkotja az alvadékot a fibrinhez képest. A nem hypertóniás CAD és AIS-betegek, valamint a PAD-betegek vérének fehérvérsejtszám-értékei nem mutatnak korrelációt a thrombus vWF-tartalmával (11A. ábra)[190]. A hypertóniás koszorúér-thrombosisos betegekben a vérben keringő fehérvérsejtek száma és a thrombus vWF-tartalma közötti összefüggés még erősebb: regressziós koefficiens  $-0,066$ ,  $R^2_{\text{adj}} = 0,38$  és  $p = 0,026$ .

A pásztázó elektronmikroszkópos felvételeken a thrombus metszetén látható fehérvérsejtek csak a koszorúér-thrombosisos betegek egy részében vannak 5%-nál nagyobb felületen. A magas vérnyomásban szenvedő CAD és AIS-betegek thrombusmetszetén egyre több fehérvérsejt látható, ha a vWF/Fn arány nő, vagyis az FW50 érték csökken (11B. ábra)[190].

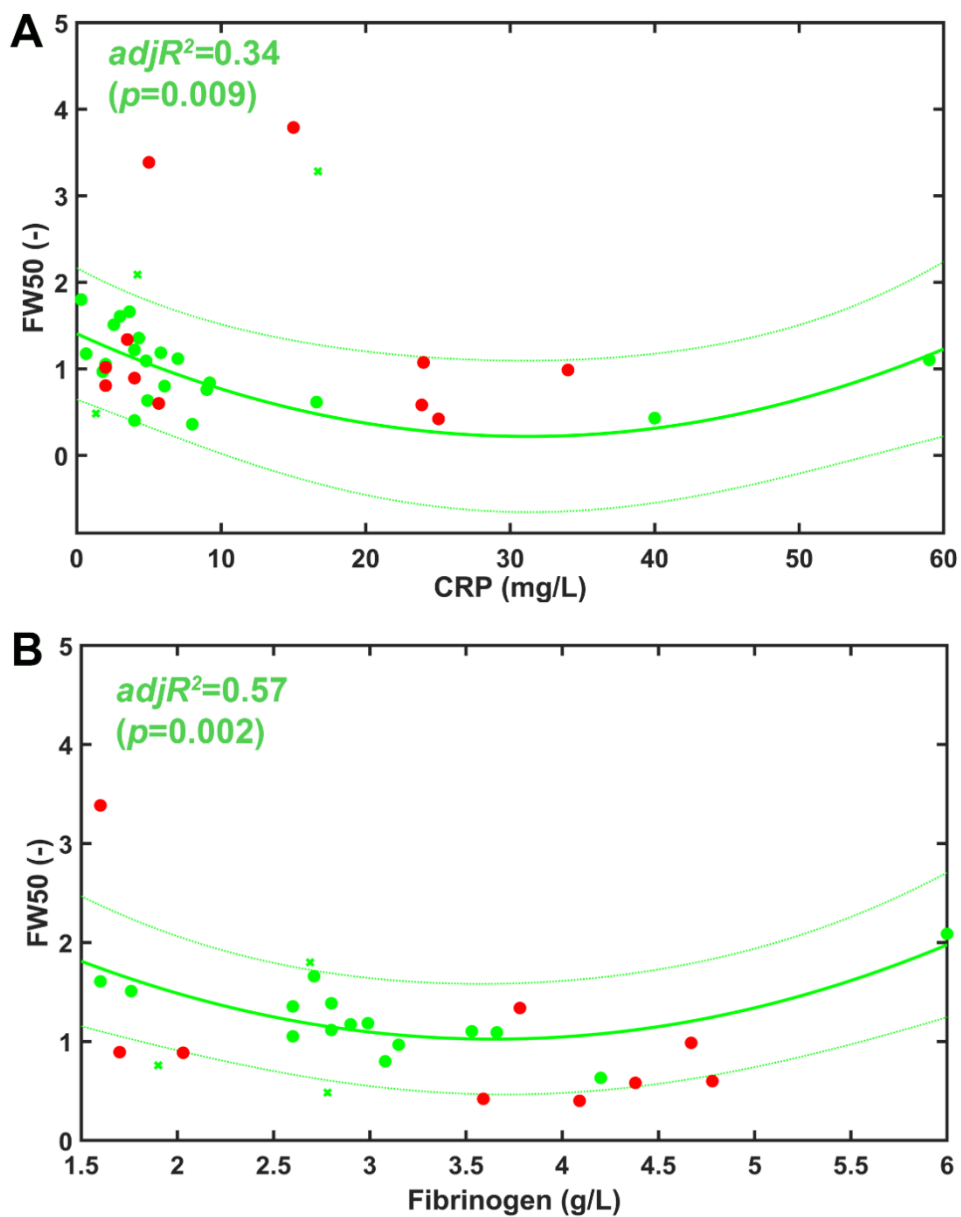


11. ábra Összefüggés az artériás thrombusok medián fibrin/von Willebrand-faktor aránya (FW50) és a keringő fehérvérsejtszám (FVS, A panel) vagy a thrombusrezidens fehérvérsejtek (B panel) között. Az FW50 medián értékét a fibrin- és vWF-specifikus immunfluoreszcens festődés relatív területéből határoztuk meg thrombusmetszetek

konfokális mikroszkópos felvételein. A thrombusrezidens fehérvérsejtek által elfoglalt területet pásztázó elektronmikroszkópos képekből (fFVS) határoztuk meg. A hypertóniás CAD- és AIS-betegek regressziós görbéi zöld színnel (az egyenlet paramétereit a 2. táblázat mutatja be) 95%-os konfidencia intervallumokkal (szaggatott vonalak). Az x szimbólumok a [196] közleményben leírtak szerint azonosított kiugró értékeket mutatnak. Piros szimbólumok: nem hypertóniás CAD és AIS-betegek. Kék szimbólumok: PAD-betegek.

#### **5.6. A vér fibrinogén, valamint C-reaktív protein szintjének összefüggése a thrombus von Willebrand-faktor vagy DNS tartalmával**

Az atherosclerosisban szenvedő koszorúér- és agyérthrombosisos betegek vérében keringő fibrinogénszint, valamint C-reaktív protein koncentrációja korrelál a betegek thrombusának FW50 értékével. A görbe parabola alakú, egy-egy szintig a vér CRP és fibrinogénszintje növekedésével a thrombus fibrin/vWF arány mediánja csökken, aztán nő (12. ábra, 2. táblázat) [190].



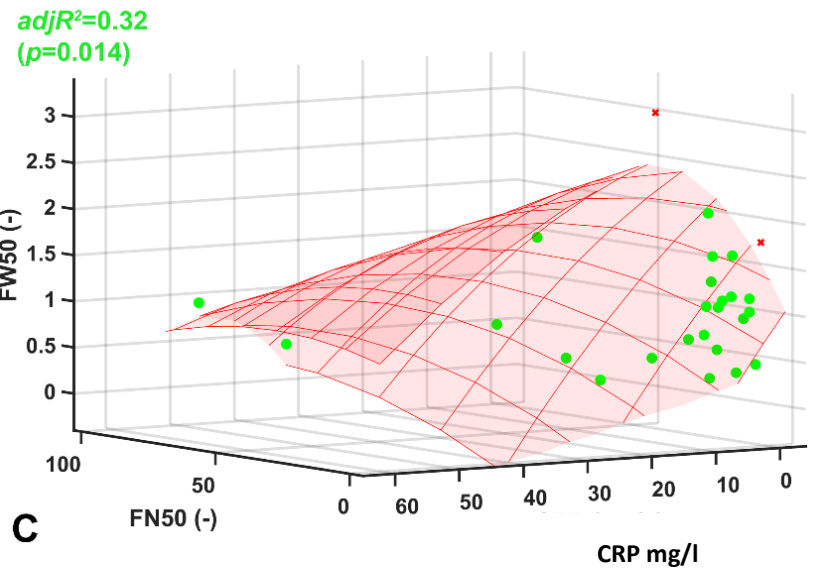
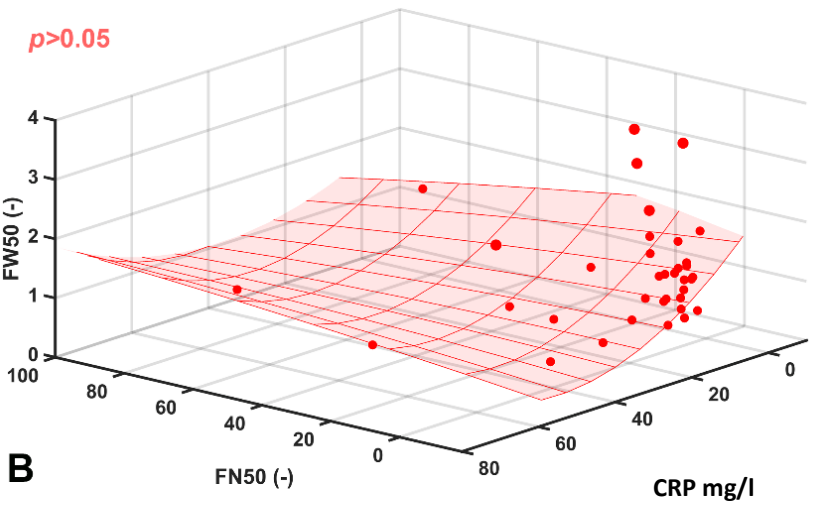
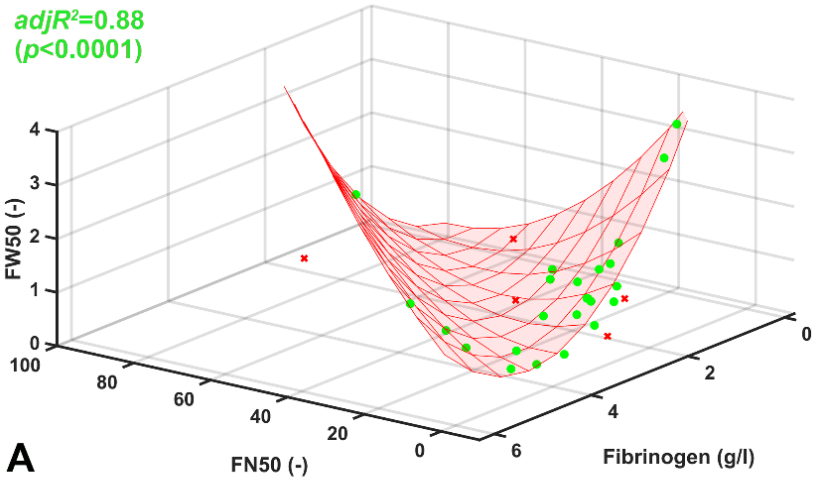
12. ábra Az artériás thrombusok medián fibrin/von Willebrand faktor aránya (FW50) és a gyulladás plazma biomarkerei (C-reaktív protein [CRP] az A panelen és fibrinogén a B panelen) közötti kapcsolat. Az FW50 medián értékét a fibrin- és vWF-specifikus immunfluoreszcens festődés relatív területéből határoztuk meg thrombus metszetek konfokális mikroszkópos felvételein. Az érleszesedésben szenvedő CAD és AIS-betegek regressziós görbéje (az egyenlet paramétereit a 2. táblázat mutatja be) zöld színnel 95%-os konfidencia intervallumokkal (szaggatott vonalak) látható; az x szimbólumok a [196]

közleményben leírtak szerint azonosított kiugró értékeket mutatnak. Piros szimbólumok: CAD- és AIS-betegek az érlelmeszesedés jelei nélkül, valamint minden PAD-beteg.

A vizsgált betegek egyes alcsoportjaiban a vér fibrinogénszintje és az FW50 érték között a 12B. ábrához nagyon hasonló, minimumot mutató parabolikus összefüggés volt kimutatható: az összes CAD-beteg, akik egyébként mind szedtek acetilszalicilsavat és clopidogrelt, az összes beteg közül a nem diabetesesek, a hypertóniások, a dyslipidaemiások (2. táblázat). Mindegyik FW50 vs. fibrinogén görbére jellemző, hogy ha az összefüggést 5 g/l fibrinogénszintig vizsgáljuk, a FW50 csökkenő tendenciát mutat, vagyis bizonyos tartományon belül a vér fibrinogénszintjének növekedésével a thrombus fibrin/vWF arány mediánja csökken.

A thrombus FN50 értéke és a vér fibrinogénszintje kevés esetben mutatott korrelációt: ezek voltak a dyslipidaemiások, hypertóniások (2. táblázat). A görbe minimumot mutató parabola, és az FW50 értékhez hasonlóan 5 g/l fibrinogénszintig csökkenő tendenciájú görbét kapunk, a vér Fg-szintjének növekedésével párhuzamosan a thrombus DNS/fibrin aránya nő, az FN50 érték csökken.

A 13A. ábra azt mutatja, hogyan hat a vér fibrinogénszintjének és a thrombus FN50 értékének változása a thrombus FW50 értékére az összes betegben [190]. Azokban a betegekben, akikben a vér fibrinogénszintje magasabb, a thrombusnak mind a fibrin/ vWF, mind a fibrin /DNS arány mediánja egyszerre csökken, vagyis egyre több DNS és vWF alkotja a thrombust a fibrinhez képest.



