

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**DEFICIENS HEPARIN KÖTÉST EREDMÉNYEZŐ ANTITROMBIN
RENDELLENESÉG FELISMERÉSE ÉS DIFFERENCIÁL DIAGNOSZTIKÁJA**

Dr. Kovács Bettina Erzsébet

Témavezető:

Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus



DEBRECENI EGYETEM

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2015

**DEFICIENS HEPARIN KÖTÉST EREDMÉNYEZŐ ANTITROMBIN
RENDELLENESSÉG FELISMERÉSE ÉS DIFFERENCIÁL DIAGNOSZTIKÁJA**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Kovács Bettina Erzsébet

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Trombózis, Hemosztázis és Vaszkuláris betegségek programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus

tagok:

Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora

Prof. Dr. Losonczy Hajna, kandidátus

A doktori szigorlat időpontja, helyszíne: Debreceni Egyetem ÁOK,
Gyermekgyógyászati Intézet könyvtára
2015. május 19. 12:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Ajzner Éva PhD

Dr. Pfliegler György, kandidátus

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus

tagok:

Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora

Prof. Dr. Losonczy Hajna, kandidátus

Dr. Ajzner Éva PhD

Dr. Pfliegler György, kandidátus

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2015. május 19. 14:00 óra

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az antitrombin szerkezete és fiziológiája

Az antitrombin (AT) egyláncú, 58,2 kDa molekulatömegű glikoprotein. Az érett fehérje 432 aminosavból áll és három belső diszulfid hidat tartalmaz. Az AT molekula kétféle izoformáját különböztetjük meg, melyek a glikolizáció fokában térnek el. Az α izoforma négy aszparagin reziduumon (95, 135, 155, 192) N-glikolizált, míg a β izoformában az Asn135 glikolizáció hiányzik. A keringésben nagyrészt, 90-95%-ban az α variáns fordul elő, a β izoforma csupán 5-10%-ban jelenik meg. Az AT-t a máj szintetizálja, féléletideje a keringésben 2,4 nap. Nagy affinitással képes kötődni a speciális pentaszacharid egységet tartalmazó negatív töltésű glükózaminoglikán (GAG) molekulákhoz, mint a heparin vagy a heparán szulfát. Az Asn135 glikolizációt nem tartalmazó β variáns kötődése a GAG molekulákhoz lényegesen erősebb, ezért a vaszkuláris endotelium felszínén megjelenő heparán szulfát proteoglikánok (HSPG) a β izoforma jelentős részét megkötik a keringésből az érfalakra.

Az AT a szerin proteáz inhibitorok (SERPIN) családjába tartozik, a proteáz inhibitorok azon legnagyobb családjába, amely 1500-nál is több tagot számlál. Ezek mindannyian egyláncú, 300-500 aminosavból álló globuláris szerkezetű proteinek, 30% körüli szekvencia azonossággal. A SERPIN-ek harmadlagos struktúrájukat tekintve három β -redőt (A-C) és 8-9 α -hélixet (A-I) tartalmaznak egységesen. A reaktív helyüket tartalmazó központi reaktív kacs (RK), a reactive center loop (RCL) a molekula tetején jelenik meg. A cél proteáz aktív helyével komplementer szekvenciákat tartalmaz a RCL. Minden SERPIN jelentős strukturális flexibilitással rendelkezik, ezt teszi lehetővé azt a drámai szerkezeti változást, amely a cél proteáz gátlásával jár. A szerin proteáz inhibitorokat egységesen öngyilkos inhibitorok névvel illetjük, mivel a proteáz RCL területén bekövetkező hasításával a SERPIN és a proteáz molekula között stabil kovalens kötés jön létre.

Az AT gátló hatása nevével ellentétben nem csupán a trombin molekulára korlátozódik. Polivalens SERPIN molekula, amely jelentős gátló hatást fejt ki az aktivált X faktorra (FXa). Ezen túl kevésbé kifejezetten gátolja a hemosztázisban résztvevő egyéb szerin proteázokat, így a FIXa, FXIa, FXIIa, plazmin és kallikrein molekulákat és a szöveti faktorhoz kötött FVIIa aktivitását is. Az AT un. progresszív inhibitor, mivel reakciója az aktivált koagulációs faktorokkal lassú, de heparin vagy HSPG jelenlétében a gátlás sebessége mintegy 500-szorosára gyorsul.

