

## Vpliv lipoproteina(a) na fibrinolizo in vitro The effect of lipoprotein(a) on fibrinolysis in vitro

Jana Ambrožič\*, Blaž Berger\*\*

Deskriptorji  
fibrinoliza  
lipoproteini  
plazminogen aktivator tkivni

Descriptors  
fibrinolysis  
lipoproteins  
alteplase

**Izvleček.** Lipoprotein(a) je samostojen dejavnik tveganja za razvoj aterosklerotične bolezni. Zaradi strukturne podobnosti s plazminogenom naj bi visoke koncentracije lipoproteina(a) v plazmi zavirale fibrinolizo in tako pripomogle k razvoju te bolezni. Zaviralen vpliv na fibrinolizo so nekatere raziskave potrdile, druge pa ovrgele, zato smo v naši raziskavi opazovali raztapljanje strdkov in vitro dvanajstih preiskovancev z normalnimi koncentracijami in dvanajstih preiskovancev s povišanimi koncentracijami lipoproteina(a) v plazmi. Skupini sta si bili podobni po starosti, spolu, koncentraciji ostalih lipidov v plazmi in fibrinolitičnih parametrih. Merili smo spontano raztapljanje evglobulinskih strdkov in raztapljanje po dodatku tkivnega aktivatorja plazminogena. Raztapljali smo tudi neretrahirane in retrahirane strdke iz plazme brez in z dodanim tkivnim aktivatorjem plazminogena. Primerjali smo raztapljanje neretrahiranih strdkov v normalni zmesni plazmi in v preiskovancevi lastni plazmi. Razen pri raztapljanju neretrahiranih strdkov pri koncentraciji tkivnega aktivatorja plazminogena 50 ng/ml po dveh urah v normalni zmesni plazmi v nobenem drugem poskusu nismo ugotovili statistično pomembnih razlik med skupinama preiskovancev. Zato smo zaključili, da visoke koncentracije plazemskega lipoproteina(a) ne vplivajo pomembno na raztapljanje strdkov in vitro.

**Abstract.** Lipoprotein(a) is an independent risk factor for atherosclerotic disease. Because of its structural similarity to plasminogen, lipoprotein(a) in high concentrations may inhibit fibrinolysis, thus promoting the development of atherosclerosis. Since the inhibitory effect of lipoprotein(a) on fibrinolysis was rejected by some studies and confirmed by others, we decided to investigate in vitro clot lysis in 12 subjects with elevated concentrations of lipoprotein(a) levels and in 12 subjects with normal lipoprotein(a). The groups were matched for age, sex distribution, other lipid concentrations and fibrinolytic parameters. Spontaneous euglobulin clot lysis, euglobulin lysis induced with tissue-type plasminogen activator and lysis of non-retracted and retracted plasma clots in the absence and in the presence of plasminogen activator were measured. We compared lysis of non-retracted clots incubated in normal pool plasma and of clots incubated in the subject's own plasma. In no experiment did we established a statistically significant difference between the two groups with the exception of non-retracted clot lysis at a concentration of plasminogen activator 50 ng/ml measured after two hours of incubation in normal pool plasma. The results suggested that high concentrations of plasma lipoprotein(a) have no significant influence on in vitro clot lysis.

### Uvod

Bolezni srca in ožilja so danes pomemben vzrok umrljivosti in obolevnosti v razvitem svetu. Osnovni razlog srčnih in možganskih kapi je aterosklerotična sprememba žilne stene oziroma zapora arterije s krvnim strdkom. Posledica je delno ali popolno onemogočen pretok krvi in odmrtnje pripadajočega tkiva. Osnovo krvnega strdka tvori fibrinska mreža, ki jo razgrajuje plazemski fibrinolitični sistem. Ključni encim je plazmin, ki nas-

\*Jana Ambrožič, štud. med., Univerzitetni inštitut za gerontologijo – Interna klinika Trnovo, Riharjeva 24, 61000 Ljubljana.

\*\*Blaž Berger, štud. med., Univerzitetni inštitut za gerontologijo – Interna klinika Trnovo, Riharjeva 24, 61000 Ljubljana.

taja iz neaktivnega plazminogena. Najpomembnejši aktivator plazminogena je tkivni aktivator plazminogena (t-PA), ki ga sintetizirajo in sproščajo endotelijske celice. Njegovo delovanje zavira predvsem endotelijski hitri inhibitor t-PA (PAI). Neposredni inhibitor aktivnosti plazmina pa je  $\alpha$ -2 antiplazmin (1, 2).

Aterosklerotična bolezen je lahko posledica motenj v fibrinolitičnem sistemu. V fibrinolizo se domnevno vpleta tudi lipoprotein(a) (Lp(a)). Čeprav je bil odkrit že pred 25-imi leti (3), je zanimanje zanj v zadnjih letih močno naraslo zaradi njegove povezanosti z aterosklerozo. Lp(a) je neodvisni dejavnik tveganja za razvoj miokardnega infarkta (4, 5) in ishemične cerebrovaskularne bolezni (6).

Lp(a) je eden izmed plazemskih lipoproteinskih delcev nizke gostote (LDL-lipoproteini) (7). Zgrajen je iz hidrofobne sredice s trigliceridi in holesterolnimi estri, obdane s slojem holesterola in fosfolipidov. V tem sloju se nahaja specifičen glikoprotein apo A, ki je z disulfidnim mostičkom kovalentno vezan na protein apo B-100 (8). Obstaja več izooblik apo A, ki se razlikujejo v polipeptidni in ogljikohidratni verigi. Plazemski nivo posameznih oblik je genetsko določen (9, 10). Koncentracija Lp(a) v plazmi ne kaže povezanosti s plazemskimi koncentracijami celotnega holesterola, holesterola visoke gostote (HDL-holesterola), holesterola nizke gostote (LDL-holesterola) ali trigliceridov, ni odvisna od spola, prehrabnenih navad in starosti (4).

Aminokislinski zaporedji apo A in plazminogena sta si zelo podobni. Gena za obe molekuli ležita blizu, na dolgem kraku šestega kromosoma (3). Kljub strukturni podobnosti med Lp(a) in plazminogenom (11), aktivatorji plazminogena ne aktivirajo Lp(a), ker je na mestu delovanja aktivatorja v molekuli Lp(a) namesto arginina vezan serin (12).

