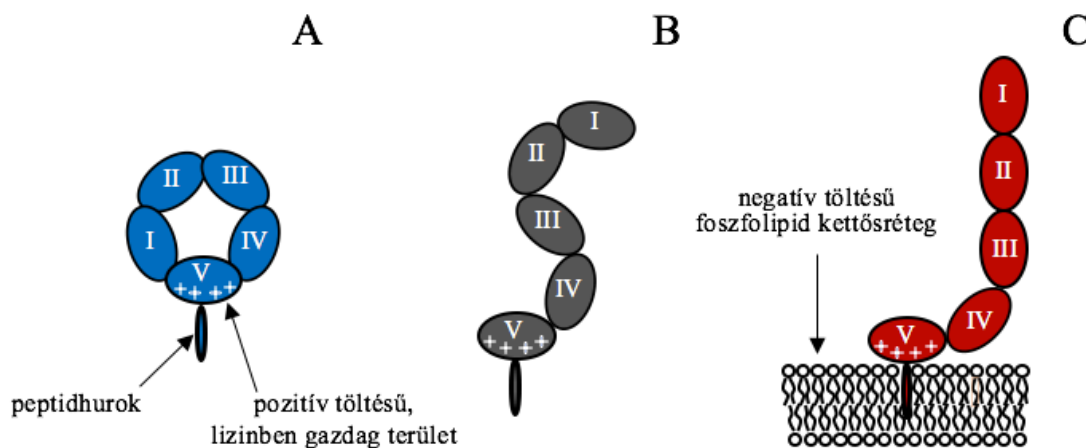


Az OTKA kutatási projekt során antifoszfolipid szindróma (APS) pathomechnizmusára vonatkozó új megállapításokat igyekeztünk tenni. Valamennyi fentebb felsorolt témakörben az eredményekről in extenso nemzetközi publikációk születtek, (összesen 7 db) melyekben egyetlen publikáció kivételével a kutatás vezetője a szenior szerző vagy a levelező szerző.

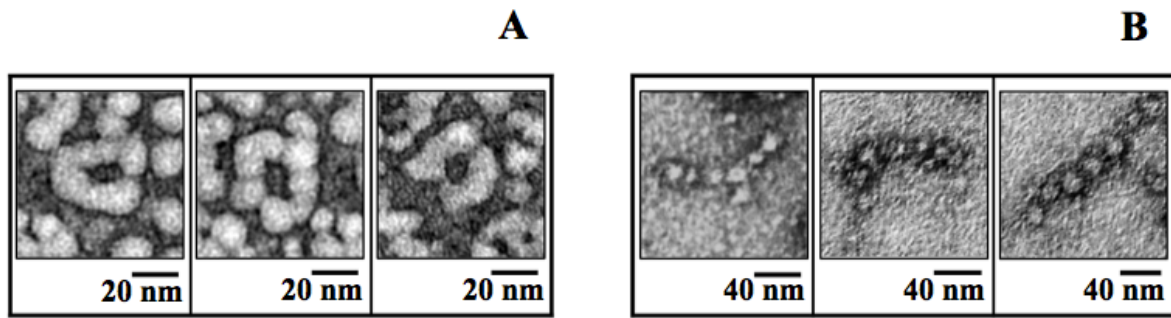
Összefoglalás:

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

Az APS egyik legfontosabb autoantigénje, a β_2 -glikoprotein-I-et (β_2 GPI) vagy más néven apolipoprotein H-t (apoH). A β_2 GPI egy 45–50 kDa (meghatározási módszertől függ) méretű, erősen glikozilált szérumfehérje, amely kb. 200 mg/l koncentrációban van jelen a keringésben. A molekula öt egymás után gyöngyszerűen kapcsolódó doménből áll. Az irodalomban már korábban leírták, hogy a β_2 GPI konformációja zártból (A panel) nyitottá (C panel) – és vice versa – alakítható a fehérjét tartalmazó oldószer pH-értékének és NaCl-koncentrációjának különböző irányú és mértékű változtatásával.

