# Az artériás thrombusszerkezet molekuláris és klinikai determinánsai

Doktori értekezés

**Dr. Kovács András**

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

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

Hivatalos bírálók: Dr. Széplaki Gábor egyetemi adjunktus, PhD
Dr. Tóth-Zsámboki Emese adjunktus, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sándor Péter ny. egyetemi tanár, DSc
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Gadó Klára főiskolai tanár, PhD
Dr. Kiss Róbert Gábor osztályvezető főorvos, PhD

Budapest
2015

**TARTALOMJEGYZÉK**

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE ... 3
1. BEVEZETÉS ... 6
1.1. A fibrinháló kialakulása és feloldódása ... 7
1.2. A fibrinszerkezet hatása a lysis folyamatára ... 8
1.3. A fibrinszerkezetet befolyásoló molekuláris tényezők ... 9
1.4. A fibrinszerkezetet és -lysist befolyásoló celluláris komponensek ... 10
1.5. Patológiás állapotok összefüggése a fibrinszerkezettel ... 12
1.6. A thrombus relatív összetételét meghatározó tényezők ... 14
1.7. A TAFI és CPB működése ... 16
2. CÉLKITŰZÉSEK ... 18
3. MÓDSZEREK ... 19
3.1. A fibrinoldás követése: turbidimetria ... 19
3.2. A fibrinoldás követése: konfokális lézer mikroszkópia ... 20
3.3. A plazminogén aktiváció vizsgálata ... 20
3.4. Thrombus minták gyűjtése ... 21
3.5. A betegek klinikai adatai ... 21
3.6. Pásztázó elektronmikroszkópia a thrombusszerkezet vizsgálatában ... 23
3.7. Immunfluoreszcencia a vérlemezkék vizualizálására ... 24
3.8. Immunfluoreszcencia a thrombusösszetétel meghatározására ... 25
3.9. Statisztikai módszerek ... 26
4. EREDMÉNYEK ... 28
4.1. Coronaria és perifériás thrombusok összetétele, a fibrinszálak vastagsága ... 28
4.2. A szisztémás sejtszámok és a vérlemezke-gátló gyógyszerek hatása ... 30
4.3. A mért ultrastrukturális paraméterek közötti összefüggések ... 33
4.4. A thrombusok korának hatása ... 34
4.5. A C-reaktív protein (CRP) szint hatása ... 37
4.6. A dohányzás, mint a vérrög szerkezeti determinánsa ... 38
4.7. Karboxipeptidáz B (CPB) és arginin hatása a fibrinszerkezetre ... 38
4.8. CPB hatása a lysisre, arginin hatása a lysisre ... 39
5. MEGBESZÉLÉS ... 44

5.1. Szerkezeti különbségek coronaria és perifériás artériás thrombusok között ... 44
5.2. Vér- és vérrög-összetétel közötti relációk ... 45
5.3. Mért ultrastrukturális jellemzők összefüggései ... 45
5.4. A thrombus-architektúra változása az idő függvényében ... 46
5.5. CRP hatásai a thrombusszerkezetre ... 47
5.6. Dohányzás hatásai a thrombusszerkezetre ... 47
5.7. CPB és arginin fibrinolysisre gyakorolt hatásai, in vivo relevancia ... 48
5.8. Klinikai és alapkutatási relevancia ... 50
6. KÖVETKEZTETÉSEK ... 52
7. ÖSSZEFOGLALÁS ... 54
8. SUMMARY ... 55
IRODALOMJEGYZÉK ... 56
SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE ... 72
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények ... 72
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ... 73

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| | | |
|---|---|---|
| AAA | - | hasi aorta aneurysma |
| ADAMTS-13 | - | *a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type-1 repeats-13* (von Willebrand faktor proteáz) |
| ADP | - | adenozin-difoszfát |
| AMI | - | acut myocardialis infarctus |
| Arg | - | arginin |
| ATP | - | adenozin-trifoszfát |
| Cor | - | coronaria |
| CPB | - | karboxipeptidáz B |
| CPN | - | karboxipeptidáz N |
| CRP | - | C-reaktív protein |
| CX | - | ramus circumflexus coronaria ág |
| DNS | - | dezoxi-ribonukleinsav |
| EKG | - | elektrokardiográfia |
| Ér Ø | - | érátmérő |
| Fem-pop | - | femoro-poplitealis |
| Fg | - | fibrinogén |
| FP | - | fluoreszcens fibrin/vérlemezke lefedettség arány |
| FP50 | - | fluoreszcens fibrin/vérlemezke lefedettség arány medián |
| GpIb | - | glikoprotein Ib vérlemezke-receptor |
| GpIIb/IIIa | - | glikoprotein IIb/IIIa vérlemezke-receptor |
| HEPES | - | 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav puffer |
| Hgb | - | haemoglobin |
| Ht | - | haematocrit |
| IgG | - | immunglobulin G |
| Ilio-fem | - | ilio-femoralis |

| | | |
|---|---|---|
| IQR | - | interkvartilis tartomány |
| LAD | - | bal anterior descendens coronaria ág |
| Lys | - | lizin |
| MI | - | myocardialis infarctus |
| mRNS | - | messenger RNS |
| NET | - | neutrophil extracelluláris csapda |
| NSTEMI | - | non-ST-elevációs myocardialis infarctus |
| PAI-1 | - | plazminogén aktivátor inhibitor-1 |
| PAI-2 | - | plazminogén aktivátor inhibitor-2 |
| PCI | - | percutan coronaria intervenció |
| Per | - | perifériás |
| Plt | - | vérlemezke |
| $R^2_{adj}$ | - | módosított determinációs koefficiens |
| RBC | - | vörösvértest |
| RCA | - | jobb arteria coronaria |
| RNS | - | ribonukleinsav |
| SD | - | standard deviáció |
| SNP | - | *single nucleotid polymorphism* |
| SpPL | - | Spectrozyme-PL szintetikus plazmin szubsztrát (H-D-norleucil-hexahirdotirozil-lizin-p-nitroanilid) |
| STEMI | - | ST-elevációs myocardialis infarctus |
| Szál Ø | - | fibrinszál átmérő |
| TAFI | - | thrombin által aktivált fibrinolysis inhibitor |
| TAFIa | - | a TAFI aktivált formája |
| Thr.kor | - | a tünetek felléptétől a thrombus eltávolításáig eltelt idő |
| TIMI | - | *Thrombolysis In Myocardial Infarction* (pontrendszer) |
| tPA | - | szöveti típusú plazminogén aktivátor |
| tPA-YFP | - | sárga fluoreszcens proteinnel jelölt tPA |

| | | |
|---|---|---|
| vWF | - | von Willebrand faktor |
| WBC | - | fehérvérsejt |
| YFP | - | sárga fluoreszcens protein |

Az értekezésben az idegen eredetű szakkifejezések írásmódját az Orvosi Helyesírási Szótár (Akadémiai Kiadó, 1992) iránymutatásainak nyomán igyekeztem alkalmazni. Olyan esetekben, ahol két hasonló jelentésű és alakú kifejezésnél eltérő írásmód javasolt (pl. thrombolysis ↔ fibrinolízis), a magyar nyelvű szakszövegekben való elterjedtséget, legfőképpen pedig a következetesség elvét szem előtt tartva használtam a fonetikus, ill. az eredeti írásmódot.

# 1. BEVEZETÉS

Az érpályán belül létrejövő vérrögök jelentős szerkezeti diverzitást mutatnak. A makroszkopikus jellegzetességek alapján történő osztályozás (így pl. a kórbonctanban klasszikusnak számító fehér és vörös thrombusok közötti különbségtétel) mellől az orvostudománynak egészen a közelmúltig nélkülöznie kellett a mikro- és ultrastrukturális felépítésre, illetve az azokat determináló molekuláris tényezőkre vonatkozó ismereteket. Ugyan régóta tudjuk, hogy a thrombusok kialakulását alapvetően befolyásolja a hemodinamikai milieu és a vér általános összetétele [1], az élettani alapjelenségek vérrögképződésre kifejtett hatását a mai napig nem ismerjük pontosan, ahogyan nem bizonyult könnyű feladatnak a laboratóriumi környezetben kimutatott összefüggések valós, *in vivo* relevanciájának megítélése sem. Másfelől jól ismert tény, hogy a thromusok szerkezete nagyban meghatározza azok viselkedését: kialakulásuk dinamikáját csakúgy, mint terápiás válaszkészségüket – ilyenformán tehát a teljes klinikai képet.

A „fejlett országok" haláloki statisztikáinak élén álló cardiovascularis betegségek [2] szinte mindig thrombus képződésével járnak. Eddigi kutatói munkám során az artériás thrombusok szerkezetét befolyásoló hatásokat vizsgáltam, elsősorban a vérrögök enzimatikus feloldásának aspektusából, mely terápiás modalitás a korlátozott hatékonyság és a korántsem elhanyagolható mellékhatások [3] miatt még bőven finomításra szorul. Az acut myocardialis infarctus kezelésében az utóbbi időben a katéteres beavatkozások térnyerésével párhuzamosan kiszorultak a kémiai thrombolysisen alapuló gyógyszeres eljárások, mindazonáltal az eszközös intervenció még intézményi szakellátás tekintetében kielégítő lefedettségű területen is csak korlátozottan, az acut kórlefolyás szempontjából jelentős időveszteséggel érhető el. A gyógyszeres thrombolysis nem csak alternatívája, de kiegészítője is lehet az eszközös beavatkozásnak, ha figyelembe vesszük, hogy az infarctust okozó vérrög thromboaspirációval el nem távolítható maradványai distalis embolizáció forrásai lehetnek, valamint hogy a kórfolyamat triggereként számon tartott atheroscleroticus plaque és az esetlegesen beültetésre kerülő coronaria-stent egyaránt rethrombosis táptalajául szolgálhatnak. Még nagyobb szükség lenne a gyorsan és biztonságosan alkalmazható gyógyszeres terápiára a stroke betegek ellátásában, mivel esetükben a katéter-intervenció csak bizonyos kitüntetett esetekben kivitelezhető, a rutinszerűen

alkalmazott thrombolysis pedig komoly vérzéses szövődményei miatt kizárólag cerebrovascularis betegségekre szakosodott centrumban végezhető, ahová a beteg eljuttatása csak komoly időveszteség, azzal párhuzamosan fokozódó neuronális károsodás, egyszersmind jelentősen romló prognosztikus kilátások árán lehetséges.

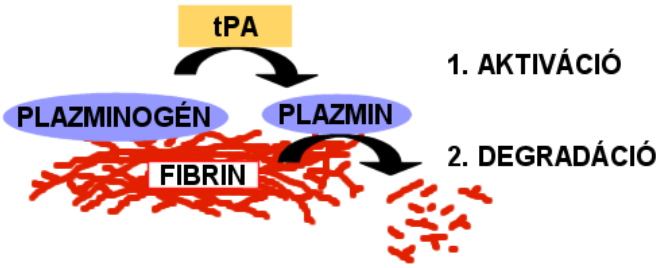
A thrombusok alapvetően két fő szerkezeti komponensből állnak: sejtes elemekből (thrombocyták, vérsejtek) és fibrinhálóból. Az artériás áramlási körülmények között domináló von Willebrand faktor-dependens thrombocyta adhézió és aggregáció proteolyticus gátlását kutatómunkám kezdetén vizsgáltam; az ezzel kapcsolatos eredmények képezték alapját szakdolgozatomnak.

Jelen dolgozatban egyrészt a fibrinháló szerkezetét befolyásoló tényezőkkel foglalkozom, másrészt az artériás thrombosisban szenvedő betegek klinikai paraméterei és a betegekből eltávolított thrombusok ultrastrukturális architektúrája közötti összefüggésekkel.

### *1.1. A fibrinháló kialakulása és feloldódása*

A koagulációs kaszkád utolsó enzimeként képződő thrombin proteolyticus aktivitása révén a vízoldékony fibrinogénből négy fibrinopeptid leválása mellett fibrin monomereket hoz létre. A monomerek hossztengelyükkel párhuzamos irányban összetapadnak, ilyen módon hosszú fibrin protofibrilek jönnek létre, e protofibrilek pedig oldalirányú polimerizációval elágazó rosthálózatot alakítanak ki. Az így keletkező fibrinháló képezi vázát mind az érsérülés során kialakuló fiziológiás koagulumnak, mind az érpályán belül patológiás körülmények között létrejövő thrombusnak.

A kialakult fibrinháló térbeli kiterjedésének korlátozása céljából, illetve vérzéscsillapító funkciójának betöltése után annak teljes feloldására a szervezet hatékony proteolyticus mechanizmust fejlesztett ki. A fibrinolysis folyamatának sémáját az *1. ábra* mutatja. Ennek első mozzanataként a vérben aktív enzimként keringő, de kofaktor (pl. fibrin) hiányában gyenge hatásfokú tPA a fibrinmolekulához jellegzetes fehérjedoménje (kringle) segítségével kikötődve hasítja és aktiválja az ugyanolyan mechanizmussal kihorgonyzott plazminogént. A




***1. ábra:*** **A fibrinolysis folyamatának sémája.**

felaktivált plazmin azután a protofibrilek hasításával bontja a fibrinhálót, szolubilis degradációs termékeket bocsátva ezzel a keringésbe.

### *1.2. A fibrinszerkezet hatása a lysis folyamatára*

A fibrin enzimes feloldásának dinamikáját és hatékonyságát egyaránt befolyásolják az enzimaktiváció körülményei és a feloldani kívánt vérrög fizikai felépítése. Míg az enzimatikus lysis fiziológiás körülmények között a thrombus belseje felől megy végbe, addig a terápiás céllal beadott plazminogén aktivátor (többnyire tPA és annak módosított változatai) először annak felszínén fejti ki hatását és a „lysisfront" csak lassan éri el a thrombus mélyebben fekvő részeit. Mikroszkopikus szinten azonban a hasítás mindkét esetben azonosan zajlik. Korábban feltételezték, hogy a plazminogén aktivátorok működése nyomán létrejövő plazmin a szálak felszínét kikezdve fokozatosan vékonyítja el azokat, míg végül folytonosságuk megszakad. Elektronmikroszkópos és konfokális mikroszkópos felvételeken ugyanakkor a felszínen zajló lysis környezetében nem vékonyabb, hanem vastagabb rostok és következményesen kialakuló nagyobb pórusok figyelhetők meg. E vastagabb szálak legvalószínűbb kialakulási mechanizmusa a szomszédos, már elhasított rostok laterális irányú összecsapzódása [4,5,6]. További meglepetésként szolgált, hogy a vékony szálú, nagy rostsűrűségű fibrin teljes feloldódása elhúzódóbb, a lysisfront haladása pedig lassabb, mint a vastag szálú, lazább szerkezetű fibrin esetében, ugyanakkor egyetlen fibrinszálat vizsgálva a vékony szálak lysise gyorsabb, mint a vastagaké [7,8]. A jelenség kézenfekvő magyarázata, hogy a vékonyabb szálakból álló hálózat összességében több szálat tartalmaz, ezért bár az individuális szálak hasítása gyorsabb, a teljes lysis több időt vesz igénybe. Fentiek alapján a folyamat úgy képzelhető el, hogy a fibrinrostok lysise nem fokozatos vékonyodás, hanem hossztengelyükre merőleges irányú hasítás formájában valósul meg, melynek során a plazmin laterális irányban vándorol a fibrin protofibrilek között. Enzimkinetikai vizsgálatok tanúsága szerint ez a mechanizmus előnyösebb, mintha az enzim csupán passzív diffúzióval terjedne a pórusokon keresztül [9,10]. A finomabb fibrinszerkezet tehát ellenállóbb a plazmin hatás iránt, ezzel szemben a tPA-dependens plazminképződéshez jobb aktivációs felszínt szolgáltatva elősegíti azt. Mindamellett megjegyzendő, hogy a tPA koncentráció emelésével a plazminogén aktivációban tapasztalt különbségek csökkennek a durva és a finom fibrinszerkezet között [6].

Intravénásan beadott thrombolyticum esetén a plazminogén aktivátor szállítása a vérkeringés feladata. A thrombust elérve az enzim feldúsul annak felszínén, de bizonyos mértékig penetrál is abba. Ugyan a thrombus pórusmérete lehetővé teszi a passzív diffúziót, az így bejutó fehérje mennyisége elhanyagolható, ezért fontos faktor a thrombus permeációja, amit a pórosuk méretén kívül a felszínre ható nyomás is befolyásol. Utóbbit *in vitro* modellekben az alvadékra nehezedő folyadékoszlop hidrosztatikai nyomása [11], *in vivo* az artériás áramlási erő szolgáltatja, jelentősen felgyorsítva a fibrinre specifikus lysis sebességét [12].

Természetesen a fibrin monomerek egymáshoz képesti szerveződése mellett azok strukturális varianciája is befolyásolhatja a végső architektúrát. Így pl. a fibrinogén mRNS alternatív splicingjával létrejövő γ'fibrinogénből képződő fibrin (ld. még *1.5. fejezet*) ellenállóbb, lysise elhúzódó [13].

### *1.3. A fibrinszerkezetet befolyásoló molekuláris tényezők*

A 0,1-5 μm átmérőjű pórusokat közrezáró fibrinrostok vastagsága 100-200 nm között változik [14,15], a pontos rostvastagságot azonban több tényező is befolyásolja. Az egyik legjelentősebb tényező a thrombin koncentrációja [16], amelyben igen nagy különbségek lehetnek, lévén képződését és aktivitását összetett mechanizmusok szabályozzák. Tiszta *in vitro* rendszerben, tisztított fibrinogén és thrombin oldatának elegyítésekor a thrombin koncentráció 10 nM-ig növelésével párhuzamosan a fibrinrostok vastagsága 198 nm-ig nő, azonban annak további növelésével a rostátmérő csökkenni kezd és 40 nM thrombinnál 99 nm körüli értéket mutat [14]. A thrombin közvetlen hatásán kívül indirekt módon is befolyásolja a fibrin struktúrát, amennyiben összefüggés mutatható ki az aktivált XII-es faktor szintje és a rostdenzitás [17], valamint az aktivált XIII-as faktor jelenlét és a fibrinháló stabilitása között (ld. lejjebb). Hatással van a rostok vastagságára a fibrinogén koncentrációja is, noha ez *in vivo* sokkal kisebb ingadozást mutat (5 – 20 μM), mint a thrombin aktivitása: magasabb fibrinogén koncentráció több és nagyobb méretű fibrinszálat eredményez [18], hasonlóképpen a fibinogén-fibrin átalakulás sebességének lassítása vastagabb szálú és porózusabb fibrinhálózat kialakulásához vezet [14].

Vérplazmában mérve a két komponens hatását a végső rostátmérőre hasonló összefüggések figyelhetők meg [19], tehát ezek az élő szervezetben is releváns tényezőknek tekinthetők. Ugyanakkor a vérkeringésben több, a fenti alapreakciót

jelentősen módosító ágens is jelen van, amelyek lényegesen komplexebb összefüggéseket eredményeznek. Ilyen, a tiszta rendszerből hiányzó elemek például a fiziológiásan vagy patológiásan képződő immunglobulinok [20,21], valamint az albumin [22]. Ezek a makromolekulák tömeghatásuk révén nagy lokális koncentrációváltozásokat idézhetnek elő, másrészt kiválthatják a fibrinogén molekulák asszociációját is [23], jelentősen módosítva ezáltal a fibrinképződés kinetikai paramétereit. A fibrinogén molekulák nem csak egymáshoz, hanem számos más plazmafehérjéhez is kötődnek [24], ezek közül a thrombusszerkezet szempontjából talán a legfontosabb a XIII-as faktor, amely kovalens γ-glutamil-ε-amino-lizin keresztkötések kialakításával egymáshoz kapcsolja a fibrin monomerek γ- és α-láncait [25], valamint hozzájuk köti a fibrinolysis inhibitoraiként ismert $\alpha_2$-plazmin inhibitort [26], thrombin által aktivált fibrinolysis inhibitort (TAFI) [27] és plazminogén aktivátor inhibitor 2-t (PAI-2) [28], ily módon stabilizálva és a lysis iránt ellenállóbbá téve a thrombust.

A fehérjéken kívül egyéb faktorok is szerepet játszanak a fibrinrost vastagságának kialakításában. Növekvő só koncentráció kevesebb protofibrilből álló fibrinszálak és porózusabb fibrinháló létrejöttének kedvez: a NaCl koncentráció 50-ről 400 mM-ra növelésével az átlagos szálátmérő 180 nm-ről 39 nm-re csökken, a hálózat két elágazási pontja közötti átlagos távolság pedig 1690 nm-ről 93 nm-re. Egyéb ionkoncentrációk is befolyásolják a szerkezetet, pl. $Ca^{2+}$ jelenlétében vastagabb rostok keletkeznek és a gél porozitása fokozódik, a lúgos vegyhatású közeg pedig a finomabb rostszerkezetnek kedvez [15,29,30].

### *1.4. A fibrinszerkezetet és -lysist befolyásoló celluláris komponensek*

Nemcsak a vér szolubilis komponensei, de sejtes elemek is jelentős szereppel bírnak a fibrinszerkezet alakításában. Fiziológiás haematocrit értéknek megfelelő vörösvértest-szám mellett kétszeres pórusméretű fibrinháló jön létre a sejtmentes körülmények között mérthez képest [31]. A vörösvértestek jelenléte a fibrinszál átmérő jelentős csökkenésével jár: 40% (v/v) vörösvértest a rostátmérőt 150 nm-ről 92, illetve 96 nm-re csökkentette, függően attól, hogy az extracelluláris fibrinogén koncentrációt állandó értéken tartották vagy az a sejtek térfoglaló hatásának következtében emelkedett. A fenti arányban jelenlévő vörösvértestek mind a homogén rendszerben zajló, mind a felszínre rétegzett enzimmel indított fibrinolysist késleltették és gátolták a tPA indukálta plazminogén aktivációt. A tapasztalt hatások mindegyike antagonizálható volt

eptifibatid hozzáadásával, ami megerősíti, hogy a vörösvértestek a thrombocytákon már régóta ismert GpIIb/IIIa-integrinhez hasonló, azzal azonos gátlószer-érzékenységű receptor közvetítésével kapcsolódnak a fibrinogénhez [32].

A vérlemezkék kontraktilis apparátusuk révén a hozzájuk kihorgonyzott fibrinszálak összehúzásához, ennek megfelelően az egész thrombus retractiójához vezetnek, mind a mechanikai [33], mind a kémiai (lyticus) [34,35] hatásokkal szemben ellenállóbb, tömörebb szerkezetű vérrögöt alakítva ki ezáltal. Ezenkívül számos, a thrombusszerkezetre ható komponenst bocsátanak ki: pl. vérlemezke-gazdag vérrögökben a miozin és az aktin koncentrációja mikromoláris nagyságrendet is elér. A miozin szabad formában a fibrinhez hasonlóan a plazmin kofaktora és szubsztrátja, azaz képes megóvni az enzimet inhibitoraitól, a thrombusban azonban kompeticióba lép a fibrinnel a plazmin kötéséért, ezzel gátolja a fibrinolysist [36,37]. Az aktin jelenléte vékonyabb fibrinszálak, következésképp a lysis iránt ellenállóbb fibriháló létrejöttével társul [38]. Szintén a vérlemezkékből kerülnek a thrombusba a foszfolipidek [39] és a szabad zsírsavak [40]. A foszfolipidek hosszabb ideje kialakult arteriás vérrögökben a fibrinnél is nagyobb koncentrációt érhetnek el [41], felületaktív tulajdonságuk révén jelentősen befolyásolhatják az enzimatikus emésztés folyamatát [42], diffúziós barriert képezhetnek a plazminogén aktivátorok (pl. tPA) számára és gátolhatják a plazmin működését is [43]. Mindezeknél fundamentálisabb hatás, hogy a foszfolipid-asszimetriáját vesztett membrán mind vérlemezkéken, mind erythrocytákon [44] aktivációs felszínt szolgáltat a koagulációs kaszkád reakciói, közvetve tehát a fibrinképződés számára. Thrombocyták környezetében nagyobb mennyiségű, vékonyabb szálú fibrin található, amelyért a vérlemezke-felszínen képződő thrombin felelős [34,45]. Ez a jelenség a vékony szálú, sűrű fibrin fokozott lyticus rezisztenciája révén nemcsak a vérrög szerkezeti, de a fibrinolysis kinetikai heterogenitását is fokozza. Aktivációjukat követően a thrombocyták koagulációs faktorokat és inhibitorokat is szekretálnak, így nemcsak a fibrinháló stabilizálásában (szöveti faktor, thrombin, XIII-as faktor), de a plazminogén aktiváció (PAI-1) és a plazmin funkció ($\alpha_2$-plazmin inhibitor) gátlásában is aktívan közreműködnek.

A thrombusokban állandóan megtalálható celluláris elemek, a vérlemezkék és vörösvértestek mellett változó számban leukocyták is jelen vannak [46]. Az elektronmikroszkóp alatt jól felismerhető morfológiájú granulocyták és macrophagok

nemcsak passzív résztvevői a vérrög képződés folyamatának, hanem változatos módokon be is kapcsolódnak a thrombus sorsát kísérő bonyolult összjátékba. Maguk a sejtek szorosan kapcsolódnak fibrinhez és az artériás thrombusok másik fő strukturális proteinjéhez, a von Willebrand-faktorhoz [47]. Képesek e szerkezeti fehérjék [48-50,III], valamint a XIII-as faktor [51] extracelluláris bontására, illetve a fibrin közvetlen fagocitózisára [52] is, ezenkívül interakcióba lépnek a fibrinolysis enzimeivel és azok inhibitoraival [összefoglalva: 53]. A veleszületett immunitás korábban homály fedte, de mostanra kulcsfontosságú elemeként számon tartott NET-osis során a granulocyták DNS-ből és hisztonfehérjékből álló extracelluláris csapdákat (NET-eket) bocsátanak ki, amelyek elsődleges, antimikrobiális funkciójuk mellett befolyásolják a thrombus-architektúrát és a fibrinolysis folyamatát is. DNS és hisztonok jelenlétében vastagabb fibrinszálakból (123 nm *vs.* 84 nm) álló alvadék keletkezik, amely stabilabb és rigidebb is egyben [54]. A hisztonok hozzáadása mellett létrehozott thrombus sűrűbb (a fényáteresztés-változást detektáló eljárások terminusával élve ’turbidabb’), lysise pedig elhúzódóbb a hisztont nem tartalmazó kontrollhoz képest [54].