Zaradi opisane podobnosti naj bi Lp(a) tekmoval s plazminogenom za lizinska vezavna mesta na fibrinu, fibrinogenu in endotelijskih celicah (13, 14). Tako bi lahko krožeči Lp(a), če zaide v ateromsko leho, inhibiral endogeno fibrinolizo in prispeval k aterosklerotični bolezni (15). Lp(a) deluje tudi kot kompetitivni inhibitor t-PA. Na njem zasede aktivno mesto in tako prepreči vezavo s plazminogenom (16). Vendar Lp(a), vezan na t-PA, lahko prepreči tudi njegovo inhibicijo s PAI-1 (17) in ima na ta način vzpodbudne vpliv na fibrinolizo. Enak učinek Lp(a) na plazemske strdke in vitro razlagajo tudi z inhibicijo  $\alpha$ -2 antiplazmina z Lp(a) (18). Številne raziskave so torej dale različne rezultate pri ugotavljanju vpliva povišanega Lp(a) na fibrinolizo. Prisotnost različnih izooblik Lp(a) in vivo z različnimi afinitetami do fibrina ima verjetno pri tem tudi pomembno vlogo (19, 20).

Namen naše raziskave je bil ugotoviti, ali obstaja razlika v raztapljanju strdkov, pripravljenih iz plazme z visoko in nizko koncentracijo Lp(a). Pripravili smo strdke iz evglobulinske frakcije plazme in ugotavljali, ali ima Lp(a) vpliv na njihovo raztapljanje. Pripravili smo tudi neretrahirane in retrahirane plazemske strdke. Njihov mehanizem raztapljanja je različen, zato smo ugotavljali, ali je tudi vpliv visoke koncentracije Lp(a) na ene in druge različen. Strdke smo inkubirali v normalni zmesni plazmi in preiskovančevi lastni plazmi in proučevali morebiten vpliv Lp(a) iz okoliške plazme na raztapljanje. S to raziskavo smo želeli potrditi hipotezo o zaviralnem vplivu Lp(a) na fibrinolizo in vitro.

## Preiskovanci in metode

### Preiskovanci

V raziskavo smo vključili 24 zdravih prostovoljcev: 7 žensk in 17 moških, starih od 22 do 59 let, srednja vrednost 43 let. V skupino z niskimi koncentracijami Lp(a) v plazmi smo uvrstili preiskovance s koncentracijo Lp(a) v plazmi pod 300 mg/l, v skupino z visokimi koncentracijami pa preiskovance s koncentracijo Lp(a) nad 300 mg/l. V vsaki skupini je bilo 12 oseb. Nihče od preiskovancev ni imel v anamnezi obolenj srca in ožilja. Obe skupini sta si bili podobni glede starosti in spola.

Preiskovance smo seznanili z namenom raziskave. Prostovoljno so privolili v sodelovanje. Raziskavo je odobrila Republiška komisija za medicinsko-etična vprašanja.

### Odvzem krvi

Kri smo jemali iz vene na podlahti, med sedmo in deveto uro zjutraj, v sedečem položaju. Preiskovanci so bili tešči. Za pripravo strdkov in za merjenje fibrinolitičnih parametrov smo odvzeli tri 10 ml epruvete z 1 ml 0,13 mol/l Na citrata in eno 5 ml epruveto z 0,5 ml 0,45 mol/l Na citratnega pufru. Epruvete smo postavili v ledeno kopel in nato kri 30 minut centrifugirali pri  $2000 \times g/\text{min}$  v  $4^{\circ}\text{C}$  v nihajnem rotorju. Plazmo smo razpipetirali v plastične epruvete, nato zamrznili v tekočem dušiku in shranili pri  $-70^{\circ}\text{C}$ , dokler je nismo uporabili za analize.

Kri za določitev koncentracij lipidov smo odvzeli v 5 ml vakuumsko epruveto brez anti-koagulantnega sredstva.

### Preiskave lipidov

V serumu smo določali koncentracije celotnega holesterola (21), HDL-holesterola (22) in trigliceride (23). LDL-holesterol smo izračunali po enačbi:  $\text{LDL-holesterol} = (\text{celotni holesterol} - \text{HDL-holesterol} - \text{trigliceridi}) / 2,2$ .

Koncentracije Lp(a) v serumu smo določili z nefelometrijo (24) in uporabili tovarniško pripravljene reagente. Nefelometrija je imunokemijski postopek, pri katerem antigen iz vzorca v kivetu reagira z raztopino protiteles. Nastanejo precipitacijski kompleksi, katerih koncentracijo smo merili spektrofotometrično. S pomočjo umeritvene krivulje, pripravljene z znanimi koncentracijami Lp(a), smo odčitali koncentracijo antigena v vzorcu. Pri dveh preiskovancih smo zaradi motnosti seruma koncentracijo Lp(a) določili s postopkom raketne imunoelektroforeze (25). Najnižja koncentracija Lp(a), ki smo jo lahko izmerili z obema metodama, je bila 103 mg/l. Zato smo vrednosti, nižje od 103 mg/l, izrazili kot 103 mg/l.

### Preiskave fibrinolitičnih parametrov

Aktivnost plazminogena (26) smo določali po kinetični metodi, ki temelji na stvarjanju kompleksa med plazminogenom in streptokinazo, aktivaciji plazminogena v plazmin s tem kompleksom ter razgradnji kromogenega substrata s plazminom. Aktivnost plazmina na

kromogeni substrat smo kinetično izmerili kot porast absorpcije pri 405 nm v določenem času. Uporabljali smo tovarniško pripravljene reagente.

Aktivnost  $\alpha$ -2 antiplazmina (27) smo določali po kinetični metodi in uporabljali tovarniško pripravljene reagente.  $\alpha$ -2 antiplazmin v plazmi je inaktiviral dodani plazmin. Preostalo aktivnost plazmina smo izmerili kinetično s kromogenim substratom kot porast absorpcije pri 405 nm v določenem času.

Aktivnost t-PA (28) smo merili s tovarniško pripravljenim kitom. Metoda temelji na principu aktivacije plazminogena v plazmin in razgradnje kromogenega substrata. Uporabili smo kri, odvzeto v epruvete Stabilyte. V luknjice mikrotitrške plošče smo dali 20  $\mu$ l razredčene, nakisane plazme. Dodali smo 0,2 ml mešanice plazminogena in kromogenega substrata ter 0,01 ml stimulatorja t-PA. Ploščo smo inkubirali pri 37°C 13 ur. Za prekinitev reakcije smo dodali 25  $\mu$ l žveplene kisline in nato izmerili absorpcijo pri 405 nm. Iz umeritvene krivulje z znanimi aktivnostmi t-PA, izraženimi v mednarodnih enotah (ME/ml), smo odčitali aktivnosti t-PA v vzorcih plazme.

Antigen t-PA (29) smo določali z encimsko-imunskim testom (ELISA) z dvojnimi protitelesi. Vzorce plazme smo inkubirali na mikrotitrskih ploščah, prekritih s protitelesi proti t-PA. Na kompleks med protitelesi, vezanimi na površino plošče in t-PA iz vzorca plazme smo vezali druga protitelesa proti t-PA, označena s peroksidazo. Po dodatku substrata za peroksidazo je bil porast absorpcije pri 405 nm sorazmeren količini t-PA v vzorcu plazme. Koncentracijo t-PA v vzorcu smo odčitali z umeritvene krivulje, pripravljene s standardnimi raztopinami t-PA.