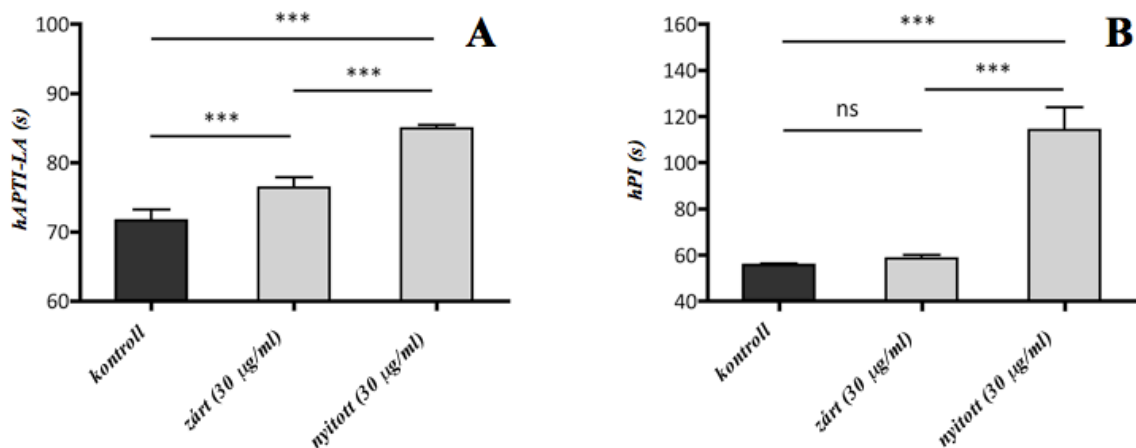


A β_2 GPI konformációjának átalakítása – A zárt és nyitott konformációjú molekulát negatív kontrasztoszással láthatóvá tettük, amivel sikerült bizonyítanunk a záró- és nyitópufferes kezelés hatásosságát. Az elektronmikroszkópiás felvételeken egyértelműen tudtuk azonosítani a gyűrű alakú zárt (A panel, 150 000x-es nagyítás) és a pálcika alakú nyitott konformációjú (B panel, 120 000x-es nagyítás) β_2 GPI-et. A kezelés hatékonyságának számszerűsítéséhez a β_2 GPI_{zárt} és a β_2 GPI_{nyitott} mintában 3-3 látótérben megszámoltuk a zárt molekulákat. A β_2 GPI_{zárt} mintában összesen 103, a β_2 GPI_{nyitott}-ban 3 db zárt konformációjú β_2 GPI-et találtunk, ez alapján ezt a módszert igen hatékonynak ítéltük.



A kísérleteink során elvégzett alvadásiidő-tesztek kettős szerepet töltek be: elsősorban a β_2 GPI két konformációjának fibrinképződésre kifejtett hatását szerettük volna velük vizsgálni, másodsorban a konformációátalakítás hatásosságát megerősítő tesztként is szolgáltak. Két alvadási szűrőtesztet használtunk: az aPTI egy a mindennapi gyakorlatban használt alvadási szűrőteszt, amelyben kontaktaktivátort, foszfolipideket és Ca^{2+} -t használnak az alvadás beindítására, míg a PI egy olyan szűrőteszt, melyben a fibrinképződést kontaktaktivátor helyett szöveti faktorral váltják ki; ennek megfelelően az aPTI-vel az intrinzik, míg a PI-vel az extrinzik koagulációs útvonalat vizsgáljuk.

A hAPTI-tesztben (A panel) a β_2 GPI_{zárt} 6,6%-kal ($P < 0,001$), a β_2 GPI_{nyitott} még tovább, összesen 18,5%-kal ($P < 0,001$) növelte meg a fibrinképződés idejét a kontrollhoz képest. A PI-tesztben (B panel) a β_2 GPI_{zárt}-nak elhanyagolható hatását tapasztaltuk, ellenben a β_2 GPI_{nyitott} egy igen erőteljes hatást váltott ki: a PI-t 105%-kal ($P < 0,001$) növelte 55,7 s-ról 114,1 s-ra. Eredményeink alapján a β_2 GPI nyitott formája megközelítőleg hússzor erősebb hatást fejtett ki az extrinzik koagulációs útvonalra, mint a β_2 GPI zárt formája.