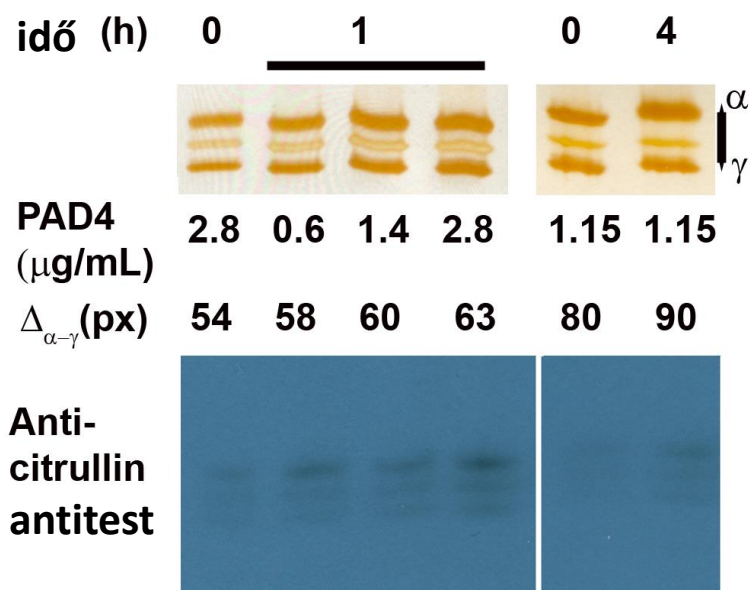
13. ábra A medián fibrin/extracelluláris DNS (FN50) és a vérplazma gyulladáso biomarkereinek (CRP vagy fibrinogén) együttes hatása a fibrin/von Willebrand faktor (FW50) arányára artériás thrombusokban. A medián FW50 és FN50 arányokat a fibrin-, vWF- és DNS-specifikus immunfluoreszcens festődés relatív területéből határoztuk meg thrombusmetszetek konfokális mikroszkópos felvételein. Az A és B panel a három (CAD, PAD, AIS) csoportból származó összes beteg adatait mutatja, míg a C panel az atherosclerosisban szenvedő betegek adatait tartalmazza ugyanabból a csoportból. Az A és C paneleken a regressziós felületen (az egyenlet paraméterekkel a 3. táblázatban látható) a zöld pontok a szignifikáns értékek a kiugró értékek (piros „x” szimbólumok) elutasítása után. A B panelen a regressziós iterációk nem tudtak konvergálni statisztikailag szignifikáns modell együtthatókkal.

A vér CRP-szintje és a FW50 érték között minimumot mutató parabolikus összefüggést találtunk az atheroscleroticus CAD + AIS-betegek esetében (12A. ábra). Önállóan a PAD-betegekben nem találtuk szignifikánsnak sem a FW50 vs. fibrinogén, sem a FW50 vs. CRP összefüggést, annak ellenére, hogy mind az emelkedett vér fibrinogénszint, mind az emelkedett vér C-reaktív proteinszint a perifériás artériás thrombosisban szenvedőkre volt jellemzőbb a másik két betegcsoporthoz képest. Viszont ha minden betegben együttesen vizsgáltuk a vér CRP, a thrombus FN50 és FW50 értékét, akkor az atheroscleroticus betegekben találtunk korrelációt, minél magasabb a vér CRP-szintje, annál kisebb a thrombus fibrin/DNS és fibrin/vWF arány mediánja (13C. ábra). A teljes vizsgált beteganyagban, az atherosclerosis korlátozást nem alkalmazva az adatok statisztikailag nem szignifikánsak, de a görbe mégis jól szemlélteti az előzőleg vázolt tendenciát (13B. ábra).

### **5.7. Citrullinált fibrinogénből képződő alvadék szerkezete**

A fibrinogén citrullinációját SDS PAGE vizsgálattal igazoltuk. A fibrinogén citrullinált  $\alpha$ -láncának mobilitása a citrullináció fokával arányosan egyre inkább eltér a nem citrullinált 0 perces, Cl-amidin gátlószert tartalmazó kontroll mobilitásától. A fibrinogén citrullinált  $\alpha$ -

láncának nem citrullinált  $\gamma$ -láncához képest relatív eltolódását pixelben adjuk meg [133] (14. ábra).



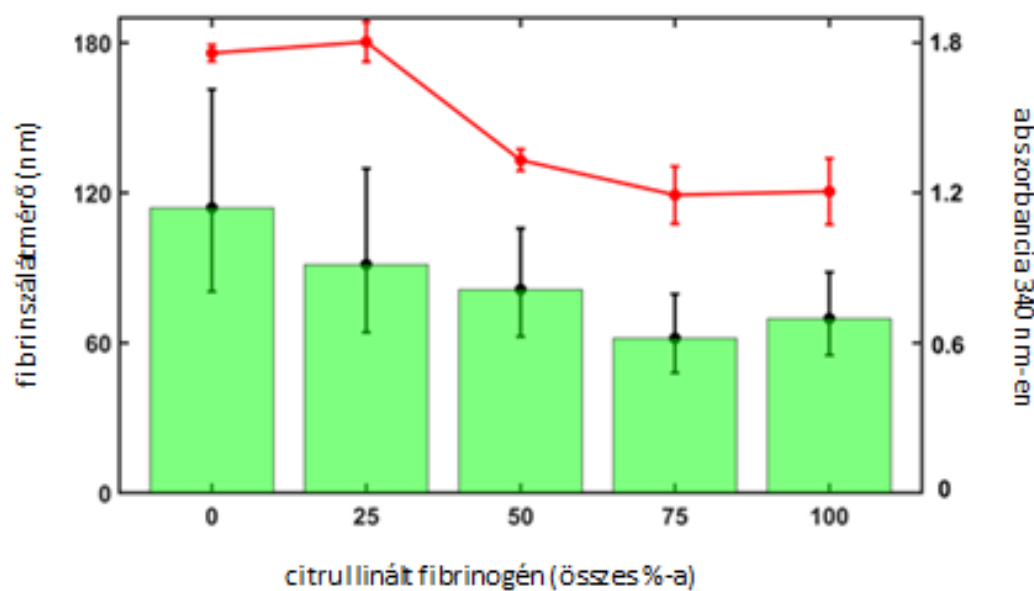
14. ábra A fibrinogén citrullinációja mértékének értékelése a fibrinogén  $\alpha$ -lánc elektroforetikus mobilitása alapján. 8  $\mu\text{M}$  fibrinogént inkubáltunk PAD4-gyel a megadott koncentrációkban 1 vagy 4 órán keresztül 37 °C-on. A citrullinációt 60  $\mu\text{g/ml}$  PAD4-inhibitor Cl-amidin hozzáadásával állítottuk le a jelzett időpontokban. A fibrinogén mintákat redukáló körülmények között SDS elektroforézisnek vetettük alá 4-15%-os poliakrilamid gélen, és ezüstfestéssel festettük. A citrullináció hatékonyságát az  $\alpha$ -lánc  $\gamma$ -láncához viszonyított relatív eltolódása alapján értékeltük ( $\Delta_{\alpha-\gamma}$  pixelben). A minták, amelyekhez a PAD4 hozzáadása előtt Cl-amidint adtunk ( $t=0$ ), kontroll, nem citrullinált fibrinogénként használtuk.

A fiziológias véralvadék és a thrombus szerkezetét, keletkezésének és oldódásának tulajdonságait nagy mértékben megváltoztatja a fibrin(ogén) poszttranszlációs módosulása, többek között a citrullinációja, ami a NETosis során felszabadult PAD enzimek



működésének következménye. Szükségesnek láttuk megvizsgálni, hogy a fehérjében levő arginin oldalláncainak töltésvesztése milyen következményekkel jár in vitro kísérletekben, vagyis a betegekből származó thrombusokhoz képes jóval definiáltabb, egyszerűbb körülmények között.

A pásztázó elektronmikroszkópos felvételeken a fibrinszálak átmérőjét határoztuk meg. A citrullinált (cFg) és nem citrullinált fibrinogén (Fg) összekeverésével történő alvasztáskor a cFg mennyiségének emelkedésével a fibrin szálátmérője csökken a 75% cFg: 25% Fg arányú keverékig (15. ábra) [198]. A teljesen citrullinált fibrinogénben további csökkenés nem tapasztalható. A kontroll kísérletben klóramidin nonspecifikus PAD-inhibitor került hozzáadásra a PAD4 enzim hozzáadása előtt, ami teljesen gátolta az enzim működését. A kontroll a 0% cFg tartalmú rendszerrel azonos eredményt adott.



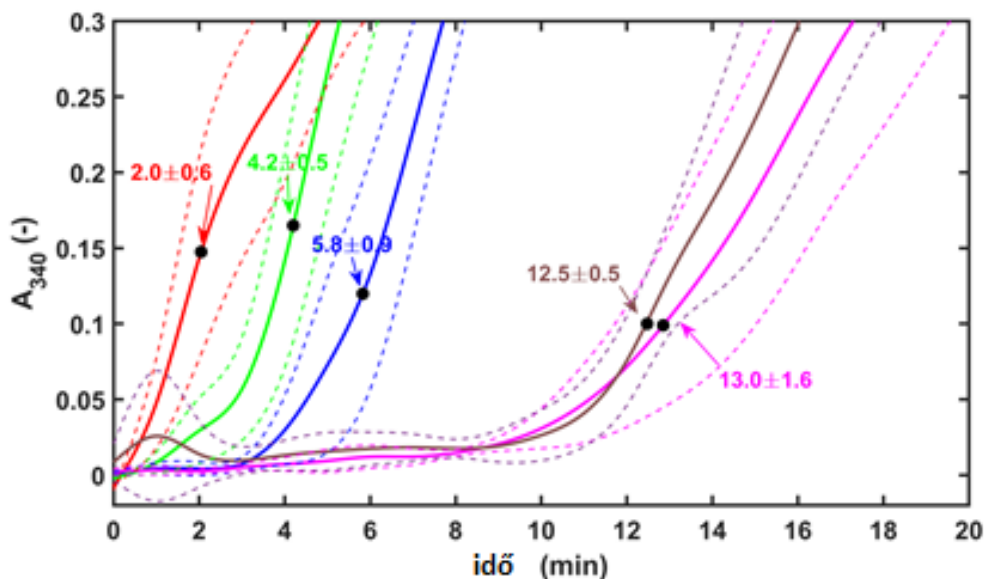
15. ábra Fibrinszálak átmérője (bal oldali ordináta) citrullinált és nem citrullinált fibrinogén keverékéből trombin hozzáadásával készült alvadék pásztázó

elektronmikroszkópos felvételein, valamint ugyanezen alvadék képződésekor az abszorbancia maximuma a turbidimetriás mérés során (jobb oldali ordináta). A fibrinogén citrullinációja PAD4 (peptidil-arginil-dezimináz-4) enzim hozzáadásával, a kontroll fibrinogén készítése enzim nélkül 4 óra 37°C-on történő inkubációval történt. A nem citrullinált és citrullinált fibrinogént összekevertük és 0,68 U/ml trombin hozzáadásával alvasztottuk. A keverékek citrullinált fibrinogén térfogatszázalékos tartalma a vízszintes tengelyen van ábrázolva. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek készültek. A zöld oszlopok magassága a fibrinszálak medián átmérőjét mutatja nm-ben, a hibavonalak az interkvartilis tartományt jelzik. A turbidimetriás mérés során az abszorbanciát 340 nm-en követtük teljes alvadásig. A piros vonal az abszorbanciák maximuma 5 párhuzamos mérésben (átlag±SD).

### **5.8. Citrullináció hatása a fibrinogén alvadási kinetikájára**

A fibrinogén és citrullinált fibrinogén keverékek trombinnal indított alvasztása során a maximális abszorbanciaértékek (15. ábra) jól követik a SEM képen látható fibrinszálvastagságot [198]. A finomabb fibrinszálakból álló fibrin abszorbanciája kisebb a vastagabbakénál.

A fibrinogén/citrullinált fibrinogén arány jelentősen befolyásolja az alvadás időlefordulását (16. ábra). Ha a citrullinált fibrinogén aránya 75%-ig emelkedik, az alvadás egyre később indul, de efelett az alvadási idő nem változik.



16. ábra A citrullináció hatása a fibrinogén alvadékonyságára. Fibrinogént ( $8 \mu\text{M}$ ) 1,15  $\mu\text{g/ml}$  PAD4-gyel inkubáltunk 4 órán át. A keletkezett citrullinált fibrinogént növekvő, 0, 25, 50, 75 és 100% arányban adtuk a nem citrullinált fibrinogénhez, és a  $4 \mu\text{M}$  összkoncentrációjú keveréket  $7,5 \text{ nM}$  trombinnal  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on alvasztottuk. A véralvadás előrehaladását mikrotiterlemezekon követtük az abszorbancia mérésével  $340 \text{ nm}$ -en. A görbék 5 minta átlagát (folyamatos vonalak)  $\pm$  szórását (szaggatott vonalak) mutatják be piros (0 % cFg), zöld (25 % cFg), kék (50 % cFg), barna (75 % cFg) és lila színben (100 % cFg). A számok azt az időt (átlag  $\pm$  szórás) mutatják, amíg a teljes alvadásnál eléri a maximális abszorbancia 10%-át, ami a fibrinogén alvadékonyságának változását jelzi a citrullináció változó fokával összefüggésben.

## 6. Megbeszélés

### 6.1. Az artériás thrombusok von Willebrand-faktor vagy extracelluláris DNS tartalmának függése a beteg életkorától

A vWF vérszintje függ a beteg életkorától, vércsoportjától, attól, hogy van-e gyulladás a szervezetében, van-e mutáció a vWF fehérje génjében és az milyen következményekkel jár [61], rendben megtörténhet-e a Weibel-Palade-testecskek exocitózisa [55, 199], illetőleg a vWF-t hasító ADAMTS13 metalloproteáz működése megfelelő-e [57].

A vWF gyulladáshoz köthető, a Weibel-Palade-testekből több ürül helyi gyulladás esetén [74, 75, 200-202]. Az általunk vizsgált artériás thrombusok olyan idős emberekből származtak, akik nem szenvedtek vérzékenységben, a vWF exocitózisának zavarára nem utalt semmi, nem szenvedtek TTP-ben.