Aktivnost PAI (30) smo merili tako, da smo plazmi dodajali različne koncentracije t-PA. PAI je inhibiral del t-PA, preostalo aktivnost t-PA pa smo izmerili spektrofotometrično (31). Aktivnost 1 ME/ml PAI smo definirali kot količino PAI, ki je inhibirala aktivnost 1 ME/ml t-PA.

Antigen PAI-1 (32) smo določali z encimsko-imunskim testom (ELISA) z dvojnimi protitelesi. Vzorce smo inkubirali na mikrotitrskih ploščah, prekritih z mišjimi monoklonalnimi protitelesi proti človeškemu PAI-1. Na kompleks, ki ga je tvoril PAI-1 iz vzorca plazme z mišjimi protitelesi, smo vezali druga mišja monoklonalna, anti-PAI-1 protitelesa, označena s peroksidazo. Po dodatku substrata za peroksidazo je bil porast absorpcije pri 492 nm sorazmeren s količino PAI-1 v vzorcu. Koncentracijo PAI-1 v vzorcu smo odčitali z umeritvene krivulje, pripravljene s standardnimi raztopinami PAI-1.

Koncentracijo fibrinogena (33) v plazmi smo določali v koagulacijskem aparatu. Metoda temelji na koagulaciji plazme z dodatkom trombina. Čas strjevanja je odvisen predvsem od koncentracije fibrinogena v plazmi.

### **Priprava in merjenje raztapljanja evglobulinskih strdkov**

Evglobuline (34), ki vsebujejo sestavine fibrinolitičnega sistema, smo oborili iz plazme po razredčenju plazme z destilirano vodo in nakisanju z očetno kislino na pH 5,9. Inhibitorji fibrinolize so ostali po centrifugiranju v supernatantu, ki smo ga odlili. Evglobuline smo raztopili v boratnem pufru enake prostornine, kot je bila začetna prostornina plazme, iz katere smo pripravili evglobuline. Evglobuline smo koagulirali z enako prostor-

nino raztopine  $\text{CaCl}_2$ . Po koagulaciji smo merili čas, v katerem se je strdek raztopil. Rezultate smo izrazili v minutah.

Pripravimo še evglobulinske strdke z rekombinantnim tkivnim aktivatorjem plazminogena (rt-PA). Evglobuline smo pripravili na zgoraj opisan način. Raztopili smo jih v enaki prostornini Tris-pufra, kot je bila začetna prostornina plazme, iz katere smo pripravili evglobuline, in dodali 10  $\mu\text{l}$  raztopine rt-PA tako, da je bila končna koncentracija 25 ng/ml. Evglobuline smo koagulirali z enako prostornino raztopine  $\text{CaCl}_2$ , kot je bila začetna prostornina plazme. Čas raztapljanja strdkov smo izrazili v minutah.

### **Prprava in merjenje raztapljanja plazemskih strdkov**

Plazemske strdke smo pripravljali tako, kot so opisali Šabovič in sodelavci (35). Zmrznjeno plazmo smo odtajali v kopeli pri 37°C in jo premešali v vibratorju. 2 ml plazme smo dodali po 10  $\mu\text{l}$  125-I fibrinogena, raztopine  $\text{CaCl}_2$  in trombina. Preden je plazma koagulirala, smo jo vsrkali v silikonizirane plastične cevke notranjega premera 4 mm. Po uri inkubacije pri 37°C smo razrezali cevke na 1 cm dolge koščke in iz cevk iztisnili strdke, ki so imeli povprečno prostornino 0,13 ml. Nekatere strdke smo stisnili in tako dobili retrahirane. Retrahirane in neretrahirane strdke smo nato 60 minut spirali v petrijevkah s Tris-pufrom pri sobni temperaturi. Pripravili smo epruvete z 1 ml normalne zmesne plazme ali lastne plazme preiskovancev. Epruvete so bile nameščene v vodni kopeli pri 37°C. Tik preden smo strdke, označene s 125-I fibrinom, potopili v plazmo, smo dodali 20  $\mu\text{l}$  rt-PA v različnih koncentracijah. V poizkusih, v katerih smo merili obseg spontanega raztapljanja, pa aktivatorja nismo dodali. V določenih časovnih razmikih (2-8 ur) smo odvzeli vzorec 100  $\mu\text{l}$  plazme, v katerem je bil strdek. Izmerili smo vsebnost 125-I z gama števcem in iz vrednosti radioaktivnosti izračunali delež raztapljanja strdkov v odstotkih glede na začetno radioaktivnost strdka. Vse poizkuse smo opravili v trojniku in kot rezultate vzeli povprečje treh meritev.

### **Statistične metode**

Rezultate raztapljanja evglobulinskih strdkov, evglobulinskih strdkov z rt-PA, aktivnosti t-PA, antigena t-PA, aktivnosti PAI in antigena PAI-1 smo prikazali kot mediane in razpone. Razlike med skupinama smo testirali z Mann-Whitneyevim U testom. Rezultate ostalih fibrinolitičnih parametrov, koncentracij lipidov in raztapljanja plazemskih strdkov pa smo prikazali kot srednje vrednosti s standardnimi odkloni. Razlike med skupinama smo testirali s Studentovim t-testom. Pri iskanju razlik smo vrednosti  $p < 0,05$  imeli za statistično značilne. Povezavo med spremenljivkami smo testirali s koeficientom korelacije ( $r$ ) po Pearsonu. Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket SPSS/PC+.

## **Rezultati**

### **Vrednosti lipidov**

Koncentracije lipidov za obe skupini so prikazane v tabeli 1. Glede na izbor preiskovancev sta se po pričakovanju skupini močno razlikovali v koncentraciji Lp(a) v plazmi. Pri koncentracijah ostalih lipidov pa med skupinama ni bilo statistično pomembnih razlik.

### Vrednosti fibrinoličnih parametrov

Vrednosti izmerjenih fibrinoličnih parametrov so prikazane v tabeli 2. Razlike med skupinama niso bile statistično značilne. V tabeli 3 so prikazane povezave med fibrinoličnimi parametri in koncentracijo Lp(a) v plazmi. Koncentracija Lp(a) v plazmi ni kazala pomembne povezave z nobenim od fibrinoličnih parametrov. Pomembne povezave pa so bile med koncentracijo antigena t-PA, aktivnostjo PAI ter koncentracijo antigena PAI.