Végezetül a vér intrinsic komponensein kívül az áramlási milieu is hatással van a fibrinszerkezetre. Bár az ezt érintő kutatási eredmények helyenként egymásnak ellentmondóak [55,56], egyesek felvetik, hogy a gyorsabb véráramlás az áramlási iránnyal párhuzamosan vastagabb fibrinrostokat alakít ki, amelyeket merőleges irányú vékonyabbak kötnek egymáshoz. Az így kialakuló vérrög magasabb szakítószilárdságú, a deformációval szemben ellenállóbb [56].

### *1.5. Patológiás állapotok összefüggése a fibrinszerkezettel*

A fibrinszerkezet jellegzetességei és a konkrét patológiás állapotok közötti összefüggések celluláris és szubcelluláris alapreakciói általában nem ismertek, némely esetben azonban egyértelműnek látszik a fent leírt molekuláris determinánsok szerepe a betegséghez társuló szerkezeti sajátosság kialakításában. Így például a vér emelkedett fibrinogén koncentrációját találták számos thrombosissal járó betegségben: koszorúér megbetegedésben [57,58], stroke-ban [57], perifériás érbetegségben [59], hasi aorta aneurysmához társultan [60] és vénás eredetű thrombosisok, pl. pulmonális embolia [61] esetén is. Hogy a magas fibrinogén szint oka vagy következménye-e az említett betegségeknek, máig nem tisztázott. A fibrinogén homocysteinilációját figyelték meg hyperhomocysteinaemiával járó állapotokban és az ilyen betegek plazmájából mind *ex*

*vivo* előállított, mind *in vivo* képződő thrombusokat rövidebb, vastagabb rostok és csökkent permeabilitás jellemzik, a terápiás célú folsav bevitel ugyanakkor e hatásokat antagonizálja [62-64]. Acut myocardialis infarctuson átesett fiatal betegek [65] és előrehaladott koszorúér betegségben szenvedő idősebbek [66] egyaránt rövidebb szálú, rigidebb fibrinthrombusok kialakítására hajlamosak *ex vivo* körülmények között vizsgálva. Utóbbi betegcsoportban az emelkedett C-reaktív protein (CRP) szint, a lipoprotein(a) jelenléte és a magasabb életkor egyaránt vékonyabb szálú, kevésbé permeábilis, kisebb pórusméretű fibrin fenotípussal társul és ugyanilyen fibrinszerkezet kialakítására hajlamosak a diabeteses betegek is [66]. A dohányzás, mint a káros környezeti ágensek legáltalánosabbika, acut hatással is bír a fibrinszerkezetre: cigarettafüst expozíció után vékonyabb szálú, denzebb fibrinháló kialakulása figyelhető meg *ex vivo* körülmények között [67].

Nem csak maguk a kórállapotok, de a terápiásan alkalmazott vegyületek is befolyásolhatják a vérrög felépítését. A cardiovascularis betegségek primer és secunder prevenciójára egyaránt alkalmazott aspirin hatására a fibrinogén molekulák acetilálódnak [68], ezenkívül jelenlétében nagyobb pórusméretű és vastagabb szálú fibrinháló létrejöttét figyelték meg *in vitro* és *ex vivo* körülmények között is [69-71]. Felvetődött továbbá, hogy a kis dózisban (75 mg/nap) adagolt aspirin a thrombusszerkezet szempontjából kedvezőbb hatású, mint a nagyobb (>300 mg/nap) mennyiség beviteléből álló terápia [72]. Ugyanakkor aspirinre nem reagáló, a terápiás időszak alatt is acut cardiovascularis eseményen áteső betegek esetében a nem kezeltekhez hasonló, rigid, vékony szálú, a fibrinolysis iránt ellenállóbb *ex vivo* thrombusok alakulnak ki [73]. A heparinszármazékok [74,75], csakúgy, mint az új orális antikoaguláns rivaroxaban [76] és dabigatran [77], a lazább szerkezetű, nagyobb pórusméretű, permeábilisabb, lysis iránt kevésbé ellenálló fibrinthrombusok képződésének irányában hatnak és hasonló fibrinhálózatot figyeltek meg a hyperlipidaemia kezelésében használt statinok és fibrátok esetében is [78]. Utóbbi megfigyelés és a csökkent permeabilitású thrombusok által jellemzett szívérrendszeri betegek nagy többségében fellelhető hypercholesterinaemia felveti a koleszterin közvetett szerepét a fibrin struktúra alakításában.

Számos adat szól a thrombusszerkezet genetikai determináltságáról és heritabilitásáról. Koszorúér betegségben [79], perifériás artériás betegségben [80] és

vénás thromboemboliában [81] szenvedők közvetlen rokonai a betegekhez hasonló vékony szálú, csökkent permeabilitású thrombusok kialakítására hajlamosak. Utóbbi megfigyelések pontos genetikai oka nem ismert, de elképzelhető, hogy a magasabb koleszterin szint felelős közvetlenül a betegek és hozzátartozóik között tapasztalható thrombusszerkezeti hasonlóságért [80]. Egypetéjű ikreken végzet vizsgálatok a fibrinszerkezet 40-45%-os örökölhetőségét mutatták [82]. A fibrin háló felépítésének különbözőségét több génpolimorfizmussal is összefüggésbe hozták, az irodalomban gyakran említettek ezek közül a fibrinogén Aα- és Bβ-láncának, illetve a XIII-as faktornak egy nukleotidot érintő polimorfizmusai (SNP) [83-91]. Az SNP-ken kívül a plazmában keringő fibrinogén kb. 8-15%-ban a γ-lánc mRNS-ének alternatív splicingjával létrejövő γ'-láncot hordoz [92], amely addicionális XIII-as faktor és thrombin kötőhelyekekel bír [93,94] és amely vékony szálú, ellenálóbb fibrinháló kialakulásának kedvez [95,96].

### *1.6. A thrombus relatív összetételét meghatározó tényezők*

A thrombus komponenseinek egymáshoz viszonyított aránya nagyfokú különbségeket mutat vérrög és vérrög között. Régóta ismert, hogy az artériás rendszerre jellemző áramlási környezetben, azaz magas (>500 $s^{-1}$) nyírási sebesség esetén a von Willebrand faktor-dependens folyamatok dominálnak [97,98]. Az így képződő thrombusokban a vérlemezkék a von Willebrand faktor glikoprotein (vWF) segítségével tapadnak ki a megjelenő thrombogén felszínhez (pl. érsérülés vagy plaque-ruptúra esetén a kollagén rostokhoz), az aggregáció folyamata során pedig egymáshoz [99]. Az igen gyors kapcsolódási sebességgel jellemezhető vWF–GpIb-vérlemezke receptor interakció lehetővé teszi, hogy a thrombocyták emelkedett áramlási sebesség mellett, pl. kis artériákban vagy szűkült érlumen esetén is kikötődhessenek a szabaddá vált thrombogén felszínhez [100]. A kötés a gyors kialakulás mellett nagy disszociációs rátával is jellemezhető, emiatt irreverzibilis kapcsolat kialakítására nem képes. Tehát az adhézió kezdetén a thrombocyták bár sokkal lassabban, de továbbra is állandó sebességgel mozognak az áramlás irányának megfelelően, gördülve az érfali kollagén rostok mentén. Ezalatt következik be az aktiváció, amelynek során az állandó, irreverzibilis kötés kialakítására képes GpIIb/IIIa-integrin teszi teljessé az adhéziót és indítja el az aggregációt [101,102]. A vérlemezkék szolubilis adhezív proteineket kötnek meg, elsősorban fibrinogént és vWF-t, amelyek a thrombocytamembránra való lerakódásuk

révén újabb réteg thrombocyta kitapadását segítik elő [103]. Az így lerakódott thrombocytaréteg ugyancsak aktiválódik és ezek az események egészen addig ismétlődnek, amíg a thrombus a) fiziológiás szituációban elég naggyá nem válik a vérzés elállításához, illetve b) thrombosis esetén ki nem tölti a teljes érlument. 100 $s^{-1}$ alatti nyírássebességnél, azaz vénás áramlási körülmények között a fibrinogén képez hidat a GpIIb/IIIa-integrinek között és kapcsolja össze a thrombocytákat [104], magas nyírássebességnél (pl. az arteriolák területén) viszont a fibrinogén egyedül nem képes összetartani a thrombocytadugót, stabil thrombus csak vWF jelenlétében jön létre [105], így tehát a thrombusok jelentős szerkezeti komponense a vWF is. Ezek miatt a vWF fehérje enzimatikus bontása kézenfekvő eszköz lenne a thrombolyticus terápiában. A vWF proteolysisére a néhány évvel ezelőtt megismert és leírt ADAMTS-13 mellett egyéb proteázok, pl. a klasszikusan fibrinolyticus plazmin, illetve a fehérvérsejt eredetű elasztáz is képesek az áramlási szituációtól és az uralkodó nyíróerőktől függő módon [III].

Az artériás körülmények között keletkező thrombus tehát általában több vérlemezkét és relatíve kevesebb fibrint tartalmaz [106], mint a vénás oldalon kifejlődők. Ugyanezen a gondolatmeneten haladva, a magasabb nyírási sebesség jellemezte arteriolákban [97] vérlemezkében gazdagabb thrombusok létrejöttét várnánk a nagyobb lumenű verőerekhez képest. Ugyanakkor a nagy nyírási sebesség jellemezte artériás rendszeren belül is különböző szerkezetű thrombusok jöhetnek létre anatómiai lokalizáció szerint, pl. a hasi aorta aneurysmában kifejlődő thrombus celluláris komponenseket alig tartalmaz [107], hozzá kell azonban tenni, hogy ezek a kisér elzáródást okozó vérrögökhöz képest jóval hosszabb idő alatt alakulnak ki. Talán pont ez a kitétel ihlette az artériás thrombusszerkezet temporalis aspektusait vizsgáló tanulmányokat. ST-elevációs infarctust okozó coronaria thrombusok szerkezetében például jelentős különbség van attól függően, hogy azt a tünetek fellépte utáni 6 órán belül vagy azt követően távolították-e el: míg az irodalmi adatok alapján a friss thrombusok vérlemezkében gazdagok, a késeiek jóformán kizárólag fibrint és kevés vörösvértestet tartalmaznak [108,109]. A vér alacsony thrombocyta-tartalma a stabil vérrög képződésének akadályozásával haemorrhagiás szövődményekhez vezet, mindazonáltal a magas vérlemezkeszámmal jellemzett esszenciális thrombocytaemia is gyakran inkább vérzéses, semmint thromboticus szövődményekkel társul [110].

Mindezek alapján a szisztémás thrombocytaszám önmagában nem, csak egyéb faktorokkal (pl. haematocrit, ld. lejjebb) együtthatva determinálja a vérrög thrombocyta-tartalmát.

A vér vörösvértest-tartalma és a vérzési idő közötti összefüggés egyértelmű: az anaemiás betegeknél tapasztalható megnyúlt vérzési idő korrigálható mosott vörösvértestek transzfúziójával változatlan vérlemezkeszám mellett [111]. A magasabb haematocrit vérlemezke-kitapadást elősegítő hatásában az áramlás szerepe tűnik kézenfekvőnek: az érlumenben centrálisan keringő vörösvértesttömeg a thrombocytákat az érfal felé nyomva segíti azok interakcióját az endothel folytonossági hiányakor exponálódó thrombogén felszínnel. A sztérikus hatáson túl a vörösvértestek kémiai úton is segítik a thrombocyták aktiválódását: alacsony $pO_2$, savas pH és mechanikai deformáció hatására vérlemezke aktivátor molekulákat, ATP-t és ADP-t bocsátanak ki [112,113]. Ugyanakkor emlősökön végzett mérések csak lassú (vénás) áramlás esetén találtak összefüggést a thrombocyták kitapadási hajlama és a haematocrit között: ilyen áramlási sebességnél az alacsony haematocrit kedvez a thrombocyták kitapadásának és meredekebbé teszi a szisztémás vérlemezkeszám – vérlemezke depozíció közötti összefüggést [106].

A vörösvértestek beépülése a vérlemezkéknél kevésbé specifikus mechanizmus útján történik [114], noha a fibrinogénhez a vérlemezkén megtalálható GpIIb/IIIa integrinnel rokon, ahhoz hasonló gátlószer-szenzitivitást mutató receptor segítségével kötődnek [32,115]. A thrombus vörösvértest-tartalma mind lassú, mind gyors áramlási körülmények között egyértelműen függ a haematocrittól [106].

### *1.7. A TAFI és CPB működése*

A plazmin proteolyticus aktivitása nyomán a fibrinen új C-terminális lizin aminosavak válnak elérhetővé, amelyek újabb tPA, plazminogén és plazmin molekulákat kötnek meg. A plazminogén aktivátor (tPA) és szubsztrátja (plazminogén) a kofaktorhoz (fibrin) kötődve, egymással közvetlen közelségbe kerülve hatékony, inhibitoroktól védett aktivációs komplexszé áll össze; ilyen módon a fibrinolysis pozitív feedback szabályozása valósul meg [116]. Ezt az amplifikációs mechanizmust megakadályozva gátolja a fibrinolysist a plazma karboxipeptidáz TAFI, amely bázikus aminosavakat (lizint és arginint) hasít le a peptidek C-terminálisáról [117]. A TAFI thrombin-thrombomodulin komplex általi aktiválása után azonban rendkívül gyorsan, néhány

perces féléletidővel elveszíti aktivitását [118], emiatt kísérletes vizsgálatakor a vele homológ, szintén bázikus aminosavakra specifikus, de stabilabb karboxipeptidáz B-t (CPB) használják [119]. A TAFI élettani szerepe a mai napig nem teljesen tisztázott. Vérplazmában mért magas szintjét egyaránt összefüggésbe hozták fokozott és csökkent thrombosis rizikóval [120-124], *in vitro* viselkedése pedig ellentmondásokat mutat: pl. $\alpha_2$-plazmin inhibitor jelenlétében a TAFI bizonyos koncentráció felett profibrinolyticussá válik, amit nem magyaráz a plazmin inhibitor C-terminális lizinjének emésztése [125]. Minthogy a fibrinolysist jelentősen befolyásolja a fibrin szerkezete (ld. korábban), adja magát a kérdés, hogy a vérrög kialakulásának idején aktiválódó TAFI-nak van-e a fibrin szerkezetét moduláló aktivitása, ami egyúttal kihathat a fibrinolysisre is.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozat további részében bemutatott kísérletekben az alábbi kérdésekre keresem a választ.

- Milyen alapvető szerkezeti különbségek figyelhetők meg coronaria és perifériás thrombusok között?
- Milyen interakció áll fenn a thrombus komponensei között a végső thrombus-architektúra kialakításában?
- A thrombus kialakulásától az eltávolításáig eltelt idő miként hat a szerkezetére?
- A fibrinolysis/thrombolysis szempontjából releváns szerkezeti jellegzetességek kialakulásában milyen tényezők játszanak szerepet?
- Általában véve milyen klinikai determinánsai vannak az artériás thrombusszerkezetnek?
- Alkalmas-e az immunfluoreszcens megjelenítés a thrombus összetételének kvantitatív elemzésére, helyettesítheti-e a bonyolultabb elektronmikroszkópos feldolgozást?
- A TAFI / CPB működése mi módon érinti a fibrinháló felépítését?
- A TAFI / CPB hatásaiban szerepet játszik-e az arginin?
- A TAFI / CPB enzimhez köthető szerkezeti változások milyen konzekvenciákat hordoznak a fibrinolysis szempontjából?

# 3. MÓDSZEREK

## *3.1. A fibrinoldás követése: turbidimetria*

A fibrin kialakulása során képződő polimerek mérete összevethető a fény hullámhosszával, ezért a fibrin alvadékon áteresztett fény szóródás miatt veszít intenzitásából. Az így kialakuló intenzitáscsökkenés, a tulajdonképpeni turbiditás (opálosság) információt hordoz a fibrin szerkezetéről is (ti. arányos a szálak vastagságával). A látható fény tartományába eső 340 nm-es hullámhosszon mért intenzitáscsökkenéssel nyomon követhető a fibrin kialakulásának és a már kialakult fibrin oldásának folyamata. Ezen a módon microplateben nagyszámú párhuzamos mérés végezhető, mérhető tisztított fibrinogénből és vérplazmából előállított alvadék is, ezenkívül a módszer további előnye, hogy segítségével egyaránt modellezhető az alvadék belsejében homogénen eloszló enzim által katalizált és a felszínre rétegzett aktív proteázzal vagy plazminogén aktivátorral indított fibrinolysis.

A 96 minta mérésére alkalmas microplateben 100 µL végtérfogatban 6 µM fibrinogént és változó koncentrációjú arginint illeve karboxipeptidázt tartalmazó 7.4 pH-jú, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl összetételű pufferhez 20 nM thrombin adtunk. Amennyiben a lysist felszíni tPA-val indítottuk, a fibrinogénhez előzőleg 1 µM plazminogént is kevertünk és 30 perces alvasztási periódus után rétegeztünk tPA-t az alvadék felszínére 15 nM koncentrációban. A rendszerben maximális hatást kifejtő karboxipeptidáz B koncentrációt (8 U/mL) használtuk a többi mérési elrendezésben is. Abban az esetben, ha a lysist alvadékban egyenletesen eloszló tPA-val indítottuk, a fibrinogén 0.26 µM plazminogént is tartalmazott, a 0.1 nM koncentrációjú tPA-t pedig a thrombinnal együtt adtuk az elegyhez. Amennyiben a lysist aktív plazminnal indítottuk, a koncentrációját úgy választottuk meg, hogy az oldás 5 órás időtartományon belül végbemenjen: 2-10 nM a homogénen eloszlatott plazmin és 0.5-2 µM a felszínen alkalmazott plazmin esetén. Az alvadást és a lysist a fény abszorbancia regisztrálásával követtük 340 nm-es hullámhosszon, 37°C-on, Zenyth 200rt spektrofotométerben (Anthos Labtec Instruments GmbH, Salzburg, Ausztria). Az abszorbancia értékeket normalizált formában kezeltük, hogy össze tudjuk hasonlítani a lyticus sebességeket az azonos mennyiségű fibrintartalom ellenére is különböző maximális turbiditást mutató mérések között. A turbiditásnak a maximális érték bizonyos hányadára csökkenéséig

eltelt időt ($t_{0.5}$ az 50%-ra, $t_{0.1}$ a 10%-ra csökkenésig) használtuk a fibrinolyticus aktivitás kvantitatív jellemzésére. Néhány esetben arginint vagy karboxipeptidáz B-t tartalmazó *plazmát* alvasztottunk 15 nM thrombin és 12.5 mM $CaCl_2$ hozzáadásával. Ha a plazma alvadék feloldását belekevert tPA-val végeztük, a tPA koncentráció 0.8 nM volt, míg a felszíni tPA-val indított lysisnél 30 nM.

### *3.2. A fibrinoldás követése: konfokális lézer mikroszkópia*

A fibrin alvadék elkészítéséhez tisztított, 2%-ban vörös fluorophorral (Alexa Fluor 546) jelölt 6 μM koncentrációjú fibrinogént alkalmaztunk 7.4 pH-jú, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl összetételű pufferben, amelybe alvasztás előtt 1.5 μM plazminogént, és karboxipeptidázt vagy arginint is kevertünk. Az alvadékot 0.4 mm magas, 30 μl térfogatú csatornát tartalmazó, előre gyártott lemezben (Ibidi GmbH, Martinsried, Németország) hoztuk létre 15 nM thrombin hozzáadásával, 30 perces inkubációval. Ezt követően sárga fluoreszcens proteinnel jelölt tPA-t (tPA-YFP, pFastBac-tPA-val expresszálva [6]) rétegeztünk az alvadék felszínére és a két fluorophor excitációs hullámhosszának (tPA-YFP: 488 nm; $Alexa_{546}$-fibrinogén: 543 nm) megfelelő gerjesztést követően az emissziós fluoreszcenciát (525 nm; 575 nm) LSM710 konfokális lézer mikroszkóppal (Carl Zeiss HmbG, Jena, Németország) követtük, rendszeres időközönként felvételt készítve a folyadék-fibrin határfelszínről, kb. 50 μm távolságra a csatorna felszínétől, azonos lézer intenzitásokkal és expozicióval, Plan-Neofluar 20x/0.5 objektív segítségével.

### *3.3. A plazminogén aktiváció vizsgálata*

Ebben a rendszerben microplate wellekben a 0.5 μM plazminogént, és karboxipeptidázt vagy arginint is tartalmazó, 7.4 pH-jú, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl összetételű pufferben oldott 6 μM fibrinogénből 25 nM thrombin hozzáadásával 80 μl végtérfogatban létrehozott, 30 percig 37°C-on inkubált fibrin felszínére 60 μL 15 nM koncentrációjú tPA-t és nagy koncentrációjú (0.6 mM) szintetikus Spectrozyme-PL plazmin szubsztrátot (SpPL, H-D-norleucil-hexahirdotirozil-lizin-p-nitroanilid, American Diagnostica, Pfungstadt, Németország) rétegeztünk, mely utóbbi kompetícióba lép fibrinnel a plazminért. A magas koncentráció miatt a plazmin csak a szintetikus SpPL szubsztrátot bontja, p-nitroanilint állítva elő, melynek abszorbanciája 405 nm-en spektrofotométerrel (Zenith 200rt) mérhető. Az abszorbancia értékeket az

idő négyzetével szemben ábrázolva lineáris összefüggést kapunk a $\Delta A_{405} = 0.5\varepsilon k_1 k_{cat}[tPA]t^2$ egyenlet alapján [126], ahol $\varepsilon$ = 12.6 $mM^{-1}cm^{-1}$ a p-nitroanilin extinkciós koefficiense [127], $k_1$ = 350 $min^{-1}$ a plazmin szintetikus szubsztráton mért átalakítási száma [127], $k_{cat}$ a plazminogén aktiváció katalitikus állandója, [tPA] a tPA fibrinfelszíni koncentrációja.

### *3.4. Thrombus minták gyűjtése*

Az artériás vérrögök vizsgálatához 22 hónapon keresztül 101 acut myocardialis infarctuson (AMI) átesett és 50 perifériás artériás thrombosisban szenvedő betegből eltávolított thrombust gyűjtöttünk. Előbbi betegcsoportban a thrombusokat percutan coronaria intervencióval (PCI) összekapcsolt thromboaspiráció útján távolították el. A vizsgálat inklúziós kritériumait az AMI definitív diagnózisa, a PCI-ra való alkalmasság, az előzetes thrombolyticus terápiás próbálkozás hiánya és a TIMI beosztás szerinti >3 fokozatú thrombus jelenléte képezték. A betegek a revascularisatio előtt aspirin (500 mg), clopidogrel (600 mg), nem frakcionált heparin (5000 NE) és – abszolút kontraindikáció hiányában – abciximab gyógyszeres kezelésben részesültek. A rendszeresen aggregáció-gátlót szedő betegek a beavatkozás előtt alacsonyabb dózist kaptak.

A változó időtartamú panaszokkal jelentkező perifériás artériás betegek az érelzáródás definitív radiológiai és klinikai képe, valamint operabilitása esetén thrombendarterectomián estek át. A betegek anamnesisében sokszor már szerepelt korábbi sebészeti beavatkozás és néhány esetben a thrombosis bypass-graftok területén jött létre. Ezeket a graft-thrombusokat a vizsgálatok során nem különítettük el, mint ahogy nem kezeltük elkülönítve az okklúziótól proximálisan elhelyezkedő plaque-on létrejövő, onnan tovasodródó és az elzáródást tulajdonképpen embolusként kialakító vérrögöket sem. A betegek az operáció során nem frakcionált heparint (150 NE/ttkg) kaptak, ezenkívül 78%-ban részesültek aspirin és/vagy clopidogrel premedikációban.