Ismert, hogy az életkor előrehaladtával a vWF vérszintje nő. Mindezek ellenére azt tapasztaltuk az immunhisztokémiás kimutatás során, hogy az életkor előrehaladtával a thrombusban levő vWF mennyisége a fibrinhez viszonyítva csökkent (8. ábra). Eredményeinket a következőképpen magyarázzuk. A vWF-nak a vérlemezkéhez való kötődéséhez szükséges szerkezeti változás két lépcsőben történik [203]. Amikor a molekulára alacsony nyíróerő hat, rendezetlen gomolyag szerkezetű, melyben az A1-domének rejtve vannak, és a molekula bukfencezve gördül tova a vérben. Amikor a vWF nem lamináris áramlású érterületre ér: bifurkációhoz, az érszakasz kontrakciójának és relaxációjának átmenetéhez, atheroscleroticus plakkhoz, a bukfencezés helyett többé-kevésbé szállá nyúlik, az A1-domén felszínre kerül [66]. Ahhoz, hogy az A1-domén a térszerkezetét megváltoztassa és képes legyen a vérlemezke GpIb alegységéhez kötődni, egy másik doménnel létrejött H-hidaknak meg kell szűnnie. Ha a multimer legalább egy ponton kötődik az endothelhez, kollagénhez, kitapadt vérlemezkéhez, akkor minél hosszabb a multimer, annál nagyobb feszülés lesz a kötődési pont és a molekula eleje között, ami felszakítja a H-hidakat, létrejöhet a vWF és a vérlemezke közötti kötés [203]. Bár nem állnak rendelkezésünkre laboratóriumi adatok a vWF és ADAMTS13 vérszintjére vonatkozóan, de

feltételezzük, hogy az irodalmi adatoknak megfelelően minél idősebb volt a betegünk, annál magasabb volt a vWF vérszintje és aktivitása, viszont annál alacsonyabb a metalloproteázé. Az ADAMTS13 metalloproteázának a NETosis során felszabaduló PAD4 enzim általi citrullinációja és funkcióvesztése az életkor előrehaladtával fokozódik. Feltételezzük, hogy a vWF hasítatlan és hosszabb maradt, ezért kisebb mennyiség is elegendő volt a thrombusképzéshez [77].

A koszorúér, agyér és perifériás artéria eredetű thrombusok között nem találtunk különbséget a vWF tartalomban. Ezek szerint nem a keletkezés helye a meghatározó, hanem feltehetőleg a keletkezés körülményei, a társbetegségek. A thrombosis tüneteinek megjelenése és a thrombus műtéti eltávolítása között különböző idő telt el attól függően, hogy hol keletkezett a vérrög. A koszorúérből átlagosan 3 óra elteltével, a perifériás artériából átlag 24 óra múlva, az agyi érből pedig átlag 5,3 óra elteltével távolították el a thrombust. Valószínűleg a thrombus szerkezetét befolyásolta ez az idő is, de nem tudjuk, hogy a thrombus a tünetek megjelenése előtt mennyi idővel kezdett növekedésnek indulni. Agyi eret szívből származó, onnan leszakadó thrombus zárt el az esetek mintegy felében, de nem kizárható egyes esetekben a perifériás artériákból való eredet sem.

DNS többféleképpen kerülhet a vérbe és a thrombusba. Az egyik lehetőség a sejtek necrosissal történő pusztulása, ami előfordul pl. az atheroscleroticus plakkok egyes területein is. A másik lehetőség, hogy a neutrofil, eozinofil és bazofil granulociták, makrofágok és hízósejtek kibocsátják a DNS-tartalmukat a karioplazma és citoplazma fehérjéivel együtt, és extracelluláris csapdát hoznak létre. A NETosis folyamatát sokkal intenzívebbnek találták a friss thrombusokban, mint a többi immunsejt hasonló folyamatát, aztán a thrombus öregedésével egyre intenzívebbé válik a makrofág extracelluláris csapda (MET) képződése [120]. Mivel a munkacsoportunk korábban extracelluláris DNS-t és citrullinált hisztonfehérjéket mutatott ki immunhisztokémiai módszerekkel artériás thrombusokban, mely minták azonosak voltak az általam vizsgáltakkal [115], feltételezzük, hogy az általam kimutatott extracelluláris DNS NET-ből vagy MET-ből származik annak ellenére, hogy a forrásként szolgáló sejtípust nem vizsgáltam, mert irodalmi adatok szerint az eozinofil és mastocytá extracelluláris csapda mennyisége elhanyagolható [120]. Korábbi és mostani méréseink szerint is kb. 50 év fölött az életkor előrehaladtával az artériás thrombus DNS-

tartalma csökken a fibrinhez viszonyítva. Feltételezhető, hogy a trombociták már részben aktivált állapotba kerültek, az alvadék könnyebben képződött, hiszen betegeink között volt diabeteses, hypercholesterolaemiás, érszűkületben szenvedő, a trombociták pedig egymást is aktiválhatták CD40L segítségével [5]. Mivel a betegek többsége több társbetegségben is szenvedett, egyre több tényező együttesen okozta a thrombus megjelenését, növekedését. Önmagában az extracelluláris DNS-nek az életkor előrehaladtával csökkent a szerepe, de nem szűnt meg.

A vWF-hoz hasonlóan a DNS-tartalomban sem tudtunk különbséget kimutatni attól függően, hogy a thrombus koszorúérből, agyi vagy perifériás artériából származott.

## **6.2. Az artériás thrombus DNS- és von Willebrand-faktor tartalmának korrelációja**

Vizsgáltuk, vannak-e olyan rizikófaktorok, amelyek miatt a thrombus DNS- és vWF tartalma egyszerre változik, függ egymástól. A CAD és PAD-betegek közül azoknak változott szignifikánsan egyszerre a FN50 és FW50 értéke, akik dyslipidaemiásak, de azoké nem, akiknek normális a plazma lipidprofiljuk (9. ábra). A vizsgálatba vont CAD-betegek mindegyike atheroscleroticus és 44%-a dyslipidaemiás, a PAD-betegek 83 %-a atheroscleroticus és 56%-a dyslipidaemiás, míg az AIS-betegeknél ezek a számok 57%, ill. 38%. Úgy tűnik, hogy az olyan artériás thrombosisban, amelyben oki tényező a vér kóros lipidprofilja miatt kialakuló érelmeszesedés, nagyobb szerepe van a vWF helyi szintje/aktivációja és a NETosis között leírt összefüggésnek: a vWF képes NETosist provokálni, ugyanakkor a NET-komponensek a Weibel-Palade-testek exocitózisát, ezzel a vWF felszabadulását okozzák, valamint mind a vWF, mind a NET komponensei képesek aktiválni a vérlemezkéket, vérfalendothelsejteket, neutrofil granulocitákat, és beindítani a véralvadás folyamatát, emellett akadályozni a fibrinolízist [32, 62, 64, 204, 205].

Amikor a fibroatheromatosus, lipidlerakódásokkal teli plakokban fokozódik a gyulladás, a plakk sérülékennyé válik. Proinflammatorikus hatásúak a bakteriális és virális fertőzések, az oxLDL magas szintje miatti további lipidlerakódás, a plakk nekrotikus részéből felszabaduló HMGB1, a neutrofil granulocitákból származó S100A12 endogén AGE

(fokozottan glikált végtermék) [206]. A makrofágokból és neutrofil granulocitákból (a NETosis során is) felszabaduló mátrix metalloproteázok és egyéb enzimek bontják az extracelluláris mátrixot. A gyulladáshoz citokinek hatására kevesebb kollagén keletkezik. A NETosis során felszabaduló hisztonok toxikusak a simaizomszövetek számára. Mindezek következményeként a plakk sapkája vékonyodik, könnyen bekövetkezik a szakadása. A plakkban a sejtek aktivált állapotban vannak, felszínükön TF jelenik meg, a vWF aktív konformációjává nyúlik és kötődik sok-sok sejthez és molekulához, a beáramló vér gyorsan megalvad.

### **6.3. Az artériás thrombusok fibrinszálmérőjének függése a thrombus vWF- és DNS-tartalmától**

Amikor a thrombus DNS- és vWF-tartalma is nő a fibrinhez képest, a fibrinszál átmérője kisebb (10.A és B ábra). A finomabb szálú fibrinnek a mechanikai és kémiai stabilitása is nagyobb in vitro kísérletek szerint [178]. A magas trombin- és fibrinogénszint, a vérlemezkék és vörösvértestek közelsége vékonyítja a fibrinszálakat. Ugyan in vitro kísérletekben a NET-komponens DNS-nek és hisztonfehérjéknek fibrinszálvastagító hatása van, mégis lassítják a fibrinolízist, mert kötődnek a fibrindegradációs termékhez a plazmin és tPA helyett, valamint gátolják a trombin inaktivációját [116, 123]. A betegekben a spontán meginduló fibrinolízis elégtelen volt, az érelzáródás bekövetkezett, a thrombust műtéttel távolították el. Feltételezhető, hogy ebben szerepe volt annak, hogy ezekben az alvadékokban mind a vWF, mind a DNS, ezért a NET többi alkotórésze is jelentős mennyiségben jelen volt és akadályozta a tPA penetrációját a thrombusba. Betegeinkben olyan prothrombotikus rizikófaktorok működtek, melyek felülírták a NET-komponensek in vitro tapasztalható fibrinszálvastagító hatását. A vWF aktiválja a NETosist, a NET-komponensek elősegítik a vWF felszabadulását az endothelből, a NET komponensei a vWF-ral együtt aktiválják a vérlemezkéket és segítik a thrombus képződését [32, 62, 64, 204, 205].

Mindegyik koszorúér-thrombosisos beteget a műtét előtt kezelték acetilszalicilsavval és clopidogrellel. Ismert, hogy az acetilszalicilsavnak van a ciklooxygenázgátló, ezért a

vérlemezkében tromboxánszintézist gátló hatásán kívül másik hatása is, miszerint acetilálja a fibrint, ezáltal vastagabb fibrinszál képződését okozza [207]. A fibrinszál vastagságára vonatkozó méréseink eredményét tehát nem csak a thrombusképződés helye, hanem a farmakológiai kezelés is befolyásolta. Ezen kívül éppen az acetilszalicilsav-kezeléssel kapcsolatban nemi különbségekre is fényt derítettek: csak a férfiakban vastagítja a fibrinszálat, a nőkben nem [115, 208]. A férfiak és nők között különbség van a vérlemezke reaktivitásában, egyes véralvadásgátló gyógyszerek, köztük az acetilszalicilsav hatásosságában [209]. Méréseink szerint a CRP-szint nem korrelál a szálátmérővel, talán épp az acetilszalicilsav adása miatt. Irodalmi adatok szerint cukorbetegekben és/vagy hypercholesterolaemiásokban az acetilszalicilsavval való kezelés ellenére is csökkent a szuperoxid-dizmutáz aktivitás és reaktívabbak a vérlemezkék [210].

#### **6.4. A dohányzás hatása a fibrinszál vastagságára és a thrombus von Willebrand-faktor tartalmára**

A FW50 és FN50 együttes hatása jelentős mértékben (79%-ban) magyarázza a perifériás artériás thrombusok fibrinszálátmérőjének alakulását (10B. ábra). Ha mind a vWF, mind a NET komponensek, köztük a DNS, nagy mennyiségben vannak jelen a thrombusban, akkor vékonyabb a fibrinszál. Az általunk vizsgált 19 PAD-betegből 15 dohányos volt, így a dohányzás is állhat e jelenség hátterében. Az összes vizsgált dohányos fibrinszála átlagosan vékonyabbak a nemdohányzókéénál. Ismert, hogy a plazmaalvadék permeabilitása dohányosokban kisebb, mint a nemdohányzókéban in vitro eredmények szerint [12]. A vékony tömör fibrinhálót nehezebb feloldani [211], ami fennállhat a vizsgált dohányos betegek esetében, hiszen fibrinhálójuk tömör, vékonyszálú.

A dohányzásnak hatása van a betegek vérlemezkeszámára is. Irodalmi adatok szerint mind a vérlemezkeszám, mind a vérlemezke adhezív képessége emelkedett dohányos emberekben [212]. Az általunk vizsgált dohányzó betegeknek, akiknek a perifériás vagy agyi artériájában keletkezett thrombus, a vérlemezkeszáma gyakran abnormálisan alacsony vagy a határérték alsó tartományában volt, ami összefüggésbe hozható a trombotikus eseményhez



kötődő vérlemezke felhasználással. A betegekben az előzetesen részlegesen aktivált, de akár a normálisnál kevesebb vérlemezke részt tudott venni a thrombusképzésben. Ugyanezen betegek thrombusában a FW50 érték alacsony, a thrombus jelentős mennyiségű vWF-t tartalmazott a fibrinhez képest. A PAD-betegek között gyakori volt az anémia is. A koszorúér-betegek közül csak 38% dohányzott, a vérlemezkeszámuk viszont minden esetben normális volt, a thrombus FW50 értéke pedig magasabb a többi betegénél.

### **6.5. A vér, valamint a thrombus fehérvérsejt-tartalmának és a thrombus vWF-tartalmának korrelációja**

Az általunk vizsgáltak közül leukocitózisa volt 14 CAD, 7 AIS és 5 PAD-betegnek. Szignifikáns összefüggést a hypertóniás koszorúér- és agyérthrombotikus betegek FW50 értéke és a vérük fehérvérsejtszáma között tudtunk megállapítani (11A ábra). Minél nagyobb, sok beteg vérében patológiásan magas a fehérvérsejtszám, annál nagyobb a thrombus vWF tartalma a fibrinhez viszonyítva. A hypertóniás betegek szívében, atheroscleroticus plakkjaiban helyileg is keletkezhetett angiotenzin-2, pl. a neutrofil granulocitákból felszabaduló katepszin-G hatására [160]. Ennek a vérnyomásemelő hormonnak a magas szintje, valamint a NETosis is fokozza a ROS helyi mennyiségét, ami a Weibel-Palade-testecskék szekrécióját, a vWF felszabadulását serkenti [161, 162]. A nagy nyíróerő a hypertóniás betegek vékony artériáinak atheroscleroticus plakkjainál lehetővé teszi a vWF konformációváltozását, ennek következtében kötődését vérfehérjékhez, vérsejtekhez [66]. A nem hypertóniás CAD + AIS, valamint az összes PAD-beteg esetén sem a fehérvérsejtszám, sem a FW50 értékek nem mutattak konzekvens eltéréseket, egyéb rizikófaktoroknak meghatározóbb szerepe volt az alvadék képződésében.