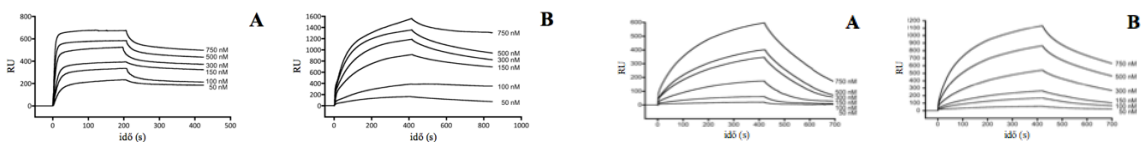


Az alvadásiidő-tesztekkel ellentétben a TGT-nek az az előnye, hogy a koagulációs folyamat alatt keletkezett trombin mennyiségét képes mérni, ami a trombin véralvadásban kifejtett pleiotróp hatása miatt globálisabb képet ad a véralvadási állapotról.

Az alvadási tesztekben tapasztalt hatáshoz hasonlóan a β_2 GPI – mindkét konformációja, mindkét koncentrációban – enyhe időbeli nyújtó hatást fejtett ki: a β_2 GPI_{nyitott} 30 µg/ml koncentrációban 4,1%-kal nyújtotta meg a látenciaidőt, bár ez a változás statisztikailag nem volt szignifikáns. Az ETP, a TGT alatt mért teljes trombinmennyiség is enyhe emelkedést mutatott, de statisztikailag ez sem volt szignifikánsan magasabb a kontrollértékekhez képest.

Vizsgálatainkban először anti- β_2 GPI-et kötöttünk SPR-csip felszínére, és β_2 GPI_{zárt}-at és β_2 GPI_{nyitott}-at injektáltunk a mikroáramlási cellába hat különböző koncentrációban.

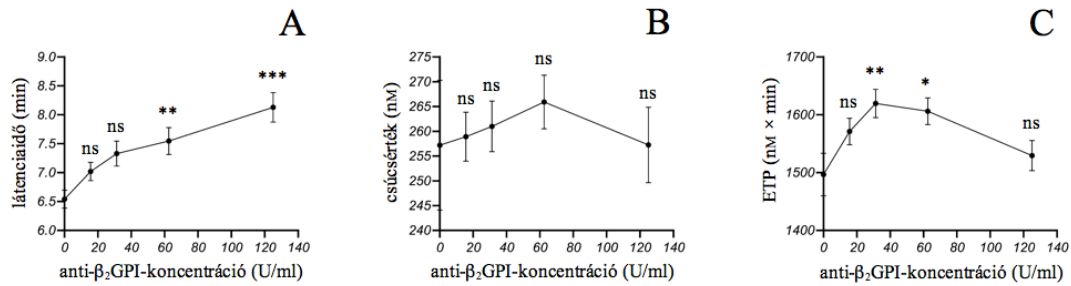
A nyitott és zárt formának hasonló disszociációs egyensúlyi állandóit kaptuk: bár mind a β_2 GPI_{zárt}, mind a β_2 GPI_{nyitott} az anti- β_2 GPI-hez erős affinitást mutatott (K_d -értékei rendre $5,17 \times 10^{-8}$ M és $7,18 \times 10^{-8}$ M, a két eredmény között nem volt statisztikailag szignifikáns különbség. Bal oldali mutatja zárt (A) és nyitott (B) ligand kötődést. A β_2 GPI és heparin közötti kölcsönhatás vizsgálatához a felszínén heparint kötött SPR-csipet használtunk, majd β_2 GPI_{zárt}-at és β_2 GPI_{nyitott}-at 6-6 különböző koncentrációban injektáltunk a mikroáramlási cellába. Várakozásainknak megfelelően a β_2 GPI jelentős affinitást mutatott a heparinhoz (jobb oldali 2 panel), és statisztikailag szignifikáns különbség nélkül, a nyitott konformációnál (B panel) egy nagyságrenddel erősebb ($K_d = 2,98 \times 10^{-7}$) affinitást találtunk a zárthoz (A panel) ($K_d = 3,50 \times 10^{-6}$) képest.