### *3.5. A betegek klinikai adatai*

A betegek klinikai adatait az *1. táblázat* tartalmazza. Néhány esetben a feldolgozott adatok száma (zárójelben) alacsonyabb, mint a teljes betegszám, amelynek oka, hogy az inkomplett klinikai dokumentáció miatt bizonyos betegeknél nem állt rendelkezésre adat, így pl. az aspirin és clopidogrel premedikációt csak adekvát klinikai dokumentáció

***1. táblázat:*** **A betegek klinikai adatai.** A feltüntetett értékek számtani átlagok ± SD vagy mediánok [IQR]. Zárójelben a rendelkezésre álló mintaszám vagy adatszám. Rövidítések: WBC = fehérvérsejtek; Plt = vérlemezkék; RBC = vörösvértestek; Hgb = haemoglobin; Ht = haematocrit; CRP = C-reaktív protein; MI = myocardiális infarctus; STEMI = ST-elevációs myocardiális infarctus; NSTEMI = non-ST-elevációs myocardiális infarctus; AAA = hasi aorta aneurysma; CX = ramus circumflexus; LAD = bal anterior descendens coronaria ág; RCA = jobb arteria coronaria.

| | **Coronaria** (101) | **Perifériás** (50) | **Összes** (151) |
|---|---|---|---|
| *Demográfiai adatok* | | | |
| Férfi | 62.4% (63/101) | 60% (30/50) | 61.6% (93/151) |
| Nő | 37.6% (38/101) | 40% (20/50) | 38.2% (58/151) |
| Kor (év) | 62.9 ± 13.9 (100) | 67.1 ± 12.4 (50) | 64.2 ± 13.6 (150) |
| *Laboratóriumi értékek* | | | |
| WBC ($10^3$/μL) | 11.9 ± 4.3 (101) | 9.6 ± 4.8 (49) | 11.1 ± 4.6 (150) |
| Plt ($10^3$/μL) | 241.1 ± 63.9 (101) | 267.9±107.6(49) | 249.8±81.4(150) |
| RBC ($10^6$/μL) | 4.5 ± 0.6 (101) | 4.5 ± 0.6 (49) | 4.5 ± 0.6 (150) |
| Hgb (g/dL) | 13.4 ± 1.8 (101) | 13.7 ± 2.2 (49) | 13.5 ± 1.9 (150) |
| Ht (%) | 40.3 ± 5.3 (101) | 40.5 ± 6.0 (49) | 40.4 ± 5.5 (150) |
| CRP (mg/L) | 16.1 ± 26.2 (81) | 62.7 ± 63.2 (11) | 21.7 ± 35.7 (92) |
| *EKG eltérések* | | | |
| STEMI | 80.8% (80/99) | | |
| NSTEMI | 19.2% (19/99) | | |
| Inferolateralis MI | 3.5% (3/85) | | |
| Inferior MI | 51.8% (44/85) | | |
| Anterior MI | 42.4% (36/85) | | |
| Anteroseptalis MI | 1.2% (1/85) | | |
| Posterior MI | 1.2% (1/85) | | |
| *Társbetegségek* | | | |
| Atherosclerosis | 100% (101/101) | 92% (46/50) | 97.4% (147/151) |
| Diabetes | 15.8% (12/76) | 34% (17/50) | 23% (29/126) |
| Hypertonia | 67.1% (51/76) | 96% (48/50) | 78.6% (99/126) |
| Dyslipidaemia | 38.2% (29/76) | 58% (29/50) | 46% (58/126) |
| Uraemia | 1.3% (1/76) | 6% (3/50) | 3.2% (4/126) |
| Thrombophilia | 0% (0/76) | 6% (3/50) | 2.4% (3/126) |
| Tumor | 1.3% (1/76) | 12% (6/50) | 5.6% (7/126) |

| | **Coronaria** (101) | **Perifériás** (50) | **Összes** (151) |
|---|---|---|---|
| *Dohányzás* | | | |
| Aktív / ex | 56.6% (43/76) | 74% (37/50) | 63.5% (80/126) |
| Soha | 43.4% (33/76) | 26% (13/50) | 36.5% (46/126) |
| *Thrombusok lokalizációja* | | | |
| Vénás | | 6% (3/50) | |
| Oldalági | | 4% (2/50) | |
| Axillo-femoralis | | 2% (1/50) | |
| Aorto-femoralis | | 4% (2/50) | |
| Ilio-femoralis | | 44% (22/50) | |
| Femoro-poplitealis | | 26% (13/50) | |
| AAA | | 14% (7/50) | |
| CX | 14% (14/100) | | |
| LAD | 41% (41/100) | | |
| RCA | 41% (41/100) | | |
| LAD/RCA | 1% (1/100) | | |
| Mesterséges | 3% (3/100) | | |
| *Aggregáció-gátló premedikáció* | | | |
| Aspirin + | 100% (86/86) | 64% (32/50) | 86.8% (118/136) |
| Aspirin - | 0% (0/86) | 36% (18/50) | 13.2% (18/136) |
| Clopidogrel + | 96.6% (82/88) | 14% (7/50) | 64.5% (89/138) |
| Clopidogrel - | 3.4% (3/88) | 86% (43/50) | 33.3% (46/138) |
| *Thrombusok műtéti adatai* | | | |
| Thrombus kora (óra) | 14.6 ± 37.9 (93) | 174.8±241.1(40) | 62.8±153.7(133) |
| Érátmérő (mm) | 3.2 ± 0.4 (87) | 14.9 ± 17.7 (50) | 7.5 ± 12.0 (137) |

esetén vettük figyelembe a statisztikai számításokban. Atherosclerosisra pozitívnak az összes AMI beteget és a műtéti feltárásnál szabad szemmel látható plaque-kal rendelkező perifériás érbetegeket tekintettük. A kórházi felvétel idején már tartósan statint szedő vagy a hospitalizációs periódus alatt született laboratóriumi leletben emelkedett vérzsír-értéket mutató betegeket minősítettük dyslipidaemiásnak. Hasonlóan, az orális antidiabetikummal vagy inzulinnal kezelt betegeket, illetve a hospitalizáció idején kóros laboratóriumi glukóz-tolerancia profilt mutató betegeket tekintettük diabetesesnek.

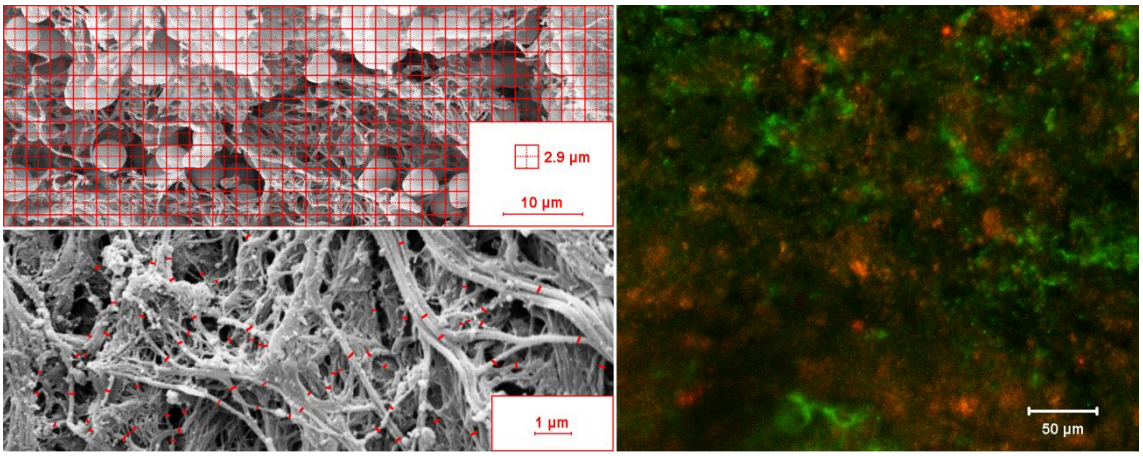
### *3.6. Pásztázó elektronmikroszkópia a thrombusszerkezet vizsgálatában*

Mind kémcsőben kialakított alvadékok, mind *in vivo* keletkezett thrombusok vizsgálhatók pásztázó elektronmikroszkóppal. Ehhez a 7.2 pH-jú, 100 mM koncentrációjú nátrium-kakodilátban 24 óráig 4°C-on tárolt mintákat további 16 órán át 1%(v/v) glutáraldehides fixálásnak, majd felszálló etanolsorban (20-96%(v/v)), 1:1 arányú 96%(v/v) etanol/aceton elegyben és tiszta acetonban történő dehidrálásnak, végül $CO_2$-os kritikus pont szárításnak (E3000 szárító apparátus, Quorum Technologies, Newhaven, Egyesült Királyság) vetettük alá. A karbon lemezekre felvitt mintákat a felvételek készítése előtt a nyerhető felbontás növelésének céljából arany-vákuumgőzzel kezeltük (SC7620 Sputter Coater, Quorum Technologies, Newhaven, Egyesült Királyság). EVO40 pásztázó elektronmikroszkóppal (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Németország) készítettünk képeket, a betegből nyert thrombusok esetén egy thrombus több régiójáról, összesen legalább 15 felvételt.

A készített felvételeket morfometrikusan analizáltuk, hogy meghatározzuk a fibrinszálak átmérőjének eloszlását, illetve a thrombus szerkezeti összetételét. Előbbihez saját készítésű függvényekkel kiegészített MatLab R2014a szoftvert (Mathworks, Natick, MA, USA) használtunk és képenként legalább 300 fibrinszál manuális kiválasztásával határoztuk meg a rostátmérők eloszlását (*2. ábra*, bal oldalon lent). A statisztikai tesztek elvégzéséhez végül az adatokból mediánt és interkvartilis tartományt (IQR) számítottunk.

A thrombusok százalékos összetételének meghatározásához a képeket 432 cellából álló rácsozat szuperpozíciójával osztottuk fel egyenlő területekre Photoshop 7.0 szoftver (Adobe, San José, CA, USA) segítségével és az egyenként 8.4 $\mu m^2$ területű cellákat aszerint osztályoztuk, hogy mely komponens, azaz fibrin, vérlemezke,

vörösvértest, fehérvérsejt vagy ezek keveréke esett bele (*2. ábra*, bal oldalon fent). Így végül a teljes cellaszámhoz viszonyítva megkaptuk az összetevők százalékos arányát.




***2. ábra:*** **A thrombusok összetételének mikroszkópos analízise.** A thrombus összetételének (bal oldalon fent) és a fibrinszál átmérők eloszlásának (bal oldalon lent) kvantitatív jellemzését pásztázó elektronmikroszkópos felvételek morfometrikus elemzésével végeztük, a thrombus metszetek vézlemekék (zöld fluoreszcencia) és fibrin (piros fluoreszcencia) általi relatív lefedettségét pedig immunfluoreszcens technikával (jobb oldalon) detektáltuk a *3.6.*, *3.8.* fejezetekben leírtak szerint.

### *3.7. Immunfluoreszcencia a vérlemezkék vizualizálására*

Az élőben kialakult thrombusok immunfluoreszcens vizsgálata előtt, a módszer pontos beállítása és a thrombocyta-receptor elleni antitest viselkedésének karakterizálása céljából elsőként *in vitro* kitapadt thromboyták immunfluoreszcens festését végeztük el. A vérlemezke-kitapadást Na-citráttal antikoagulált teljes vér thrombogén felszínen történő áramoltatásával modelleztük. Thrombogén felszínként egyrészt elhalálozott szervdonorokból műtéti úton eltávolított és -70°C-on tárolt humán arteria iliaca 6 µm-es keresztmetszetei, másrészt 100 µg/ml koncentrációra oldott kollagén reagens (Helena Biosciences Europe, Gateshead, Egyesült Királyság) szolgáltak. Mind az érkeresztmetszeteket, mind a kollagént poli-lizinnel bevont tárgylemezre ("Poly-Prep Slides", Sigma-Aldrich Kft., Budapest) vittük fel, utóbbit 15 perces 37°C-on történő inkubáció útján. Az így nyert, thrombogén felszínt hordozó tárgylemez képezte az áramlási csatorna alapját; annak oldalát kétoldalon tapadó ragasztószalagból (Scotch, 64 µm vastag) alakítottuk ki, tetejére pedig 1 mm átmérőjű be- és kimeneti nyílást tartalmazó metil-akrilát fedőlemezt helyeztünk. Így a bementi nyíláson bejutó vér egy 64 µm magasságú, 0.3 cm szélességű, 1.5 cm hosszú csatornán, a thrombogén felszín felett áramolva jutott el a kimeneti nyílásig. A vér áramoltatását pneumatikus pumpa

segítségével végeztük, amelyet a vWF-dependens thrombocyta-kitapadáshoz szükséges 3350 $s^{-1}$ nyírási sebességre állítottunk be, lamináris áramlást feltételezve az 1.03*6 $Q/(w*h^2)$ képlet szerint, ahol Q az áramlási sebesség ml/s-ban, w és h pedig a csatorna szélessége és magassága cm-ben [128]. A vért 1.5 percig áramoltattuk a rendszerben, azt követően a csatorna alapját képező, thrombogén felszínt és kitapadt vérlemezkéket tartalmazó tárgylemezt mostuk, majd marha szérum albumint tartalmazó pufferrel blokkoltuk 30 percig. A thrombocyták megjelenítésére egérben termeltetett monoklonális anti-GPIIb/IIIa (Biodesign International, Saco, ME, USA) elsődleges és zöld fluoreszcens kecske-anti-egér IgG másodlagos (Alexa Fluor 488, Invitrogen, Budapest) antitesteket használtunk. Ismételt mosás és lefedés után a lemezekről LSM710 konfokális lézer mikroszkóppal (Carl Zeiss GmbH, Jena, Németország) készítettünk felvételeket, beállítva a megfelelő küszöbintenzitást a háttér-fluoreszcencia kiszűrésére, ilyenformán a jel/zaj arány optimalizálására. A felvételek készítése során ideálisnak mutatkozó hullámhossz értékek és küszöbintenzitások nyújtották az alapot az élőből származó thrombusok fluoreszcens vizualizációjának (ld. 3.8.) beállításaihoz.

### *3.8. Immunfluoreszcencia a thrombusösszetétel meghatározására*

Az immunfluoreszcens feldolgozáshoz az élőben kialakult thrombusokat eltávolítás után -80°C-ra hűtve tároltuk izopentánban, majd kriosztáttal készítettünk metszeteket, minden minta esetén három különböző régióból. A metszeteket ezután indirekt immunfluoreszcenciával dolgoztuk fel: egérben termeltetett monoklonális anti-GPIIb/IIIa (Biodesign International, Saco, ME, USA) és monoklonális anti-fibrin (ADI311, American Diagnostica, Pfungstadt Németország) antitesteket, majd zöld (Alexa Fluor 488), illetve piros (Alexa Fluor 568) fluoreszcenciát adó anti-egér IgG másodlagos antitesteket (Invitrogen, Budapest) használtunk (*2. ábra*, jobb oldalon). A metszetekről LSM710 konfokális lézer mikroszkóppal (Carl Zeiss GmbH, Jena, Németország) készítettünk felvételeket, metszetenként 5-öt, thrombusonként (betegenként) 15-öt. A képek kiértékelését és az eredmények kvantifikálását szoftveresen (ImageJ szoftver, NIH, Bethesda, MD, USA) végeztük, a megfelelő terület és küszöbintenzitás beállításával meghatározva a terület vérlemezkék és fibrin általi lefedettségének pixelekben kifejezett értékét. A statisztikai tesztekhez a továbbiakban a fibrin és vérlemezke lefedettségek egymáshoz viszonyított arányát (FP) használtuk.

### *3.9. Statisztikai módszerek*

A klinikai adatok és a szerkezeti sajátosságok közötti relációk vizsgálatára hipotézis teszteket és egyszeres, illetve többszörös regressziós analízist alkalmaztunk. Ötféle *Bootstrap*[1] tesztet végeztünk a kísérletek során nyert független, egy dimenziós, folytonos eloszlású mintapopulációk közötti különbségek detektálására: kétoldalú és egyoldalú tesztet a számtani átlagok és a mediánok, illetve Kuiper-tesztet az eloszlások összehasonlítására. A teszteket eredeti algoritmusok módosított változataival végeztük [129]. A regressziós modelleket, ahol a függő változót a regresszorok által kvadratikusan befolyásolt függvénynek vártuk, klasszikus regressziós feltevések alapján alakítottuk [130]. A regressziós modellek koefficienseit legkisebb négyzetek módszerével számítottuk a változó mátrix szinguláris értékek szerinti felbontásával [131]. Az egytényezős regressziós modell kezdetben lineáris és négyzetes tényezőt tartalmazott ($y = A_0 + A_1x + A_2x^2 + \varepsilon$ formában, ahol $y$ a függő változó, $x$ a regresszor, $A_0,A_1,A_2$ az együtthatók, $\varepsilon$ a hibatényező), a két regresszoros modell mindkét lineáris és mindkét négyzetes tényezőn kívül a két regresszor szorzataként meghatározott tényezőt is tartalmazta ($z = A_0 + A_{10}x + A_{01}y + A_{20}x^2 + A_{11}xy + A_{02}y^2 + \varepsilon$ egyenlet alapján, ahol $z$ a függő változó, $x$ és $y$ a regresszorok, $A_0,A_{10},A_{01},A_{20},A_{11},A_{02}$ az együtthatók, $\varepsilon$ a hibatényező). Az eredeti modellből a legnagyobb $P$ értéket mutató, azaz a regressziós görbét szignifikánsan nem befolyásoló tényezőt kihagytuk, az így módosított modellt az adatpontokra újraillesztettük. Fenti eljárást a megfelelő modell kialakítása érdekében ismételtük, amíg olyan modellhez nem jutottunk, melynek minden tényezője szignifikáns hatással bír a végső illesztési görbére. A regressziós modellek kiugró értékeit (outliereit) ugyancsak eredeti algoritmussal azonosítottuk, $n$ elemű mintára $n$-szer végzett, szubciklusonként $n$-1 adatpontra kalkulált próba-regresszióval, a kihagyott adatpont 95%-os konfidencia tartományhoz való viszonya alapján. Az ábrázolt regressziós görbék és felszínek a kiugró értékek kiszelektálása után maradó adatpontokra illesztett függvények.

---

1 *Bootstrap*: Az eljárás során az eredeti mintából visszatevéssel egy új, az eredeti elemszámmal megegyező elemszámú mintát veszünk. Így egy virtuális mintához, ún. *bootstrap*-utánzathoz (*pseudo-reality*) jutunk. Amennyiben az eljárást elég sokszor ismételjük, az utánzatok eloszlása modellezni fogja az eredeti minta elméleti eloszálását. Vizsgálatainkban 10000-es ismétlési számot használtunk.

A karboxipeptidáz B, ill. arginin jelenlétében létrehozott fibrinháló esetében a szálátmérő-eloszlások közötti különbségek megállapításához az empirikus eloszlásokra legjobban illeszkedő teoretikus eloszlásokat Monte Carlo szimulációval[2] nyertük, az így kapott elméleti eloszlások közötti különbségeket Kuiper-teszt[3] segítségével vizsgáltuk [132].

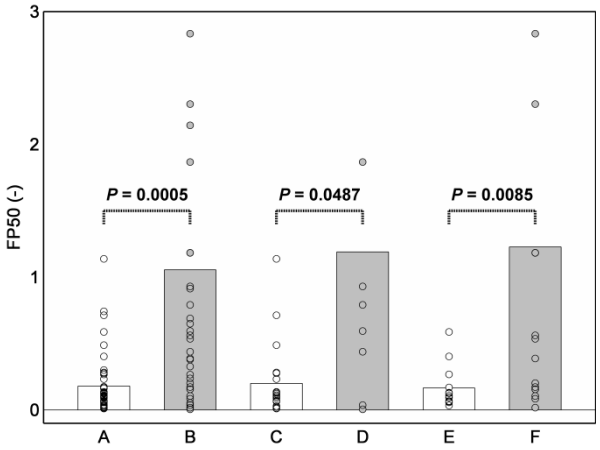
2 *Monte Carlo szimuláció*: Több különálló adathalmazból azok feltételezett elméleti eloszlásának megfelelő virtuális mintahalmaz generálása véletlenszerű mintavételezéssel. Részletesen ld. [132].

3 *Kuiper-teszt*: A Kolmogorov-Smirnov-teszttel rokon, non-parametrikus teszt, amely a kumulatív eloszlás függvények közötti legnagyobb pozitív és legnagyobb negatív különbség összege alapján teszteli a két adathalmaz különböző ségét.

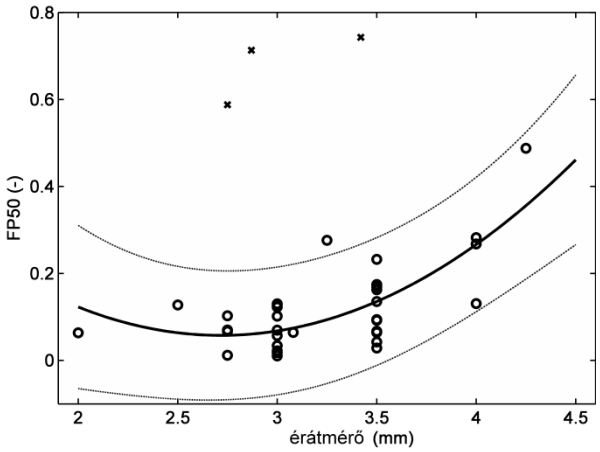
# 4. EREDMÉNYEK

## *4.1. Coronaria és perifériás thrombusok összetétele, a fibrinszálak vastagsága*

A koszorúerekből és perifériás artériákból eltávolított thrombusok fibrin- és sejttartalmát pásztázó elektronmikroszkóppal és immunfluoreszcens technikával vizsgáltuk (*2. ábra*), a szerkezeti sajátosságok kvantitatív analízisének alapjául a mért paraméterek (szálátmérő, fibrintartalom, sejttartalom) eloszlása szolgált. A statisztikai összehasonlításhoz a betegcsoportokat a thrombus anatómiai lokalizációja, illetve klinikai adatok szerint állítottuk fel. Mindkét mikroszkópos technika szignifikáns különbségeket mutatott coronaria és perifériás thrombusok között. Több mint ötszörös különbség mutatkozott a fluoreszcens fibrin/vérlemezke lefedettség eloszlás medián értékei (FP50) között a perifériás thrombusok javára ($P<0.05$, *2. táblázat*). Az FP50 eloszlás a két csoport között szignifikánsan különbözött ($P=0.0002$): a perifériás csoportban jobbra tolt és szélesebb volt. A két fő csoporton belül anatómiai lokalizáció szerint kialakított alcsoportokat összehasonlítva a FP50 szintén a fenti trendet követte, azaz konzekvensen alacsonyabb volt coronaria alcsoportokban, mint perifériás alcsoportokban (*3. ábra*, *2. táblázat*): pl. alacsonyabb volt jobb arteria coronaria (RCA) thrombusokban, mint a femoro-poplitealis régióból származókban, ugyanígy alacsonyabb volt bal anterior descendens coronaria (LAD) thrombusokban, mint ilio-femoralis eredetűekben. Coronaria thrombusok adatainak regressziós analízisével pozitív korrelációt találtunk a FP50 és az érátmérő között (*4. ábra*, *5. táblázat*); 2.6 mm felett a nagyobb koszorúér átmérő alacsonyabb relatív intrathromboticus vérlemezke-tartalommal társult a minták több mint 50%-ában ( $R^2_{adj} = 0.51$, $P=1\text{x}10^{-7}$).




***3. ábra:*** **Fluoreszcens fibrin/vérlemezke lefedettség arány coronaria és perifériás thrombusokban.** Az oszlopok magassága a fibrin/vérlemezke arány mediánok (FP50) átlagát reprezentálja a thrombus anatómiai lokalizációja szerinti alcsoportonként: coronaria (A), perifériás (B), jobb arteria coronaria (C), femoro-popliteális (D), bal anterior descendens coronaria ág (E), ilio-femorális (F) lokalizáció. Az oszloppárok felett jelöltük az átlagok eltérésének egyoldalú teszttel kapott *P*-értékeit.




***4. ábra:*** **A fibrin/vérlemezke lefedettség arány és a coronaria arteriák átmérője közötti korreláció.** A fibrin/vérlemezke lefedettség arány mediánok (FP50) átlagában kifejezett relatív vérlemezke-tartalom alacsonyabb a nagyobb koszorúerekben létrejött vérrögökben. Folytonos vonal jelöli a kiugró értékek (x) eltávolítása után maradt adatpontokra (o) illesztett regressziós görbét, szaggatott vonal a 95%-os konfidencia határokat.

***2. táblázat:*** **Hipotézis tesztek eredményei.** A felsorolt *P*-értékek kétoldalú hipotézis tesztek eredményei (zárójelben az egyoldalú tesztek *P*-értékei). Minden statisztikai teszthez n'=10000 elemszámú Bootstrap mintát használtunk. Param = vizsgált paraméter; $n_1$, $n_2$ = minták elemszáma; $\mu_1$, $\mu_2$ = számtani átlag; $P_\mu$ = számtani átlagok *P*-értéke; $med_1$, $med_2$ = mediánok; $P_{med}$ = mediánok *P*-értéke; $P_{Kuiper}$ = Kuiper-teszt *P*-értéke; FP50 = fluoreszcens fibrin/vérlemezke lefedettség arány medián; Szál Ø = fibrinszál átmérő (µm); Fibrin% = thrombusok fibrintartalma százalékban; Plt% = thrombusok vérlemezke-tartalma százalékban; RBC% = thrombusok vörösvértest-tartalma százalékban; Cor = coronaria; Per = perifériás; RCA = jobb arteria coronaria lokalizáció; LAD = bal anterior descendens coronaria ág lokalizáció; Fem-pop = femoro-popliteális lokalizáció; CX = ramus circumflexus lokalizáció; AAA = hasi aorta aneurysma lokalizáció; ⊘ = nem dohányzó; ex = ex-dohányzó. A szignifikáns különbségeket félkövérrel jelöltük.

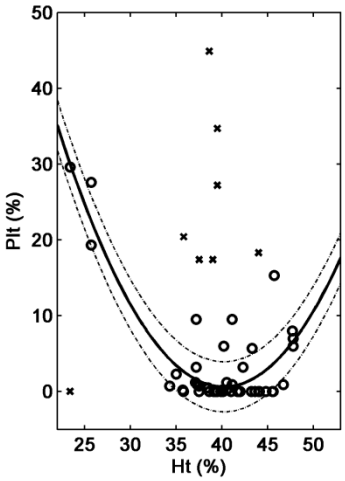
| Param | Minta 1 | Minta 2 | $n_1$ | $n_2$ | $\mu_1$ | $\mu_2$ | $P_\mu$ | $med_1$ | $med_2$ | $P_{med}$ | $P_{Kuiper}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FP50 | Cor | Per | 47 | 33 | 0.180 | 1.06 | **$5x10^{-4}$ ($5x10^{-4}$)** | 0.103 | 0.536 | **0.003 (0.003)** | **$2x10^{-4}$** |
| FP50 | Cor/RCA | Per/Fem-pop | 22 | 8 | 0.200 | 1.19 | 0.051 **(0.049)** | 0.107 | 0.693 | 0.125 (0.096) | **0.004** |
| FP50 | Cor/LAD | Per/Ilio-fem | 14 | 16 | 0.166 | 1.23 | **0.009 (0.008)** | 0.116 | 0.462 | 0.201 (0.196) | **0.026** |
| Szál Ø | Cor | Per | 49 | 47 | 0.123 | 0.135 | **0.049 (0.025)** | 0.117 | 0.127 | 0.510 (0.355) | **0.006** |
| Fibrin% | Cor | Per | 59 | 50 | 70.5 | 83.9 | **0.004 (0.002)** | 78.4 | 93.7 | **0.009 (0.006)** | **0.022** |
| Plt% | Cor | Per | 59 | 50 | 12.6 | 10.0 | 0.435 (0.214) | 0.900 | 7.90 | **0.015 ($2x10^{-4}$)** | **0.004** |
| RBC% | Cor | Per | 59 | 50 | 39.0 | 29.1 | 0.102 (0.052) | 31.2 | 18.0 | 0.254 (0.118) | 0.25 |
| RBC% | Cor/CX | Per/AAA | 6 | 8 | 49.6 | 28.4 | 0.208 (0.101) | 58.2 | 9.80 | 0.069 (**0**) | **0.02** |
| Fibrin% | Cor/⊘ | Cor/Dohányzó | 20 | 20 | 62.2 | 78.1 | **0.040 (0.020)** | 59.8 | 87.3 | 0.102 **(0.002)** | **0.035** |
| Fibrin% | Cor/⊘ + ex | Cor/Dohányzó | 27 | 20 | 63.7 | 78.1 | **0.045 (0.022)** | 67.4 | 87.3 | 0.198 (0.055) | **0.039** |
| FP50 | ⊘ + ex | Dohányzó | 31 | 38 | 0.238 | 0.855 | **0.006 (0.006)** | 0.128 | 0.220 | 0.415 (0.323) | **0.008** |

Pásztázó elektronmikroszkóppal a fentiekkel összhangban álló különbségeket figyeltünk meg a két fő thrombuscsoport között. A teljes fibrintartalom szignifikánsan alacsonyabb volt coronaria thrombusokban, amit mutatnak az átlagok közötti ($P$<0.01) és az eloszlások közötti különbségek ($P$=0.022) (*2. táblázat*). Míg a coronaria thrombusok finom szerkezetű, vékony szálakból álló fibrint tartalmaztak, a perifériás thrombusokra a durvább, vastagabb szálakból álló, nagy pórusméretű fibrinháló volt jellemző. A fibrin szálámérő átlaga coronaria thrombusokban 122 nm, perifériás thrombusokban 135 nm volt ($P$<0.05), a szálátmérők eloszlása pedig jobbra tolt és szélesebb tartományt felölelő volt az utóbbi csoportban ($P$=0.00635) (*2. táblázat*). A vörösvértestek aránya a morfológiai kép alaján különbözött bár a két fő csoport között, a különbség nem volt

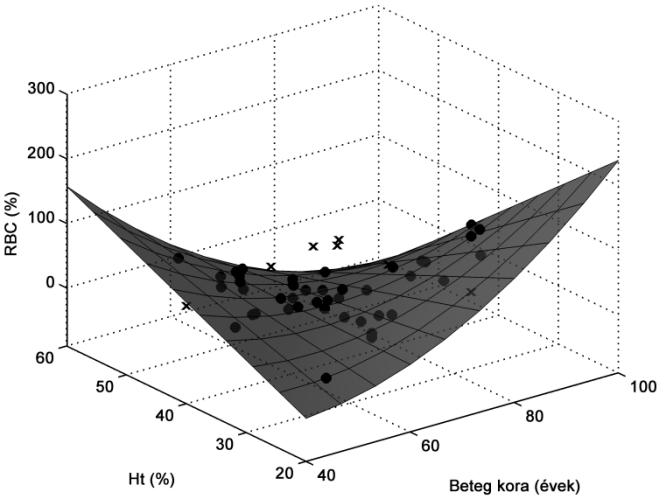
szignifikáns. Lokalizáció szerinti alcsoportokat összehasonlítva a bal a. coronaria ramus circumflexusából (CX) származó thrombusok szignifikánsan több vörösvértestet tartalmaztak, mint a hasi aorta aneurysmából (AAA) származó thrombusok.