A SEM felvételeken az alvadékban látható fehérvérsejtek száma és a hypertóniás CAD + AIS-betegek FW50 értéke közötti korreláció nem olyan erős, bár az összefüggés a vér fehérvérsejtszámához hasonló: minél több leukocita kerül bele a thrombusba, annál nagyobb a vWF/fibrin arány a véralvadékban (11B ábra). Feltételezzük, hogy a leukocitáknak nagyobb szerepe van a thrombus képződésének kezdetén a trombogén felszín és az áramló

vér érintkezésénél, főképp hiperdinámiás körülmények között a kis átmérőjű agyi és koszorúerekben, mint az alvadék öregeedésének későbbi szakaszában, amikor a fehérvérsejtek elhalhatnak, tehát már nem azonosíthatók a SEM felvételeken. Irodalmi adatok szerint a NET-marker MPO, PAD4 és cH3, ebből következően a neutrofil granulociták a friss és litikus coronaria thrombusokban mutathatók ki nagy mennyiségben, az idősebb szervült thrombusokban alig [118]. Viszont az eltávolított plakkok vizsgálata alapján minél nagyobb a NET-markerek mennyisége a plakkon belül, annál jobban lehet számítani trombotikus komplikációkra, mert a felszabadult proteázok destabilizálják a plakkot, valamint a NET komponensei elősegítik a véralvadék képződését [121].

#### **6.6. A vér fibrinogén, valamint C-reaktív protein szintjének összefüggése a thrombus von Willebrand-faktor vagy DNS tartalmával**

Az általunk vizsgált betegek közül a vérben patológiásan magas fibrinogénszint (Fg) 4 PAD, 2 CAD és 1 AIS-betegben fordult elő, a többi betegben jellemzően referencia-tartományban volt, míg az AIS-betegek 1/4-ében patológiásan alacsony. A vér CRP-szintje 4 PAD, 4 AIS és 3 CAD-betegben volt magasabb a normálisnál. Az átlagos Fg- és CRP-szint is a PAD-betegcsoportban volt a legmagasabb (1. táblázat). Több betegcsoport FW50 vagy FN50 értékének függése a vér fibrinogén- vagy CRP-szintjétől egy minimumot mutató parabola alakú görbével írható le (12. ábra). Ilyen a FW50 értékének függése a vér CRP-, ill. fibrinogénszintjétől az atheroscleroticus koszorúér- és agyérthrombosisos betegek, a hypertóniások, dyslipidaemiások, nem diabetesesek, az összes CAD-beteg, a dohányzó PAD-betegek, valamint a dyslipidaemiások vagy hypertóniások esetében, tehát betegeinkben ez egy általános tendencia. A Fg és CRP vérszintjének növekedése együtt jár a thrombus vWF és/vagy DNS-szintjének emelkedésével. A betegeinkben mért legmagasabb CRP- és Fg-szint esetén a thrombus fibrin/vWF és/vagy fibrin/DNS aránya újra nő, de csak 1-1 ilyen adatunk van, ezért ezt nem gondolom bizonyítottnak.

Ha azt nézzük, hogy a Fg és FN50 értéknek együttesen milyen hatása van az összes betegben a thrombus FW50 értékére, akkor a mérési pontok aszimmetrikus völgy alakú

felszínen helyezkednek el, a magasabb Fg-szintek együtt fordulnak elő a magas thrombus DNS/fibrin [115] és vWF/fibrin aránnyal (az FW50 és FN50 értékek reciprokával) (13A ábra). Az összes beteg halmazában a CRP és FN50 együttes hatása a FW50 értékre nem éri el a statisztikai szignifikancia szintjét (13B ábra), de szignifikánsná válik, ha az atheroscleroticus betegekre szűkítjük a kört (13C ábra). Bár mind a CRP, mind a fibrinogén a májban keletkező szisztémás gyulladási marker, sőt gyulladási állapotban szintézisük legfőbb serkentője is azonos, a vér IL-6 szintjének emelkedése, de az egyéb szekréciót növelő szignálok különböznek [166, 174]. Ennek következtében nem minden betegben emelkedik mindkét fehérjének a vérszintje patológiásan magas értékre. A fibrinogén nem csak az alvadék fő hálóképző fehérjéje, hanem koncentrációjának emelkedése növeli a vér viszkozitását, valamint ha nagyobb mennyiségben van jelen szubsztrátként, a trombin hamarabb megtalálja és hasítja [175]. A CRP serkenti az alvadék képződését, aktivált pentamer formája leukocitákat vonz és aktivál, tehát NETosist is okoz, monomer formája pedig érendothelt és vérlemezkét aktivál, miáltal serkenti a Weibel-Palade-testek felszabadulását, valamint a trombociták adhézióját és aggregációját [170, 171].

Itt jegyzem meg, hogy a vastag perifériás artériák elzáródását eredményező hatalmas thrombusok létrejöttéhez kell a legtöbb rizikótényezőnek egyszerre jelen lennie a betegben: majdnem mindegyik dohányzott és atheroscleroticus, többeknél dyslipidaemia jelentkezett, a betegek fele anémiás és 20 %-uk cukorbeteg. Több PAD-betegnek legalább két szisztémás inflammatorikus markere magas, de gyakran a fehérvérsejtszám, CRP és fibrinogén is, míg a másik két betegcsoportban jellemzően csak az egyik gyulladási marker vérszintje emelkedett (1. tábl. és 5. ábra).

A gyűjtött kísérleti adatok prognosztikai célú alkalmazása új analitikai eszközöket igényel, pl. másfajta módon, úgynevezett gépi tanulási módszerekkel történő elemzéssel [213]. A 17. ábrán egy ilyen módszer eredményeit láthatjuk. Az alkalmazott gépi tanulási módszer, a 'döntési fa' segítségével bizonyos bemeneti adatokból meg kívántuk jósolni, hogy az adott vérrög milyen típusú patológiás esetből származik: infarktus, stroke vagy perifériás thrombus. A gépi vizsgálat értelme az, hogy ha a vérképből és/vagy vérrög adatokból ezt meg lehet jósolni, úgy talán megelőzésre is alkalmas lehet egy ilyen módszer, azon túl, hogy

a kutatást segíti, hiszen a sikeres jóslás talán azt is megmutatja, hogy milyen kísérleti paraméterek játszanak szerepet a patológiás eset kialakításában.

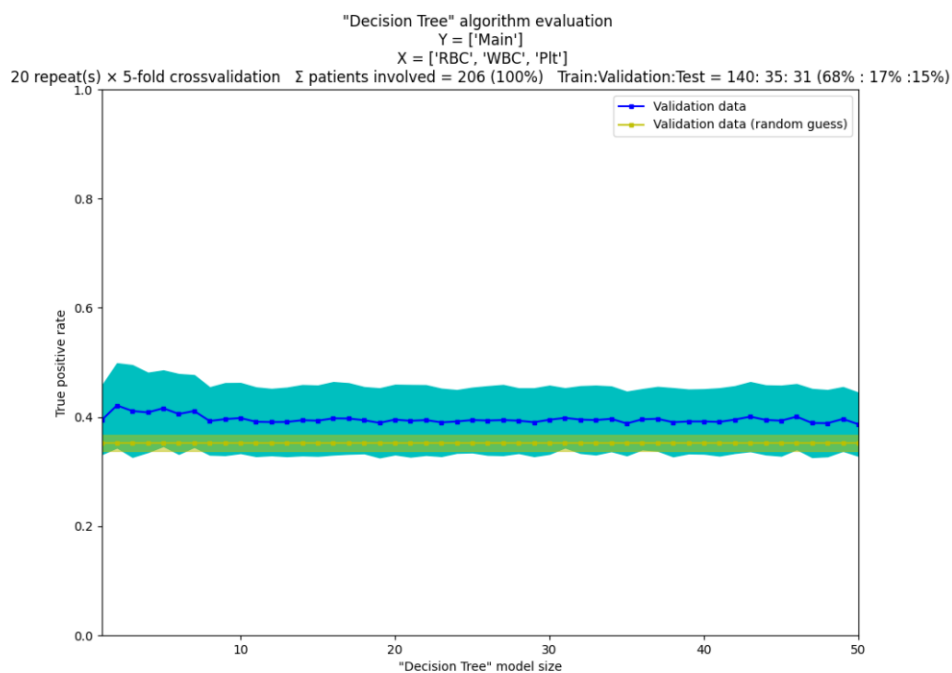
A döntési fa leegyszerűsítve úgy működik, ahogy egy racionális emberi döntéshozatalt elképzelünk. Megvizsgáljuk a bemeneti adatokat egyenként, és egy optimális értéknél elválasztjuk azokat - egy küszöbérték mentén döntést hozunk, hogy milyen végeredményhez tartozónak gondoljuk a bemeneti kísérleti paramétert (azaz stroke, infarktus, vagy perifériás thrombushoz tartozónak). Természetesen sok bemeneti változó lehet, és az értékelési sorrendtől is függhet a döntés, ezért ez egy összetett optimalizációs feladat, amire talán nincs is globálisan jó megoldás. A problémát tovább bonyolítja a kísérleti adatok zajossága, ami miatt sem lehetséges 'tökéletes' osztályozás.

Konkrét eredményeink alkalmazását a 17. ábra (a) és (b) panelon szemléltetjük. Az (a) panelban azt kívántuk megmondani, hogy mindössze 3 bemeneti adatból: vörösvértestszám, fehérvérsejtszám és vérlemezkesszám (RBC, WBC, Plt), meg tudjuk-e mondani, mi volt a patológiás kondíció, mi a thrombus lokalizációja. A vízszintes skálán egyedi 'döntési fa' modellek helyezkednek el, számmal jelölve. A függőleges skálán láthatjuk a modellek jóságát, amit most leegyszerűsítve a valós pozitív rátával jellemeztünk, azaz hány százalékban találta el a modell a megfelelő diagnózist. Látható, hogy a modellek itt nem túl sikeresek: tipikusan 40% körül tippelték meg jól a diagnózist (zöldeskék vonal). Az, hogy a modellek nem jók (vagy megfordítva, hogy a 3 bemeneti adat kevés és/vagy nem megfelelő), az abból is látszik, hogy véletlenszerű tippelés esetén (sárga vonal) is közel hasonló eredményt kapunk (~35%).

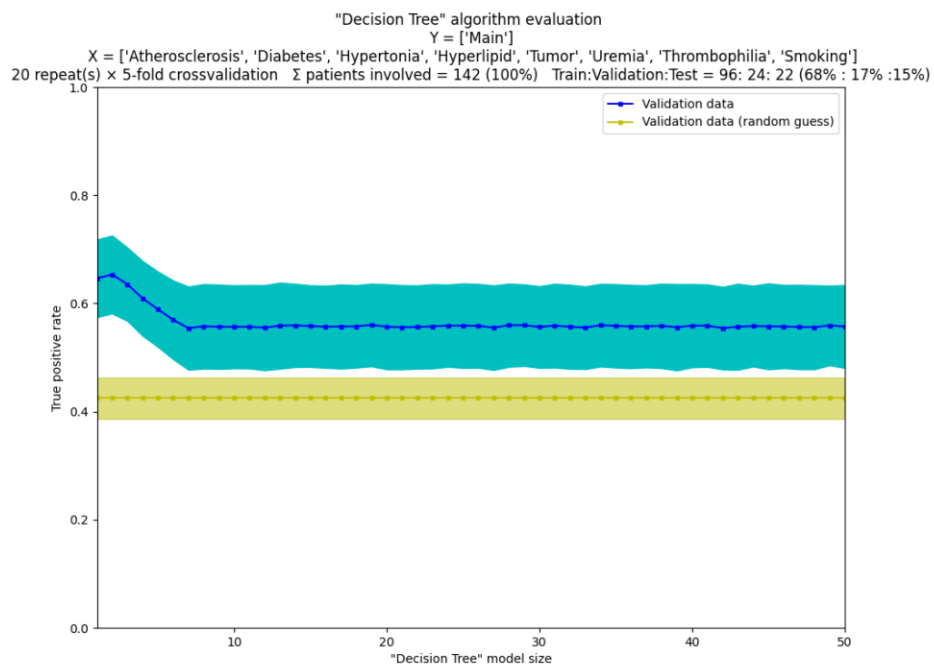
Jobbnak látszik a helyzet a (b) panelen, ahol bemeneti adatnak többet és másféle adatokat választottunk. Itt atherosclerosis, diabetes, hypertonia, stb. azaz klinikai jellegű észrevételeket adtunk meg bemenetnek (lásd a panelon az "X" változó megjelölését). 1-5-ös számú modellek itt már szebben, 65% körül tippelték meg helyesen a diagnózist, vagyis az esetek kétharmadában. Hogy a modellek csakugyan javultak, és nem véletlen szerencséről van szó, az látszik abból, hogy a véletlen találgatás csak ~45%-ban hozna sikert. Sok függ attól is, milyen bemeneti adatokat választunk, és mivel több tucat lehetséges, ezek kombinációja igen számos. A munka jelenleg is folyik a kísérleti adatokkal és új gépi tanulási

módszerekkel, ami nemcsak a thrombus lokalizációjára, hanem annak összetételére is lehetővé tennék az előrejelzést.

**(a)**



**(b)**



17. ábra „PyTanito” szoftver tényleges használatban – példa a legfejlettebb képzési és értékelési funkciók használatára. (a) Döntési fa modellek és értékelésük adathalmazunkban. X független változó a vörösvértestszám 'RBC', fehérvérsejtszám 'WBC' és trombocitaszám 'Plt', Y függő változó a 'main' címke, melynek értékei 'stroke', 'myocardialis' vagy 'perifériás' thrombus. Az „igazi pozitív” arányt választottuk hibamérőként az y skálán ábrázolva egy osztályozási problémához, az ismétléseknél 5-szörös kereszt validálást alkalmaztunk. Az x skálán a különböző döntési fa modellek találhatók, 1-50-ig számozva. (b) X független változók: atherosclerosis, diabetes, hypertonia, hyperlipidaemia, tumor, uraemia, thrombophilia, dohányzás, Y függő változó a 'main' címke, melynek értékei 'stroke', 'myocardialis' vagy 'perifériás' thrombus.