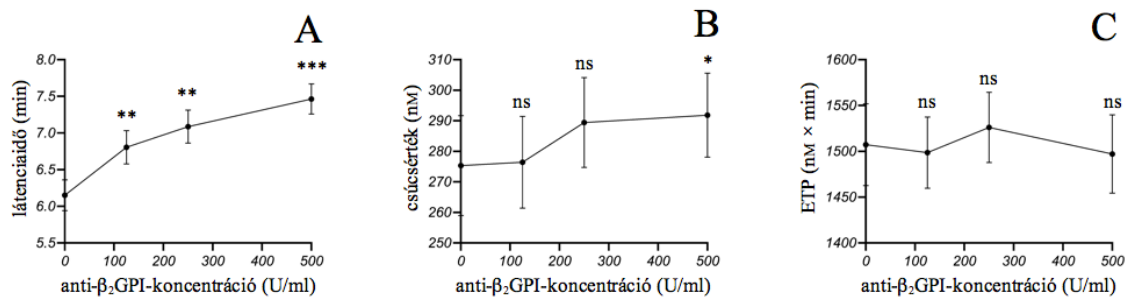
A kutatásunkhoz az APS-ben szenvedő betegektől mintagyűjtést a Tudományos és Kutatásügyi Bizottság Egészségügyi Tudományos Tanács engedélyével (engedélyszám: 45368-1/2017/EKU) végeztük, azzal a céllal, hogy tiszta formában előállítsuk az anti- β_2 GPI antitesteket in vitro kísérleteinkhez.

A kísérleteinkbe beválogatott betegeket két csoportba oszthatjuk: (i) antifoszfolipid szindrómások, akik vérsavójából IgG anti- β_2 GPI ellenanyagot tisztítottunk, (ii) az V-ös véralvadási faktor Leiden-mutációját heterozigóta formában hordozó (FV_{Leiden}), vagy a protrombin gén G20210A polimorfizmusát heterozigóta formában hordozó (FII_{G20210A}) egyének, akik vérplazmáját trombingenerációs vizsgálatainkban használtuk. Az IgG anti- β_2 GPI ellenanyagok tisztításához az APS-es betegek beválogatási szempontjai a következők voltak: LA-pozitivitás, anti-KL-pozitivitás és anti- β_2 GPI-pozitivitás – az utóbbi szintje meghaladja a szeropozitivitási referenciahatár (20 U/ml) 25-szörösét.

Az anti- β_2 GPI kevert kontrollplazma trombingenerációjára kifejtett hatását alacsony (15–125 U/ml) és magas (125–500 U/ml) koncentrációterületben is vizsgáltuk. A reakciót 1 pM TF-fel és 4 μ M FL-lel indítottuk be. Alacsony koncentrációterületben a lupusz antikoaguláns alvadási időt nyújtó hatásának megfelelően az anti- β_2 GPI a látenciaidőt már 62 U/ml-nél szignifikánsan nyújtotta (6,54 min-ről 7,55 min-re; $P < 0,01$), ami 125 U/ml-nél még tovább fokozódott (8,13 min; $P < 0,001$) (A panel). Ezzel ellentmondásos módon viszont az ellenanyag a mennyiségi paraméterekben növekedést okozott: bár a csúcserőben is láttunk némi emelkedést, 31 U/ml anti- β_2 GPI szignifikánsan, 1496 nm \times min-ről 1619 nm \times min-re ($P < 0,01$) növelte a teljes reakció alatt keletkezett trombin össz mennyiségét (C panel).



A magasabb koncentrációtartományban végzett kísérletben az időparaméterre való hatásban az előző méréshez hasonló eredményeket kaptunk: 125 U/ml anti-β₂GPI már szignifikánsan nyújtotta a látenciaidőt mely az A panelen látható ($P < 0,01$), amely hatás 500 U/ml-nél még erősebbnek mutatkozott ($P < 0,001$). Az anti-β₂GPI mennyiségi paramétereket növelő hatását magasabb koncentrációknál is sikerült kimutatni, azonban itt az ellenanyag az ETP-re nem volt hatással, viszont a csúcsértéket 500 U/ml-nél szignifikánsan növelte ($P < 0,05$) mely a B-panelen látható



Megvizsgáltuk, hogy a β₂GPI koncentrációjának változása hogyan befolyásolja az anti-β₂GPI trombingenerációra kifejtett hatását. β₂GPI-et 200–1000 μg/ml végkoncentrációban és anti-β₂GPI-et 15–125 U/ml végkoncentrációban kevert kontrollplazmához adtunk, majd a trombingenerációt 1 pM TF-fel és 4 μM FL-lel indítottuk be.