### *4.2. A szisztémás sejtszámok és a vérlemezke-gátló gyógyszerek hatása*

Coronaria thrombusokban regressziós analízissel parabolikus függést kaptunk a thrombus vérlemezke-tartalma és a szisztémás vörösvértest-függő paraméterek (vörösvértestszám, haematocrit, haemoglobin) között: a vérlemezke-tartalom mind magas, mind alacsony haematocrit esetén magasabb volt, mint köztes értékeknél ( $R^2_{adj}$ >0.7) (*5. ábra, 3. táblázat*). Ugyanez a modell a két változó közötti függést jóval kisebb arányban ( $R^2_{adj}$ =0.20) magyarázta perifériás thrombusok esetén. Mindazonáltal, a perifériás thrombusokat is tartalmazó adathalmazban elkülöníthető volt néhány alcsoport, ahol a haematocrit – intrathromboticus vérlemezke-tartalom összefüggés figyelemre méltóan erős volt, így pl. nőbetegekben ( $R^2_{adj}$ =0.6, *3. táblázat*). Önmagában sem a haematocrit, sem a haemoglobin szint nem volt hatással a thrombus vörösvértest-tartalmára, a betegek korát második regresszorként tartalmazó modellek azonban kifejezett függést jeleztek hypertoniás betegekben (*6. ábra*).




***5. ábra:*** **A haematocrit (Ht) és a thrombus százalékos vérlemezke-tartalma (Plt) közötti összefüggés.** Folytonos vonal jelöli a kiugró értékek (x) eltávolítása után maradt adapontokra (o) illesztett regressziós görbét, szaggatott vonal a 95%-os konfidencia határokat.

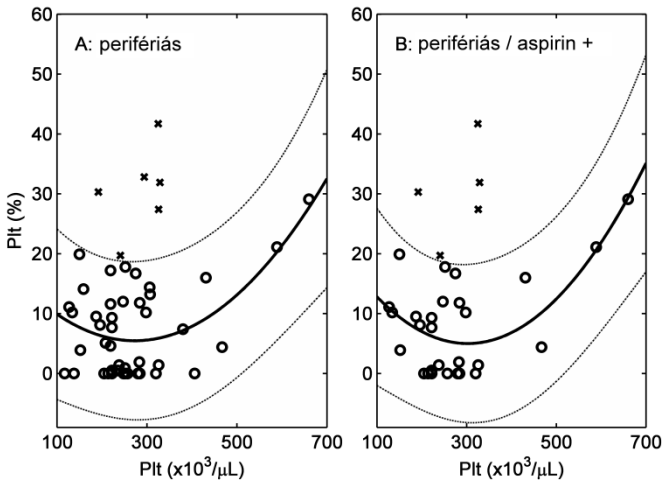



***6. ábra:*** **A thrombus vörösvértest-tartalmának függése a haematocrittól és a kortól hypertoniás perifériás érbetegekben.** A vérrögök pásztázó elektronmikroszkópos felvételek alapján számított százalékos vörösvértest-tartalmát (RBC) a haematocrit (Ht) és a beteg korának függvényeként ábrázoltuk. Az ábrán a kiugró értékek (x) eltávolítása után maradt adatpontokra (●) illesztett regressziós felszín látható.

***3. táblázat:*** **Szisztémás sejtszámok hatása a thrombusösszetételre.** A regressziós modellt a $z = A_0 + A_{10}x + A_{20}x^2 + \varepsilon$ egyenlet alapján számítottuk, ahol *z* a függő változó, *x* és *y* pedig a független változók. A többváltozós regressziót a $z = A_0 + A_{10}x + A_{01}y + A_{20}x^2 + A_{11}xy + A_{02}y^2 + \varepsilon$ egyenlet alapján számítottuk, ahol *z* a függő változó, *x* és *y* a regresszorok. $A_0 – A_{02}$ az együtthatók, $\varepsilon$ a hibatényező. n = minta eredeti elemszáma; m = kiugró értékek száma; $R^2_{adj}$ = módosított determinációs együttható; $P_{ANOVA}$ = a variancia analízis *P*-értéke; $\sigma_\varepsilon$ = az ε hibatényező varianciája; Plt% = thrombus vérlemezke-tartalma százalékban; RBC% = thrombus vörösvértest-tartalma százalékban; RBC = szisztémás vörösvértestszám (x $10^6$/µL); WBC = szisztémás fehérvérsejtszám (x $10^3$/µL); Ht = haematocrit (%); Hgb = haemoglobin (g/dL); Kor = beteg kora; Cor = coronaria; Per = perifériás; RCA = jobb arteria coronaria lokalizáció;

| z | x | y | Szűkítés | n | m | $A_0$ | $A_{10}$ | $A_{01}$ | $A_{20}$ | $A_{11}$ | $A_{02}$ | $R^2_{adj}$ | $P_{ANOVA}$ | $\sigma_\varepsilon$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Plt% | RBC | - | Cor | 59 | 13 | 179 | -78.8 | - | 8.67 | - | - | 0.7 | $2.3x10^{-12}$ | 3.76 |
| Plt% | Ht | - | Cor | 59 | 13 | 169 | -8.38 | - | 0.104 | - | - | 0.77 | $8.5x10^{-15}$ | 3.31 |
| Plt% | Hgb | - | Cor | 59 | 13 | 145 | -21.6 | - | 0.806 | - | - | 0.74 | $1.1x10^{-13}$ | 3.5 |
| Plt% | Ht | - | Nő | 47 | 9 | 191 | -10.4 | - | 0.141 | - | - | 0.60 | $5.3x10^{-8}$ | 5.36 |
| Plt% | RBC | WBC | Per | 49 | 10 | 0 | 14.5 | -26.6 | 0.416 | -4.65 | 7.39 | 0.29 | $3.5x10^{-3}$ | 5.83 |
| Plt% | RBC | WBC | Per/Nő | 21 | 3 | 0 | 19.2 | -34.1 | 0.648 | -6.55 | 9.68 | 0.7 | $4.6x10^{-4}$ | 4.2 |
| Plt% | RBC | WBC | Per/Atherosclerosis | 45 | 6 | 0 | 15.9 | -31.2 | 0.50 | -5.35 | 8.81 | 0.59 | $5.1x10^{-7}$ | 5.77 |
| Plt% | RBC | WBC | Per/Nem diabeteses | 32 | 4 | 0 | 17.3 | -33.7 | 0.518 | -5.72 | 9.38 | 0.68 | $3.6x10^{-6}$ | 5.6 |
| RBC% | Hgb | Kor | Per | 49 | 8 | -213 | 0 | 38.2 | 0.059 | -0.619 | 0 | 0.52 | $1.\ 3x10^{-6}$ | 17 |
| RBC% | Ht | Kor | Per | 49 | 7 | -213 | 0 | 13.2 | 0.062 | -0.217 | 0 | 0.48 | $3.8x10^{-6}$ | 18 |
| RBC% | Hgb | Kor | Per/Hypertoniás | 47 | 8 | -227 | 0 | 41.8 | 0.064 | -0.677 | 0 | 0.58 | $2.5x10^{-7}$ | 16 |
| RBC% | Ht | Kor | Per/Hypertoniás | 47 | 8 | -243 | 0 | 15.3 | 0.070 | -0.251 | 0 | 0.6 | $8.2x10^{-8}$ | 16 |

A thrombus vérlemezke-tartalmának függése a szisztémás thrombocytaszámtól perifériás thrombusokban *J*-alakú regressziós modellekkel volt leírható ($P<0.05$), ahogy azt a *7. ábra* mutatja. A fenti összefüggéseket leíró görbék alakja némileg eltér ugyan a különböző anatómiai lokalizációjú thrombusok között, ahogyan azt az A1, A2 együtthatók különböző értékei is tükrözik (*4. táblázat*), mégis 250.000/µL vérlemezke-szám felett azonos trend mutatkozik: a vérrög thrombocyta-tartalma párhuzasmosan nő a szisztémás thrombocytaszámmal. Coronaria thrombusokban a vérlemezke-gátló premedikáció érdemben nem befolyásolta az összefüggés erősségét ($R^2_{adj}$ 0.33-ról 0.32-re csökken mind aspirin, mind clopidogrel előkezelés hatására), ugyanakkor perifériás thrombusokban kifejezett, az összefüggést

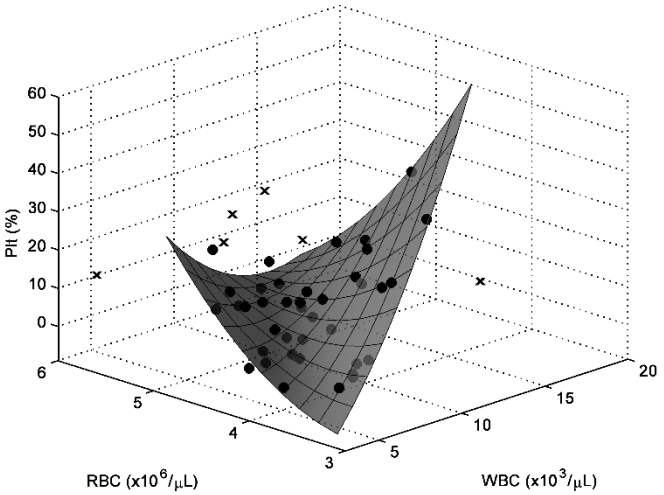



***7. ábra:*** **A thrombus vérlemezke-tartalmának függése a szisztémás thrombocytaszámtól.** A thrombus százalékos vérlemezke-tartalmát (Plt%) a vérben mérhető thrombocytaszám (Plt x$10^3$/µL) függvényében ábrázoltuk minden perifériás thrombusra (A), illetve aspirinnel kezelt perifériás érbetegek thrombusaira (B). Folytonos vonal jelöli a kiugró értékek (x) eltávolítása után maradt adatpontokra (o) illesztett regressziós görbét, szaggatott vonal a 95%-os konfidencia határokat.

***4. táblázat:*** **Szisztémás vérlemezkeszám és a vérrög vérlemezke-tartalma közötti összefüggés.** A regressziót az $y = A_0 + A_1x + A_2x^2 + \varepsilon$ egyenlet alapján számítottuk, ahol $y$ jelöli a vérrög vérlemezke-tartalmát (%), $x$ a szisztémás vérlemezkeszámot (x $10^3$/µl), $A_0$, $A_1$, $A_2$ az együtthatók, $\varepsilon$ a hibatényező. n = minta eredeti elemszáma; m = kiugró értékek száma; $R^2_{adj}$ = módosított determinációs együttható; $P_{ANOVA}$ = a variancia analízis $P$-értéke; $\sigma_\varepsilon$ = az ε hibatényező varianciája; Cor = coronaria; Per = perifériás.

| Szűkítés | n | m | $A_0$ | $A_1$ | $A_2$ | $R^2_{adj}$ | $P_{ANOVA}$ | $\sigma_\varepsilon$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| - | 108 | 15 | 21.0 | -0.115 | $1.9\times10^{-4}$ | 0.18 | $3.9\times10^{-5}$ | 6.39 |
| Cor | 59 | 14 | 31.7 | -0.206 | $3.3\times10^{-4}$ | 0.33 | $8.4\times10^{-5}$ | 3.36 |
| Per | 49 | 6 | 16.5 | -0.081 | $1.5\times10^{-4}$ | 0.26 | $9.8\times10^{-4}$ | 6.42 |
| Aspirin: + | 77 | 13 | 25.8 | -0.151 | $2.4\times10^{-4}$ | 0.40 | $5.8\times10^{-8}$ | 5.20 |
| Cor/Aspirin: + | 44 | 8 | 32.6 | -0.210 | $3.3\times10^{-4}$ | 0.32 | $6.1\times10^{-4}$ | 3.64 |
| Per/Aspirin: + | 33 | 5 | 22.4 | -0.115 | $1.9\times10^{-4}$ | 0.39 | $7.4\times10^{-4}$ | 6.19 |
| Clopidogrel: + | 51 | 11 | 25.4 | -0.159 | $2.6\times10^{-4}$ | 0.38 | $5.2\times10^{-5}$ | 4.26 |
| Cor/Clopidogrel: + | 44 | 8 | 32.8 | -0.212 | $3.4\times10^{-4}$ | 0.32 | $5.4\times10^{-4}$ | 3.64 |
| Per/Clopidogrel: + | 7 | 1 | -47.4 | 0.398 | $-4.8\times10^{-4}$ | 0.91 | 0.013 | 3.91 |
| Nő | 47 | 10 | 36.4 | -0.213 | $3.1\times10^{-4}$ | 0.58 | $1.6\times10^{-7}$ | 4.95 |
| Per/Nő | 21 | 4 | 40.3 | -0.233 | $3.3\times10^{-4}$ | 0.80 | $5.8\times10^{-6}$ | 4.12 |
| Dyslipidaemiás | 49 | 7 | 21.7 | -0.125 | $2.1\times10^{-4}$ | 0.42 | $1.1\times10^{-5}$ | 4.8 |
| Cor/Dyslipidaemiás | 20 | 4 | 85.4 | -0.668 | $1.3\times10^{-3}$ | 0.65 | $4.6\times10^{-4}$ | 3.42 |
| Per/Dyslipidaemiás | 29 | 4 | 15.4 | -0.084 | $1.6\times10^{-4}$ | 0.48 | $3.1\times10^{-4}$ | 4.9 |
| Dohányzó | 64 | 9 | 15.7 | -0.079 | $1.5\times10^{-4}$ | 0.22 | $6.0\times10^{-4}$ | 6.4 |
| Cor/Dohányzó | 27 | 6 | 43.1 | -0.293 | $4.8\times10^{-4}$ | 0.43 | $2.4\times10^{-3}$ | 3.2 |

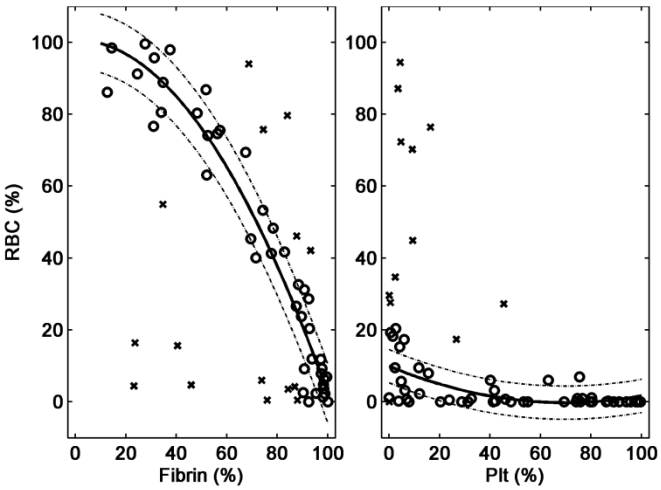
erősítő hatás figyelhető meg aspirin esetében ($R^2_{adj}$ 0.26→0.39) (a clopidogrel bár erős hatást mutat, az elemszám alacsony). A női nem ugyancsak jelentős determinánsnak bizonyult a szisztémás – intrathromboticus vérlemezke-tartalom függés viszonylatában perifériás betegekben ($R^2_{adj}$ =0.80), de nem befolyásolta azt coronaria betegekben. Annak ellenére, hogy sem a dohányzás, sem a dyslipidaemia önmagában nem gyakorolt befolyást a coronaria thrombusok vérlemezke-tartalmára, a vér – thrombus vérlemezke-tartalom összefüggést fokozták ($R^2_{adj}$ 0.43-ra, illetve 0.65-re nőtt, *4. táblázat*). Több paraméteres modellek alapján ugyan általában a szisztémás fehérvérsejt- és vörösvértestszám nem befolyásolta a perifériás vérrögök vérlemezke-tartalmát, néhány alcsoportban a függés egyértelmű volt, pl. nőkben ($R^2_{adj}$ =0.70), atheroscleroticus ($R^2_{adj}$ = 0.59, *8. ábra*) és nem diabeteses ($R^2_{adj}$ =0.68) betegekben (*3. táblázat*).




***8. ábra:*** **A sejtszámok hatása a thrombus vérlemezke-tartalmára atheroscleroticus perifériás érbetegekben.** A vérrögök pásztázó elektronmikroszkópos felvételek alapján számított százalékos vérlemezke-tartalmát (Plt) a szisztémás sejtszámok (RBC, WBC) függvényeként ábrázoltuk. Az ábrán a kiugró értékek (x) eltávolítása után maradt pontokra (●) illesztett regressziós felszín látható.

### *4.3. A mért ultrastrukturális paraméterek közötti összefüggések*

Parabolikus regressziós modellek zéró lineáris együtthatóval (*5. táblázat*) adekvátan ($P$<0.01) írták le a thrombus vörösvértest- és fibrintartalma közötti összefüggést egy igen erős ($R^2_{adj}$>0.93) függést fedve fel e paraméterek között, negatív korrelációval minden anatómiai lokalizációban (*9. ábra, bal panel*). Coronaria thrombusokban a parabolikus regressziós modell ($P$=1×10$^{-5}$) hasonló, közel lineáris negatív korrelációt ($R^2_{adj}$=0.37) írt le a thrombus vérlemezke és vörösvértest-tartalma között (*9. ábra*, jobb panel). A fibrin szálátmérő medián és FP50 közötti összefüggést leíró zéró lineáris együtthatójú parabolikus modell alapján a magasabb intrathromboticus vérlemezke-tartalom vékonyabb fibrinszálakkal társul minden anatómiai lokalizációban, és a függés erősebb-

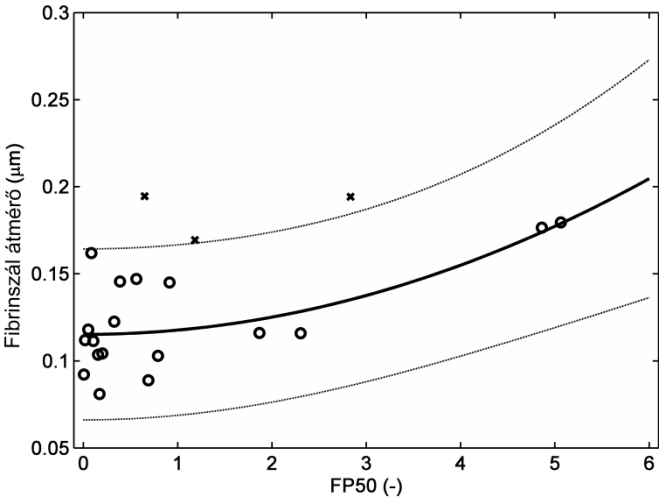



***9. ábra:* A coronaria thrombusok építőelemeinek kölcsönös függése a végső összetétel meghatározásában.** A coronaria thrombusok vörösvértest-tartalmát (%) a fibrin- (%, bal oldalon), illetve vérlemezke-tartalom (%, jobb oldalon) függvényeként ábrázoltuk. Folytonos vonal jelöli a kiugró értékek (x) eltávolítása után maradt adatpontokra (o) illesztett regressziós görbét, szaggatott vonal a 95%-os konfidencia határokat.

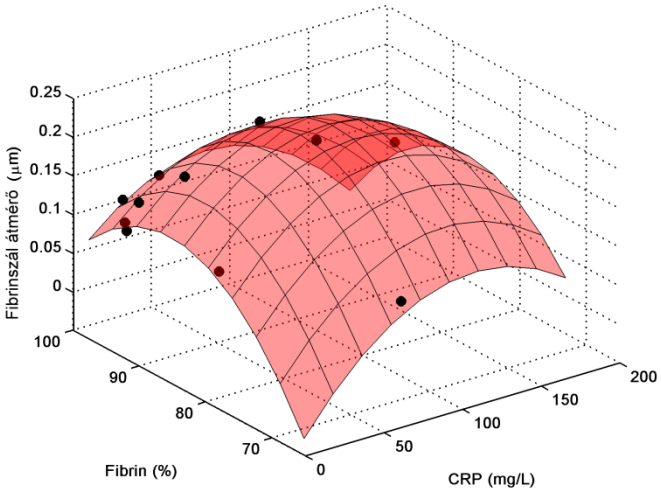
***5. táblázat:* A thrombus összetevői közötti interakciók a végső thrombus-architektúra kialakításában.** A regressziót az $y = A_0 + A_1x + A_2x^2 + \varepsilon$ egyenlet alapján kalkuláltuk, ahol $y$ jelöli a függő változót, $x$ jelöli a független változót, $A_0$, $A_1$, $A_2$ az együtthatók, $\varepsilon$ a hibatényező. n = minta eredeti elemszáma; m = kiugró értékek száma; $R^2_{adj}$ = módosított determinációs együttható; $P_{ANOVA}$ = a variancia analízis $P$-értéke; $\sigma_\varepsilon$ = az ε hibatényező varianciája; Szál Ø = fibrin szálátmérő medián (µm); Ér Ø = a thrombotisált ér átmérője (mm); RBC% = thrombus százalékos vörösvértest-tartalma; Plt% = thrombus százalékos vérlemezke-tartalma; Fibrin% = thrombus százalékos fibrintartalma; Cor = coronaria; Per = perifériás; RCA = jobb arteria coronaria lokalizáció.

| y | x | Szűkítés | n | m | $A_0$ | $A_1$ | $A_2$ | $R^2_{adj}$ | $P_{ANOVA}$ | $\sigma_\varepsilon$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FP50 | Ér Ø | Cor | 37 | 4 | 0.995 | -0.690 | 0.127 | 0.51 | 9.9x10$^{-6}$ | 0.070 |
| Szál Ø | FP50 | - | 44 | 7 | 0.115 | 0 | 2.1x10$^{-3}$ | 0.35 | 7.9x10$^{-5}$ | 0.018 |
| Szál Ø | FP50 | Aspirin: + | 33 | 5 | 0.112 | 0 | 2.6x10$^{-3}$ | 0.52 | 9.4x10$^{-6}$ | 0.016 |
| Szál Ø | FP50 | Dyslipidaemia | 21 | 4 | 0.110 | 0 | 2.8x10$^{-3}$ | 0.51 | 8.2x10$^{-4}$ | 0.015 |
| Szál Ø | FP50 | Per/Atherosclerosis | 30 | 4 | 0.116 | 0 | 2.1x10$^{-3}$ | 0.29 | 2.6x10$^{-3}$ | 0.024 |
| Szál Ø | FP50 | Per | 32 | 4 | 0.117 | 0 | 2.0 x10$^{-3}$ | 0.24 | 4.8x10$^{-3}$ | 0.025 |
| Szál Ø | FP50 | Per/Dyslipidaemia | 17 | 3 | 0.110 | 0 | 2.7 x10$^{-3}$ | 0.47 | 4.1x10$^{-5}$ | 0.017 |
| RBC% | Fibrin% | Cor | 59 | 15 | 101 | 0 | -9.8x10$^{-3}$ | 0.95 | 0 | 8.2 |
| RBC% | Fibrin% | Per | 50 | 8 | 95.9 | 0 | -9.4x10$^{-3}$ | 0.93 | 0 | 7.8 |
| RBC% | Fibrin% | - | 109 | 23 | 99.1 | 0 | -9.7x10$^{-3}$ | 0.94 | 0 | 8.0 |
| Plt% | RBC% | Cor | 59 | 12 | 9.91 | -0.290 | 2.1x10$^{-3}$ | 0.37 | 1.5x10$^{-5}$ | 4.6 |

nek bizonyult aspirinnel előkezelt ($R^2_{adj}$=0.52), illetve dyslipidaemiás ($R^2_{adj}$=0.51, *11. ábra*) betegek esetén. Érdekes módon a magasabb fibrintartalomhoz önmagában nem társult a fibrinszálak átmérőjének változása, ugyanakkor perifériás thrombusoknál erős ($R^2_{adj}$=0.65) összefüggés mutatkozott, ha a betegek CRP értékeit is tartalmazta a többtényezős regressziós modell (*7. táblázat*, *10. ábra*).



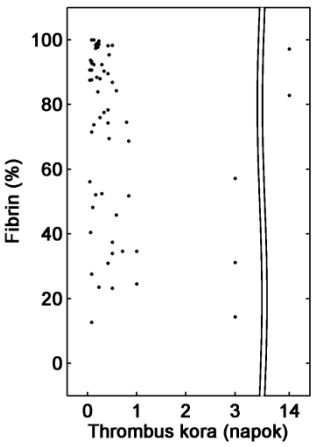

***11. ábra:*** **A fibrin szálátmérő medián függése a fibrin/vérlemezke lefedettség aránytól (FP50) hyperlipidaemiás perifériás érbetegek thrombusaiban.** Folytonos vonal jelöli a kiugró értékek (x) eltávolítása után maradt adatpontokra (o) illesztett regressziós görbét, szaggatott vonal a 95%-os konfidencia határokat.