Az AT tipikus másodlagos és harmadlagos konfigurációval rendelkező SERPIN. Kilenc α -hélixet és három β -redőt tartalmaz, a RCL tekintetében két fő konformációs állapotban, natív és látens formában jelenik meg. A natív formában a 24 tagból álló RCL, melynek része a P1 és P1' (Arg393-Ser394) aminosavak közötti hasító hely, a molekula testén kívül helyezkedik el. Ezzel szemben a látens formában a reaktív hely, az RCL a β -redők közé ékelődik. A látens forma termodinamikai szempontból stabilabb, de a molekula a magasabb energiaszinten csapdába esik, így a keringésben elsősorban natív formában fordul elő. A röntgenkrisztallográfiás felvételeken megfigyelhető, hogy natív állapotban a P1 (Arg393) reziduum a molekula felszínén található, míg a P14-P15 reziduum a β -redő A-ba hajlik.

A P1 arginin oldallánc kölcsönhatásba kerül a molekula testével, ennek következtében a molekula szerkezete meglehetősen merev lesz, és ebben a formában igen gyenge inhibitora a célmolekuláknak, a trombinnak és az FXa-nak, illetve egyáltalán nem képes gátolni a FIXa-t. Az α -hélix D-hez kapcsolódó pentaszacharid vagy pentaszacharid egységet tartalmazó heparin a molekula szerkezetében figyelemreméltó változást hoz létre. A β -redő A-ba ágyazott RCL kiemelkedik onnan, a β -redő A harmadik szálának vége az ötödik szál közelébe rendeződik, az α -hélix D megnyúlik. Az AT és pentaszacharid alegység kötődése két lépésben történik. Első lépésben gyenge kötés alakul ki közöttük, majd ez a kötés átalakul egy igen erős, ezerszeres erősségű kapcsolattá. Ez az utóbbi konformáció szükséges az AT és FXa vagy FIXa közötti Michaelis-komplex kialakulásához. Ennek során az AT Arg393 melletti kötését a proteáz szubsztrátként ismeri fel. A trombin és AT közötti Michaelis-komplex kialakulásának mechanizmusa ettől kissé eltér. A pentaszacharid egység által létrehozott allosztérikus hatás következtében kiváltott konformáció változás közel sem elegendő és talán nem is szükséges a trombin hatékony inaktiválásához. A trombin és az AT kötődéséhez legalább 18 vagy még több cukor alegységet tartalmazó heparin molekula szükséges, ezáltal egyfajta hídképződés révén jön létre a hatékony kapcsolat a két molekula között. Miután az egyensúlyi állapotoknak megfelelően létrejött a Michaelis-komplex, bekövetkezik a tényleges reakció, az aktivált koagulációs faktorok gátlása a SERPIN működés általánosan megegyező sémája alapján. A proteolitikus folyamat első lépésében az aktivált koagulációs faktor és az AT egy acil-enzim köztes formát hoz létre észter kötés révén az AT Arg393 aminosav és a proteáz aktív helyének szerinje között, majd az ezt követően zajló proteolitikus reakció igen gyors, drasztikus és irreverzibilis konformációs változást hoz létre az AT molekulában, amely során az RCL P14-P3 szakasza a β -redő A-ba ágyazódik be. A heparin kötése ezt a reakciót gyorsítja fel ezerszeresére azáltal, hogy igen nagyfokú konformációs változást idéz elő az acil-enzim komplexben. A kovalens kötéssel csapdába ejtett, Arg393 aminosavhoz kötött

proteáz a folyamat során az AT molekula tetejéről annak aljára kerül, körülbelül 70 Å távolságra a kezdeti helyzetétől. Az AT-hoz kovalensen kötött proteáz struktúrája szétesik, katalitikus aktivitását elveszti, ezt követően már nem képes proteolitikus aktivitásra. Az AT molekula sem képes további gátló hatást kifejteni. Az AT-proteáz komplex szétválása csupán igen lassan és kismértékben detektálható.

A SERPIN-proteáz komplexek egységes útvonalon vonódnak ki a keringésből. Ezen az útvonalon távozik igen gyorsan az AT-proteáz komplex is. A komplex az alacsony denzitású lipoprotein (LDL) receptor család tagjaihoz képes kötődni, azok közül is leginkább az LDL receptorhoz hasonló proteinhez (LDL receptor-related protein), amely a máj fontos receptora. Ez a fő útvonala a SERPIN-proteáz komplexek eliminációjának.