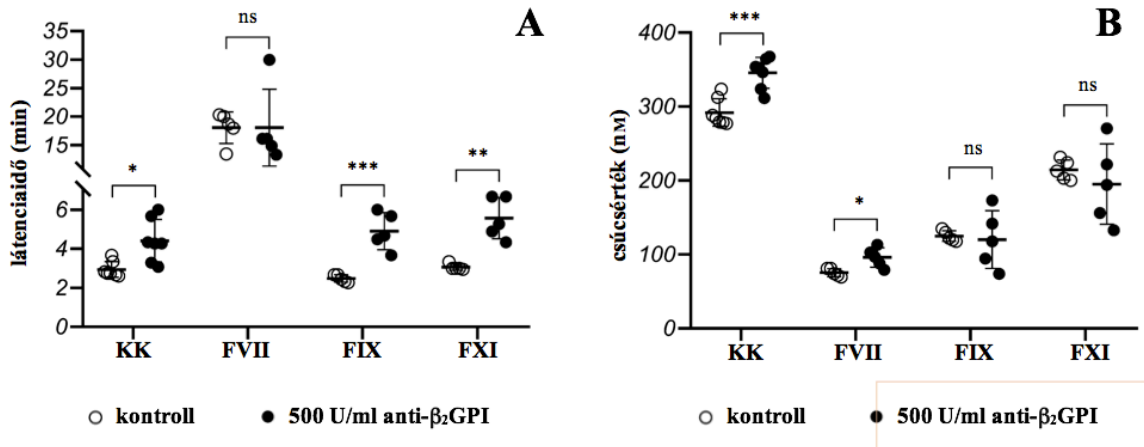
A β₂GPI befolyásoló hatását leginkább az ETP-re való hatásában láttuk. A korábbi eredményekhez hasonlóan az ellenanyag növelte az ETP-t, ami a 31 U/ml-nél volt a legkifejezettebb, viszont a β₂GPI koncentrációjának egyidejű növekedésével az anti-β₂GPI ETP-növelő hatása csökkenni látszott, 1000 μg/ml esetében már minden ellenanyag-koncentrációnál.

Az eddig bemutatott hatásokért felelős mechanizmus(oka)t is vizsgáltuk, amihez FVII-, FIX- és FXI-hiányos plazmát használtunk. A plazmákhoz 500 U/ml végkoncentrációban anti-β₂GPI-et adtunk. A faktorhiányos plazmáknak a trombingenerációja jelentősen gyengébb az egészséges plazmáéhoz képest, 1 pM TF-fel nem kaptunk reprodukálható trombogramot, ezért ebben a kísérletsorozatban magasabb koncentrációjú, 5 pM TF-fel és 4 μM FL-lel indítottuk be a trombingenerációt.

A látenciaidő a KK-ban (A-panel), a FIX- és FXI-hiányos plazmában kontrolljaiban hasonlóak voltak, viszont a FVII-hiányos plazmában érthető módon (mivel szöveti faktorról indítjuk be a reakciót) látványosan hosszabb időt vett igénybe, hogy elinduljon a trombingeneráció. A FIX