***10. ábra:*** **A fibrin szálátmérő függése a fibrintartalomtól és a CRP szinttől perifériás thrombusokban.** A fibrinszálak pásztázó elektronmikroszkópos felvételek alapján számított átmérőjének medián értékeit (µm) ábrázoltuk a vérrög fibrintartalmával (%) és a betegek CRP értékeivel (mg/L) szemben. Ábrázolva a regressziós felszín és az adatpontok (o), kiugró érték nem volt.

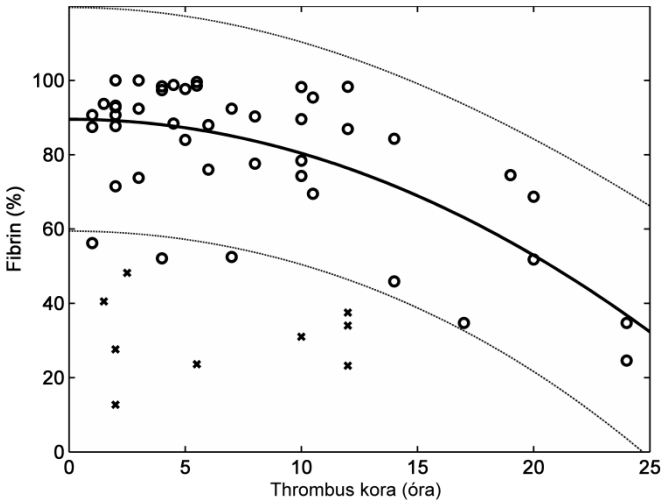
### *4.4.A thrombusok korának hatása*

A thrombusok kora, azaz a kialakulásuktól eltávolításukig eltelt idő jelentősen különböző tartományban mozgott a két fő csoportban (*1. táblázat*). A coronaria csoportban a nagyon régi (>300 órás) thrombusok fibrintartalma közelítőleg megegyezett a friss thrombusokéval (*6. táblázat*, *12. ábra*), ugyanakkor nem állt rendelkezésre 14 naposnál frissebb, de 3 naposnál régebbi coronaria thrombus, ezért a köztes

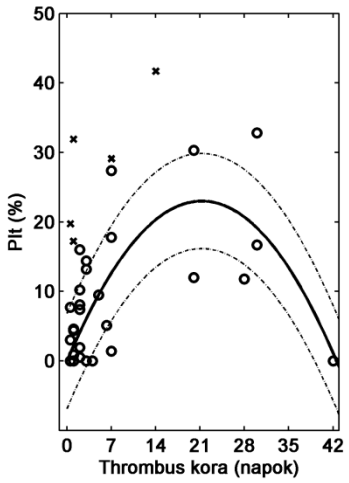



***12. ábra:*** **A coronaria thrombusok koreloszlása és fibrintartalma.**

időtartományban egyértelmű összefüggést kimutatni nem tudtunk. Amennyiben a regressziót friss (<24 órás) thrombusokra korlátoztuk, negatív korreláció jelent meg a fibrintartalom és a thrombus kora között (*13. ábra*). Perifériás thrombusokban a vérlemezke-tartalom és a thrombus kora között fordított U-alakú függést találtunk ($R^2_{adj}$ =0.56, *14. ábra*, *6. táblázat*) a vérrögök korának teljes tartományában (42 naposig bezárólag), kifejezett pozitív korrelációval az első 7 napban ($R^2_{adj}$=0.57), amikor is a vérrögök thrombocyta-tartalma 29%-os maximumig emelkedő tendenciát mutat. Ugyanakkor a thrombusok kora nem gyakorolt szignifikáns hatást a vérlemezke-tartalomra coronaria betegek körében. Többváltozós regressziós analízis erős ($R^2_{adj}$ =0.68) összefüggésre derített fényt az intrathromboticus vörösvérsejt-tartalom, a beteg kora és a thrombus kora között, jellemzően magasabb vörösvértest aránnyal fiatal betegekből származó friss perifériás thrombusokban. Utóbbi összefüggést tovább erősítette az aspirin előkezelés ($R^2_{adj}$=0.87) és a társuló dyslipidaemia ($R^2_{adj}$=0.86, *15. ábra*). A beteg kora és a vérrög kora erősen ($R^2_{adj}$=0.73, *16. ábra*) befolyásolták a FP50 értéket perifériás thrombusokban, jóval gyengébben ($R^2_{adj}$=0.17) coronaria mintákban, de megintcsak erősen anterior laesioval jelentkező coronaria betegekben ($R^2_{adj}$=0.70).



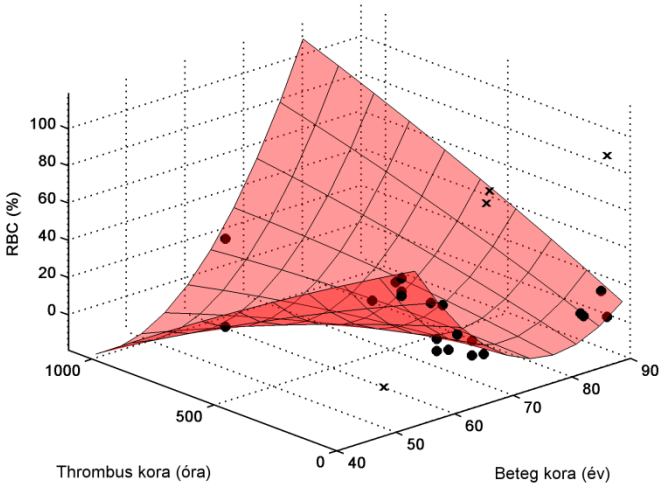

***13. ábra:*** **Az idő hatása a vérrög fibrintartalmára coronaria thrombusokban.** A százalékos fibrintartalmat a thrombus korának függvényeként ábrázoltuk. Folytonos vonal jelöli a kiugró értékek (x) eltávolítása után maradt adatpontokra (o) illesztett regressziós görbét, szaggatott vonal a 95%-os konfidencia határokat. ◄



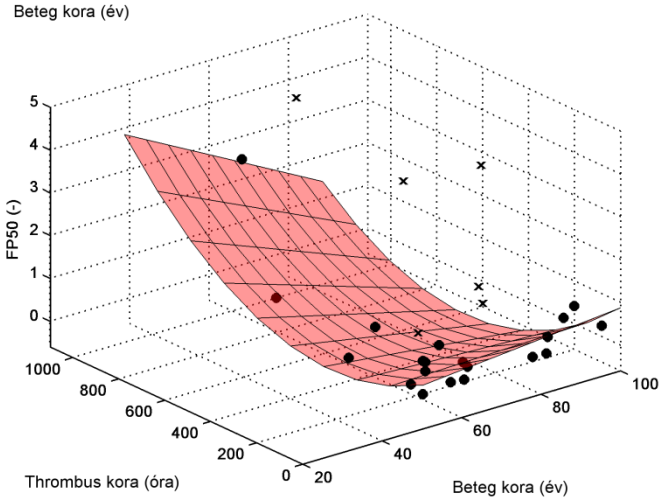

***14. ábra:*** **A perifériás thrombusok kora és vérlemezke-tartalma közötti összefüggés.** A pásztázó elektronmikroszkópos felvételek alapján számított vérlemezke-tartalmat (%) a thrombus korának függvényeként ábrázoltuk. Folytonos vonal jelöli a kiugró értékek (x) eltávolítása után maradt adatpontokra (o) illesztett regressziós görbét, szaggatott vonal a 95%-os konfidencia határokat. ►

***6. táblázat:*** **A thrombus korának hatása az összetételére.** Az egyszerű regressziót a $z = A_0 + A_{01}x + A_{02}x^2 + \varepsilon$ egyenlet alapján számítottuk, ahol $z$ a függő változó és $x$ a thrombus kora, mint független változó. A többszörös regressziót a $z = A_0 + A_{10}y + A_{01}x + A_{20}y^2 + A_{11}yx + A_{02}x^2 + \varepsilon$ egyenlet alapján számítottuk, ahol $z$ a függő változó, $y$ az első regresszor, $x$ pedig a thrombus kora, mint második regresszor. $A_0 – A_{02}$ az együtthatók, $\varepsilon$ a hibatényező mindkét egyenletben. n = minta eredeti elemszáma; m = kiugró értékek száma; $R^2_{adj}$ = módosított determinációs együttható; $P_{ANOVA}$ = a variancia analízis *P*-értéke; $\sigma_\varepsilon$ = az ε hibatényező varianciája; Fibrin% = thrombus százalékos fibrintartalma; Plt% = thrombus százalékos vérlemezke-tartalma; RBC% = thrombus százalékos vörösvértest-tartalma; FP50 = a fluoreszcens fibrin/vérlemezke lefedettség arány mediánja; Kor = a beteg kora; CRP = C-reaktív protein plazma szintje; Cor = coronaria; Per = perifériás; EKG = a laesio klinikai lokalizációja EKG eltérések alapján; LAD = bal anterior descendens coronaria lokalizáció.

| z | y | Szűkítés | n | m | $A_0$ | $A_{10}$ | $A_{01}$ | $A_{20}$ | $A_{11}$ | $A_{02}$ | $R^2_{adj}$ | $P_{ANOVA}$ | $\sigma_\varepsilon$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fibrin% | - | Cor | 58 | 9 | 89.9 | - | -1.29 | - | - | $3.8\times10^{-3}$ | 0.41 | $2.1\times10^{-6}$ | 17 |
| Fibrin% | - | Cor/ <24 óra | 53 | 9 | 89.5 | - | 0 | - | - | -0.092 | 0.46 | $3.0\times10^{-7}$ | 15 |
| Plt% | - | Per | 39 | 1 | 0 | - | 0.110 | - | - | $-1.1\times10^{-4}$ | 0.56 | $1.5\times10^{-6}$ | 8.6 |
| Plt% | - | Per/ <168 óra | 32 | 5 | 2.68 | - | 0 | - | - | $7.3\times10^{-4}$ | 0.57 | $3.7\times10^{-6}$ | 5.5 |
| RBC% | Kor | Per | 39 | 8 | 525 | -13.1 | -0.471 | 0.083 | $6.2\times10^{-3}$ | $7.8\times10^{-5}$ | 0.68 | $1.9\times10^{-6}$ | 10 |
| RBC% | Kor | Per/Aspirin: + | 24 | 4 | 674 | -17.4 | -0.537 | 0.111 | $8.0\times10^{-3}$ | $3.9\times10^{-5}$ | 0.87 | $1.2\times10^{-6}$ | 6.8 |
| RBC% | Kor | Per/Dyslipidemiás | 24 | 4 | 711 | -18.7 | -0.540 | 0.123 | $7.7\times10^{-3}$ | $5.8\times10^{-5}$ | 0.86 | $2.1\times10^{-6}$ | 6.8 |
| FP50 | Kor | Cor | 43 | 6 | 0 | $2.4\times10^{-3}$ | 0 | 0 | $-8.2\times10^{-5}$ | $5.6\times10^{-5}$ | 0.17 | 0.012 | 0.079 |
| FP50 | Kor | Per | 26 | 6 | 0 | $8.6\times10^{-3}$ | 0 | 0 | $-5.6\times10^{-5}$ | $5.5\times10^{-6}$ | 0.73 | $7.2\times10^{-6}$ | 0.33 |
| FP50 | Kor | Cor/EKG:anterior | 10 | 1 | 0 | $6.0\times10^{-3}$ | 0 | 0 | $-6.3\times10^{-4}$ | $9.5\times10^{-4}$ | 0.70 | $6.0\times10^{-3}$ | 0.056 |
| FP50 | Kor | Cor/LAD | 14 | 1 | 0 | $3.2\times10^{-3}$ | 0 | 0 | $-1.4\times10^{-4}$ | $1.1\times10^{-4}$ | 0.27 | $3.6\times10^{-4}$ | 0.038 |
| Fibrin% | CRP | Cor/Férfi | 27 | 4 | 90.4 | -2.30 | -0.971 | 0.020 | 0 | $3.0\times10^{-3}$ | 0.73 | $9.5\times10^{-6}$ | 14 |



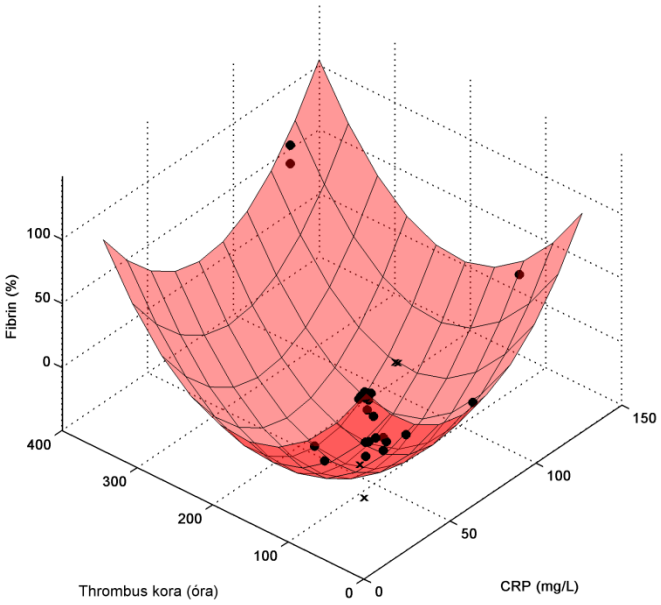

***15. ábra:*** **A beteg korának és a thrombus korának együttes hatása dyslipidaemiás perifériás betegek intrathromboticus vörösvértest tartalmára.** A vérrög százalékos vörösvértest-tartalmát (RBC%) a thrombus korának (órában) és a beteg korának (években) függvényében ábrázoltuk. A regressziós felszínt a kiugró értékek (x) eltávolítása után maradt adatpontokra (o) illesztettük. ◀




***16. ábra:*** **A beteg korának és a thrombus korának együttes hatása perifériás thrombusok fluoreszcens fibrin/vérlemezke arányára.** A fluoreszcens fibrin/vérlemezke arány mediánt (FP50) a thrombus korának (órában) és a beteg korának (években) függvényében ábrázoltuk. A regressziós felszínt a kiugró értékek (x) eltávolítása után maradt adatpontokra (o) illesztettük. ▶

### *4.5. A C-reaktív protein (CRP) szint hatása*

A rendelkezésre álló adatok kis száma miatt a CRP érték analítikus hasznossága korlátozott volt a perifériás csoportban, mindazonáltal néhány elgondolkodtató tendencia megfigyelhető volt. Közel lineáris kapcsolat mutatkozott például a fluoreszcens FP50 értékek és a CRP szint között erős pozitív korrelációval ($R^2_{adj}$=0.94, *7. táblázat*) és egy hasonló, de gyengébb ($R^2_{adj}$=0.67) összefüggés jelent meg az intrathromboticus fibrintartalom esetében 120 mg/L CRP szint alatt (150 – 200 mg/L tartományban a parabolikus modell kisfokú csökkenő trendet mutatott). Coronaria thrombusokban erős ($R^2_{adj}$=0.73) kölcsönös függés volt megfigyelhető a CRP szint és a vérrög fibrintartalma között férfi betegekben, amennyiben a thrombusok korát is tartalmazta a regressziós modell második változóként: alacsonyabb CRP szint friss thrombusokban magasabb fibrintartalommal társult (*17. ábra*).




***17. ábra:*** **A fibrintartalom függése a thrombus korától és a CRP szinttől férfi coronaria betegekben.** A százalékos fibrintartalmat (Fibrin %) a thrombus kora (órában) és a CRP szint (mg/L) függvényében ábrázoltuk. A regressziós felszínt a kiugró értékek (x) eltávolítása után maradt adatpontokra (o) illesztettük.

***7. táblázat:*** **CRP hatásai a thrombusösszetételre.** Az egyszerű regressziót a $z = A_0 + A_{10}x + A_{20}x^2 + \varepsilon$ egyenlet alapján számítottuk, ahol *z* jelöli a függő változót és *x* reprezentálja a CRP szintet, mint független változót. A többszörös regressziót a $z = A_0 + A_{10}x + A_{01}y + A_{20}x^2 + A_{11}xy + A_{02}y^2 + \varepsilon$ egyenlet alapján számítottuk, ahol *z* a függő változó, *x* a CRP szint mint első regresszor, *y* pedig a második regresszor. $A_0$ – $A_{02}$ az együtthatók, $\varepsilon$ pedig a hibatényező mindkét egyenletben. n = minta eredeti elemszáma; m = kiugró értékek száma; $R^2_{adj}$ = módosított determinációs együttható; $P_{ANOVA}$ = a variancia analízis *P*-értéke; $\sigma_\varepsilon$ = az ε hibatényező varianciája; FP50 = a fluoreszcens fibrin/vérlemezke lefedettség arány mediánja; Fibrin% = thrombus százalékos fibrintartalma; Szál Ø = fibrin szálátmérő medián (µm); Thr. kor = thrombus kora (óra); Per = perifériás; Cor = coronaria.

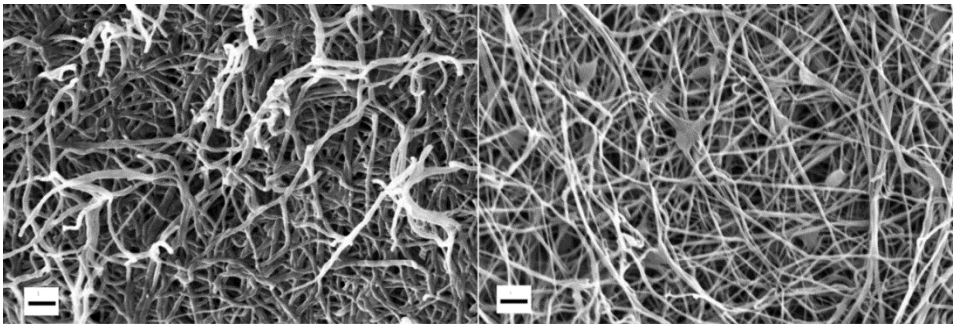
| z | y | Szűkítés | n | m | $A_0$ | $A_{10}$ | $A_{01}$ | $A_{20}$ | $A_{11}$ | $A_{02}$ | $R^2_{adj}$ | $P_{ANOVA}$ | $\sigma_\varepsilon$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FP50 | - | Per | 8 | 3 | 0.108 | 0 | - | $1.9\times10^{-5}$ | - | - | 0.94 | $3.9\times10^{-3}$ | 0.044 |
| Fibrin% | - | Per | 11 | 3 | 93.8 | 0.108 | - | $-4.9\times10^{-4}$ | - | - | 0.67 | 0.027 | 1.3 |
| Szál Ø | Fibrin% | Per | 11 | 0 | -3.03 | 0.002 | 0.072 | $-9.4\times10^{-6}$ | 0 | $-4.1\times10^{-4}$ | 0.65 | 0.032 | 0.016 |
| Fibrin% | Thr.kor | Cor/Férfi | 27 | 4 | 90.4 | -2.30 | -0.971 | 0.0204 | 0 | $3.0\times10^{-3}$ | 0.73 | $9.5\times10^{-6}$ | 14 |

### *4.6. A dohányzás, mint a vérrög szerkezeti determinánsa*

A fibrintartalom figyelemre méltó különbsége jelent meg dohányzó és nem dohányzó coronaria betegek között. Míg az átlagos fibrintartalom nem dohányzók esetén 62.2% volt, dohányosoknál 78.14%-os értéket ért el ($P<0.05$, *2. táblázat*). Ehhez hasonló eltérés volt megfigyelhető, ha a nem dohányzók csoportja az ex-dohányosok adatait is tartalmazta. A fibrintartalom fenti alakulásával összhangban a FP50 értékek is szignifikánsan alacsonyabbak voltak nem dohányzókban (átlag 0.24 ex-dohányosokkal együtt), mint az aktívan dohányzók között (0.86) a teljes betegmintában ($P<0.01$). A dohányzásnak közvetlen hatását a thrombus vörösvértest-tartalmára nem találtuk.

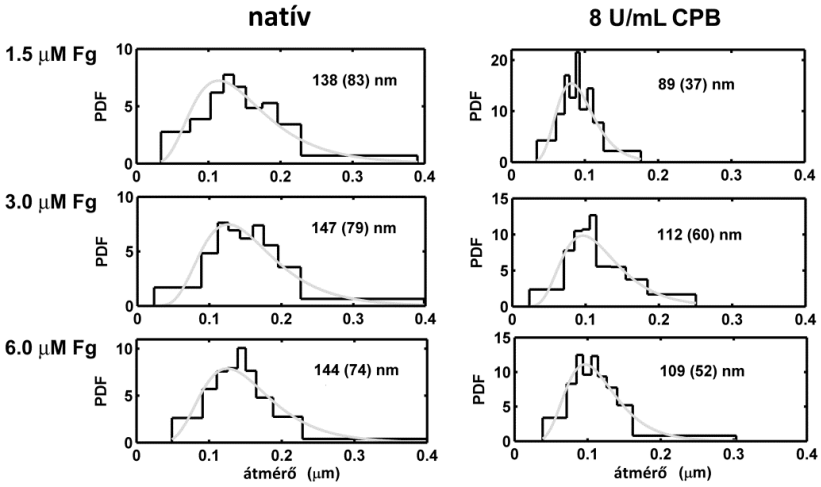
### *4.7. Karboxipeptidáz B (CPB) és arginin hatása a fibrinszerkezetre*

Már régebb óta ismert volt, hogy az alvadás idején jelenlévő CPB, amely a TAFI stabil analógja, már a lysis kezdete előtt is hatást gyakorol a fibrin turbiditására. A fibrinháló szerkezetét érintő hatások pásztázó elektronmikroszkóppal nyertek igazolást (*18. ábra*): CPB jelenléte fiziológiás koncentrációjú fibrinogén (1.5-6 μM) alvasztásakor a fibrin szálátmérő 21-25%-os csökkenését eredményezte (*19. ábra*). Minthogy a natív fibrinogén molekula nem tartalmaz hasítóhelyet (C-terminális lizint vagy arginint) a CPB számára, tiszta rendszerben a CPB egyetlen szubsztrátja a thrombin által leválasztott fibrinopeptidek C-terminális argininje lehet. Amennyiben az összes fibrinogén összes fibrinopeptidjének (4 fibrinopeptid/fibrinogén) C-terminális argininje lehasad, 2-4 g/L fibrinogén koncentrációból kiindulva az arginin 25-50 μM-os lokális koncentrációemelkedésével számolhatunk a rendszerben (ezt megerősítik a TAFI általi arginin felszabadítást közvetlenül detektáló mérések: 10 μM az első 5 percben [133]).



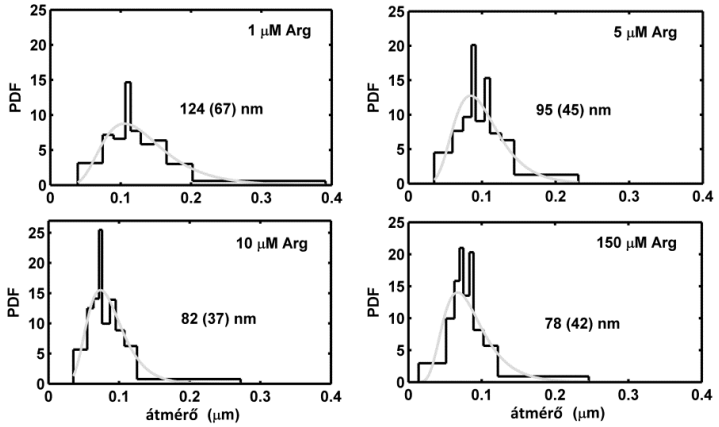
***18. ábra:*** **A fibrin ultrastruktúrájának módosítása karboxipeptidáz B (CPB) által.** 6 μM fibrinogénből alvasztott natív (bal oldal), ill. 8 U/mL CPB-vel kezelt fibrin (jobb oldal). Lépték = 1 μm.

Ennek a maximális koncentrációnak az 5 – 20%-át használva a fibrinszerkezetnek a CPB jelenlétében tapasztalttal azonos változásait figyeltük meg (*20. ábra*). Figyelembe véve ezeket a szerkezeti változásokat, valamint hogy az arginin normál plazma koncentrációja kb. 100 μM [134], adja magát a következtetés, hogy *in vitro* körülmények között mikromoláris koncentrációjú arginin hozzáadásával lehet csak hűen modellezni fibrinszerkezet-függő folyamatokat.