### **6.7. Citrullinált fibrinogénből képződő alvadék szerkezete**

A neutrofil extracelluláris csapdák jelenlétét a betegekből származó thrombusokban rendre ki tudtuk mutatni. A NETosis során a DNS mellett rengeteg citoplazmatikus és magi fehérje is felszabadul, amelyek közül többnek hatása van az alvadékképződés kinetikájára, a keletkezett alvadék tulajdonságaira.

A citrullinált fibrin egérben olyan thrombusból is ki lehet mutatni, amelyet a vena cava részleges lekötésével indukáltak. A fibrin(ogén) citrullinációja PAD enzimek által megváltoztatja az alvadék reológiai tulajdonságait, csökkenti a mechanikai stabilitását és rugalmasságát, kisebb nyíróerő képes a gél-szol átmenetet előidézni a reométerben. A cFn felszínére rétegzett tPA lassabban penetrál, a fibrinolízis lassúbb [184]. A citrullinált fibrin is tartalmazó alvadék mechanikailag kevésbé stabil, könnyebben képződhet az ilyen alvadékból embólia, de ugyanakkor a lízisre, a farmakológiai kezelésre rezisztenssé válik.

A fibrinogén citrullinációja megváltoztatja az alvadék szerkezetét, vékonyítja a fibrinszálakat (15. ábra), ezzel pedig átjárhatatlanabbá teszi a plazminogénaktivátorok, plazmin és egyéb fehérjék számára, bár a vékonyabb szálakat könnyebben hasítja a plazmin az alvadék felszínén [181]. A cFn-nak plazmin hozzáadásával mért lízisideje megnyúlt a nem

citrullinálthoz képest, aminek oka lehet, hogy a plazmin nehezebben penetrál a tömör hálóba, in vivo pedig a NET-tel összefonódó és cFn-t tartalmazó fibrinhálót nehezebb emészteni. A kísérlet alapján úgy véljük, hogy a NETosis során a neutrofil granulocitákból felszabadult és aktiválódott PAD4 (és valószínűleg PAD2) is jelentősen hozzájárul a fibrinolízisrezisztens háló kialakulásához [184], nem csak a korábban már leírt DNS-háló és a hisztonok hatnak ilyen módon [116, 123]. A vékony szálakból álló tömör fibrinháló rendszerint lassabban oldódik az in vitro kísérletekben, ex vivo pedig korai életkorban előforduló szívinfarktusos betegek thrombusaiban is kimutatták [214], valamint a tüdőembóliát okozó mélyvénás thrombosisos betegekben is ez a jellemző [215]. A thrombusszerkezet ismeretének klinikai prognosztikus értéke van [216].

In vivo a PAD enzimek a fibrinogénen kívül egy sor más fehérjét is citrullinálnak a vérben [77, 217], aminek szintén hatása van az alvadék keletkezésének és oldódásának kinetikájára. Mivel a fibrinogén a fő vázalkotója az alvadéknak és a többi alvadási faktorhoz képest nagy, mikromoláris koncentrációban van jelen a vérben, ennek a fehérjének a citrullinációja központi jelentőségű. PAD4-specifikus és csak extracellulárisan ható, tehát a sejtekbe nem penetráló inhibitort lehetne használni a trombotikus betegek kezelésére, hogy gátoljuk a fibrin(ogén) és egyéb vérfehérjék citrullinációját és az alvadék tulajdonságainak kedvezőtlen változását.

### **6.8. Citrullináció hatása a fibrinogén alvadási kinetikájára**

A fibrinogén előzetes citrullinációja PAD4 enzim által csökkenti a fehérje pozitív töltését, megváltoztatja a fehérje szerkezetét, emiatt a belőle keletkező fibrinháló vékonyabb szálakból áll, abszorbanciája kisebb a turbidimetriás vizsgálatban, mint a nem citrullinált fibrinogéné (15. ábra). A turbidimetriás vizsgálat során minél több citrullinált fibrinogén van jelen a keverékben, annál később indul az alvadás a trombin hozzáadása után (16. ábra). A PAD2 és PAD4 enzim azt a két arginint is képes deziminálni, ami mellett a trombin lehasítaná a fibrinopeptid A-t és B-t, vagyis a citrullináció miatt elvész a trombin hasítóhelye a fibrinogén A $\alpha$  és B $\beta$  láncában [135, 218], sőt a cFg akadályozza a polimerizációt [219]. A

két enzim részben eltérő helyeken és eltérő hatékonysággal citrullinál: mindkét enzim az A $\alpha$ -láncot 16, a B $\beta$ -t 4 és a  $\gamma$  láncot 1 helyen, míg 6 helyen az A $\alpha$ , illetve 3 helyen a B $\beta$  láncban csak a PAD2 deziminál, a PAD4 pedig specifikusan 1 helyen a B $\beta$  láncban [133]. Feltételezhető, hogy a trombin hasítóhelyén kívül a többi arginin deziminálódása is befolyásolja a fibrinháló szerkezetét.

Csak néhány publikáció említ adatokat szöveti vagy vérplazmában mért PAD enzimaktivitásokról [220, 221], a NETosis során felszabaduló koncentrációt csak becsülni tudjuk. A neutrofil elasztáz koncentrációja az azurofil granulomokban 160 mg/ml, degranuláció után 5  $\mu$ m-es pericelluláris körben ez 0,1 mg/ml-re hígul, majd tovább az egész keringésben 0,2  $\mu$ g/ml-re. Ha hasonló hígulást veszünk figyelembe és a közölt 5 ng/ml vérkoncentrációból indulunk ki, akkor a PAD4 2,5-5  $\mu$ g/ml pericelluláris koncentrációban lehet jelen, ami magasabb, mint az általunk használt mennyiség. A PAD enzimek aktívak extracellulárisan, hiszen citrullinált fehérjét rheumatioid arthritises betegek ízületi folyadékában, atheroscleroticus plakkokban és számtalan szövetben is kimutattak [130, 134, 222].



## 7. Következtetések

- A thrombusok magas DNS-tartalma a dyslipidaemiás betegekben magas vWF-tartalommal párosult, ami arra utal, hogy ebben az összefüggésben a thrombusok atheroscleroticus etiológiájának szerepe van.
- Amikor a feltehetően NET eredetű DNS kolokalizált a vérrögök emelkedett vWF-tartalmával, a fibrinrostok vékonyabbak voltak. A plakokban a prothrombotikus körülmények között nem érvényesült a DNS és hiszton szálvastagító hatása.
- A hipertóniás betegek kisebb átmérőjű agyi artériáiban és koszorúereiben (de nem a perifériás artériákban) keletkezett thrombusok vWF tartalma korrelált a vér fehérvérsejtszámával, ami arra utal, hogy a hidrodinamikusan környezet szerepet játszik a keringő leukociták és a kialakuló fibrinrögök kölcsönhatásában.
- A thrombus vWF és a szisztémás CRP összefüggése specifikus volt az atheroscleroticus etiológiájú thrombusokra.
- A citrullinált fibrinogénből keletkező fibrinháló vékonyabb szálú, kisebb pórusú a citrullinált fibrin nem tartalmazónál. Ez magyarázatul szolgálhat a korábbi megfigyelésre, miszerint a tömör fibrinháló kevésbé permeabilis, a tPA és plazmin nehezebben jut a háló belsejébe, ezért lízise jelentősen tovább tart.
- A citrullinált fibrinogén lassabban kezd alvadni trombin hozzáadására, mert a trombin elveszíti hasítóhelyeit, hiszen az ott levő argininek is átalakulnak citrullinná.

## 8. Összefoglalás

A 2019. évi WHO adatok szerint globálisan az első két vezető halálok az isémiás szívbetegség és az akut agyi érkatasztrófa (stroke). A diabetes, hypertonia, dohányzás, daganat nemcsak fokozzák az atherosclerosis, s ezzel az artériás thrombosis kialakulásának kockázatát, hanem megváltoztatják a véralvadék összetételét, mechanikai tulajdonságait és oldékonyságát is.

Coronaria, agyi és perifériás artériákból származó thrombusból kriometszeteket készítettünk, majd azok konfokális mikroszkópos felvételein a fibrin-, von Willebrand-faktor- (vWF) és DNS-specifikus immunfluoreszcens festődés területét határoztuk meg. A fibrin/vWF és fibrin/DNS területi arányok mediánjával számoltunk tovább. A dyslipidaemiás betegekből származó thrombusok felvételén mind a DNS, mind a vWF aránya fibrinhez viszonyítva magas volt. A megrepedő/erodálódott atheroscleroticus plakokban a neutrofil granulocitából felszabaduló csapda (NET) aktiválja az érendothelt, az onnan exocitózisra kerülő vWF pedig további NETosist okoz, és mind a vWF, mind a DNS aktiválja a trombocitákat, beindítja a véralvadást.

Amikor a feltehetőleg NET eredetű DNS és a vWF mennyisége egyaránt emelkedik a thrombusban, a fibrinháló szálátmérője csökken a pásztázó elektronmikroszkópos képek tanúsága szerint. Korábbi vizsgálataink szerint a DNS-sel összefonódó és vékonyszálú fibrint nehéz oldani.

A hypertoniás betegek kis átmérőjű agyi artériáiban és koszorúereiben keletkezett thrombus vWF tartalma korrelált a vérük leukocitaszámával, ami arra utal, hogy a thrombus keletkezésében fontos szerepe volt a hydrodinámiás környezetben aktiválódó vWF-nak és kitapadt granulocitáknak. A thrombus vWF-tartalma és a betegek vérének gyulladási marker C-reaktív protein tartalma az atheroscleroticus betegeknél korrelált egymással.

A peptidil-arginil-dezimináz (PAD4) enzim hozzáadásával citrullinált fibrinogénből keletkező fibrinháló vékonyabb szálú és kisebb pórusú a nem citrullináltnál. Ez a megfigyelés magyarázhatja a korábbiakat, miszerint a tömör hálóba nehezen penetrál a tPA és a plazmin, a háló nehezen oldódik, a betegek fibrinolízisrezisztensek. Ugyanakkor a trombin hatására induló véralvadás később indul a turbidimetriás vizsgálatban, mert a PAD4 citrullinálja a trombin hasítóhelyein levő arginineket is.

## 9. Irodalomjegyzék

1. [Anonymous]. WHO: Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability 2019. In: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates> (accessed 29 June 2021) edn.
2. Santos-Gallego CG, Bayón J, Badimón JJ. Thrombi of different pathologies: implications for diagnosis and treatment. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2010; 12: 274-291. DOI: 10.1007/s11936-010-0075-8
3. Undas A, Ariëns RA. Fibrin clot structure and function: a role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: e88-99. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.230631
4. Brinjikji W, Duffy S, Burrows A et al. Correlation of imaging and histopathology of thrombi in acute ischemic stroke with etiology and outcome: a systematic review. *J Neurointerv Surg* 2017; 9: 529-534. DOI: 10.1136/neurintsurg-2016-012391
5. Baaten CCFM, Ten Cate H, van der Meijden PEJ et al. Platelet populations and priming in hematological diseases. *Blood Rev* 2017; 31: 389-399. DOI: 10.1016/j.blre.2017.07.004
6. Munnix IC, Cosemans JM, Auger JM et al. Platelet response heterogeneity in thrombus formation. *Thromb Haemost* 2009; 102: 1149-1156. DOI: 10.1160/TH09-05-0289
7. Heemskerk JW, Mattheij NJ, Cosemans JM. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 2-16. DOI: 10.1111/jth.12045
8. Friedman M. The coronary thrombus: its origin and fate. *Hum Pathol* 1971; 2: 81-128. DOI: 10.1016/s0046-8177(71)80022-9
9. Rajzer M, Wojciechowska W, Kawecka-Jaszcz K et al. Plasma fibrin clot properties in arterial hypertension and their modification by antihypertensive medication. *Thromb Res* 2012; 130: 99-103. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.08.022

10. Dunn EJ, Ariëns RA. Fibrinogen and fibrin clot structure in diabetes. *Herz* 2004; 29: 470-479. DOI: 10.1007/s00059-004-2607-z
11. Fatah K, Hamsten A, Blombäck B et al. Fibrin gel network characteristics and coronary heart disease: relations to plasma fibrinogen concentration, acute phase protein, serum lipoproteins and coronary atherosclerosis. *Thromb Haemost* 1992; 68: 130-135.
12. Undas A, Topór-Madry R, Tracz W et al. Effect of cigarette smoking on plasma fibrin clot permeability and susceptibility to lysis. *Thromb Haemost* 2009; 102: 1289-1291. DOI: 10.1160/TH09-03-0187
13. Silvain J, Collet JP, Nagaswami C et al. Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57: 1359-1367. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.09.077
14. Cines DB, Lebedeva T, Nagaswami C et al. Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood* 2014; 123: 1596-1603. DOI: 10.1182/blood-2013-08-523860
15. Sato Y, Hatakeyama K, Yamashita A et al. Proportion of fibrin and platelets differs in thrombi on ruptured and eroded coronary atherosclerotic plaques in humans. *Heart* 2005; 91: 526-530. DOI: 10.1136/hrt.2004.034058
16. Yamashita A, Nishihira K, Gi T et al. Pathological Features of Ruptured Coronary Plaque and Thrombus Interfaces: Fibrin and von Willebrand Factor as Platelet Scaffolds on Rupture Sites. *Thromb Haemost* 2021; 121: 234-241. DOI: 10.1055/s-0040-1716539
17. Wang J, Jia L, Li X et al. New Insights into the Association between Fibrinogen and Coronary Atherosclerotic Plaque Vulnerability: An Intravascular Optical Coherence Tomography Study. *Cardiovasc Ther* 2019; 2019: 8563717. DOI: 10.1155/2019/8563717
18. Lau JF, Weinberg MD, Olin JW. Peripheral artery disease. Part 1: clinical evaluation and noninvasive diagnosis. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8: 405-418. DOI: 10.1038/nrcardio.2011.66