Tabela 1. Rezultati meritev (aritmetična sredina  $\pm$  standardna deviacija) koncentracij lipoproteina(a) (Lp(a)), celotnega holesterola, HDL in LDL-holesterola ter trigliceridov za skupino preiskovancev z visokimi ( $> 300$  mg/l) in skupino z nizkimi koncentracijami Lp(a) ( $< 300$  mg/l) v plazmi.

parameter	enota	visok Lp(a)	nizek Lp(a)	p
Lp(a)	mg/l	783,2 $\pm$ 347,6	111,1 $\pm$ 15,8	0,000
Celotni holesterol	mmol/l	7,6 $\pm$ 1,5	7,7 $\pm$ 2,0	0,912
HDL – holesterol	mmol/l	1,1 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,4	0,566
LDL – holesterol	mmol/l	5,19 $\pm$ 1,37	4,32 $\pm$ 1,19	0,127
Trigliceridi	mmol/l	3,3 $\pm$ 2,7	6,8 $\pm$ 8,4	0,186

Tabela 2. Rezultati meritev (aritmetična sredina  $\pm$  standardna deviacija) aktivnosti plazminogena, aktivnosti  $\alpha$ -2 antiplazmina in fibrinogena za skupino preiskovancev z visokimi ( $> 300$  mg/l) in skupino z nizkimi koncentracijami lipoproteina(a) (Lp(a)) ( $< 300$  mg/l) ter rezultati meritev (mediana in razpon) aktivnosti tkivnega aktivatorja plazminogena (t-PA), antigena t-PA, aktivnosti inhibitorja tkivnega plazminogena (PAI) in antigena PAI-1 pri istih preiskovancih.

parameter	enota	visok Lp(a)	nizek Lp(a)	p
Plazminogen: aktivnost	rel	0,97 $\pm$ 0,13	0,90 $\pm$ 0,10	0,187
$\alpha$ -2 antiplazmin: aktivnost	rel	0,83 $\pm$ 0,08	0,88 $\pm$ 0,13	0,290
Fibrinogen	g/l	3,42 $\pm$ 0,55	3,53 $\pm$ 0,67	0,657
t-PA: aktivnost	ME/ml	0,82 (0,41–1,37)	0,81 (0,50–1,48)	0,931
t-PA: antigen	ng/ml	8,2 (5,1–12,4)	13,1 (5,3–19,3)	0,085
PAI: aktivnost	ME/ml	7,8 (1,0–29,8)	12,6 (1,6–39,6)	0,248
PAI-1: antigen	ng/ml	13,3 (5,0–43,5)	18,3 (2,2–73,7)	0,603

### Raztapljanje evglobulinskih strdkov

Iz plazme preiskovancev z visokimi in nizkimi koncentracijami Lp(a) smo pripravili evglobulinske strdke in merili čas njihovega raztapljanja. V skupini z visokimi koncentracijami Lp(a) v plazmi so se strdki raztopili v 330 (240–420) minutah, v skupini z nizkimi koncentracijami Lp(a) v plazmi, pa v 305 (75–420) minutah. Razlika med skupinama ni bila statistično pomembna ( $p = 0,269$ ). Evglobulinskim strdkom smo nato dodajali rt-PA in merili čas raztapljanja. Rezultati so bili naslednji: 20 (10–25) minut v skupini z visokimi koncentracijami Lp(a) v plazmi in 20 (15–24) minut v skupini z nizkimi koncentracijami Lp(a) v plazmi (rezultati so mediane in razponi). Tudi tu ni bilo statistično pomembnih razlik ( $p = 0,685$ ). Povezave med raztapljanjem evglobulinskih strdkov, raztapljanjem evglobulinskih strdkov z rt-PA in koncentracijo Lp(a) niso bile pomembne (tabela 3).

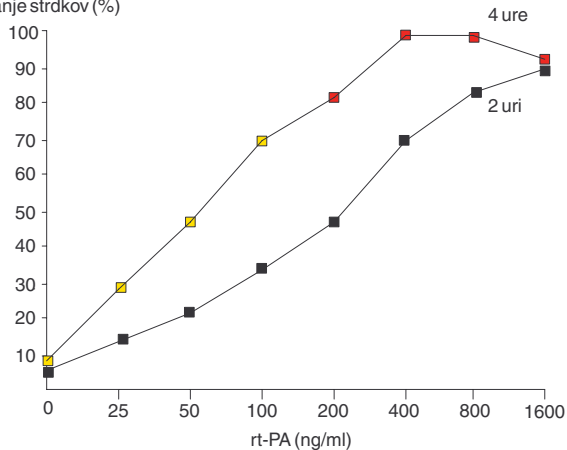
Tabela 3. Korelacijski koeficienti (*r*) za povezave med raztapljanjem evglobulinskih strdkov (evgl str), raztapljanjem evglobulinskih strdkov z rekombinantnim tkivnim aktivatorjem plazminogena (evgl str z rt-PA), aktivnostjo plazminogena (ppl: ak), aktivnostjo  $\alpha$ -2 antiplazmina ( $\alpha$ -2 ap: ak), fibrinogena (fbg), aktivnostjo tkivnega aktivatorja plazminogena (t-PA: ak), antigenom t-PA (t-PA: ag), aktivnostjo inhibitorja tkivnega plazminogena (PAI: ak), antigenom PAI-1 (PAI: ag) in koncentracijo lipoproteina(a) (konc Lp(a)) vseh preiskovancev. \**p* < 0,01; \*\**p* < 0,001

	Evgl str z rt-PA	Pplg: ak	$\alpha$ -2 ap: ak	Fbg	t-PA: ak	t-PA: ag	PAI: ak	PAI-1: ag	Konc Lp(a)
Evgl str	-0,03	0,24	-0,41	-0,07	0,08	-0,27	-0,22	-0,17	0,17
Evgl str z rt-PA		0,33	0,14	0,53*	-0,16	-0,01	-0,02	-0,09	0,03
Pplg: ak			-0,02	-0,01	-0,25	-0,20	0,03	0,00	0,29
$\alpha$ -2 ap: ak				0,12	-0,28	-0,13	-0,03	-0,11	0,00
Fbg					-0,29	0,17	0,32	0,22	-0,08
t-PA: ak							0,11	-0,15	0,12-0,04
t-PA: ag							0,74**	0,79**	-0,46
PAI: ak								0,93**	-0,23
PAI-1: ag									-0,23

