

Kutatási célkitűzésünk lényege, hogy megismerjük azokat a mechanizmusokat, amelyek módosíthatják a plazmin(ogen)-rendszer fibrinolitikus reakcióit. A fibrinolízis (a plazminogén aktivációja, a fibrin degradációja, a plazmin inaktiválása) in vitro meglehetősen jól ismert, de az in vivo történő folyamatokról kevés az információnk. Ezért keressük azokat a komponenseket, amelyek egy humán artériás trombusban jelen vannak és meghatározzuk, hogy ezek hogyan befolyásolják a fibrinolízis lépéseit. Elsőként a miozint vizsgáltuk (amely vérlemezkéből és elhalt simaizomsejtekből származhat) és mint előző OTKA pályázatunkban jeleztük, jelenléte gátolja a fibrinolitikus folyamatokat (Kolev K, Tenekedjiev K, Ajtai K, Kovalszky I, Gombás J, Váradi B and Machovich R. (2003): Myosin: a non-covalent stabilizer of fibrin in the process of clot dissolution. *Blood*. 101: 4380-4386).

Azt a koncepciót, hogy a fibrinolitikus folyamatok kompartmentekben játszódnak, amelyek szilárd-folyékony határfelületein a reakció sebességek nagy mértékben módosulnak és az ott lévő egyéb komponensek tovább módosíthatják (ilyenek tekinthető egy trombus is) egy Editorial Focusban (Preissner KT, Machovich R. (2004): Fibrinolysis and proteolysis in a cellular context. *Thromb.Haemost.* 91: 423-424) és egy felkérésre készült reviewer közleményben írtuk le (Kolev K, Longstaff C and Machovich R. (2005): Fibrinolysis at the Fluid-Solid Interface of Thrombi. *Curr. Med. Chem. – Cardiovascular & Hematological Agents*, 3: 341-355) és szintén egy felkérésre készült közleményben jeleztem (Machovich R (2008): Fibrinolytics. In: *Encyclopedia of Molecular Pharmacology, 2nd Edition*. Eds. S Offermanns and W. Rosenthal, Springer Verlag GmbH, Heidelberg in press).

Az alapkoncepció folytatásaként a foszfolipidekkel és zsírsavakkal (a vérlemezkéből származhatnak és mennyiségük jelentős lehet artériás trombusban) illetve az immunglobulinok szerepével foglalkoztunk.

A foszfolipidek (mind a szintetikus, mind a vérlemezkéből izolált) a plazminogén aktiváción és plazmin aktivitáson keresztül gátolják a fibrinolízist. A foszfolipidek ezeken kívül diffúziós barriert képeznek a plazminogén aktivátorokkal szemben (Váradi B, Kolev K, Tenekedjiev K, Mészáros Gy, Kovalszky I, Longstaff C and Machovich R (2004): Phospholipid-barrier to fibrinolysis: role for the anionic polar head charge and the gelphase crystalline structure. *J. Biol. Chem.* 279: 39863-39871).

A foszfolipidek tovább módosíthatják a reakciókat azáltal, hogy belőlük zsírsavak szabadulhatnak fel, amelyek megtalálhatók az artériás trombusban (mM koncentrációban), és ezek teljesen legátolják a plazmin amidolitikus aktivitását, és részlegesen gátolják

fibrinolitikus aktivitását, ezzel szemben a plazminogén aktivációját fibrin felszín jelenlétében fokozzák. A zsírsavak ezen hatásai eddig nem ismert mechanizmust, fibrinspecificitást jelentenek (Rábai Gy, Váradi B, Longstaff C, Sótonyi P, Kristóf V, Tímár F, Machovich R and Kolev K. (2007): Fibrinolysis in a lipid environment: modulation through release of free fatty acids. *J. Thromb. Haemost.* 5: 1265-1273).

Korábbi vizsgálataink azt mutatták, hogy az immunglobulinok (IgG) is gátolják a fibrinolízist (előző OTKA pályázatunkban jeleztük: Kolev K, Gombás J, Váradi B, Skopál J, Mede K, Pitlik E, Nagy Z and Machovich R. (2002): Immunoglobulin G from patients with antiphospholipid syndrome impairs the fibrin dissolution with plasmin. *Thromb. Haemost.* 87: 502-508). Ezeket a vizsgálatokat tovább folytattuk antifoszfolipid szindrómás betegek véréből izolált IgG-vel, illetve meghatároztuk ezek hatását foszfolipidek jelenlétében. Találtunk egy olyan IgG molekulát (antifoszfolipid-szindrómás beteg plazmájából izoláltuk), amely aktív trombint tartalmazott (átalakította a fibrinogént fibrinné, amidolitikus aktivitással bírt és aktiválta a XIII-faktort), de az antitrombinnal és hirudinnal szemben rezisztens maradt. Ezért a hatásért az IgG Fab fragmentje volt felelős. Bár ez az IgG változás ritka (23 beteg vizsgálatából csak egy fordult elő), részben magyarázattal szolgál a betegek trombózis hajlamára (Kolev K, Léránt I, Skopál J, Kelemen A, Nagy Z and Machovich R. (2005): Impaired inactivation by antithrombin and hirudin and preserved fibrinogen-clotting activity of thrombin in complex with antithrombin antibody from a patient with antiphospholipid syndrome. *Thromb. Haemost.* 94: 82-87).