***19. ábra:*** **A szálátmérő változása 8 U/mL karboxipeptidáz B (CPB) jelenlétében.** Az elektronmikroszkópos analízis során képenként 300 szál átmérőjének empirikus (fekete hisztogramok), illetve teoretikus (szürke görbék) sűrűségfüggvényét (PDF) határoztuk meg. A feltüntetett értékek az elméleti eloszlás medián és interkvartilis tartomány (zárójelben) értékei. A fibrinogén (Fg) koncentrációját bal oldalon tüntettük fel. ◄

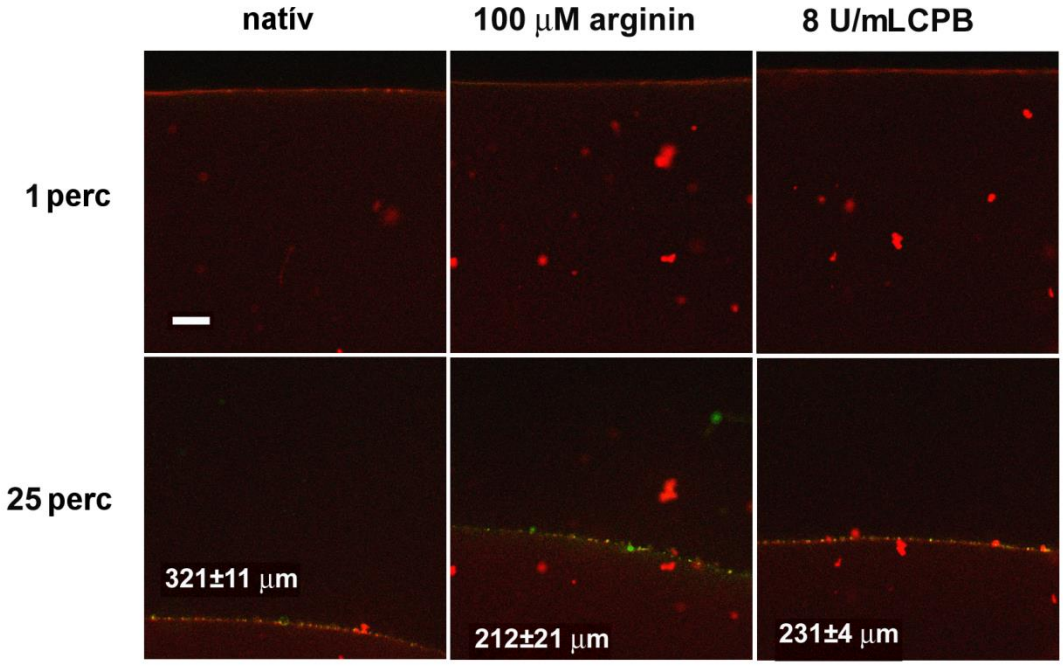
***20. ábra:*** **Az arginin hatása a szálátmérőre.** A *19. ábranál* leírtakkal megegyezően kvantifikáltuk az arginin fibrinszál átmérőre gyakorolt hatását, 6 μM fibrinogénből kiindulva, a panelek jobb felső sarkában feltüntetett arginin (Arg) koncentrációk jelenlétében. ►



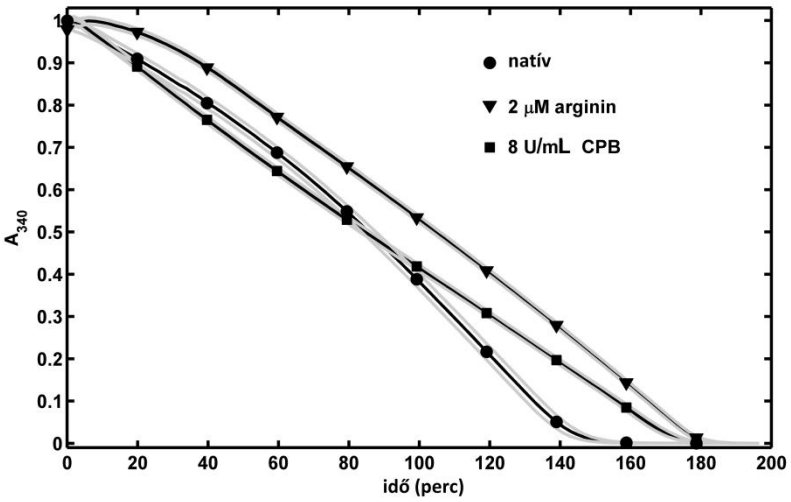

### *4.8. CPB hatása a lysisre, arginin hatása a lysisre*

Mikroszkópikus szinten, konfokális mikroszkóppal vizsgálva a CPB által módosított fibrin tPA indukálta lysisét, az szignifikánsan lassabb volt a natív fibrinhez képest, ugyanakkor a tPA granuláris mintázatú akkumulációja a natív fibrinnél megfigyelhetőhöz hasonlóan itt is tapasztalható volt (*21. ábra*). A lysis kinetikáját turbidimetriával követve, felszínről indított lysis során a CPB 8 U/mL koncentrációnál fejtette ki maximális gátlóhatását és hasonló szintű gátlás volt megfigyelhető már 2 μM

arginin jelenlétében is (*22. ábra*). Mind CPB, mind arginin jelenlétében elmaradt a natív fibrin lysisénél megfigyelhető késői akceleráció, és bár a teljes feloldódásig tartó idő megegyezett, a lysis kinetikája valamelyest különböző volt, amely eltérő hatásmechanizmust vet fel a két ágens esetében. Ennek pontosabb karakterizálására két mérést állí-



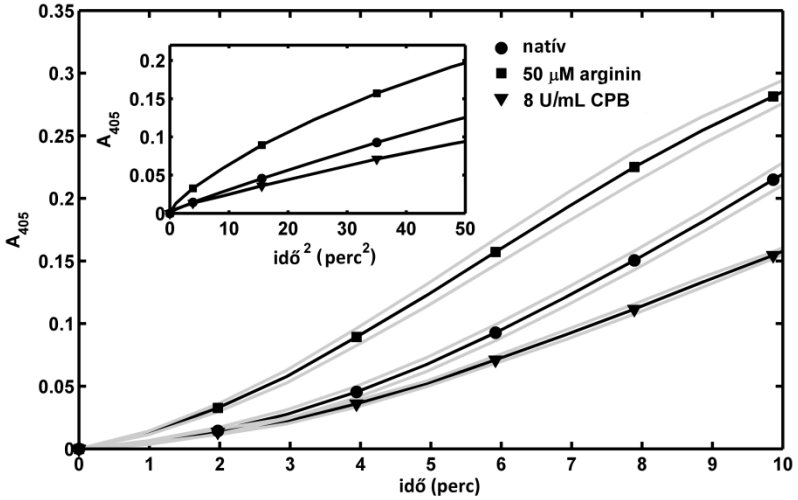

***21. ábra:*** **Arginin és karboxipeptidáz B hatásai a tPA-YFP fibrin-penetrációjára a lysis folyamata során.** Vörös fluorophorral jelölt fibrinogénből és plazminogénből álló, arginint vagy CPB-t is tartalmazó alvadékok felszínére tPA-YFP-t rétegeztünk (a képek felső részén látható) és a folyadék/fibrin határfelszínt konfokális lézer pásztázó mikroszkópiával monitoroztuk kettős fluoreszcens követést alkalmazva (a tPA zöld, a fibrin vörös fluoreszcencia formájában jelenik meg). A tPA-YFP felszínre rétegzésétől eltelt időt bal oldalon jelöltük, a bal felső panelen látható lépték 50 μm-t jelöl. Az alsó paneleken látható számok a tPA-YFP penetrációjának távolságát mutatják 25 perc után (átlag és SD 3 mintából; az arginin és CPB esetén kapott értékek a tiszta fibrinnél megfigyelhetőtől az elvégzett Kolmogorov-Smirnov-teszt alapján $P<0.05$ szignifikancia-szinten különböznek).




***22. ábra:*** **Arginin és karboxipeptidáz (CPB) hatása a fibrin alvadék oldására.** A plazminogént és arginint/CPB-t tartalmazó fibrinre tPA-t rétegeztünk. A 340 nm-en folyamatosan mért abszorbanciát ($A_{340}$) relatív egységekben tüntettük fel, a görbék maximális $A_{340}$ értékére normalizálva. 3 független kísérlet 8 mérésének átlagait ábrázoltuk (feketével, jelölve minden 10. mérési adat). Szürkével a standard hibát jelöltük.

tottunk össze: egyiknél csak a plazmin keletkezését követtük (*23. ábra*), a másiknál aktív enzim használatával kikerültük a plazminogén aktiváció fázisát (*24. ábra*).

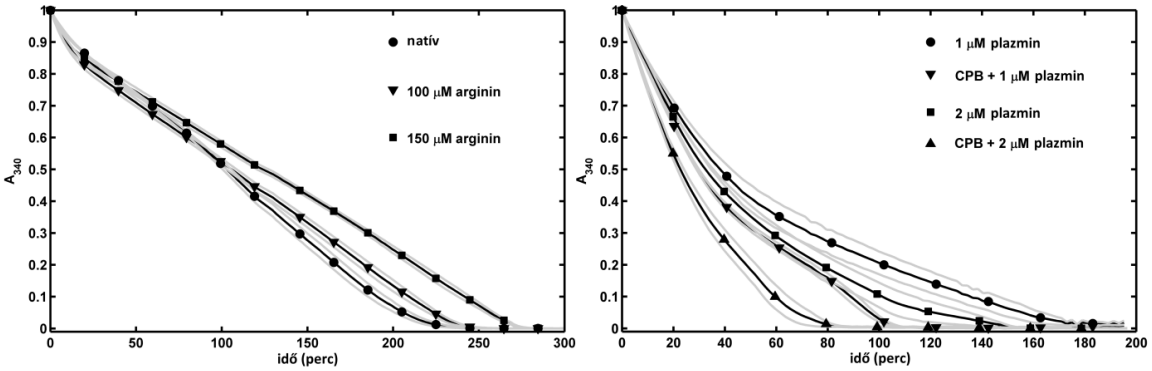
A CPB és az arginin hatását a tPA általi plazminogén aktivációra szintetikus plazmin szubsztrát felhasználásával követtük. A vártnak megfelelően a plazmin keletkezését a CPB gátolta, feltehetően az újonnan exponálódó C-terminális lizinek fibrinről való eltávolításával. Ezzel szemben az arginin jelenlétében kialakult fibrin a natívnál jobb táptalajnak bizonyult a plazminogén aktiváció szempontjából (*23. ábra*), a teljes lysisre gyakorolt gátló hatás ellenére. Megjegyzendő még, hogy az arginin nem befolyásolta a tPA általi plazminogén aktivációt fibrinmentes rendszerben.




***23. ábra:*** **Plazminogén aktiváció a fibrin felszínén.** A plazminogént és arginint / CPB-t tartalmazó fibrin alvadék felszínére tPA-t és szintetikus kromogén plazmin szubsztrátot rétegeztünk, az abszorbanciát 405 nm-en mértük. 3 független kísérlet 8 mérésének átlagait ábrázoltuk (feketével, szimbólum minden 5. mérési adatnál). Szürkével a standard hibát jelöltük. Mellékletben: a nyers adatok másodlagos ábrázolása, ahol a görbék meredeksége reprezentálja a maximális plazminogén aktivációs sebességet a 3.3. fejezetben ismertetettek szerint (1.1 nM/perc natív, 0.8 nM/perc CPB-módosított fibrin, 1.8 nM/perc arginin-módosított fibrin esetében).

Amennyiben aktív plazmint rétegeztünk a fibrin gélre, a tPA-val indított lysisnél megfigyelthez hasonló lassabb oldást figyeltünk meg arginin jelenlétében (*24. ábra*, bal oldalon). Váratlan volt ugyanakkor, hogy a CPB mellett létrehozott fibrin érzékenyebb volt a felszíni plazminnal indított degradációra (*24. ábra*, jobb oldalon): a natív fibrin feloldódása 2 μM plazminnal ugyanannyi időt vett igénybe, mint a CPB-kezelt fibrin oldása 1 μM koncentrációjú plazminnal (*8. táblázat*). Ugyanakkor a plazmin fibrinben történő homogén eloszlatásával sem az arginin gátló, sem a CPB facilitáló hatása nem mutatkozott. A két mérési elrendezés között tapasztalt eltérő modulációs hatás jelzi,

hogy a hatásmechanizmusban szerepe van a plazmin penetráció fibrinszerkezettel kapcsolatos varianciájának.

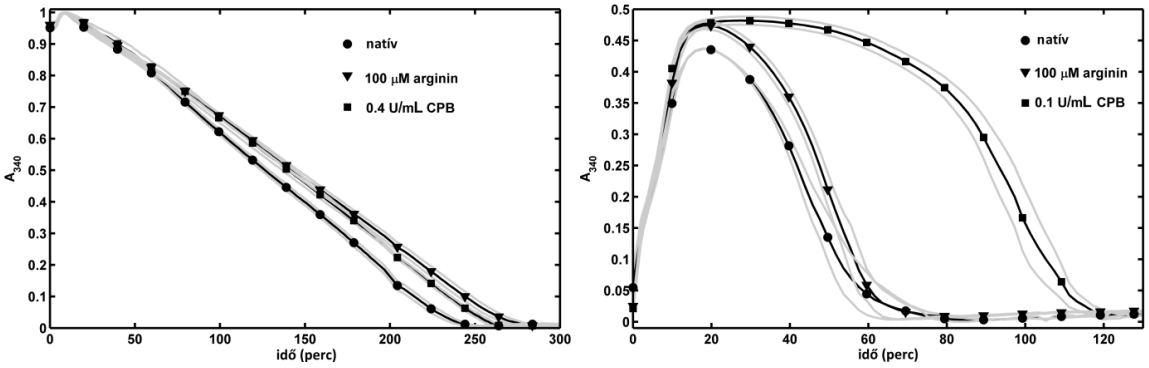



***24. ábra:*** **Fibrinoldás felszínen alkalmazott plazminnal.** Arginint vagy CPB-t tartalmazó fibrinogénhez thrombint adtunk, majd az alvadás lejátszódása után a kialakult gél felszínére plazmint rétegeztünk, az abszorbanciát 340 nm-en mértük. A turbiditást ($A_{340}$) relatív egységekben tüntettük fel, az egyes görbék maximális abszorbancia értékére normalizálva. 3 független kísérlet 8 mérésének átlagait ábrázoltuk (feketével, szimbólum minden 10. mérési adatnál). Szürkével a standard hibát jelöltük. Bal oldalon: arginin hatása 0.5 μM plazminnal indított lysisre. Jobb oldalon: 8 U/mL CPB hatása plazminnal indított lysisre.

***8. táblázat:*** **A karboxipeptidáz B hatása a plazmin katalizálta fibrin degradáció kinetikájára.** *t* a maximális abszorbancia adott hányadára (alsó indexben) csökkenéséig eltelt időt jelöli, az értékek 3 független kísérlet 8 méréséből kapott számtani átlagok percben ± SD. * a CPB-kezelt és natív minták közötti, Kolmogorov-Smirnov teszt szerinti $P<0.05$ különbséget jelöli.

| | **0.5 μM plazmin** | | **1.0 μM plazmin** | | **2.0 μM plazmin** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **CPB** | 0 | 8 U/mL | 0 | 8 U/mL | 0 | 8 U/mL |
| $t_{0.9}$ | 7.9 ± 0.7 | 10.4 ± 0.6* | 5.8 ± 0.7 | 3.8 ± 0.3* | 5.4 ± 1.4 | 3.9 ± 0.2 |
| $t_{0.5}$ | 75.4 ± 6.7 | 81.8 ± 2.3 | 46.5 ± 0.8 | 37.0 ± 3.5* | 33.1 ± 5.6 | 23.0 ± 2.6* |
| $t_{0.3}$ | 126.0 ± 9.3 | 126.3 ± 1.2 | 77.6 ± 0.9 | 68.8 ± 4.0* | 54.4 ± 11.1 | 35.6 ± 6.4* |
| $t_{0.1}$ | 187.0 ± 9.0 | 165.0 ± 2.6* | 126.5 ± 4.1 | 110.5 ± 3.4* | 90.6 ± 19.2 | 54.5 ± 8.8* |

A tisztított komponensekből összeállított rendszerekhez hasonlóan az arginin és a CPB késleltette a vérplazmából létrehozott alvadékok tPA iniciált feloldását (*25. ábra*) is. A CPB a plazma alvadékok lysisét a tiszta rendszerben használthoz képest már jóval alacsonyabb koncentrációban is hatékonyan gátolta. Amennyiben a tPA-t az alvasztás megindítása előtt homogénen eloszlattuk az elegyben, 0.1 U/mL CPB az 50%-os lysishez szükséges időt kétszeresére növelte, míg a 100 μM koncentrációban hozzáadott arginin ugyanilyen mérési szituációban minimális befolyást gyakorolt csupán (*25. ábra*, jobb oldalon). Fibrinfelszínre rétegzett tPA-val iniciálva az oldást, az arginin hatása a 0.4 U/mL CPB jelenlétében tapasztattal megegyező mértékű volt (*25. ábra*, bal oldalon).




***25. ábra:*** **Arginin és karboxipeptidáz B hatása a fibrinolysisre plazma környezetben.** Az arginint / CPB-t tartalmazó citráttal antikoagulált plazmát thrombin és calcium hozzáadásával alvasztottuk, a fibrinolysist tPA felszínre rétegzésével (30 nM koncentrációban, bal oldalon) vagy az alvadást megelőzően az elegybe keverésével (0.8 nM koncentrációban, jobb oldalon) indítottuk. Az abszorbanciát 340 nm-en mértük ($A_{340}$). 3 független kísérlet 4 mérésének átlagait ábrázoltuk (feketével, szimbólum minden 10. mérési adatnál). Szürkével a standard hibát jelöltük.

# 5. MEGBESZÉLÉS

## *5.1. Szerkezeti különbségek coronaria és perifériás artériás thrombusok között*

Számos különbséget találtunk a coronaria és a perifériás arteriákból származó thrombusok között, amik a vérrögképződéssel és a hemodinamikai faktorokkal kapcsolatos, korábban már feltérképezett molekuláris mechanizmusokra vezethetők vissza. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételeken szignifikáns különbség ábrázolódott a fibrin szálátmérő tekintetében: koszorúér thrombusok vékonyabb szálú, finomabb szerkezetű, perifériás thrombusok vastagabb szálú, durvább fibrinből épültek fel (*2. táblázat*), amely összhangban áll korábbi *ex vivo* megfigyelésekkel [65]. A szálátmérő egyik jól ismert *in vitro* determinánsa az alvadási folyamat színhelyén rendelkezésre álló fibrinogen plazmafehérje mennyisége [32]; alacsonyabb lokális fibrinogen és fibrin koncentráció finom szerkezetű, vékony szálú hálózatot hoz létre. A lokális fibrin koncentráció szálvastagság meghatározásában betöltött *in vivo* szerepét látszik igazolni az általunk megfigyelt pozitív korreláció a szálátmérő és a fluoreszcens fibrin/vérlemezke lefedettség arány között (*11. ábra*), valamint a coronaria thrombusokban ugyancsak alacsonyabbnak mutatkozó százalékos fibrintartalom. Minthogy a szálátmérő másik ismert determinánsáról, nevezetesen a lokális thrombin aktivitásról [135] nem állt rendelkezésre direkt adatunk, e faktor szerepét csak közvetve, a thrombin képződését elősegítő vérlemezkék relatív mennyiségéből következtetve tudtuk becsülni. Ilyenformán a coronaria thrombusokban mért alacsonyabb fibrin/vérlemezke arány (*3. ábra*, *2. táblázat*) magasabb lokális thrombin aktivitást sejtet, ami ismerten a vékony szálú, finom struktúrájú fibrin kialakulásának kedvez [6,135]. Valószínűleg hemodinamikai faktorok a felelősek a magasabb fibrin/vérlemezke arányért nagyobb átmérőjű koszorúerekben (*4. ábra*), ugyanis a nagy nyírási sebesség jellemezte kisebb artériák hajlamosabbak vérlemezkében gazdag, ugyanakkor vörösvértestben és fibrinben szegény vérrögök kialakítására [106,136]. A vörösvértest-tartalomban nem tapasztaltunk szignifikáns differenciát a két fő thrombuscsoport között, a ramus circumflexus (CX) és hasi aorta aneurysma (AAA) lokalizáció szerinti alcsoportok összehasonlításakor látott különbséget pedig az aorta aneurysmák thrombosisának speciális, időben elhúzódó, rétegről rétegre történő

kialakulása miatt nem tartjuk reprezentatívnak a perifériás thrombusok egészére vonatkozóan.

### *5.2. Vér- és vérrög-összetétel közötti relációk*

A haematocrit és a coronaria thrombusok vérlemezke-tartalma között megfigyelt parabolikus összefüggésért (*3. táblázat*) a reológiai faktorok összjátéka tehető felelőssé. Magas haematocrit esetén az érlumen centrális részén áramló vörösvértest tömeg a vérlemezkéket radiális irányba nyomva az érfal felé tereli azokat, ilymódon az érfal közvetlen szomszédságában egy vérlemezke-dús plazma réteg alakul ki, amely lehetővé teszi a vérlemezkék nagy mennyiségű felhalmozódását az útjukba kerülő endothel dehiscentia területén. Másfelől alacsony haematocritnál a vér viszkozitása csökken és a – például anaemiában megfigyelhető – kompenzatorikus hiperdinám keringés szintén kedvez a vérlemezke depoziciónak. Megjegyzésre érdemes, hogy sem 0.5 feletti, sem 0.24 alatti haematocrit érték nem szerepelt az adataink között, ami nyitva hagyja a pl. polycythaemiában vagy gravis anaemiában megfigyelhető extrém haematocrit thrombusszerkezetre gyakorolt hatásának kérdését.

Perifériás betegekben az aspirin fokozta a thrombus vérlemezke-tartalmának függését a szisztémás vérlemezkeszámtól (*7. ábra, 4. táblázat*). A vegyület a vérlemezke aktiváló mediátorok lokális felszabadulását gátolja és jelenlétében sokkal inkább a szisztémás, semmint a lokális faktorok jutnak érvényre a thrombus összetételének alakításában. A mediator felszabadulás rendszeres dohányzókban [137], illetve statint szedőkben [138] előforduló károsodásával magyarázható a vérlemezke-tartalom kifejezett függése a szisztémás vérlemezkeszámtól dohányzó, illetve – a rutinszerűen statin terápiában részesülő – dyslipidaemiás coronaria betegeknél, mely megfigyelések ugyancsak a lokális faktorok iránti érzékenység csökkenését jelzik.

### *5.3. Mért ultrastrukturális jellemzők összefüggései*

A megfigyelt fordított korreláció az intrathromboticus vörösvértest és fibrintartalom között (*5. táblázat*) nem meglepő, ha figyelembe vesszük a tényt, hogy a vörösvértestek a vérrög térfogatának nagy hányadát elfoglalhatják, ezzel mintegy kiszorítva a fibrint a rendelkezésre álló intrathromboticus területről. Mindazonáltal a vörösvértest-tartalomnak semmilyen hatását nem tapasztaltuk a fibrin szálvastagságra, amit azonban korábban demonstráltunk *in vitro*, tisztított fibrint és vörösvértestet tartalmazó

rendszerekben [32]. Ez az eltérés betudható az összetettebb *in vivo* környezetnek. Például a korábban említett magasabb vérlemezke-tartalom – vékonyabb fibrinszál kapcsolat mellett megfigyeltük a vörösvértestben szegény thrombusok nagyobb vérlemezke-tartalmát is. Ilyen módon tehát a fibrinszerkezet vérlemezkék általi modulációja ellensúlyozhatja az alacsony vörösvértest-tartalom szálvastagító hatását [32]. Mi több, megfigyeltünk egy komplex asszociációt a szisztémás vörösvértest- és fehérvérsejtszámok, valamint a vérrög thrombocyta-tartalma között (*8. ábra, 3. táblázat*), ami aláhúzza a fehér- és vörös thrombusok közötti klasszikus különbségtétel finomításának szükségességét több tényezőre kiterjedő analízis igénybevételével. Ebben a komplex összefüggésben alacsony fehérvérsejtszám esetén a thrombus thrombocyta-tartalma a vörösvértestszámmal párhuzamosan emelkedik, amelyben a keringő vörösvértestek sztérikus hatása tekinthető elsődleges oki tényezőnek, magas fehérvérsejtszámnál viszont a reláció megfordul és a növekvő szisztémás sejttartalom alacsony intrathromboticus vérlemezke arányt von maga után, mely jelenség hátterében valamilyen, a monocyta-thrombocyta aggregátumok mintájára [139] elképzelhető általános leukocyta-thrombocyta interakció merül fel.

### *5.4. A thrombus-architektúra változása az idő függvényében*

A tünetek fellépése és a thrombus eltávolítása között eltelt időnek nagy jelentőséget tulajdonítanak a coronaria thrombusok szerkezetének alakulásában [108,109]. A mi megfigyeléseink valamivel árnyaltabb képet mutattak a thrombus összetétele és kora közötti összefüggésről. Koszorúér thrombusokban a fibrintartalom nem egyenes arányban, inkább parabolikus függésben állt a vérrög korával (*6. táblázat*). Az elemzést friss (<24 órás) thrombusokra korlátozva egy, a fibrintartalomra vonatkozó kifejezett negatív hatás körvonalazódott (*13. ábra*). A perifériás thrombusok kora sokkal szélesebb tartományban mozgott, amit a vérlemezke-tartalom harang alakú regressziós görbét adva követett: néhány hetes thrombusok körülbelül ugyanannyi vérlemezkét tartalmaztak, mint a friss thrombusok, míg a köztes korú vérrögökre a magasabb vérlemezke-tartalom volt jellemző. Az analízis első 168 órára való korlátozása ugyanakkor a vérlemezke-tartalom 0%-ról 29%-ra emelkedő tendenciáját fedte fel. A thrombocyták jelenlétének ilyen jellegű idő-függése eltér a korábban leírt, különböző lokalizációjú és korú thrombusok elemzésével nyert irodalmi adatoktól [109], ami azt sugallja, hogy ezek az idő-függő strukturális változások nem általánosíthatók minden

fajta artériás betegségre. Továbbmenve, a beteg kora és CRP szintje szintén befolyásolhatják ezeket a szerkezeti tendenciákat (*6. táblázat*). Fontos azonban hozzátenni, hogy noha a leírásban konzekvensen a „thrombus kora" kifejezést használjuk, a vérrögök valódi kora lényegesen meghaladhatja a tünetek fellépte óta eltelt időtartamot [140].

### *5.5. CRP hatásai a thrombusszerkezetre*

A gyulladás és a thrombosis több ponton kapcsolódó folyamatok. A CRP, egy akut fázis fehérje és a klinikai gyakorlatban széleskörűen használt gyulladásos marker, nemcsak emelkedett thromboticus állapotokban, de befolyásolja is a fibrin és vérlemezke lerakódás folyamatát. Magas CRP szintek és állandó fibrinogen koncentráció mellett kialakult plazma alvadékok nagy szakítószilárdságúak és denzebb, kevésbé permeábilis szerkezetűek [66,141]. A fibrin hálózat ilyen jellegű változásai összefüggésben lehetnek a CRP fibrinogénhez való kötődésével [142], de az akut fázis protein endothel sejteken és monocytákon leírt, szöveti faktor expressziót fokozó hatásával is [143,144]. Ezekkel az adatokkal összhangban, két különböző mikroszkópos modalitás segítségével tett megfigyeléseink pozitív korrelációt mutattak a CRP szint és a vérrög fibrintartalma között perifériás thrombusokban (*7. táblázat*). Coronaria betegeknél a CRP hatását csak a thrombus korával, mint második regresszorral kombinálva tudtuk detektálni (*7. táblázat*), ami a CRP hatások idő-függő természetét és a perifériás érműtétek idejére (átlag 174.8 óra, coronaria átlag 14.6 óra) már komplettálódott voltát sugallja.

### *5.6. Dohányzás hatásai a thrombusszerkezetre*

Dohányosok plazma alvadékainak fibrintartalma magasabbnak bizonyult, a leszokás pedig közelebb hozza az értéket a nem dohányzókban mérhetőhöz [67]. A mi méréseink mind a fibrintartalmat (a coronaria csoportban), mind a fluoreszcens fibrin/vérlemezke lefedettség arányt szignifikánsan magasabbnak mutatták dohányzó betegekből származó vérrögök esetében (*2. táblázat*), az ex-dohányosok mintáiban mért értékek pedig alig különböztek a nem dohányzókéitól. Mivel a tömör fibrin állomány csökkent fibrinolyticus érzékenységgel párosul, a dohányzás agresszívabb kórlefolyást és rosszabb terápiás válaszkészséget eredményezhet.