### Raztapljanje plazemskih strdkov

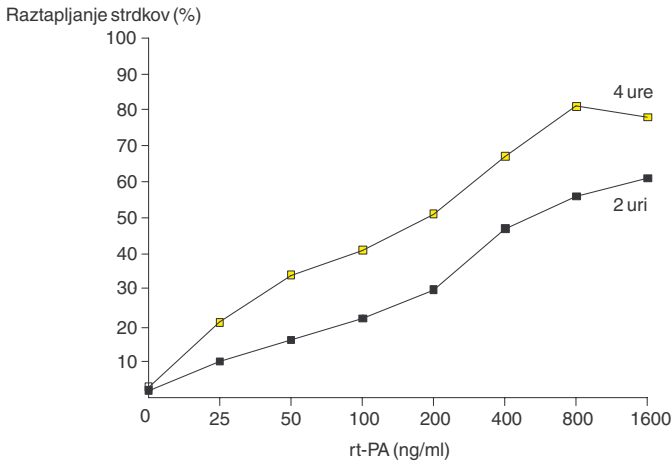
Strdke iz normalne zmesne plazme smo raztapljali pri različnih koncentracijah rt-PA. Iz dobljenih rezultatov smo določili koncentracije rt-PA, pri katerih so se strdki raztapljali približno 50 %. Pri teh koncentracijah smo v nadaljnjih poskusih raztapljali strdke preiskovancev z visokimi in nizkimi koncentracijami Lp(a) v plazmi. Neretrahirani strdki iz normalne zmesne plazme so se brez dodanega rt-PA po 4 urah raztapljali največ 8 %, pri dodajanju rt-PA pa se je topnost povečevala z večanjem koncentracije in z daljšim

Raztapljanje strdkov (%)



Slika 1. Odvisnost raztapljanja neretrahiranih strdkov iz normalne zmesne plazme od koncentracije rekombinantnega tkivnega aktivatorja plazminogena (rt-PA). Prikazani so rezultati raztapljanja po 2 in 4 urah.

časom inkubacije. Približno 50 % raztapljanje po 4 urah smo dosegli s 50 ng rt-PA/ml, do popolnega raztapljanja v tem času pa je prišlo s 400 ng/ml rt-PA (slika 1). Retrahirani strdki so se brez dodanega rt-PA po 4 urni inkubaciji raztapljali največ 3 %. Pri dodajanju rt-PA se je topnost povečevala z večanjem koncentracije in z daljšim časom inkubacije. Približno 50 % raztapljanje po 4 urah inkubacije smo dosegli z 200 ng rt-PA/ml. Do največjega raztapljanja v tem času (81 %) je prišlo z 800 ng rt-PA/ml (slika 2).

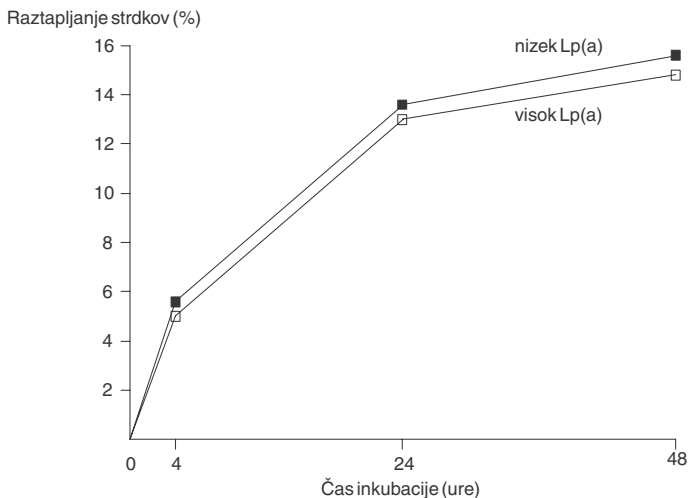


Slika 2. Odvisnost raztapljanja retrahiranih strdkov iz normalne zmesne plazme od koncentracije rekombinantnega tkivnega aktivatorja plazminogena (rt-PA). Prikazani so rezultati raztapljanja po 2 in 4 urah.

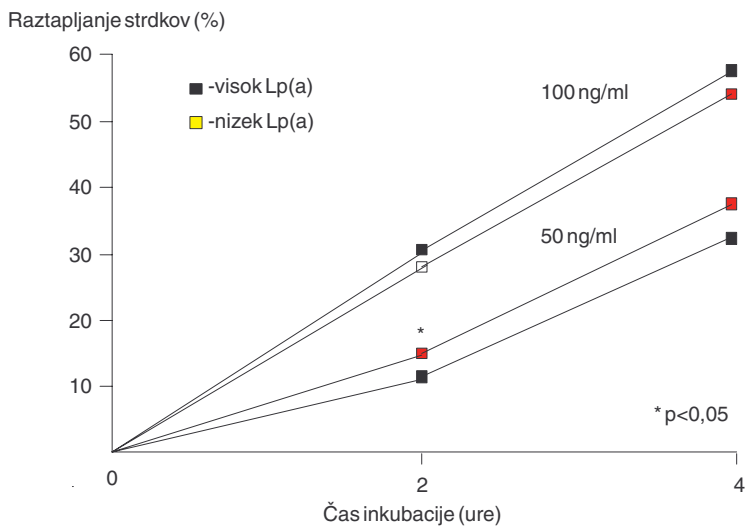
Spontano raztapljanje neretahiranih in retrahiranih strdkov iz plazme preiskovancev z visokimi in nizkimi koncentracijami Lp(a) v normalni zmesni plazmi smo merili po 4, 24 in 48 urah. Neretahirani strdki so se po 48 urah v obeh skupinah preiskovancev raztapljali približno 15 % (slika 3). Razlika med skupinama ni bila statistično pomembna. Retrahirani strdki so se v obeh skupinah po 48 urah raztapljali le do 3 %.

Raztapljanje neretahiranih in retrahiranih strdkov iz plazme preiskovancev z visokimi in nizkimi koncentracijami Lp(a) v normalni zmesni plazmi smo merili pri različnih koncentracijah rt-PA. Raztapljanje neretahiranih strdkov smo merili pri koncentraciji rt-PA 50 in 100 ng/ml po 2 in 4 urah. Pri koncentraciji rt-PA 50 ng/ml smo dobili statistično značilno razliko ( $p < 0,05$ ) med obema skupinama po 2-urni inkubaciji, razlika po 4 urah je bila na meji statistične pomembnosti ( $p = 0,057$ ). Bolje so se topili strdki skupine z nizkimi koncentracijami Lp(a) v plazmi. Pri koncentraciji rt-PA 100 ng/ml med skupinama skoraj ni bilo razlik niti po 2 niti po 4 urah (slika 4). Raztapljanje retrahiranih strdkov smo merili pri rt-PA 200 ng/ml. Po 2, 4, 6 in 8 urni inkubaciji je bilo raztapljanje nekoliko boljše v skupini z nizkimi koncentracijami Lp(a) v plazmi (17–55 %) kot v skupini z visokimi koncentracijami Lp(a) v plazmi (14–52 %), vendar razlike med skupinama niso bile statistično značilne (slika 5).