19. Undas A, Nowakowski T, Cieśła-Dul M et al. Abnormal plasma fibrin clot characteristics are associated with worse clinical outcome in patients with peripheral arterial disease and thromboangiitis obliterans. *Atherosclerosis* 2011; 215: 481-486. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.12.040
20. Kovács A, Sótonyi P, Nagy AI et al. Ultrastructure and composition of thrombi in coronary and peripheral artery disease: correlations with clinical and laboratory findings. *Thromb Res* 2015; 135: 760-766. DOI: 10.1016/j.thromres.2015.02.004
21. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 1993; 24: 35-41. DOI: 10.1161/01.str.24.1.35
22. Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR et al. The ASCOD phenotyping of ischemic stroke (Updated ASCO Phenotyping). *Cerebrovasc Dis* 2013; 36: 1-5. DOI: 10.1159/000352050
23. Kim SK, Yoon W, Kim TS et al. Histologic Analysis of Retrieved Clots in Acute Ischemic Stroke: Correlation with Stroke Etiology and Gradient-Echo MRI. *AJNR Am J Neuroradiol* 2015; 36: 1756-1762. DOI: 10.3174/ajnr.A4402
24. Rubiś P, Natorka J, Ząbczyk M et al. Fibrin Clot Properties and Thrombin Generation in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Thromb Haemost* 2020; 120: 181-183. DOI: 10.1055/s-0039-1697956
25. Boehme AK, Esenwa C, Elkind MS. Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circ Res* 2017; 120: 472-495. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308398
26. Liebeskind DS, Sanossian N, Yong WH et al. CT and MRI early vessel signs reflect clot composition in acute stroke. *Stroke* 2011; 42: 1237-1243. DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.605576
27. Sporns PB, Hanning U, Schwindt W et al. Ischemic Stroke: What Does the Histological Composition Tell Us About the Origin of the Thrombus? *Stroke* 2017; 48: 2206-2210. DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.016590
28. Laridan E, Denorme F, Desender L et al. Neutrophil extracellular traps in ischemic stroke thrombi. *Ann Neurol* 2017; 82: 223-232. DOI: 10.1002/ana.24993

29. Boeckh-Behrens T, Schubert M, Förschler A et al. The Impact of Histological Clot Composition in Embolic Stroke. *Clin Neuroradiol* 2016; 26: 189-197. DOI: 10.1007/s00062-014-0347-x
30. Park H, Kim J, Ha J et al. Histological features of intracranial thrombi in stroke patients with cancer. *Ann Neurol* 2019; 86: 143-149. DOI: 10.1002/ana.25495
31. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood* 2014; 123: 2768-2776. DOI: 10.1182/blood-2013-10-463646
32. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 15880-15885. DOI: 10.1073/pnas.1005743107
33. Heo JH, Nam HS, Kim YD et al. Pathophysiologic and Therapeutic Perspectives Based on Thrombus Histology in Stroke. *J Stroke* 2020; 22: 64-75. DOI: 10.5853/jos.2019.03440
34. Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost* 2011; 9 Suppl 1: 92-104. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04361.x
35. Sporns PB, Hanning U, Schwindt W et al. Ischemic Stroke: Histological Thrombus Composition and Pre-Interventional CT Attenuation Are Associated with Intervention Time and Rate of Secondary Embolism. *Cerebrovasc Dis* 2017; 44: 344-350. DOI: 10.1159/000481578
36. Maekawa K, Shibata M, Nakajima H et al. Erythrocyte-Rich Thrombus Is Associated with Reduced Number of Maneuvers and Procedure Time in Patients with Acute Ischemic Stroke Undergoing Mechanical Thrombectomy. *Cerebrovasc Dis Extra* 2018; 8: 39-49. DOI: 10.1159/000486042
37. Duffy S, McCarthy R, Farrell M et al. Per-Pass Analysis of Thrombus Composition in Patients With Acute Ischemic Stroke Undergoing Mechanical Thrombectomy. *Stroke* 2019; 50: 1156-1163. DOI: 10.1161/STROKEAHA.118.023419
38. Boodt N, Snouckaert van Schauburg PRW, Hund HM et al. Mechanical Characterization of Thrombi Retrieved With Endovascular Thrombectomy in

- Patients With Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 2021; STROKEAHA120033527. DOI: 10.1161/STROKEAHA.120.033527
39. Alexandrov AV, Grotta JC. Arterial reocclusion in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Neurology* 2002; 59: 862-867. DOI: 10.1212/wnl.59.6.862
  40. Weisel JW, Litvinov RI. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2019; 17: 271-282. DOI: 10.1111/jth.14360
  41. Kroll MH, Michaelis LC, Verstovsek S. Mechanisms of thrombogenesis in polycythemia vera. *Blood Rev* 2015; 29: 215-221. DOI: 10.1016/j.blre.2014.12.002
  42. Goel MS, Diamond SL. Adhesion of normal erythrocytes at depressed venous shear rates to activated neutrophils, activated platelets, and fibrin polymerized from plasma. *Blood* 2002; 100: 3797-3803. DOI: 10.1182/blood-2002-03-0712
  43. Becatti M, Marcucci R, Gori AM et al. Erythrocyte oxidative stress is associated with cell deformability in patients with retinal vein occlusion. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 2287-2297. DOI: 10.1111/jth.13482
  44. Wohner N, Sótónyi P, Machovich R et al. Lytic resistance of fibrin containing red blood cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 2306-2313. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.229088
  45. Lominadze D, Dean WL. Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte aggregation. *FEBS Lett* 2002; 517: 41-44. DOI: 10.1016/s0014-5793(02)02575-9
  46. Carvalho FA, Connell S, Miltenberger-Miltenyi G et al. Atomic force microscopy-based molecular recognition of a fibrinogen receptor on human erythrocytes. *ACS Nano* 2010; 4: 4609-4620. DOI: 10.1021/nn1009648
  47. Smeets MWJ, Mourik MJ, Niessen HWM et al. Stasis Promotes Erythrocyte Adhesion to von Willebrand Factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017; 37: 1618-1627. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.309885
  48. Ząbczyk M, Sadowski M, Zalewski J et al. Polyhedrocytes in intracoronary thrombi from patients with ST-elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2015; 179: 186-187. DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.10.004

49. Tutwiler V, Peshkova AD, Andrianova IA et al. Contraction of Blood Clots Is Impaired in Acute Ischemic Stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017; 37: 271-279. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.308622
50. Peshkova AD, Malyasyov DV, Bredikhin RA et al. Reduced Contraction of Blood Clots in Venous Thromboembolism Is a Potential Thrombogenic and Embologenic Mechanism. *TH Open* 2018; 2: e104-e115. DOI: 10.1055/s-0038-1635572
51. Le Minh G, Peshkova AD, Andrianova IA et al. Impaired contraction of blood clots as a novel prothrombotic mechanism in systemic lupus erythematosus. *Clin Sci (Lond)* 2018; 132: 243-254. DOI: 10.1042/CS20171510
52. Whelihan MF, Mooberry MJ, Zachary V et al. The contribution of red blood cells to thrombin generation in sickle cell disease: meizothrombin generation on sickled red blood cells. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 2187-2189. DOI: 10.1111/jth.12423
53. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 395-424. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.395
54. Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood* 2015; 125: 2019-2028. DOI: 10.1182/blood-2014-06-528406
55. Huang RH, Wang Y, Roth R et al. Assembly of Weibel-Palade body-like tubules from N-terminal domains of von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 482-487. DOI: 10.1073/pnas.0710079105
56. Denis C, Methia N, Frenette PS et al. A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 9524-9529. DOI: 10.1073/pnas.95.16.9524
57. Dong JF, Moake JL, Bernardo A et al. ADAMTS-13 metalloprotease interacts with the endothelial cell-derived ultra-large von Willebrand factor. *J Biol Chem* 2003; 278: 29633-29639. DOI: 10.1074/jbc.M301385200
58. Pegon JN, Kurdi M, Casari C et al. Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5. *Haematologica* 2012; 97: 1855-1863. DOI: 10.3324/haematol.2012.063297



59. Rastegarlarlari G, Pegon JN, Casari C et al. Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Blood* 2012; 119: 2126-2134. DOI: 10.1182/blood-2011-08-373605
60. O'Donnell J, Boulton FE, Manning RA et al. Amount of H antigen expressed on circulating von Willebrand factor is modified by ABO blood group genotype and is a major determinant of plasma von Willebrand factor antigen levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 335-341. DOI: 10.1161/hq0202.103997
61. Bryckaert M, Rosa JP, Denis CV et al. Of von Willebrand factor and platelets. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72: 307-326. DOI: 10.1007/s00018-014-1743-8
62. Michels A, Albáñez S, Mewburn J et al. Histones link inflammation and thrombosis through the induction of Weibel-Palade body exocytosis. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 2274-2286. DOI: 10.1111/jth.13493
63. Borissoff JI, Joosen IA, Versteyleen MO et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33: 2032-2040. DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.301627
64. Grässle S, Huck V, Pappelbaum KI et al. von Willebrand factor directly interacts with DNA from neutrophil extracellular traps. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34: 1382-1389. DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.303016
65. Wohner N, Sebastian S, Muczynski V et al. Osteoprotegerin modulates platelet adhesion to von Willebrand factor during release from endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2022; 20: 755-766. DOI: 10.1111/jth.15598
66. Springer TA. von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. *Blood* 2014; 124: 1412-1425. DOI: 10.1182/blood-2014-05-378638
67. Padilla A, Moake JL, Bernardo A et al. P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. *Blood* 2004; 103: 2150-2156. DOI: 10.1182/blood-2003-08-2956
68. Kalagara T, Moutsis T, Yang Y et al. The endothelial glycocalyx anchors von Willebrand factor fibers to the vascular endothelium. *Blood Adv* 2018; 2: 2347-2357. DOI: 10.1182/bloodadvances.2017013995

69. von Brühl ML, Stark K, Steinhart A et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* 2012; 209: 819-835. DOI: 10.1084/jem.20112322
70. Huang J, Roth R, Heuser JE et al. Integrin alpha(v)beta(3) on human endothelial cells binds von Willebrand factor strings under fluid shear stress. *Blood* 2009; 113: 1589-1597. DOI: 10.1182/blood-2008-05-158584
71. Pendu R, Terraube V, Christophe OD et al. P-selectin glycoprotein ligand 1 and beta2-integrins cooperate in the adhesion of leukocytes to von Willebrand factor. *Blood* 2006; 108: 3746-3752. DOI: 10.1182/blood-2006-03-010322
72. Wohner N, Keresztes Z, Sótonyi P et al. Neutrophil granulocyte-dependent proteolysis enhances platelet adhesion to the arterial wall under high-shear flow. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 1624-1631. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.03890.x
73. Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA et al. Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation. *J Clin Invest* 1986; 78: 1456-1461. DOI: 10.1172/JCI112736
74. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 803-815. DOI: 10.1038/nri2171
75. Baez SC, García Del Barco D, Hardy-Sosa A et al. Scalable Bio Marker Combinations for Early Stroke Diagnosis: A Systematic Review. *Front Neurol* 2021; 12: 638693. DOI: 10.3389/fneur.2021.638693
76. Reardon B, Pasalic L, Favaloro EJ. The Intriguing Relationships of von Willebrand Factor, ADAMTS13 and Cardiac Disease. *J Cardiovasc Dev Dis* 2021; 8. DOI: 10.3390/jcdd8090115
77. Sorvillo N, Mizurini DM, Coxon C et al. Plasma Peptidylarginine Deiminase IV Promotes VWF-Platelet String Formation and Accelerates Thrombosis After Vessel Injury. *Circ Res* 2019; 125: 507-519. DOI: 10.1161/circresaha.118.314571
78. Thangaraju K, Katneni U, Akpan IJ et al. The Impact of Age and BMI on the VWF/ADAMTS13 Axis and Simultaneous Thrombin and Plasmin Generation in

- Hospitalized COVID-19 Patients. *Front Med (Lausanne)* 2021; 8: 817305. DOI: 10.3389/fmed.2021.817305
79. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev* 2015; 29: 153-162. DOI: 10.1016/j.blre.2014.10.003
  80. Semple JW, Italiano JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 264-274. DOI: 10.1038/nri2956
  81. Bongiovanni D, Klug M, Lazareva O et al. SARS-CoV-2 infection is associated with a pro-thrombotic platelet phenotype. *Cell Death Dis* 2021; 12: 50. DOI: 10.1038/s41419-020-03333-9
  82. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009; 23: 177-189. DOI: 10.1016/j.blre.2009.04.001
  83. Youssefian T, Drouin A, Massé JM et al. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood* 2002; 99: 4021-4029. DOI: 10.1182/blood-2001-12-0191
  84. Barale C, Melchionda E, Morotti A et al. Prothrombotic Phenotype in COVID-19: Focus on Platelets. *Int J Mol Sci* 2021; 22. DOI: 10.3390/ijms222413638
  85. Carestia A, Kaufman T, Rivadeneyra L et al. Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. *J Leukoc Biol* 2016; 99: 153-162. DOI: 10.1189/jlb.3A0415-161R
  86. Chabot-Richards DS, George TI. Leukocytosis. *Int J Lab Hematol* 2014; 36: 279-288. DOI: 10.1111/ijlh.12212
  87. Yvan-Charvet L, Wang N, Tall AR. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 139-143. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.179283
  88. Murphy AJ, Akhtari M, Tolani S et al. ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *J Clin Invest* 2011; 121: 4138-4149. DOI: 10.1172/JCI57559