### *5.7. CPB és arginin fibrinolysisre gyakorolt hatásai, in vivo relevancia*

A TAFI anti-fibrinolyticus aktivitását felfedezése óta [145] a plazmin generálta C-terminális lizinek fibrinről való eltávolításának tudjuk be, de a TAFI szintjének cardio- és cerebrovascularis események prognózisát befolyásoló hatását populációs szinten a mai napig nem sikerült meggyőzően bizonyítani. Kutatásainkban CPB-t használtunk, egy homológ, de a TAFI-nál lényegesen hosszabb életidejű, bázikus aminosavak iránti specificitással bíró karboxipeptidázt. Méréseink a CPB aktivitás két következményét igazolták, amelyek antagonizálják a CPB anti-fibrinolyticus hatását (azaz a fibrinolysis során exponálódó C-terminális lizinek megtestesítette pozitív visszacsatolásos kör blokádját): 1) az alvadék felszínére jutó plazmin aktivitásának fokozását diffúziójának javítása révén, illetve 2) a plazminogén aktiváció fibrinszerkezet-függő facilitálását.

Váratlan volt, hogy a fibrin felszínén alkalmazott plazmin aktivitását a CPB potencírozta (*24. ábra*, jobb oldalon; *8. táblázat*): a leírt körülmények között a CPB kezelés felért a plazmin koncentráció megkétszerezésével. Ezzel ellentétben az alvadékban homogénen eloszlatott plazmin esetében a CPB hatástalannak bizonyult. A plazmin iránti szenzitizálódás magyarázható az újonnan exponálódó C-terminális lizinek leemésztésével, amelyek a plazmin kötőhelyéül szolgálva késleltethetik annak penetrációját az alvadékba. Az ilyen improduktív kötőhelyek eltávolításával a szabad és kötött plazmin közötti egyensúly az előbbi javára tolódik, amelyik ténylegesen részt vesz a fibrin mátrix bontásában. Ez a megfigyelés összhangban áll azokkal a korábban leírt adatokkal, amelyek szerint a TAFI fokozza a fibrinhez kötött plazmin $\alpha_2$-plazmin inhibitor általi gátlását [146] a gátlás sebességének csökkentéséért felelős kötőhelyek eltávolítása révén. A plazmin hatás fent említett potencírozása magyarázatot szolgáltat a TAFI anti-fibrinolyticus hatásának megfordulására olyan esetben, amikor bőségesen képződik plazmin a fibrin felszínén és ezzel a fibrinolysis sebességének meghatározójává a plazminogén aktiváció helyett a plazmin aktivitás válik [147-149], ezenkívül összhangban áll a fibrinolysis elméleti modelljei alapján kialakított becslésekkel is [150].

Ugyan a vártnak megfelelően a CPB lelassította a tPA-dependens lysist tiszta fibrinben (*22. ábra*) és plazma alvadékban is (*25. ábra*), az aktivátor lokalizációja (felszíni vagy intrathromboticus) nagyban befolyásolja az alvadék CPB moduláció iránti fogékonyságát: a felszíni plazmin diffúziójának javítása ellensúlyozza a plazminogén

aktiváció gátlását, míg e kompenzációs faktor hiánya effektív gátlóhatást tesz lehetővé homogén eloszlású rendszerben. Megfigyeltük továbbá, hogy a folyadékfázisú tPA katalizálta plazminogén aktiváció kevésbé érintett a korábbi tanulmányok által előrevetítetthez képest [133]. Olyan kísérleti elrendezésekben, ahol az enzimnek nem szükséges penetrálnia (pl. mert eleve egyenletesen oszlik el az alvadékban), a C-terminális lizinek lehasítása a plazminogén aktiváció sebességi állandóját 60%-kal csökkentette [133], ugyanakkor a CPB csak 27%-os csökkenést eredményezett a felszíni plazminogén aktiváció sebességében (*23. ábra*). Ez a diszkrepancia magyarázható a plazminogén aktiváció CPB jelenlétében kialakult vékony szálú fibrinen tapasztalható kompenzatorikus gyorsulásával.

Meglepő módon, a fentiekhez hasonló szerkezeti változások figyelhetők meg mikromoláris koncentrációjú arginin jelenlétében is. (*20. ábra*). Minthogy 250 μM-ig bezárólag az arginin nem befolyásolja a plazmin aktivitását szintetikus szubsztráton, sem a tPA-dependens plazminogén aktivációt fibrinmentes rendszerekben, az arginin által módosított fibrin hasznos eszköznek bizonyult a CPB két hatásának, a C-terminális lizinek lehasításának és a fibrinszerkezet módosításának az elkülönítésében. Az argininnel módosított fibrin minimális gátlóhatása a felszíni plazmin aktivitására (*24. ábra*, bal oldalon) kizárja a vékony szálú fibrin oki szerepét a CPB pro-fibrinolyticus funkciójában (*24. ábra*, jobb oldalon), alátámasztja viszont a C-terminális lizinjeitől megfosztott fibrin plazmin penetrációt elősegítő hatásának teóriáját. A plazminogén aktiváció gyorsulása argininnel módosított fibrinen (*23. ábra*) alátámasztja a következtetést, mely szerint a plazmin képződés a CPB-vel módosított fibrinen két antagonisztikus jelenség, a vékony szálú fibrin potencírozó és a C-terminális lizin emésztés gátló hatásának végeredménye.

Mindezekből a megfigyelésekből a karboxipeptidáz aktivitás, az arginin felszabadulás és a fibrin szerkezeti/funkcionális változásai közötti kauzális kapcsolatot felvető hipotézis körvonalazódik. Az arginin koncentrációnak a méréseinkben használt tartományon belüli változásai *in vivo* származhatnak a thrombin felszabadította fibrinopeptidek TAFI általi hasításából, miként az az arginin fiziológiás koncentrációjú fibrinogénből kialakított alvadékokban való közvetlen mérésével számítható [133]. A karboxipeptidáz aktivitás alternatív forrása lehet még a plazmában konstitutíven jelenlévő karboxipeptidáz N, illetve patológiás körülmények között akár a pancreas

eredetű CPB is [151]. A fenti megfontolások alapján számított arginin koncentrációnak már a töredéke is elég volt a CPB-vel tapasztalthoz hasonló strukturális változások létrehozásához (*18. ábra, 19. ábra*). Megjegyzésre érdemes, hogy tiszta fibrin tPA mediálta lysise során a TAFI mikromoláris koncentrációban szabadít fel mind arginint, mind lizint, azonban az előbbi néhány órán keresztül ötszörös koncentrációban van jelen az utóbbihoz képest [133]. Ezt a tényt általában figyelmen kívül hagyják a fibrinolysist *in vitro* modellező mérések összeállítása során.

Az arginin normál plazmakoncentrációja kb. 100 μM, tehát a véralvadékok *in vivo* képződésénél számolnunk kell egy minimális arginin szinttel. Ugyanakkor pl. sepsisben a szisztémás arginin koncentráció 50 μM alatti értékekre esik [152], ami lokálisan, NO szintázt expresszáló gyulladásos sejtek környezetében sepsis nélkül is végbemehet. Mi több, a vörösvértestek jelentős mennyiségben tartalmaznak arginázt [153], amely elhasználhatja az arginint vörösvértest-gazdag thrombusokban. Így tehát a thrombusok sejttartalmától függően az arginin lokális szintje a leírt hatások kiváltására alkalmas tartományon belül élénken változhat.

### *5.8. Klinikai és alapkutatási relevancia*

A vérrög összetételének kihatása a thromboticus betegségek kimenetelére széles körben tanulmányozott tudományos kérdés. Munkánk összekapcsolja a vérrög összetételének és ultrastrukturájának elemzését egyszerűen mérhető klinikai és laboratóriumi paraméterekkel (vérkép, plazma lipid profil, CRP szint, EKG eltérések, vérrög anatómiai lokalizációja, társbetegségek, dohányzás), így hasznos eszközt ajánl prognosztikus jelentőségű információk rutin klinikai adatokból történő kinyeréséhez, alternatívát kínálva a költséges és bonyolult technikák használatát megkövetelő eljárásokkal szemben. Konkrét példaként említhető az immunfluoreszcens vizualizáció, ami a vérlemezke-kitapadást modellező rendszerünkben beállított és az élőből származó thrombus mintákon kvantitatív analízisre is felhasznált módszerként kifogástalannak bizonyult a költséges és körülményes elektronmikroszkópos analízis alternatívájaként. Ezen túlmenően, a laboratóriumi és szerkezeti paraméterek között felfedett összefüggések értékes részletekkel egészítik ki a szisztémás és lokális *in vivo* faktorok thrombusképződésre gyakorolt hatásáról alkotott képünket.

A CPB-vel és argininnel végzett méréseink demonstrálják, hogy a fibrinolysis karboxipeptidáz-függő modulációja összetettebb, mint azt általában hiszik. Mindezidáig

a fibrinolysis gátlását a plazminogén aktiváció pozitív visszacsatolásának megakadályozásával vagy a plazmin $\alpha_2$-plazmin inhibitor általi inaktivációjának elősegítésével magyarázták. Eredményeink felvetik, hogy a fibrinolysis gátlását bizonyos fokig ellensúlyozzák a karboxipeptidázok (TAFI, CPN) fibrinszerkezet-módosításon keresztül megvalósuló, plazminogén aktivációt és plazmin diffúziót potencírozó funkciói. Ezen argumentumok feltétlenül mérlegelendők a TAFI-t, mint gyógyszer-targetet felvető terápiás elképzelések és fejlesztések értékelésekor [154-156].

# 6. KÖVETKEZTETÉSEK

- Coronaria és perifériás thrombusok között jelentős szerkezeti különbségek vannak: előbbiek relatív fibrintartalma alacsonyabb, vérlemezke-tartalma magasabb, fibrinrostjaik pedig vékonyabbak.
- A kisebb érátmérő inkább a fibrinben szegény, vérlemezkében gazdag thrombusok kialakulásának kedvez, amely jelenség hátterében a kis arteriákban uralkodó magasabb nyíróerők thrombocyta-depoziciót serkentő hatása feltételezhető.
- Coronaria thrombusokra és dohányzó betegekből eltávolított thrombusokra a fibrinolysis iránt ellenálóbb fibrinszerkezet jellemző.
- Az áramlási körülmények és a szisztémás sejtszámok nagyban befolyásolják a thrombusok szerkezetét. A vörösvértestek szisztémás számának emelkedésével a thrombusok vérlemezkében gazdagabbá válnak, ugyanakkor alacsony haematocrit értéknél is több vérlemezke kerül a vérrögökbe, mint köztes vörösvértestszám esetén.
- A vérlemezke-gátló szerek a lokális hatásokat elnyomva a szisztémás hatásokat juttatják érvényre a thrombus vérlemezke-tartalmának kialakításában és ugyanilyen hatás feltételezhető a dyslipidaemiás betegek általános gyógyszerének tekinthető statinok esetében is.
- A fibrinszerkezetet a rendelkezésre álló fibrin koncentrációja és a vérlemezkék jelenléte *in vivo* is befolyásolja, minthogy a vérlemezkék hozzájárulnak a lokális thrombin aktivitás emelkedéséhez, amely a fibrinszálak vastagságának talán legismertebb determinánsa a fibrinogén koncentráció mellett.
- A fenti összefüggéseket az esetleges társbetegségek, mint az atherosclerosis és a dyslipidaemia jelentősen erősítik.
- A thrombusok szerkezetének elemzése fontos szempont a terápiás válaszkészség becslésében. E tekintetben a vérlemezke-kitapadást modellező áramlási rendszerben beállított és a bemutatottak alapján az élőből eltávolított thrombusok kvantitatív elemzésére is jól használható immunfluoreszcens

analízis egyszerűsége miatt akár a mindennapi diagnosztikus eszköztárnak is hasznos kiegészítője lehet.

- A TAFI stabil analógjaként használt CPB és az arginin jelenléte egyaránt a finom szerkezetű, plazminogén aktivációt potencírozó, de a lysis iránt ellenálóbb fibrin kialakulásának kedvez.
- A CPB ugyanakkor segíti a plazmin diffúzióját az alvadék belsejébe, ezért pro-fibrinolyticus hatást is kifejthet.
- A TAFI fentiekből kirajzolódó komplex aktivitása feltétlenül figyelembe veendő az enzimet mint farmakológiai célpontot felvető elképzelések átgondolásakor.

# 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A thrombus összetétele meghatározza az acut myocardialis infarctus (AMI) és a perifériás arteriás betegség terápiájának kimenetelét. Jelen tanulmányban a thrombusok szerkezeti jellemzői és rutin klinikai paraméterek közötti korrelációkat kerestünk. Heterogén betegcsoportban thromboaspirációval (AMI után) és thromb-endarterectomiával (perifériás arteriákból) eltávolított thrombusokat vizsgáltunk pásztázó elektronmikroszkópos és áramlási vérlemezke-adhéziós modellben beállított immunfluoreszcens technikával, hogy meghatározzuk azok fibrin- és sejttartalmát. A szerkezeti paraméterek és válogatott klinikai adatok (kor, nem, thrombus lokalizációja, vérkép, C-reaktív protein szint, EKG eltérések, vérlemezke-gátló kezelés, társ-betegségek, dohányzás) összefüggéseit vizsgáltuk. Szignifikáns különbségeket találtunk coronaria és perifériás, illetve dohányzókból és nem dohányzókból származó thrombusok között. A thrombusösszetételt a szisztémás sejtszámok, a thrombus kora, a társbetegségek és a vérlemezke-gátló kezelés befolyásolták. Többszörös regressziós analízis további asszociációs mintázatokat fedett fel. A leírt összefüggések hasznos ada-tokkal szolgálhatnak az arteriás thrombosisok terápiás válaszkészségének becsléséhez.

Az oldódó fibrinben szabaddá váló C-terminális lizin aminosavak eltávolítása jól ismert, a thrombin által aktivált fibrinolysis inhibitor (TAFI) működésétől függő anti-fibrinolyticus mechanizmus, mely enzim ugyanakkor a fibrinogén alvadása során exponálódó arginineket (Arg) is eltávolítja. Az ismertetett kísérletekben a fibrinszerkezet karboxipeptidáz aktivitáshoz köthető változásainak hatását vizsgáltuk a szöveti típusú plazminogén aktivátor (tPA) indukált plazminogén aktivációra és a fibrin plazmin-dependens lysis iránti érzékenységére. A TAFI-val azonos szubsztrátspecificitású, stabil karboxipeptidáz B (CPB) 8 U/mL koncentrációban és az Arg 5-10 μM koncentrációban egyaránt vékony szálú, sűrűbb fibrinháló kialakulását idézték elő. Az Arg-kezelt, finom szerkezetű fibrin fokozta a plazminogén aktivációt, de a fluoreszcens tPA-val indukált lysist lelassította. Másfelől a plazminnal indított lysis CPB-kezelt fibrinen felgyorsult. Ezek az eredmények igazolják, hogy a CPB aktivitás nyomán finom szerkezetű fibrin jön létre, amely ellenállóbb a tPA-indukált lysis iránt, ugyanakkor a CPB és a plazmin együtt facilitálhatják is a fibinolysist, valószínűleg a plazmin diffúziójának javításával. Mindezen hatások feltétlenül mérlegelendők a TAFI-t mint gyógyszer-targetet felvető terápiás elképzelések és fejlesztések értékelésekor.

## 8. SUMMARY

Thrombus composition profoundly affects the outcome of treatment in acute myocardial infarction (AMI) and peripheral artery disease. We sought correlations between structural features of thrombi and routinely measured clinical parameters. Thrombi removed by thromboaspiration following AMI or thrombendarterectomy of peripheral arteries in a heterogeneous patient population were processed by a) scanning electronmicroscopy and b) immunofluorescent technique established in a flow chamber platelet adhesion model, to determine fibrin fibre diameter and relative occupancy by fibrin and cells. Correlations between the structural features and selected clinical parameters (age, sex, vascular localization, blood cell counts, C-reactive protein, ECG findings, antiplatelet medication, accompanying diseases, smoking) were assessed. Significant differences were observed between coronary and peripheral thrombi and between thrombi from smoking and non-smoking patients. Thrombus composition was found to be determined by systemic cell counts and the age of thrombi. Co-morbidities and antiplatelet medication strongly influenced these correlations and multivariable regression analysis revealed more complex association patterns. The revealed interrelations may provide a helpful tool to estimate therapeutic responsiveness.

Removal of C-terminal lysine residues that are exposed in lysing fibrin is an established anti-fibrinolytic mechanism dependent on thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), which also removes arginines (Arg) that are exposed at the time of fibrinogen clotting. We evaluate the impact of alterations in fibrin structure mediated by carboxypeptidase activity on the function of fibrin as a template for tissue plasminogen activator (tPA) induced plasminogen activation and its susceptibility to digestion by plasmin. We used the stable carboxypeptidase B (CPB), which shows the same substrate specificity as TAFI. In the presence of 8 U/mL CPB or 5-10 μM Arg, a denser fibrin network was formed with thinner fibers. The fine structure of Arg-treated fibrin enhanced plasminogen activation, but slowed down lysis monitored using fluorescent tPA. However, if lysis was initiated with plasmin in CPB-treated fibrin, the rate of dissolution increased. These results evidence that CPB activity generates fine-mesh fibrin which is more difficult to lyse by tPA, but conversely, CPB and plasmin together can stimulate fibrinolysis, possibly by enhancing plasmin diffusion. Consideration of these effects appears essential in view of the recent interest in TAFI as a potential drug target.

## IRODALOMJEGYZÉK


1. Virchow R. Thrombose und Embolie. Gefässentzündung und septische Infektion. In: Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin. Von Meidinger & Sohn, Frankfurt am Main, 1856: 219–732.
2. Cause-specific mortality 2000-2012. In: Global Burden of Disease Study. WHO, 2013.
3. Verstraete M. Overview of new therapeutic agents. In: Sasahara AA and Loscalzo JL (eds), New therapeutic agents in thrombosis and thrombolysis. Marcel Dekker, Inc., New York, 2003: 477-478.
4. Veklich Y, Francis CW, White J, Weisel JW. (1998) Structural studies of fibrinolysis by electron microscopy. *Blood,* 92: 4721-4729.
5. Collet JP, Lesty C, Montalescot G, Weisel JW. (2003) Dynamic changes of fibrin architecture during fibrin formation and intrinsic fibrinolysis of fibrin-rich clots. *J Biol Chem,* 278: 21331-21335.
6. Longstaff C, Thelwell C, Williams SC, Silva MM, Szabó L, Kolev K. (2011) The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: kinetic and microscopic studies. *Blood,* 117: 661-668.
7. Collet JP, Park D, Lesty C, Soria J, Soria C, Montalescot G, Weisel JW. (2000) Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 20: 1354-1361.
8. Collet JP, Soria J, Mirshahi M, Hirsch M, Dagonnet FB, Caen J, Soria C. (1993) Dusart syndrome: a new concept of the relationship between fibrin clot architecture and fibrin clot degradability: hypofibrinolysis related to an abnormal clot structure. *Blood,* 82: 2462-2469.
9. Kolev K, Tenekedjiev K, Komorowicz E, Machovich R. (1997) Functional evaluation of the structural features of proteases and their substrate in fibrin surface degradation. *J Biol Chem,* 272: 13666-13675.

10. Varjú I, Tenekedjiev K, Keresztes Z, Pap AE, Szabó L, Thelwell C, Longstaff C, Machovich R, Kolev K. (2014) Fractal kinetic behavior of plasmin on the surface of fibrin meshwork. *Biochemistry,* 53: 6348-6356.
11. Pieters M, Undas A, Marchi R, de Maat MPM, Weisel JW, Ariens AS. (2012) An international study ont he standardization of fibrin clot pemerability measurement: methodological considerations and implications for healthy control values. *J Thromb Haemost,* 10: 2179-2181.
12. Sakharov DV, Rijken DC. (2000) The effect of flow on lysis of plasma clots in a plasma environment. *Thromb Haemost,* 83: 469-474.
13. Ariens RA, Lai TS, Weisel JW, Greenberg CS, Grant PJ. (2002) Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood,* 100: 743-754.
14. Blomback B, Carlsson K, Hessel B, Liljeborg A, Procyk R, Aslund N. (1989) Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta,* 997: 96-110.
15. Baradet TC, Haselgrove JC, Weisel JW. (1995) Three-dimensional reconstruction of fibrin clot networks from stereoscopic intermediate voltage electron microscope images and analysis of branching. *Biophys J,* 68: 1551-1560.
16. Wolberg AS. (2007) Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev,* 21: 131-142.
17. Konings J, Govers-Riemslag JW, Philippou H, Mutch N, Borissoff JI, Allan P, Mohan S, Tans G, Ten Cate H, Ariens RA. (2011) Factor XIIa regulates the structure of the fibrin clot independently of thrombin generation through direct interaction with fibrin. *Blood,* 118: 3942-3951
18. Weisel JW, Nagaswami C. (1992) Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J,* 63: 111-128.
19. Blomback B, Carlsson K, Fatah K, Hessel B, Procyk R. (1994) Fibrin in human plasma: gel architecture governed by rate and nature of fibrinogen activation. *Thromb Res,* 75: 521-538.

20. Gabriel DA, Smith LA, Folds JD, Davis L, Cancelosi SE. (1983) The influence of immunoglobulin (IgG) on the assembly of fibrin gels. *J Lab Clin Med,* 1: 545-552.
21. Carr ME, Dent RM, Carr SL. (1996) Abnormal fibrin structure and inhibition of fibrinolysis in patients with multiple myeloma. *J Lab Clin Med,* 128: 83-88.
22. Galanakis DK, Lane BP, Simon ST. (1987) Albumin modulates lateral assembly of fibrin polymers: evidence of enhanced fine fibril formation and of unique synergism with fibrinogen. *Biochemistry,* 26: 2389-2400.
23. Rivas G, Fernandez JA, Minton AP. (1999) Direct observation of the self-association of dilute proteins in the presence of inert macromolecules at high concentration via tracer sedimentation equilibrium: theory, experiment and biological significance. *Biochemistry,* 38: 9379-9388.
24. London M. (1997) Non-covalent associations of protein sin plasma: self-, mixed fibrin(ogen), mixed protein-non-protein association. *Clin Biochem,* 30: 83-89.
25. Siebenlist KR, Mosesson MW. (1994) Progressive cross-linking of fibrin γ chains increases resistance to fibrinolysis. *J Biol Chem,* 269: 28414-28419,
26. Sakata Y, Aoki N. (1980) Crosslinking of $\alpha_2$-plasmin inhibitor to fibrin by fibrin stabilising factor. *J Clin Invest,* 65: 290-297.
27. Valnickova Z, Enghild JJ. (1998) Human procarboxypeptidase U, or thrombin-activable fibrinolysis inhibitor, is a substrate for transglutaminases. Evidence for transglutaminase-catalyzed cross-linking to fibrin. *J Biol Chem,* 273: 27220-27224.
28. Ritchie H, Lawrie LC, Mosesson MW, Booth NA. (2001) Characterization of crosslinking sites in fibrinogen for plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2). *Ann NY Acad Sci,* 936: 215-218.
29. Carr ME, Gabriel DA, McDonagh J. (1986) Influence of Ca2+ on the structure of reptilase-derived and thrombin-derived fibrin gels. *Biochem J,* 239: 513-516.
30. Carr ME, Shen LL, Hermans J. (1977) Mass-length ratio of fibrin fibers from gel permeation and light scattering. *Biopolymers,* 16: 1-15.
31. Carr ME, Hardin CL. (1987) Fibrin has larger pores when formed in the presence of erythrocytes. *Am J Physiol,* 253: H1069-H1073.

32. Wohner N, Sótonyi P, Machovich R, Szabó L, Tenekedjiev K, Silva M, Longstaff C, Kolev K. (2011) Lytic resistance of fibrin containing red blood cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 31: 2306-2313.
33. Chao FC, Shepro D, Tullis JL, Belamarich FA, Curby WA. (1976) Similarities between platelet contraction and cellular motility during mitosis: role of platelet microtubules in clot retraction. *J Cell Sci,* 20: 569-588.
34. Collet JP, Montalescot G, Lesty C, Weisel JW. (2002) A structural and dynamic investigation of the facilitating effect of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in dissolving platelet-rich clots. *Circ Res,* 90: 428-434.
35. Kunitada S, Fitzgerald GA, Fitzgerald DJ. (1992) Inhibition of clot lysis and decreased binding of tissue-type plasminogen activator as a consequence of clot retraction. *Blood,* 79: 1420-1427.
36. Kolev K, Tenekedjiev K, Ajtai K, Kovalszky I, Gombas J, Varadi B, Machovich R. (2003) Myosin: a noncovalent stabilizer of fibrin in the process of clot dissolution. *Blood,* 101: 4380-4386.
37. Kolev K, Lerant I, Tenekejiev K, Machovich R. (1994) Regulation of fibrinolytic activity of neutrophil leukocyte elastase, plasmin, and miniplasmin by plasma protease inhibitors. *J Biol Chem,* 269: 17030-17034.
38. Janmey PA, Lind SE, Yin HL, Stossel TP. (1985) Effects of semi-dilute actin solutions on the mobility of fibrin protofibrils during clot formation. *Biochim Biophys Acta,* 841: 151-158.
39. Skarlatos SI, Rao R, Dickens BF, Kruth HS. (1993) Phospholipid loss in dying platelets. *Virchows Arch,* 64: 241-245.
40. Yokoyama K, Kudo I, Inoue K. (1995) Phospholipid degradation in rat calcium-ionophore-activated platelets is catalyzed mainly by two discrete secretory phospholipase As. *J Biochem,* 117: 1280-1297.
41. Kolev K, Machovich R. (2003) Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost,* 89: 610-621.
42. Gunther A, Markart P, Kalinowski M, Ruppert C, Grimminger F, Seeger W. (1999) Cleavage of surfactant-incorporating fibrin by different fibrinolytic agents. Kinetics of lysis and rescue of surface activity. *Am J Resp Cell Mol Biol,* 21: 738-745.

43. Varadi B, Kolev K, Tenekedjiev K, Meszaros G, Kovalszky I, Longstaff C, Machovich R. (2004) Phospholipid barrier to fibrinolysis: role for the anionic polar head charge and the gel phase crystalline structure. *J Biol Chem,* 279: 39863-39871.

44. Zwaal RF, Schroit AJ. (1997) Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood,* 89: 1121-1132.

45. Fujii S, Hopkins WE, Sobel BE. (1991) Mechanisms contributing to increased synthesis of plasminogen activator inhibitor type 1 in endothelial cells by constituents of platelets and their implications for thrombolysis. *Circulation,* 83: 645-651.