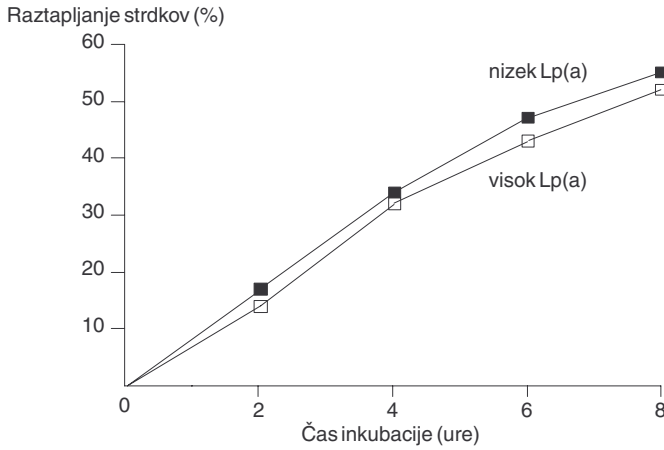




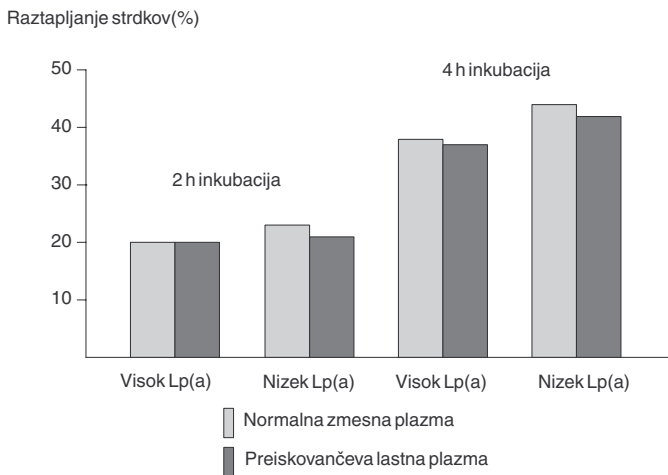
Slika 3. Časovni potek spontanega raztapljanja neretrahiranih strdkov iz plazme preiskovancev z visokim koncentracijami lipoproteina(a) (Lp(a)) (> 300 mg/l) in z nizkim koncentracijami Lp(a) (< 300 mg/l) v normalni zmesni plazmi.



Slika 4. Časovni potek raztapljanja neretrahiranih strdkov iz plazme preiskovancev z visokim koncentracijami lipoproteina(a) (Lp(a)) (> 300 mg/l) in nizkim koncentracijami Lp(a) (< 300 mg/ml) pri koncentraciji rekombinantnega tkivnega aktivatorja plazminogena (rt-PA) 50 in 100 ng/ml v normalni zmesni plazmi.



Slika 5. Časovni potek raztapljanja retrahiranih strdkov iz plazme preiskovancev z visokimi koncentracijami lipoproteina(a) (Lp(a)) (> 300 mg/l) in nizkimi koncentracijami Lp(a) (< 300 mg/l) v normalni zmesni plazmi pri koncentraciji rekombinantnega tkivnega aktivatorja plazminogena (rt-PA) 200 ng/ml.



Slika 6. Raztapljanje retrahiranih strdkov iz plazme preiskovancev obeh skupin (z visokimi koncentracijami lipoproteina(a) (Lp(a)) (> 300 mg/ml) in z nizkimi koncentracijami Lp(a) (< 300 mg/ml)) v normalni zmesni plazmi in v preiskovančevih lastnih plazmah, po 2 in 4 urah inkubacije.

Raztapljanje retrahiranih strdkov v preiskovančevi lastni plazmi in v normalni zmesni plazmi smo opazovali pri enakih koncentracijah rt-PA (200 ng/ml). V tem poizkusu smo ugotavljali morebitni vpliv Lp(a) iz okoliške plazme na fibrinolizo. Rezultate raztapljanja smo merili po 2 in 4 urah (slika 6). Pričakovali smo razlike med raztapljanjem v normalni zmesni plazmi in raztapljanjem v plazmi preiskovancev z visoko koncentracijo Lp(a) v plazmi, v skupini z nizko koncentracijo Lp(a), ki nam je služila za kontrolo, pa razlik nismo pričakovali. Statistično pomembnih razlik ni bilo niti v eni niti v drugi skupini.

## Razprava

Lp(a) je samostojen dejavnik tveganja boleznih srca in ožilja. Pri koncentracijah Lp(a) v plazmi nad 300 mg/l je verjetnost razvoja teh boleznih dva do petkrat večja (4, 5). Mehanizem njegovega delovanja še ni raziskan.

Dosedanje laboratorijske raziskave so vpliv visoke koncentracije plazemskega Lp(a) na fibrinolizo in vitro preučevale na zelo različne načine. Rezultati teh raziskav se razlikujejo med seboj, saj so nekatere pokazale zaviralen (19, 36, 37), druge pa pospeševalen vpliv Lp(a) na fibrinolizo (18). V naši raziskavi smo zato uporabili dva različna poskusna »sistema«: raztapljanje evglobulinskih strdkov in raztapljanje plazemskih strdkov. Pri obeh vrstah strdkov smo preučevali vpliv Lp(a) na spontano raztapljanje in raztapljanje, izzvano z rt-PA.

Evglobulinski strdki so pripravljene iz evglobulinske frakcije plazme in vsebujejo vse sestavine fibrinolitičnega sistema, razen inhibitorjev (PAI-1 in  $\alpha$ -2-antiplazmina), ki jih med postopkom priprave evglobulinov odstranimo. Taki strdki se zaradi odsotnosti inhibitorjev sami raztopijo v sorazmerno kratkem času (v nekaj urah). V nasprotju s tem se plazemski strdki spontano skoraj ne raztapljajo. Posebno slabo se raztapljajo retrahirani plazemski strdki, ker vsebujejo zelo malo plazminogena (38). V naši raziskavi smo ugotovili, da so se v 48 urah neretrahirani strdki spontano raztopili v največ 8 %, retrahirani pa največ v 3 %. Raztapljanje obeh vrst strdkov pospešimo, če damo v okolico strdka t-PA. Pri tem je čas raztapljanja obratno sorazmeren količini dodanega t-PA (slika 1, 2).