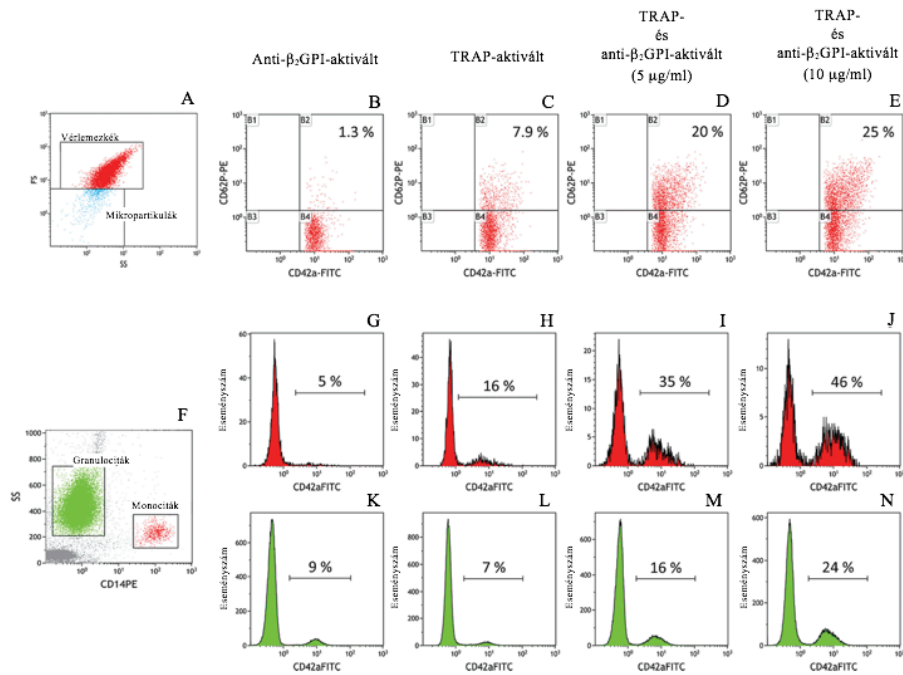
és a FXI hiánya nem befolyásolta az anti- β_2 GPI látenciaidőt nyújtó hatását, viszont a FVII-hiányos plazmában az időnyújtó hatás teljesen elmaradt.

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



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

Amikor a vérlemezékét (A-panel) csak anti- β_2 GPI-vel inkubáltuk, a P-szelektin-kifejeződés nagyon hasonló volt a kontroll értékhez (1,3%), hasonlóan a vérlemezéknek a monocitákkal (5%) és a granulocitákkal (9%) képzett heterotipikus aggregátumainak aránya jelentéktelen különbséget mutatott kontrollértékhez képest. A szupraminimális TRAP-koncentráció, ahogyan ez várható volt, a P-szelektin-pozitív vérlemezék arányát enyhén növelte (7,9%), hasonlóan a vérlemezke-monocita aggregátumok arányát (16%). Annak ellenére, hogy az ellenanyag önmagában nem váltott ki aktivációt, a TRAP hatását elősegíteni látszik, az anti- β_2 GPI koncentrációjának növelésével a TRAP-hatás is fokozódik mind a P-szelektin-kifejeződésben (5 μ g/ml anti- β_2 GPI: 20%, 10 μ g/ml anti- β_2 GPI: 25%) (lásd, B-E panelek), mind a vérlemezke-monocita (5 μ g/ml anti- β_2 GPI: 35%, 10 μ g/ml anti- β_2 GPI: 46%) (G-J panelek), illetve a vérlemezke-granulocita aggregátumok (K-N panelek) (5 μ g/ml anti- β_2 GPI: 16%, 10 μ g/ml anti- β_2 GPI: 24%) képződésében.



Főbb megállapításainkat részletesen bemutató publikációk:

- Az APS kardiovaszkuláris szövődményeinek kialakulása (Lóczy L et al, *Kardiol Pol*, 2019).
- Az APS-ben kimutatható antifoszfolipid antitestek (aPL) és ligandjuk interakciójának elemzése. (Szabó G et al, *J Immunol Methods*, 2020)
- Az aPL funkcionális vizsgálata (Szabó G et al, *Seminars in Thromb Haemost*, 2021).
- Az aPL prothrombotikus hatásainak részletes vizsgálata (Szabó G et al, *Thromb Res*, 2021)
- A súlyos APS-ben használt kezelés (bortezomib) prothrombotikus hatása (Ghansah H et al, *Int J Mol Sci*, 2021)
- Egyéb hematológiai kórképekben használt kezelések prothrombotikus hatásainak vizsgálata (Beke Debreceni I et al, *Int J Mol Sci*, 2019, Mezei G et al, *Anticancer Res*, 2021)