Érdekes és ellentmondásos eredményeket jeleztek a foszfolipid és IgG együttes hatásai. A normál IgG gátló hatását a foszfolipid tovább fokozta, az antifoszfolipid IgG azonban másként viselkedett; volt olyan beteg akinek fokozta a plazminogén aktivációját és lassította a plazminogén fibrin degradációját, és találtunk olyan IgG-t, amely pont fordítva viselkedett. Mindez azt jelzi, hogy meglehetősen nagy klinikai heterogenitás lehet az antifoszfolipidémias betegek között (Gombás J, Tanka-Salamon A, Skopál J, Nagy Z, Machovich R and Kolev K. (2008): Modulation of fibrinolysis by the combined action of phospholipids and immunglobulins. *Blood Coag. Fibrinol* 19: 82-88).

A fibrinolízisben módosulás fordulhat elő, ha denaturált fehérje is van jelen valahol a plazminogén aktiváció helyén. Bizonyos denaturált fehérjék (korábbi publikációink) kofaktor funkciót vesznek fel, ha a plazminogén activator tPA. Most kimutattuk, hogy a denaturált albumin ezen tulajdonságáért az aggregátum mérete a felelős (minimál méret 10 nm rádiusz) és az antiparallel intermolekuláris béta-redőzet mennyisége. A denaturált

fehérje kofaktor funkcióját a plazminnal történő előemésztés tovább fokozza. (Galántai R, Módos K, Fidy J, Kolev K and Machovich R. (2006): Structural basis of the cofactor function of denatured albumin in plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341: 736-741).

A zsírsavak plazmin aktivitását gátló hatásáért a kringle struktúrák jelenléte felelős (mikroplazmint, amely nem tartalmaz kringlét, a zsírsavak nem gátolják). Ezen eredményünket nem a biológiai jelentősége, hanem elsősorban egy új kinetikai modell kidolgozása teszi érdekessé (Tanka-Salamon A, Tenekedjiev K, Machovich R and 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.*, in press).

Az alapkonceptió egyik további aspektusa, hogy milyen fibrinolitikus rendszer létezhet a plazmin(ogen)-en kívül, akár önállóan, akár együttesen? Korábbi kísérleteink azt jelzik (még OTKA támogatások előtt publikáltuk), hogy a polimorf nukleáris leukociták (PMN), illetve komponenseik alkalmas jelöltek erre a funkcióra. A PMN-elasztáz direkt fibrinolitikus tulajdonságú és interferál a plazmin(ogen) rendszerrel is, fokozza annak hatékonyságát. Tovább lépésként megvizsgáltuk több pulmonális tromboembóliában szenvedő beteg alfa₁-proteináz inhibitor (alfa₁PI) szintjét: Azt találtuk, hogy a magas inhibitor mennyisége korrelál a csökkent fibrinolitikus potenciállal. Az alfa₁PI a leghatékonyabb elasztáz inhibitor, vagyis emelkedett szintje indirekt jel lehet az elasztáz csökkent működése, a trombózis hajlamra (Gombás J, Kolev K, Tarján R and Machovich R (2004): Impaired fibrinolytic potential related to elevated α_1 -protease inhibitor levels in patients with pulmonary thromboembolism. *Ann. Hematol.* 83: 759-763).

Az OTKA pályázat témaköréhez tartozik, de nincs benne köszönetnyilvánítás az alábbi publikációkban:

Machovich R (2006): A véralvadási-fibrinolitikus rendszer. In: *Thrombosis és vérzékenység*. Ed. Boda Z, Medicina. 1-25.

Machovich R (2006): Az érfal jelentősége a hemosztázisban. In: *Thrombosis és vérzékenység*. Ed. Boda Z, Medicina. 49-64.

Machovich R (2007): Hemosztázis. In: *Orvosi Patobiokémia*. Ed. Mandl J, Machovich R. *Medicina* Budapest. 162-191.

Kolev K, Machovich R (2007): Atherosclerosis. In: *Orvosi Patobiokémia*. Ed. Mandl J, Machovich R. *Medicina*. Budapest. 441-479.