Retrahirani strdki so verjetno bolj podobni strdkom, ki nastanejo in vivo kot neretrahirani, saj predvidevamo, da pride po nastanku strdka v žili do njegove retrakcije. Zaradi retrakcije je mehanizem raztapljanja retrahiranih strdkov drugačen od raztapljanja neretrahiranih. Pri neretrahiranih t-PA najprej aktivira vezani in nevezani plazminogen v strdku, kar pri teh strdkih že zadošča za raztapljanje. Pri retrahiranih, ki vsebujejo zelo malo plazminogena, pa se z aktivacijo plazminogena, vezanega na fibrin, le ta delno razgradi. Razkrijejo se nova vezavna mesta, na katera se vežejo nove molekule plazminogena iz okoliške plazme, in proces se nadaljuje po mehanizmu pozitivne povratne zveze (38). Tako bi pri neretrahiranih strdkih Lp(a) lahko vplival na vezavo plazminogena na fibrin ob nastanku strdkov, pri retrahiranih strdkih pa tudi ob poteku njihovega raztapljanja. Na podlagi tega smo se odločili preizkusiti, ali na raztapljanje strdkov vpliva tudi Lp(a) iz okoliške plazme. V ta namen smo strdke pripravljene iz plazem preiskovancev z visoko koncentracijo Lp(a), raztapljali v njihovi lastni plazmi.

Ker je raztapljanje strdkov odvisno od količine encimov (t-PA in drugih aktivatorjev plazminogena ter plazminogena) in inhibitorjev (predvsem PAI-1 in  $\alpha$ -2 antiplazmina) ter koncentracije fibrina, nanj pa poleg Lp(a) domnevno vplivajo tudi serumski lipidi, smo se najprej želeli prepričati, da se skupini razlikujeta samo po koncentraciji Lp(a) v plazmi. Rezultati so pokazali, da se vrednosti lipidov, razen Lp(a) in fibrinolitičnih parametrov med skupinama niso statistično pomembno razlikovale (tabela 1, tabela 2), iz česar smo predvidevali, da bomo vse morebitne razlike v raztapljanju strdkov lahko pripisali Lp(a).

Naši rezultati spontanega raztapljanja evglobulinskih strdkov, ki vsebujejo skoraj toliko (približno 70 %) Lp(a) kot plazma, iz katere so pripravljene (36), niso pokazali razlik med raztapljanjem strdkov z visokimi plazemskimi koncentracijami Lp(a) v primerjavi z nizkimi plazemskimi koncentracijami Lp(a). Ti rezultati so v skladu z rezultati Aznarja in sodelavcev (36) ter Szczeklika in sodelavcev (39). Manj podobnosti pa kaže primerjava med našimi rezultati in rezultati Aznarja in sodelavcev (36) pri evglobulinskih strdkih, ki smo jim dodajali t-PA. Aznar in sodelavci so pokazali, da se taki strdki pomembno slabše raztapljajo pri preiskovancih z visoko plazemsko koncentracijo Lp(a) kot pri preiskovancih z nizko plazemsko koncentracijo Lp(a), naši rezultati pa te razlike niso potrdili. Ker je bil način pripravljanja strdkov v obeh primerih zelo podoben in zato ni mogel vplivati na rezultate, smo razliko med našimi rezultati in rezultati Aznarja in sodelavcev pripisali razlikam v izboru preiskovancev. Različne izooblike Lp(a) pri različnih ljudeh imajo namreč različno afiniteto do fibrina (20) in lahko tako domnevno različno vplivajo na fibrinolizo.

Pri raztapljanju evglobulinskih strdkov nismo ugotovili povezave med časom raztapljanja in koncentracijo Lp(a). Raztapljanje teh strdkov je bilo pomembno povezano samo s koncentracijo fibrinogena v plazmi, iz katere smo pripravljali evglobuline, vendar samo pri strdkih, katerim smo dodajali rt-PA. Koncentracija Lp(a) ni bila povezana z nobenim od merjenih fibrinolitičnih parametrov (tabela 3).

Naši rezultati raztapljanja neretrahiranih in retrahiranih plazemskih strdkov z rt-PA so pokazali, da so se v večini poizkusov strdki iz plazem preiskovancev z visoko plazemsko koncentracijo Lp(a) topili nekoliko slabše kot tisti iz plazem preiskovancev z nizko plazemsko koncentracijo Lp(a). Vendar statistično pomembnih razlik nismo dokazali (slika 4, 5). Lp(a) iz okoliške plazme prav tako ni vplival na topnost retrahiranih strdkov (slika 6). Edino statistično pomembno razliko ( $p < 0,05$ ) smo dobili pri raztapljanju neretrahiranih strdkov po 2 urah pri koncentraciji rt-PA 50 ng/ml (slika 5). Strdki iz plazem z visokim Lp(a) so se raztapljali slabše. Po 4 urah pa je bila razlika na meji statistične značilnosti ( $p = 0,06$ ). Pri večji koncentraciji aktivatorja (100 ng/ml) pa razlik v raztapljanju ni bilo. Iz tega smo sklepali, da pri višjih koncentracijah t-PA, Lp(a) kot njegov kompetitivni inhibitor nima vpliva na raztapljanje. To je v svoji raziskavi prikazal tudi Terres s sodelavci (19), ki je ugotovil, da so se strdki, pripravljene iz polne krvi, ki so jim dodali čisti Lp(a), raztapljali slabše kot strdki brez dodanega Lp(a) le, če za raztapljanje ni uporabil končnih koncentracij t-PA, večjih od 400 ng/ml.

Iz rezultatov naše raziskave, ki je pokazala, da je raztapljanje strdkov, pripravljenih iz plazme preiskovancev z visokimi koncentracijami Lp(a), sicer nekoliko slabše, kot raztapljanje strdkov iz plazme preiskovancev z nizkimi koncentracijami Lp(a), vendar sta-

tistično neznačilno, smo zaključili, da Lp(a) nima pomembnega vpliva na raztapljanje teh strdkov in vitro. Pri evoglobulinskih strdkih pa je bila razlika med skupinama še bolj neznačilna, iz česar smo zaključili, da Lp(a) ne vpliva na raztapljanje teh strdkov.

## Zahvala

Najini mentorici dr. Mojci Stegnar se toplo zahvaljujemo za strokovno in spodbudno pomoč, ki nama jo je nudila ves čas nastajanja naloge. S svojo potrpežljivostjo in zavzetostjo nama je omogočila pridobitev dragocenih izkušenj pri raziskovalnem delu.

Doc. dr. Branki Wraber in ostalim sodelavcem z inštituta za mikrobiologijo v Ljubljani se lepo zahvaljujemo, da so nama omogočili opraviti meritve radioaktivnosti.

Dipl. ing. Darku Černetu z inštituta za klinično kemijo in klinično biokemijo Kliničnega centra v Ljubljani hvala za opravljene meritve koncentracij Lp(a).

Ing. Marinki Tehovnik in ostalemu osebju v laboratoriju se zahvaljujemo za natančno in hitro opravljene laboratorijske analize.

Višji medicinski sestri Brigiti Valenčič hvala za pomoč pri delu s preiskovanci.

Dr. Mirzi Šaboviču prisrčna hvala za koristne nasvete pri eksperimentalnem delu.

Dr. Zlatku Frasu in dr. Barbari Salobir-Pajnič hvala za pomoč pri delu z računalnikom.