89. Vols S, Sionov RV, Granot Z. Always Look On the Bright Side: Anti-Tumor Functions of Neutrophils. *Curr Pharm Des* 2017; 23: 4862-4892. DOI: 10.2174/1381612823666170704125420
90. von Köckritz-Blickwede M, Winstel V. Molecular Prerequisites for Neutrophil Extracellular Trap Formation and Evasion Mechanisms of. *Front Immunol* 2022; 13: 836278. DOI: 10.3389/fimmu.2022.836278
91. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303: 1532-1535. DOI: 10.1126/science.1092385
92. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V et al. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 2006; 8: 668-676. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x
93. Clark SR, Ma AC, Tavener SA et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007; 13: 463-469. DOI: 10.1038/nm1565
94. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; 176: 231-241. DOI: 10.1083/jcb.200606027
95. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ* 2009; 16: 1438-1444. DOI: 10.1038/cdd.2009.96
96. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009; 15: 623-625. DOI: 10.1038/nm.1959
97. Aulik NA, Hellenbrand KM, Klos H et al. *Mannheimia haemolytica* and its leukotoxin cause neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils. *Infect Immun* 2010; 78: 4454-4466. DOI: 10.1128/IAI.00840-10
98. Mitroulis I, Kambas K, Chrysanthopoulou A et al. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 $\beta$  and autophagy-related signaling in gout. *PLoS One* 2011; 6: e29318. DOI: 10.1371/journal.pone.0029318

99. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* 2012; 12: 109-116. DOI: 10.1016/j.chom.2012.05.015
100. Qiu SL, Zhang H, Tang QY et al. Neutrophil extracellular traps induced by cigarette smoke activate plasmacytoid dendritic cells. *Thorax* 2017; 72: 1084-1093. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2016-209887
101. Maretti-Mira AC, Golden-Mason L, Salomon MP et al. Cholesterol-Induced M4-Like Macrophages Recruit Neutrophils and Induce NETosis. *Front Immunol* 2021; 12: 671073. DOI: 10.3389/fimmu.2021.671073
102. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. *J Innate Immun* 2018; 10: 414-421. DOI: 10.1159/000489829
103. Komorowicz E, Kolev K. Fibrin structure, viscoelasticity and lysis face the interplay of biorelevant polyions. *Curr Opin Hematol* 2022; 29: 244-250. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000725
104. Buijsers B, Yanginlar C, Maciej-Hulme ML et al. Beneficial non-anticoagulant mechanisms underlying heparin treatment of COVID-19 patients. *EBioMedicine* 2020; 59: 102969. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102969
105. Kojima Y, Weissman IL, Leeper NJ. The Role of Efferocytosis in Atherosclerosis. *Circulation* 2017; 135: 476-489. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025684
106. Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol* 2013; 14: 812-820. DOI: 10.1038/ni.2639
107. Emanuel R, Sergin I, Bhattacharya S et al. Induction of lysosomal biogenesis in atherosclerotic macrophages can rescue lipid-induced lysosomal dysfunction and downstream sequelae. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34: 1942-1952. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.303342
108. Crea F, Liuzzo G. Pathogenesis of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2013; 61: 1-11. DOI: 10.1016/j.jacc.2012.07.064

109. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* 2012; 7: e32366. DOI: 10.1371/journal.pone.0032366
110. Stakos DA, Kambas K, Konstantinidis T et al. Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2015; 36: 1405-1414. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv007
111. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett* 2010; 584: 3193-3197. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.06.006
112. de Boer OJ, Li X, Teeling P et al. Neutrophils, neutrophil extracellular traps and interleukin-17 associate with the organisation of thrombi in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2013; 109: 290-297. DOI: 10.1160/TH12-06-0425
113. Mangold A, Alias S, Scherz T et al. Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size. *Circ Res* 2015; 116: 1182-1192. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304944
114. Ducroux C, Di Meglio L, Loyau S et al. Thrombus Neutrophil Extracellular Traps Content Impair tPA-Induced Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 2018; 49: 754-757. DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.019896
115. Farkas Á, Farkas VJ, Gubucz I et al. Neutrophil extracellular traps in thrombi retrieved during interventional treatment of ischemic arterial diseases. *Thromb Res* 2019; 175: 46-52. DOI: 10.1016/j.thromres.2019.01.006
116. Longstaff C, Varjú I, Sótónyi P et al. Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones. *J Biol Chem* 2013; 288: 6946-6956. DOI: 10.1074/jbc.M112.404301
117. Valles J, Lago A, Santos MT et al. Neutrophil extracellular traps are increased in patients with acute ischemic stroke: prognostic significance. *Thrombosis and Haemostasis* 2017; 117: 1919-1929. DOI: 10.1160/th17-02-0130
118. Pertiwi KR, van der Wal AC, Pabittei DR et al. Neutrophil Extracellular Traps Participate in All Different Types of Thrombotic and Haemorrhagic Complications

- of Coronary Atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2018; 118: 1078-1087. DOI: 10.1055/s-0038-1641749
119. Kramer MC, Rittersma SZ, de Winter RJ et al. Relationship of thrombus healing to underlying plaque morphology in sudden coronary death. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 122-132. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.09.007
  120. Pertiwi KR, de Boer OJ, Mackaaij C et al. Extracellular traps derived from macrophages, mast cells, eosinophils and neutrophils are generated in a time-dependent manner during atherothrombosis. *J Pathol* 2019; 247: 505-512. DOI: 10.1002/path.5212
  121. Döring Y, Libby P, Soehnlein O. Neutrophil Extracellular Traps Participate in Cardiovascular Diseases: Recent Experimental and Clinical Insights. *Circ Res* 2020; 126: 1228-1241. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.315931
  122. Varjú I, Kolev K. Networks that stop the flow: A fresh look at fibrin and neutrophil extracellular traps. *Thromb Res* 2019; 182: 1-11. DOI: 10.1016/j.thromres.2019.08.003
  123. Varju I, Longstaff C, Szabo L et al. DNA, histones and neutrophil extracellular traps exert anti-fibrinolytic effects in a plasma environment. *Thrombosis and Haemostasis* 2015; 113: 1289-1299. DOI: 10.1160/th14-08-0669
  124. Santocki M, Kolaczowska E. On Neutrophil Extracellular Trap (NET) Removal: What We Know Thus Far and Why So Little. *Cells* 2020; 9. DOI: 10.3390/cells9092079
  125. Jiménez-Alcázar M, Napirei M, Panda R et al. Impaired DNase1-mediated degradation of neutrophil extracellular traps is associated with acute thrombotic microangiopathies. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 732-742. DOI: 10.1111/jth.12796
  126. Al-U'datt DGF, Allen BG, Hiram R et al. Current knowledge into the role of the peptidylarginine deiminase (PAD) enzyme family in cardiovascular disease. *Eur J Pharmacol* 2021; 891: 173765. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173765
  127. Du M, Yang W, Schull S et al. Inhibition of peptidyl arginine deiminase-4 protects against myocardial infarction induced cardiac dysfunction. *Int Immunopharmacol* 2020; 78: 106055. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.106055

128. Mazepa MA, Masias C, Chaturvedi S. How targeted therapy disrupts the treatment paradigm for acquired TTP: the risks, benefits, and unknowns. *Blood* 2019; 134: 415-420. DOI: 10.1182/blood.2019000954
129. György B, Tóth E, Tarcsa E et al. Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 1662-1677. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.03.008
130. Lee CY, Wang D, Wilhelm M et al. Mining the Human Tissue Proteome for Protein Citrullination. *Mol Cell Proteomics* 2018; 17: 1378-1391. DOI: 10.1074/mcp.RA118.000696
131. Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ et al. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 2003; 25: 1106-1118. DOI: 10.1002/bies.10357
132. Yu K, Proost P. Insights into peptidylarginine deiminase expression and citrullination pathways. *Trends Cell Biol* 2022. DOI: 10.1016/j.tcb.2022.01.014
133. Nakayama-Hamada M, Suzuki A, Kubota K et al. Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 327: 192-200. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.11.152
134. Masson-Bessière C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E et al. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol* 2001; 166: 4177-4184. DOI: 10.4049/jimmunol.166.6.4177
135. Okumura N, Haneishi A, Terasawa F. Citrullinated fibrinogen shows defects in FPA and FPB release and fibrin polymerization catalyzed by thrombin. *Clin Chim Acta* 2009; 401: 119-123. DOI: 10.1016/j.cca.2008.12.002
136. Rosenstein ED, Greenwald RA, Kushner LJ et al. Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation* 2004; 28: 311-318. DOI: 10.1007/s10753-004-6641-z
137. Janssen KMJ, Hop H, Vissink A et al. Levels of Anti-Citrullinated Protein Antibodies and Rheumatoid Factor, Including IgA Isotypes, and Articular



- Manifestations in Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Int J Environ Res Public Health* 2020; 17. DOI: 10.3390/ijerph17218054
138. Cavalier E, Guiot J, Lechner K et al. Circulating Nucleosomes as Potential Markers to Monitor COVID-19 Disease Progression. *Front Mol Biosci* 2021; 8: 600881. DOI: 10.3389/fmolb.2021.600881
139. Zhu D, Zhang Y, Wang S. Histone citrullination: a new target for tumors. *Mol Cancer* 2021; 20: 90. DOI: 10.1186/s12943-021-01373-z
140. Holmes CL, Shim D, Kernien J et al. Insight into Neutrophil Extracellular Traps through Systematic Evaluation of Citrullination and Peptidylarginine Deiminases. *J Immunol Res* 2019; 2019: 2160192. DOI: 10.1155/2019/2160192
141. Tohme S, Yazdani HO, Al-Khafaji AB et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. *Cancer Res* 2016; 76: 1367-1380. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1591
142. Vejstrup A, Møller AM, Nielsen CH et al. Release of active peptidylarginine deiminase into the circulation during acute inflammation induced by coronary artery bypass surgery. *J Inflamm Res* 2019; 12: 137-144. DOI: 10.2147/JIR.S198611
143. Helseth R, Knudsen EC, Eritsland J et al. Glucose associated NETosis in patients with ST-elevation myocardial infarction: an observational study. *BMC Cardiovasc Disord* 2019; 19: 221. DOI: 10.1186/s12872-019-1205-1
144. Wong SL, Wagner DD. Peptidylarginine deiminase 4: a nuclear button triggering neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases and aging. *Faseb j* 2018; 32: fj201800691R. DOI: 10.1096/fj.201800691R
145. Federation ID. Diabetes facts and figures. In: <https://idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/facts-figures.html>; 2022:
146. Bayeva M, Sawicki KT, Ardehali H. Taking diabetes to heart--deregulation of myocardial lipid metabolism in diabetic cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc* 2013; 2: e000433. DOI: 10.1161/JAHA.113.000433
147. Rask-Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab* 2013; 17: 20-33. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.11.012

148. Yao D, Brownlee M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes* 2010; 59: 249-255. DOI: 10.2337/db09-0801
149. Shah MS, Brownlee M. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes. *Circ Res* 2016; 118: 1808-1829. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306923
150. Kaur R, Kaur M, Singh J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovasc Diabetol* 2018; 17: 121. DOI: 10.1186/s12933-018-0763-3
151. Du X, Edelstein D, Obici S et al. Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest* 2006; 116: 1071-1080. DOI: 10.1172/JCI23354
152. Rodriguez-Araujo G, Nakagami H. Pathophysiology of cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Cardiovasc Endocrinol Metab* 2018; 7: 4-9. DOI: 10.1097/XCE.0000000000000141
153. Mandle J, Machovich R. *Orvosi Patobiokémia*. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt.; 2007.
154. Tall AR, Westerterp M. Inflammasomes, neutrophil extracellular traps, and cholesterol. *J Lipid Res* 2019; 60: 721-727. DOI: 10.1194/jlr.S091280
155. Nagareddy PR, Murphy AJ, Stirzaker RA et al. Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. *Cell Metab* 2013; 17: 695-708. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.04.001
156. Iadecola C, Davisson RL. Hypertension and cerebrovascular dysfunction. *Cell Metab* 2008; 7: 476-484. DOI: 10.1016/j.cmet.2008.03.010
157. Bakdash N, Williams MS. Spatially distinct production of reactive oxygen species regulates platelet activation. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 158-166. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.021
158. Delaney MK, Kim K, Estevez B et al. Differential Roles of the NADPH-Oxidase 1 and 2 in Platelet Activation and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; 36: 846-854. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.307308

159. Ekholm M, Kahan T. The Impact of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System on Inflammation, Coagulation, and Atherothrombotic Complications, and to Aggravated COVID-19. *Front Pharmacol* 2021; 12: 640185. DOI: 10.3389/fphar.2021.640185
160. Rosa RM, Colucci JA, Yokota R et al. Alternative pathways for angiotensin II production as an important determinant of kidney damage in endotoxemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2016; 311: F496-504. DOI: 10.1152/ajprenal.00121.2014
161. Way KJ, Isshiki K, Suzuma K et al. Expression of connective tissue growth factor is increased in injured myocardium associated with protein kinase C beta2 activation and diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 2709-2718. DOI: 10.2337/diabetes.51.9.2709
162. Nathan C, Cunningham-Bussel A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 349-361. DOI: 10.1038/nri3423
163. Ekholm M, Kahan T, Jörneskog G et al. Haemostatic and inflammatory alterations in familial hypercholesterolaemia, and the impact of angiotensin II infusion. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2015; 16: 328-338. DOI: 10.1177/1470320315575848
164. Alarabi AB, Lozano PA, Khasawneh FT et al. The effect of emerging tobacco related products and their toxic constituents on thrombosis. *Life Sci* 2022; 290: 120255. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.120255
165. Jan R, M RJ, D SP. Effects of chronic smoking on platelet function. *Thrombosis Research* 1987; 45: 75-85.
166. Fey GH, Gauldie J. The acute phase response of the liver in inflammation. *Prog Liver Dis* 1990; 9: 89-116.
167. Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* 1983; 34: 141-212. DOI: 10.1016/s0065-2776(08)60379-x
168. Kaptoge S, Di Angelantonio E, Pennells L et al. C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N Engl J Med* 2012; 367: 1310-1320. DOI: 10.1056/NEJMoa1107477