46. Joseph R, Welch KMA, D'Andrea G, Riddle JM. (1989) Evidence for the presence of red and white cells within 'platelet' aggregates formed in whole blood. *Thromb Res,* 53: 485-491.

47. Pendu R, Terraube V, Christophe OD, Gahmberg CG, de Groot PG, Lenting PJ, Denis CV. (2006) P-selectin glycoprotein ligand 1 and beta2-integrins cooperate in the adhesion of leukocytes to von Willebrand factor. *Blood,* 108: 3746-3752.

48. Plow EF. (1980) The major fibrinolytic proteases of human leukocytes. *Biochim Biophys Acta,* 630: 47-56.

49. Thompson EA, Howard MA. (1986) Proteolytic cleavage of human von Willebrand factor induced by enzyme(s) released from polymorphonuclear cells. *Blood,* 67: 1281–1285.

50. Tsai HM, Nagel RL, Hatcher VB, Sussman II. (1989) Endothelial cell-derived high molecular weight von Willebrand factor is converted into the plasma multimer pattern by granulocyte proteases. *Biochem Biophys Res Commun,* 158: 980–5.

51. Bagoly Z, Haramura G, Muszbek L. (2007) Down-regulation of activated factor XIII by polymorphonuclear granulocyte proteases within fibrin clot. *Thromb Haemost,* 98: 359-367.

52. Lewis JH, Szeto IL, Bayer WL, Curiel DC. (1972) Leukofibrinolysis. *Blood,* 40: 844-855.

53. Machovich R, Owen WG. (1990) The elastase-mediated pathway of fibrinolysis. *Blood Coag Fibrinolysis,* 1: 79-90.

54. Longstaff C, Varjú I, Sótonyi P, Szabó L, Krumrey M, Hoell A, Bóta A, Varga Z, Komorowicz E, Kolev K. (2013) Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA and histones. *J Biol Chem,* 288: 6946-6956.

55. Gersh KC, Edmondson KE, Weisel JW. (2010) Flow rate and fibrin fibre alignment. *J Thromb Haemost,* 8: 2826–2828.

56. Campbell RA, Aleman M, Gray LD, Falvo MR, Wolberg AS. (2010) Flow profoundly influences fibrin network structure: implications for fibrin formation and clot stability in haemostasis. *Thromb Haemost,* 104: 1281–1284.

57. Danesh J, Lewington S, Thompson SG, et al. (2005) Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *J Am Med Assoc,* 294: 1799-1809.

58. Tatli E, Ozcelik F, Aktoz M. (2009) Plasma fibrinogen level may predict critical coronary artery stenosis in young adults with myocardial infarction. *Cardiol J,* 16: 317-320.

59. Bartlett JW, De Stavola BL, Meade TW. (2009) Assessing the contribution of fibrinogen in predicting risk of death in men with peripheral arterial disease. *J Thromb Haemost,* 7: 270-276.

60. Parry DJ, Al-Barjas HS, Chappell L, Rashid T, Ariens RA, Scott DJ. (2009) Haemostatic and fibrinolytic factors in men with a small abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg,* 96: 870-877.

61. Klovaite J, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Benn M. (2013) Elevated fibrinogen levels are associated with risk of pulmonary embolism, but not with deep venous thrombosis. *Am J Resp Crit Care Med,* 187: 286-293.

62. Lauricella AM, Quintana I, Castanon M, Sassetti B, Kordich L. (2006) Influence of homocysteine on fibrin network lysis. *Blood Coagul Fibrinolysis,* 17: 181-186.

63. Sauls DL, Wolberg AS, Hoffman M. (2003) Elevated plasma homocysteine leads to alterations in fibrin clot structure and stability: implications for the mechanism of thrombosis in hyperhomocysteinemia. *J Thromb Haemost,* 1: 300-306.

64. Undas A, Brozek J, Jankowski M, Siudak Z, Szczeklik A, Jakubowski H. (2006) Plasma homocysteine affects fibrin clot permeability and resistance to lysis in human subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 26: 1397-1404.

65. Collet JP, Allali Y, Lesty C, Tanguy ML, Silvain J, Ankri A, Blanchet B, Dumaine R, Gianetti J, Payot L, Weisel JW, Montalescot G. (2006) Altered fibrin architecture is associated with hypofibrinolysis and premature coronary atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 26: 2567-2573.

66. Undas A, Plicner D, Stepien E, Drwila R, Sadewski J. (2007) Altered fibrin clot structure in patients with advanced coronary artery disease: a role of C-reactive protein, lipoprotein(a) and homocysteine. *J Thromb Haemost,* 5: 1988-1990

67. Barua RS, Sy F, Srikanth S, Huang G, Javed U, Buhari C, Margosan D, Ambrose JA. (2010) Effects of cigarette smoke exposure on clot dynamics and fibrin structure: an ex vivo investigation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 30: 75-79.

68. Bridge KI, Phillippou H, Ariens RA. (2014) Clot properties and cardiovascular disease. *Thromb Res,* 112: 1-8.

69. Ajjan RA, Standeven KF, Khanbhai M, Phoenix F, Gersch KC, Weisel JW, Kearney MT, Ariens RA, Grant PJ. (2009) Effects of aspirin on clot structure and fibrinolysis using a novel in vitro cellular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 29: 712-717.

70. He S, Bark N, Wang H, Svensson J, Blomback M. (2009) Effects of acetylsalicylic acid on increase of fibrin network porosity and the consequent upregulation of fibrinolysis. *J Cardiovasc Pharmacol,* 53: 24-29.

71. He S, Blomback M, Yoo G, Sinha R, Henschen-Edman AH. (2001) Modified clotting properties of fibrinogen in the presence of acetylsalicylic acid in a purified system. *Ann NY Acad Sci,* 936: 531-535.

72. Williams S, Fatah K, Hjemdahl P, Blomback M. (1998) Better increase in fibrin gel porosity by low dose than intermediate dose acetylsalicylic acid. *Eur Heart J,* 19: 1666-1672.

73. Neergaard-Petersen S, Ajjan R, Hvas AM, Hess K, Larsen SB, Kristensen SD, Grove EL. (2013) Fibrin clot structure and platelet aggregation in patients with aspirin treatment failure. *PloS One,* 8: e71150.

74. Yeromonahos C, Marlu R, Polack B, Caton F. (2012) Antithrombin-independent effects of heparins on fibrin clot nanostructure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32: 1320-1324.

75. Varin R, Mirshahi S, Mirshahi P, Kierzek G, Sebaoun D, Mishal Z, Vannier JP, Yvonne Borg J, Simoneau G, Soria C, Soria J. (2007) Clot structure modification by fondaparinux and consequence on fibrinolysis: a new mechanism of antithrombotic activity. *Thromb Haemost*, 97: 27–31.

76. Varin R, Mirshahi S, Mirshahi P, Klein C, Jamshedov J, Chidiac J, Perzborn E, Mirshahi M, Soria C, Soria J. (2013) Whole blood clots are more resistant to lysis than plasma clots--greater efficacy of rivaroxaban. *Thromb Res*, 131: e100-109.

77. Ammollo CT, Semeraro F, Incampo F, Semeraro N, Colucci M. (2010) Dabigatran enhances clot susceptibility to fibrinolysis by mechanisms dependent on and independent of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost*, 8: 790-798.

78. Undas A, Celinska-Lowenhoff M, Lowenhoff T, Szczeklik A. (2006) Statins, fenofibrate, and quinapril increase clot permeability and enhance fibrinolysis in patients with coronary artery disease. *J Thromb Haemost*, 4: 1029-1036.

79. Mills JD, Ariens RA, Mansfield MW, Grant PJ. (2002) Altered fibrin clot structure in the healthy relatives of patients with premature coronary artery disease. *Circulation*, 106: 1938-1942.

80. Bhasin N, Ariens RA, West RM, Parry DJ, Grant PJ, Scott DJ. (2008) Altered fibrin clot structure and function in the healthy first-degree relatives of subjects with intermittent claudication. *J Vasc Surg*, 48: 1497-1503, 503 e1.

81. Undas A, Zawilska K, Ciesla-Dul M, Lehmann-Kopydlowska A, Skubiszak A, Ciepluch K, Tracz W. (2009) Altered fibrin clot structure/function in patients with idiopathic venous thromboembolism and in their relatives. *Blood*, 114: 4272-4278.

82. Dunn EJ, Ariens RA, de Lange M, Snieder H, Turney JH, Spector TD, Grant PJ. (2004) Genetics of fibrin clot structure: a twin study. *Blood*, 103: 1735-1740.

83. Ajjan R, Lim BC, Standeven KF, Harrand R, Dolling S, Phoenix F, Greaves R, Abou-Saleh RH, Connell S, Smith DA, Weisel JW, Grant PJ, Ariens RA. (2008)

Common variation in the C-terminal region of the fibrinogen beta-chain: effects on fibrin structure, fibrinolysis and clot rigidity. *Blood,* 111: 643-650.

84. Gu L, Liu W, Yan Y, Su L, Wu G, Liangh B, Tan J, Huang G. (2014) Influence of the beta-fibrinogen-455G/A polymorphism on development of ischemic stroke and coronary heart disease. *Thromb Res,* Epub ahead of print.

85. Oszajca K, Wronski K, Janiszewska G, Bienkiewicz M, Panek M, Bartkowiak J, Szemrai J. (2012) Association analysis of genetic polymorphisms of factor V, factor VII and fibrinogen beta chain genes with human abdominal aortic aneurysm. *Expe Ther Med,* 4: 514-518.

86. Standeven KF, Grant PJ, Carter AM, Scheiner T, Weisel JW, Ariens RA. (2003) Functional analysis of the fibrinogen Aalpha Thr312Ala polymorphism: effects on fibrin structure and function. *Circulation,* 107: 2326-2330.

87. Carter AM, Catto AJ, Kohler HP, Ariens RA, Stickland MH, Grant PJ. (2000) alpha-fibrinogen Thr312Ala polymorphism and venous thromboembolism. *Blood,* 96: 1177-1179.

88. Rasmussen-Torvik LJ, Cushman M, Tsai MY, Heckbert SR, Rosamond WD, Folsom AR. (2007) The association of alpha-fibrinogen Thr312Ala polymorphism and venous thromboembolism in the LITE study. *Thrombosis Res,* 121: 1–7.

89. Le Gal G, Delahousse B, Lacut K, Malaviolle V, Regina S, Blouch MT, Couturaud F, Mottier D, Oger E, Gruel Y. (2007) Fibrinogen Aalpha-Thr312Ala and factor XIII-A Val34Leu polymorphisms in idiopathic venous thromboembolism. *Thromb Res,* 121: 333-338.

90. Li JF, Lin Y, Yang YH, Gan HL, Liang Y, Liu J, Yang SQ, Zhang WJ, Cui N, Zhao L, Zhai ZG, Wang J, Wang C. (2013) Fibrinogen Aalpha Thr312Ala polymorphism specifically contributes to chronic thromboembolic pulmonary hypertension by increasing fibrin resistance. *PloS One,* 8: e69635.

91. Ariens RA, Philippou H, Nagaswami C, Weisel JW, Lane DA, Grant PJ. (2000) The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood,* 96: 988-995.

92. Wolfenstein-Todel C, Mosesson MW. (1980) Human plasma fibrinogen heterogeneity: evidence for an extended carboxyl-terminal sequence in a normal gamma chain variant (gamma'). *Proc Natl Acad Sci USA,* 77: 5069-5073.

93. Komaromi I, Bagoly Z, Muszbek L. (2011) Factor XIII: novel structural and functional aspects. *J Thromb Haemost,* 9: 9–20.

94. Meh DA, Siebenlist KR, Mosesson MW. (1996) Identification and characterization of the thrombin binding sites on fibrin. *J Biol Chem,* 271: 23121-23125.

95. Gersh KC, Nagaswami C, Weisel JW, Lord ST. (2009) The presence of gamma' chain impairs fibrin polymerization. *Thromb Res,* 124: 356-363.

96. Cooper AV, Standeven KF, Ariens RA. (2003) Fibrinogen gamma-chain splice variant gamma' alters fibrin formation and structure. *Blood,* 102: 535-540.

97. Tangelder GJ, Slaaf DW, Arts T, Reneman RS. (1988) Wall shear rate in arterioles in vivo: least estimates from platelet velocity profiles. *Am J Physiol,* 254: H1059-H1064.

98. Rand JH, Glanville RW, Wu XX, Ross JM, Zangari M, Gordon RE, Schwartz E, Potter BJ. (1997) The significance of subendothelial von Willebrand factor. *Thromb Haemost,* 78: 445-450.

99. Weiss HJ, Hawiger J, Ruggeri ZM, Turitto VT, Thiagarajan P, Hoffmann T. (1989) Fibrinogen-independent platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium mediated by glycoprotein IIb-IIIa complex at high shear rate. *J Clin Invest,* 83: 288-297.

100. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. (1996) Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell,* 84: 289-297.

101. Ruggeri ZM. (1997) von Willebrand factor. *J Clin Invest,* 99: 559-564.

102. Ruggeri ZM. (2000) Old concepts and new developments in the study of platelet aggregation. *J Clin Invest,* 105: 699-701.

103. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. (1998) Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell,* 94: 657-666.

104. Goldsmith HL, Turitto VT. (1986) Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-Report--Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*, 55: 415-435.

105. Ruggeri ZM. (2004) Platelet and von Willebrand factor interactions at the vessel wall. *Hamostaseologie*, 24: 1-11.

106. Cadroy Y, Hanson SR. (1990) Effects of red cell concentration on hemostasis and thrombus formation in a primate model. *Blood*, 75: 2185-2193.

107. Matusik P, Mazur P, Stepien E, Pfitzner R, Sadowski J, Undas A. (2009) Architecture of intraluminal thrombus removed from abdominal aortic aneurysm. *J Thromb Thrombolysis*, 30: 7-9.

108. Beygui F, Collet JP, Nagaswami C, Weisel JW, Montalescot G. (2006) Architecture of intracoronary thrombi in ST-elevation acute myocardial infarction: time makes the difference. *Circulation*, 113: e21-23.

109. Silvain J, Collet JP, Nagaswami C, Beygui F, Edmondson KE, Bellemain-Appaix A, Cayla G, Pena A, Brugier D, Barthelemy O, Montalescot G, Weisel JW. (2011) Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 57: 1359-1367.

110. Finazzi G, Budde U, Michiels JJ. (1996) Bleeding time and platelet function in essential thrombocythemia and other myeloproliferative syndromes. *Leuk Lymphoma*, 22: 71-78.

111. Hellem AJ, Borchgrevink CF, Ames SB. (1961) The role of red cells in haemostasis: the relation between haematocrit, bleeding time and platelet adhesiveness. *Br J Haematol*, 7: 42-50.

112. Reimers RC, Sutera SP, Joist JH. (1984) Potentiation by red blood cells of shear-induced platelet aggregation: relative importance of chemical and physical mechanisms. *Blood*, 64: 1200-1206.

113. Spraque RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Lonigro AJ. (1996) ATP: the red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation. *Am J Physiol*, 271: H2717-H2722.

114. Brown RS, Niewiarowski S, Stewart GJ, Millman M. (1977) A double-isotope study on incorporation of platelets and red cells into fibrin. *J Lab Clin Med,* 90: 130-140.

115. Carvalho FA, Connell S, Miltenberger-Miltenyi G, Pereira SV, Tavares A, Ariens RA, Santos NC. (2010) Atomic force microscopy-based molecular recognition of a fibrinogen receptor on human erythrocytes. *ACS Nano,* 4: 4609-4620.

116. Silva MM, Thelwell C, Williams SC, Longstaff C. (2012) Regulation of fibrinolysis by C-terminal lysines operates through plasminogen and plasmin but not tissue plasminogen activator (tPA). *J Thromb Haemost*, 10: 2354–2360.

117. Nesheim M, Bajzar L. (2005) The discovery of TAFI. *J Thromb Haemost,* 3: 2139–2146.

118. Boffa MB, Wang W, Bajzar L, Nesheim ME. (1998) Plasma and recombinant thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and activated TAFI compared with respect to glycosylation, thrombin/thrombomodulin-dependent activation, thermal stability, and enzymatic properties. *J Biol Chem,* 273: 2127–2135.

119. Wang W, Boffa MB, Bajzar L, Walker JB, Nesheim ME. (1998) A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem,* 273: 27176–27181.

120. Eichinger S, Schönauer V, Weltermann A, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M. (2004) Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for recurrent venous thromboembolism. *Blood,* 103: 3773–3776.

121. Meltzer ME, Lisman T, de Groot PG, Meijers JC, le Cessie S, Doggen CJ. (2010) Venous thrombosis risk associated with plasma hypofibrinolysis is explained by elevated plasma levels of TAFI and PAI-1. *Blood,* 116: 113–121.

122. Montaner J, Ribó M, Monasterio J, Molina CA, Alvarez-Sabín J. (2003) Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor levels in the acute phase of ischemic stroke. *Stroke,* 34: 1038–1040.

123. Folkeringa N, Coppens M, Veeger NJ, Bom VJ, Middeldorp S, Hamulyak K. (2008) Absolute risk of venous and arterial thromboembolism in thrombophilic families is not increased by high thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) levels. *Thromb Haemost,* 100: 38–44.

124. Juhan-Vague I, Morange PE, PRIME Study Group. (2003) Very high TAFI antigen levels are associated with a lower risk of hard coronary events: the PRIME Study. *J Thromb Haemost*, 1: 2243–2244.

125. Walker JB, Bajzar L. (2004) The intrinsic threshold of the fibrinolytic system is modulated by basic carboxypeptidases, but the magnitude of the antifibrinolytic effect of activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor is masked by its instability. *J Biol Chem*, 279: 27896–27904.

126. Rånby M. (1982) Studies on the kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator. *Biochim Biophys Acta*, 704: 461–469.

127. Tanka-Salamon A, Tenekedjiev K, Machovich R, Kolev K. (2008) Suppressed catalytic efficiency of plasmin in the presence of long-chain fatty acids. Identification of kinetic parameters from continuous enzymatic assay with Monte Carlo simulation. *FEBS J*, 275: 1274–1282.

128. Sakariassen KS, Aarts PA, de Groot PG, Houdijk WP, Sixma JJ. (1983) A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrix, and purified components. *J Lab Clin Med*, 102: 522–535.

129. Efron B, Tibshirani RJ. An Introduction to the Bootstrap. Chapman&Hall, New York, 1993: 220-223.

130. Gujarati DN. Basic Econometrics. 4th ed. McGraw-Hill, New York, 2004: 58-65.

131. Press W, Teukolsky S, Vetterling W, Flannery B. Numerical recipes in Fortran: the Art of Scientific Computing. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1992: 51-63, 627-628.

132. Nikolova ND, Toneva-Zheynova D, Kolev K, Tenekedjiev K. Monte Carlo statistical tests for identity of theoretical and empirical distributions of experimental data. Theory and applications of Monte Carlo simulations. InTech, Rijeka, 2013: 1-26.

133. Wang W, Boffa MB, Bajzar L, Walker JB, Nesheim ME. (1998) A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem*, 273: 27176–27181.

134. Baylis C. (2006) Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2: 209–220.

135. Weisel JW, Litvinov RI. (2008) The biochemical and physical process of fibrinolysis and effects of clot structure and stability on the lysis rate. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 6: 161-180.

136. Quadros AS, Cambruzzi E, Sebben J, David RB, Abelin A, Welter D, Sarmento-Leite R, Mehta RH, Gottschall CA, Lopes RD. (2012) Red versus white thrombi in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: clinical and angiographic outcomes. *Am Heart J*, 164:553-60.

137. Marasini B, Biondi ML, Barbesti S, Zatta G, Agostoni A. (1986) Cigarette smoking and platelet function. *Thromb Res*, 44: 85-94.

138. Pignatelli P, Carnevale R, Pastori D, Cangemi R, Napoleone L, Bartimoccia S, Nocella C, Basili S, Violi F. (2012) Immediate antioxidant and antiplatelet effect of atorvastatin via inhibition of Nox-2. *Circulation*, 126: 92-103.

139. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. (2001) Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation*, 104: 1533–1537.

140. Rittersma SZ, van der Wal AC, Koch KT, Piek JJ, Henriques JP, Mulder KJ, Ploegmakers JP, Meesterman M, de Winter RJ. (2005) Plaque instability frequently occurs days or weeks before occlusive coronary thrombosis: a pathological thrombectomy study in primary PCI. *Circulation*, 111: 1160-1165.

141. Kreutz RP, Owens J, Breall JA, Lu D, von der Lohe E, Bolad I, Sinha A, Flockhart DA. (2013) C-reactive protein and fibrin clot strength measured by thrombelastography after coronary stenting. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 24:321-326.

142. Salonen EM, Vartio T, Hedman K, Vaheri A. (1984) Binding of fibronectin by the acute phase reactant C-reactive protein. *J Biol Chem*, 259: 1496-1501.

143. Cermak J, Key NS, Bach RR, Balla J, Jacob HS, Vercellotti GM. (1993) C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood,* 82: 513-520.

144. Li R, Ren M, Luo M, Chen N, Zhang Z, Luo B, Wu J. (2012) Monomeric C-reactive protein alters fibrin clots properties on endothelial cells. *Thromb Res,* 129: e251-e256.

145. Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. (1995) Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem,* 270: 14477–14484.

146. Schneider M, Brufatto N, Neill E, Nesheim M. (2004) Activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor reduces the ability of high molecular weight fibrin degradation products to protect plasmin from antiplasmin. *J Biol Chem,* 279: 13340–13345.

147. Colucci M, D'Aprile AM, Italia A, Gresele P, Morser J, Semeraro N. (2001) Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) does not inhibit in vitro thrombolysis by pharmacological concentrations of t-PA. *Thromb Haemost,* 85: 661–666.

148. Guimarães AH, Barrett-Bergshoeff MM, Criscuoli M, Evangelista S, Rijken DC. (2006) Fibrinolytic efficacy of Amediplase, Tenecteplase and scu-PA in different external plasma clot lysis models: sensitivity to the inhibitory action of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI). *Thromb Haemost,* 96: 325–330.

149. Mutch NJ, Moore NR, Wang E, Booth NA. (2003) Thrombus lysis by uPA, scuPA and tPA is regulated by plasma TAFI. *J Thromb Haemost,* 1: 2000–2007.

150. Bannish BE, Keener JP, Fogelson AL. (2014) Modelling fibrinolysis: a 3D stochastic multiscale model. *Math Med Biol,* 31: 17-44.

151. Borgström A, Regnér S. (2005) Active carboxypeptidase B is present in free form in serum from patients with acute pancreatitis. *Pancreatology,* 5: 530–536.

152. Druml W, Heinzel G, Kleinberger G. (2001) Amino acid kinetics in patients with sepsis. *Am J Clin Nutr,* 73: 908–913.

153. Omodeo-Salè F, Cortelezzi L, Vommaro Z, Scaccabarozzi D, Dondorp AM. (2010) Dysregulation of L-arginine metabolism and bioavailability associated to free plasma heme. *Am J Physiol Cell Physiol,* 299: C148–C154.

154. Willemse JL, Heylen E, Nesheim ME, Hendriks DF. (2009) Carboxypeptidase U (TAFIa): a new drug target for fibrinolytic therapy? *J Thromb Haemost,* 7: 1962–1971.

155. Mishra N, Vercauteren E, Develter J, Bammens R, Declerk PJ, Gils A. (2011) Identification and characterisation of monoclonal antibodies that impair the activation of human thrombin activatable fibrinolysis inhibitor through different mechanisms. *Thromb Haemost,* 106: 90-101.

156. Vercauteren E, Gils A, Declerck PJ. (2013) Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor: a putative target to enhance fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost,* 39: 365–372.

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### *Az értekezés alapjául szolgáló közlemények*


I. Kovács A, Sótonyi P, Nagy AI, Tenekedjiev K, Wohner N, Komorowicz E, Kovács E, Nikolova N, Szabó L, Kovalszky I, Machovich R, Szelid Zs, Becker D, Merkely B, Kolev K. (2015) Ultrastructure and composition of coronary and peripheral arterial thrombi: correlations with clinical and laboratory findings. *Thromb Res,* 135: doi: 10.1016/j.thromres.2015.02.004.

II. Kovács A, Szabó L, Longstaff C, Tenekedjiev K, Machovich R, Kolev K. (2014) Ambivalent roles of carboxypeptidase B in the lytic susceptibility of fibrin. *Thromb Res,* 133: 80-87.

III. Wohner N, Kovács A, Machovich R, Kolev K. (2012) Modulation of the von Willebrand factor-dependent platelet adhesion through alternative proteolytic pathways. *Thromb Res,* 129: e41-46.

**KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Köszönettel tartozom *Prof. Ádám-Vizi Veronikának* és *Prof. Tretter Lászlónak*, amiért lehetővé tették, hogy az Orvosi Biokémia Intézetben végezzem kutatómunkámat és *Prof. Machovich Raymundnak*, amiért munkacsoportjában dolgozhattam.

Ezúton fejezem ki köszönetemet a *Semmelweis Egyetem Városmajori Szív- és Érgyógyászati Központ munkatársainak* a thrombus minták összegyűjtéséért és rendelkezésünkre bocsátásáért, *Kiril Tenekedjievnek* a statisztikai analízisben nyújtott segítségéért, *Dr. Szabó Lászlónak* az elektronmikroszkópos felvételek elkészítésében nyújtott segítségéért, *Dr. Wohner Nikolettnek* a konfokális lézer mikroszkóppal készített felvételekért, *Dr. Kovalszky Ilonának* a fagyasztott metszetek elkészítésének lehetőségéért, *Oravecz Györgyinek* a laboratóriumi munkában nyújtott segítségéért, *Dr. Komorowicz Erzsébetnek* az intézeti bírálói feladatok vállalásáért, *Dr. Varjú Imrének* a hasznos tanácsokért.

Köszönettel tartozom továbbá szüleimnek, akik segítségükkel és türelmükkel az egyetemi évek után is nagyban hozzájárultak doktoranduszi tevékenységem sikerességéhez.

Kiemelt köszönet illeti *Prof. Kolev Kraszimirt*, témavezetőmet és konzulensemet, aki mindig önzetlen jóindulattal segítette előmenetelemet. Az általa képviselt magas szinvonalú tudományos és oktatói munka iránymutatásul, mi több, példaképül szolgált az évek során és csak remélni tudom, hogy ha más formában nem is, további gyógyítói és kutatói tevékenységemet a tőle tanult elvek mentén végezve valamit viszonozhatok abból a tengernyi segítségből és tanításból, amelyben a jóvoltából részesültem.