---

## Literatura

1. Gaffney PY, Willmott NJ, Longstaff C. Fibrinolysis. A delicate balance between enzymes and inhibitors. In: Serner GGN, Gensini GF, Abbate R, Prisco D, eds. *Thrombosis: an update*. Firenze: Scientific Press, 1992: 519–48.
2. Plow EF, Felez J, Miles LA. Cellular regulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost 1991*; 66: 32–6.
3. Scanu AM, Fless GM. Lipoprotein(a). Heterogeneity and biological relevance. *J Clin Invest 1990*; 85: 1709–15.
4. Sandkamp M, Funke H, Schulte H, Köhler E, Assmann G. Lipoprotein(a) is an independent risk factor for myocardial infarction at a young age. *Clin Chem 1990*; 36: 20–3.
5. Rosengren A, Wilhelmsen L, Eriksson E, Risberg B, Wedel H. Lipoprotein(a) and coronary heart disease: a prospective case-control study in a general population sample of middle aged men. *BMJ 1990*; 301: 1248–51.
6. Jürgens G, Költringer P. Lipoprotein(a) in ischemic cerebrovascular disease: A new approach to the assessment of risk for stroke. *Neurology 1987*; 37: 513–5.
7. Miles LA, Plow EF. Lp(a): An interloper into the fibrinolytic system? *Thromb Haemost 1990*; 63: 331–5.
8. Bewu ADM, Durrington PN. Lipoprotein(a): structure, properties and possible involvement in thrombogenesis and atherogenesis. *Atherosclerosis 1990*; 85: 1–14.
9. McLean JW, Tomlison JE, Kuang W, et al. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature 1987*; 330: 132–7.
10. Scanu AM. Lipoprotein(a): A potential bridge between the fields of atherosclerosis and thrombosis. *Arch Pathol Lab Med 1988*; 112: 1045–7.
11. Gonzalez-Gronow M, Edelberg JM, Pizzo SV. Further characterization of the cellular plasminogen binding site: evidence that plasminogen 2 and lipoprotein(a) compete for the same site. *Biochemistry 1989*; 28: 2374–7.
12. Scanu AM. Lipoprotein(a): A genetically determined lipoprotein containing a glycoprotein of the plasminogen family. *Sem Thromb Hemostas 1988*; 14: 266–70.

13. Harpel PC, Gordon BR, Parker TS. Plasmin catalyzes binding of lipoprotein(a) to immobilized fibrinogen and fibrin. *Aca Sci USA* 1989; 86: 3847–51.
14. Hajjar KA, Gavish D, Breslow JL, Nachman RL. Lipoprotein(a) modulation of endothelial cell surface fibrinolysis and its potential role in atherosclerosis. *Nature* 1989; 339: 303–5.
15. Simon DI, Fless GM, Loscalzo J. Tissue-type plasminogen activator binds to and is inhibited by surface-bound lipoprotein(a) and low-density lipoprotein. *Biochemistry* 1991; 30: 6671–7.
16. Edelberg JM, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV. Lipoprotein(a) inhibition of plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *Thromb Res* 1990; 57: 155–62.
17. Edelberg JM, Reilly CF, Pizzo SV. The inhibition of tissue type plasminogen activator inhibitor-1. The effects of fibrinogen, heparin, vitronectin and lipoprotein(a). *J Biol Chem* 1991; 266: 7488–93.
18. Mao SJT, Tucci MA. Lipoprotein(a) enhances plasma clot lysis in vitro. *FEBS* 1990; 267: 131–4.
19. Terres W, Krewitt M, Hamm CW. Effects of lipoprotein(a) on in vitro lysis of whole blood thrombi from healthy volunteers. *Thromb Res* 1993; 69: 479–87.
20. Bertrand JJ, Boutiere B, Aroux D, Angles-Cano E, Sampol J. Is there a relationship between lipoprotein(a) levels and plasminogen activation in patients with confirmed atherosclerotic disease? *Thromb Haemost* 1991; 65: 918–91.
21. Allain CC, Poon LS, Chan GSG. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1970; 20: 470–5.
22. Finley PR, Schifman RB, William RJ et al. Cholesterol and high density lipoprotein. *Clin Chem* 1978; 24: 931–3.
23. Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 1973; 19: 476–82.
24. Cazzolato G, Prakash G, Green S, Kostner GM. The determination of Lp(a) by rate and endpoint nephelometry. *Clin Chim Acta* 1983; 135: 203–8.
25. Laurell CB. Electroimmunoassay. *Scand J Clin Lab Invest* 1972; 29: Suppl 124: 21–37.
26. Friberger P, Knöss M. Plasminogen determination in human plasma. In: Scully M, Kakkar UV, eds. *Chromogenic peptide substrates*. Edinburgh: Churchill, 1979: 128–39.
27. Friberg P. Method for the assay of antiplasmin in plasma. *Scand J Lab Invest* 1982; 42: 41–7.
28. Rånby M, Norrman B, Wallen. A sensitive assay for tissue plasminogen activator. *Thromb Res* 1982; 27: 743–9.
29. Rånby M, Bergsdorf N, Nilsson T, Mellbring G, Winblood B, Bucht G. Age dependence of tissue plasminogen activator concentrations in plasma studied by an improved enzyme linked immunosorbent assay. *Clin Chem* 1986; 32: 2160–65.
30. Verheijen JH, Chang GTG, Kluft C. Evidence for the occurrence of a fast-acting inhibitor for tissue-type plasminogen activator in human plasma. *Thromb Haemost* 1984; 51: 392–5.
31. Verheijen JH, Mullaart E, Chang GTG, Kluft C, Wijngaards G. A simple, sensitive spectrophotometric assay for extrinsic (tissue-type) plasminogen activator applicable to measurements in plasma. *Thromb Haemost* 1982; 48: 266–9.
32. Declerck PJ, Alessi MC, Verstreken M, Kruitkof EKO, Juhan-Vague I, Collen D. Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* 1988; 71: 220–5.
33. Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haematol* 1957; 17: 237–46.
34. Buckell M. The effect of citrate on euglobulin methods of estimating fibrinolytic activity. *Clin Path* 1985; 11: 403–5.
35. Šabovič M, Lijnen HR, Keber D, Collen D. Effect of retraction on the lysis of human clots with fibrin specific and non-fibrin specific plasminogen activators. *Thromb Haemost* 1989; 62: 1083–7.
36. Aznar J, Estellés A, Bretó M, España F, Alós T. Euglobulin clot lysis induced by tissue-type plasminogen activator is reduced in subjects with increased levels of lipoprotein(a). *Thromb Res* 1992; 66: 569–82.
37. Edelberg JM, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV. Lipoprotein(a) inhibits streptokinase-mediated activation of human plasminogen. *Biochemistry* 1989; 28: 2370–4.