169. Agrawal A, Shrive AK, Greenhough TJ et al. Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein. *J Immunol* 2001; 166: 3998-4004. DOI: 10.4049/jimmunol.166.6.3998
170. Eisenhardt SU, Habersberger J, Murphy A et al. Dissociation of pentameric to monomeric C-reactive protein on activated platelets localizes inflammation to atherosclerotic plaques. *Circ Res* 2009; 105: 128-137. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.190611
171. McFadyen JD, Kiefer J, Braig D et al. Dissociation of C-Reactive Protein Localizes and Amplifies Inflammation: Evidence for a Direct Biological Role of C-Reactive Protein and Its Conformational Changes. *Front Immunol* 2018; 9: 1351. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01351
172. Libby P, Loscalzo J, Ridker PM et al. Inflammation, Immunity, and Infection in Atherothrombosis: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol* 2018; 72: 2071-2081. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.08.1043
173. Zeller J, Bogner B, McFadyen JD et al. Transitional changes in the structure of C-reactive protein create highly pro-inflammatory molecules: Therapeutic implications for cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther* 2022; 235: 108165. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2022.108165
174. Fish RJ, Neerman-Arbez M. Fibrinogen gene regulation. *Thromb Haemost* 2012; 108: 419-426. DOI: 10.1160/TH12-04-0273
175. Machlus KR, Cardenas JC, Church FC et al. Causal relationship between hyperfibrinogenemia, thrombosis, and resistance to thrombolysis in mice. *Blood* 2011; 117: 4953-4963. DOI: 10.1182/blood-2010-11-316885
176. Lee SJ, Hong JM, Lee SE et al. Association of fibrinogen level with early neurological deterioration among acute ischemic stroke patients with diabetes. *BMC Neurol* 2017; 17: 101. DOI: 10.1186/s12883-017-0865-7
177. Litvinov RI, Weisel JW. Fibrin mechanical properties and their structural origins. *Matrix Biol* 2017; 60-61: 110-123. DOI: 10.1016/j.matbio.2016.08.003
178. Longstaff C, Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2015; 13 Suppl 1: S98-105. DOI: 10.1111/jth.12935

179. Varjú I, Sótonyi P, Machovich R et al. Hindered dissolution of fibrin formed under mechanical stress. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 979-986. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04203.x
180. Tanka-Salamon A, Kolev K, Machovich R et al. Proteolytic resistance conferred to fibrinogen by von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 2010; 103: 291-298. DOI: 10.1160/TH09-07-0420
181. Collet JP, Park D, Lesty C et al. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1354-1361. DOI: 10.1161/01.atv.20.5.1354
182. Longstaff C, Thelwell C, Williams SC et al. The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: kinetic and microscopic studies. *Blood* 2011; 117: 661-668. DOI: 10.1182/blood-2010-06-290338
183. Longstaff C, Hogwood J, Gray E et al. Neutralisation of the anti-coagulant effects of heparin by histones in blood plasma and purified systems. *Thromb Haemost* 2016; 115: 591-599. DOI: 10.1160/TH15-03-0214
184. Varjú I, Sorvillo N, Cherpokova D et al. Citrullinated Fibrinogen Renders Clots Mechanically Less Stable, but Lysis-Resistant. *Circ Res* 2021; 129: 342-344. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.319061
185. Kattula S, Byrnes JR, Wolberg AS. Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017; 37: e13-e21. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.308564
186. Litvinov RI, Nabiullina RM, Zubairova LD et al. Lytic Susceptibility, Structure, and Mechanical Properties of Fibrin in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol* 2019; 10: 1626. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01626
187. Binder V, Bergum B, Jaisson S et al. Impact of fibrinogen carbamylation on fibrin clot formation and stability. *Thromb Haemost* 2017; 117: 899-910. DOI: 10.1160/TH16-09-0704

188. Hood JE, Yesudasan S, Averett RD. Glucose Concentration Affects Fibrin Clot Structure and Morphology as Evidenced by Fluorescence Imaging and Molecular Simulations. *Clin Appl Thromb Hemost* 2018; 24: 104S-116S. DOI: 10.1177/1076029618792304
189. Martinez MR, Cuker A, Mills AM et al. Enhanced lysis and accelerated establishment of viscoelastic properties of fibrin clots are associated with pulmonary embolism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014; 306: L397-404. DOI: 10.1152/ajplung.00265.2013
190. Tóth E, Beinrohr L, Gubucz I et al. Fibrin to von Willebrand factor ratio in arterial thrombi is associated with plasma levels of inflammatory biomarkers and local abundance of extracellular DNA. *Thromb Res* 2022; 209: 8-15. DOI: 10.1016/j.thromres.2021.11.011
191. Belcher HA, Guthold M, Hudson NE. What is the diameter of a fibrin fiber? In: *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis: 2023:*
192. Nikolova N, Toneva-Zheynova D, Tenekedjiev K et al. Monte Carlo Statistical Tests for Identity of Theoretical and Empirical Distribution of Experimental Data. *IntechOpen:Intech*; 2013. doi:10.5772/53049
193. Nikolova N, Chai S, Ivanova S et al. Bootstrap Kuiper Testing of the Identity of 1D Continuous Distribution using Fuzzy Samples. *International Journal of Computational Intelligence Systems* 2015; 8(Supple. 2): 63-75. DOI: 10.1080/18756891.2015.1129592
194. Efron B, Tibshirani R. *An introduction to the Bootstrap*. New York, NY, USA: Chapman&Hall; 1993.
195. Nikolova N, Mihaylova N, Tenekedjiev K. Bootstrap tests for mean value differences over fuzzy samples. *IFAC-PapersOnLine* 2015; 48: 7-14. DOI: 10.1016/j.ifacol.2015.12.048
196. Nikolova N, Rodriguez RM, Symes M et al. Outlier detection algorithms over fuzzy data with weighted least squares. *Int J Fuzzy Syst* 2021. DOI: 10.1007/s40815-020-01049-8

197. Benjamini Y, Yekutieli D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann Statist* 2001; 29: 1165-1188. DOI: 10.1214/aos/1013699998
198. Varjú I, Tóth E, Farkas Á et al. Citrullinated fibrinogen forms densely packed clots with decreased permeability. *J Thromb Haemost* 2022; 20: 2862-2872. DOI: 10.1111/jth.15875
199. Rondaij MG, Bierings R, Kragt A et al. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1002-1007. DOI: 10.1161/01.ATV.0000209501.56852.6c
200. Borchiellini A, Fijnvandraat K, ten Cate JW et al. Quantitative analysis of von Willebrand factor propeptide release in vivo: effect of experimental endotoxemia and administration of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin in humans. *Blood* 1996; 88: 2951-2958.
201. Vischer UM, Emeis JJ, Bilo HJ et al. von Willebrand factor (vWf) as a plasma marker of endothelial activation in diabetes: improved reliability with parallel determination of the vWf propeptide (vWf:AgII). *Thromb Haemost* 1998; 80: 1002-1007.
202. Vischer UM, Ingerslev J, Wollheim CB et al. Acute von Willebrand factor secretion from the endothelium in vivo: assessment through plasma propeptide (vWf:AgII) Levels. *Thromb Haemost* 1997; 77: 387-393.
203. Fu H, Jiang Y, Yang D et al. Flow-induced elongation of von Willebrand factor precedes tension-dependent activation. *Nat Commun* 2017; 8: 324. DOI: 10.1038/s41467-017-00230-2
204. Gragnano F, Sperlongano S, Golia E et al. The Role of von Willebrand Factor in Vascular Inflammation: From Pathogenesis to Targeted Therapy. *Mediators Inflamm* 2017; 2017: 5620314. DOI: 10.1155/2017/5620314
205. Maugeri N, Campana L, Gavina M et al. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J Thromb Haemost* 2014; 12: 2074-2088. DOI: 10.1111/jth.12710

206. Rai V, Agrawal DK. The role of damage- and pathogen-associated molecular patterns in inflammation-mediated vulnerability of atherosclerotic plaques. *Can J Physiol Pharmacol* 2017; 95: 1245-1253. DOI: 10.1139/cjpp-2016-0664
207. He S, Bark N, Wang H et al. Effects of acetylsalicylic acid on increase of fibrin network porosity and the consequent upregulation of fibrinolysis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 53: 24-29. DOI: 10.1097/FJC.0b013e3181953e0f
208. Harris WH, Salzman EW, Athanasoulis CA et al. Aspirin prophylaxis of venous thromboembolism after total hip replacement. *N Engl J Med* 1977; 297: 1246-1249. DOI: 10.1056/NEJM197712082972302
209. Marcucci R, Cioni G, Giusti B et al. Gender and anti-thrombotic therapy: from biology to clinical implications. *J Cardiovasc Transl Res* 2014; 7: 72-81. DOI: 10.1007/s12265-013-9534-4
210. Barale C, Cavalot F, Frascaroli C et al. Association between High On-Aspirin Platelet Reactivity and Reduced Superoxide Dismutase Activity in Patients Affected by Type 2 Diabetes Mellitus or Primary Hypercholesterolemia. *Int J Mol Sci* 2020; 21. DOI: 10.3390/ijms21144983
211. Weisel JW, Litvinov RI. The biochemical and physical process of fibrinolysis and effects of clot structure and stability on the lysis rate. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008; 6: 161-180. DOI: 10.2174/187152508784871963
212. Erikssen J, Hellem A, Stormorken H. Chronic effect of smoking on platelet count and "platelet adhesiveness" in presumably healthy middle-aged men. *Thromb Haemost* 1977; 38: 606-611.
213. Beinrohr L, Kail E, Piros P et al. Anatomy of a data science software toolkit that uses machine learning to aid 'bench-to-bedside' medical research - with essential concepts of data mining and analysis explained. In: *Applied Sciences*: 2021: 12135-12151.
214. Fatah K, Silveira A, Tornvall P et al. Proneness to formation of tight and rigid fibrin gel structures in men with myocardial infarction at a young age. *Thromb Haemost* 1996; 76: 535-540.



215. Undas A. Prothrombotic Fibrin Clot Phenotype in Patients with Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism: A New Risk Factor for Recurrence. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 8196256. DOI: 10.1155/2017/8196256
216. Weisel JW, Litvinov RI. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood* 2013; 121: 1712-1719. DOI: 10.1182/blood-2012-09-306639
217. Tilvawala R, Nguyen SH, Maurais AJ et al. The Rheumatoid Arthritis-Associated Citrullinome. *Cell Chem Biol* 2018; 25: 691-704.e696. DOI: 10.1016/j.chembiol.2018.03.002
218. Damiana T, Damgaard D, Sidelmann JJ et al. Citrullination of fibrinogen by peptidylarginine deiminase 2 impairs fibrin clot structure. *Clin Chim Acta* 2020; 501: 6-11. DOI: 10.1016/j.cca.2019.10.033
219. Nakayama-Hamada M, Suzuki A, Furukawa H et al. Citrullinated fibrinogen inhibits thrombin-catalysed fibrin polymerization. *J Biochem* 2008; 144: 393-398. DOI: 10.1093/jb/mvn079
220. Chang X, Han J, Pang L et al. Increased PADI4 expression in blood and tissues of patients with malignant tumors. *BMC Cancer* 2009; 9: 40. DOI: 10.1186/1471-2407-9-40
221. Costa NA, Gut AL, Azevedo PS et al. Peptidylarginine deiminase 4 concentration, but not PADI4 polymorphisms, is associated with ICU mortality in septic shock patients. *J Cell Mol Med* 2018; 22: 4732-4737. DOI: 10.1111/jcmm.13717
222. Sokolove J, Brennan MJ, Sharpe O et al. Brief report: citrullination within the atherosclerotic plaque: a potential target for the anti-citrullinated protein antibody response in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2013; 65: 1719-1724. DOI: 10.1002/art.37961

## 10. Saját publikációk jegyzéke

Erzsébet Tóth, László Beinrohr, István Gurbucz, László Szabó, Kiril Tenekedjiev, Natalia Nikolova, Anikó I. Nagy, László Hidi, Péter Sótonyi, István Szikora, Béla Merkely, Krasimir Kolev:

Fibrin to von Willebrand factor ratio in arterial thrombi is associated with plasma levels of inflammatory biomarkers and local abundance of extracellular DNA

Thrombosis Research 209 (2022) 8-15

Imre Varjú, Erzsébet Tóth, Ádám Z. Farkas, Veronika J. Farkas, Erzsébet Komorowicz, Tímea Fellner, Balázs Kiss, Miklós Z. Kellermayer, László Szabó, András Wacha, Attila Bóta, Colin Longstaff, Krasimir Kolev:

Citrullinated fibrinogen forms densely packed clots with decreased permeability

J Thromb Haemost 2022;20:2862-2872

László Beinrohr, Eszter Kail, Péter Piros, Erzsébet Tóth, Rita Fleiner, Krasimir Kolev:  
Anatomy of a data science software toolkit that uses machine-learning to aid bench-to-bedside medical research - with essential concepts explained

Appl. Sci. 2021, 11, 12135.

Bence György, Erzsébet Tóth, Edit Tarcsa, András Falus, Edit I. Buzás:  
Citrullination: a posttranslational modification in health and disease

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 38 (2006) 1662-1677

## 11. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Kolev Kraszimir professzornak a sok segítséget a munkám során, azt, hogy mindig fordulhattam hozzá kérdéseimmel, köszönöm a publikáció és a dolgozat gondos átnézését. Nélküle a disszertáció nem született volna meg.

Köszönöm a munkáját minden intézeti és külső munkatársamnak, a közlemények szerzőtársainak. Külön köszönettel tartozom dr Varjú Imrének, dr Beinrohr Lászlónak, dr György Bencének, dr Buzás Editnek és témavezetőmnek, a közlemények első és utolsó szerzőinek.

Köszönöm dr Szabó Lászlónak és Bálint Krisztiánnak a szép pásztázó elektronmikroszkópos felvételeket, ill. Bálint Krisztiánnak a technikai segítséget is a saját kísérleteimhez.

Köszönöm dr Beinrohr Lászlónak, Kiril Tenekedjievnek és Natalia Nikolovának a számítástechnikai háttér megteremtését, valamint dr Ozohanics Olivérnek és dr Nagy Bálintnak a felmerülő számítástechnikai problémáim gyors megoldását.

Köszönettel tartozom a Biokémiai Tanszék jelenlegi és korábbi vezetőinek: dr Ádám Veronika, dr Tretter László, dr Csanády László professzoroknak, hogy támogatták munkámat.

Végül köszönöm a férjemnek és fiamnak, hogy lélekben támogattak, levették a vállamról a háztartás terhének egy részét.