A humán AT génje (SERPINC1) az 1q23-25 pozícióban helyezkedik el, hét exont és hat intront tartalmaz. Exonjai egy 1,4 kb méretű mRNS-t hoznak létre. Vezető szekvenciája 32 aminosavból áll, melyet az exon 1 és az exon 2 5' vége kódol. Az AT heparin kötő helyének kódolásáért az exon 2 és 3a felelős. A reaktív hely a fehérje karboxi-terminális végén található, melynek kódolásáért az exon 6 felelős.

Az AT szerepe a hemosztázis szabályozásában

Az AT a hemosztázis igen fontos szabályozó fehérjéje, teljes hiánya összeegyeztethetetlen az élettel. Az AT elsődleges funkcióját tekintve gátolja a trombin mediálta fibrinháló kialakulását és a FXa által előidézett trombin generációt. Gátolja ezen túl az intrinszik (FIXa, FXIa, FXIIa) és az extrinszik (FVIIa-szöveti faktor komplex) út több résztvevőjét. Elsősorban a trombin gátló hatásán keresztül az AT számos egyéb, nem a véralvadásra közvetlenül kifejtett hatással is rendelkezik, így befolyásolja a trombocita aggregációt, az érfal szignalizációs folyamatait, a sejt proliferációt, a citokin termelést. Az AT hatásának két fontos jellemzője, hogy gyenge inhibitora az aktivált alvadási faktoroknak, illetve hogy a fibrinhez kötött trombinnal és a trombociták felszínén aktivációs komplexben jelen lévő FXa molekulával szemben nem fejt ki gátló hatást. Az aktív alvadási faktorok kötődése az aktivált trombociták felszínéhez illetve a fibrin alvadékhoz tehát szignifikánsan módosítja az AT illetve az AT-heparin komplex gátló hatását. A trombocitákhoz vagy foszfolipid felszínhez kötött protrombináz komplexben található FXa molekulát az AT nem képes gátolni. A FVIIa a szöveti faktorral kötődve válik érzékennyé az AT gátló hatására. Ezek a tényezők azt sugallják, hogy a véralvadás folyamatában az AT és az AT-HSPG komplex fiziológiai regulációja kettős szabályozás alatt áll. A lamináris keringésben a

trombin képződését alacsony szinten tartja azáltal, hogy gátolja a kialakuló FVIIa-szöveti faktor komplexet, a FXa molekulát és egyéb más aktív alvadási faktorokat. Az alvadéktól és az aktivációs komplextől távolabbra sodródó FXa és trombin molekulákat elfogja és neutralizálja, ezzel megelőzve azt, hogy az érfal sérülésének helyétől távolabbra kiterjedjen az alvadási folyamat.

Az AT deficiencia epidemiológiája

A veleszületett AT deficiencia prevalenciáját az átlagos populációban 1:2000-1:3000 körülre becsülik. A vénás tromboembóliát (VTE) elszenvedő egyének körében a prevalencia lényegesen gyakoribb, 1:20-1:200 arányban tapasztalható. Egy összesített analízisben 1705 VTE-ban szenvedő beteg 2,4%-ban találtak AT deficienciát. Egy másik vizsgálatban megállapították, hogy a veleszületett AT deficienciát hordozó egyének 12%-ában alakult ki vénás trombózis. Összehasonlításként a trombózis incidenciája protein C (PC) deficienciában 2,8%, protein S (PS) deficienciában 3,3%.

Az EPCOT (European Prospective Cohort on Trombophilia) prospektív tanulmányban az aszimptomatikus AT, PC és PS deficienciát, és emellett faktor V (FV) Leiden mutációt hordozó egyének első VTE bekövetkezésének rizikóját vizsgálták, és megállapították, hogy AT deficiencia hordozása esetén legmagasabb a kockázat, 1,7%/év.

Az általános populáció és VTE-ban szenvedő betegek adatainak elemzésével megállapítható, hogy VTE kialakulásának relatív kockázata AT deficienciában 25-50-szeres. Általában az öröklött trombofiliák között az AT deficiencia jelenti a legmagasabb kockázatot a VTE kialakulására, ugyanakkor az AT deficiencia II HBS altípusának heterozigóta formájában a rizikó lényegesen alacsonyabb, mint egyéb altípusokban.

A tüdőembólia (TE) és a rekurrens VTE kialakulásának kockázata szintén magasabb. TE vonatkozásában a rizikó 2,4-szeres az öröklött trombofiliában nem szenvedő betegekhez képest. A rekurrens VTE éves incidenciáját egy holland vizsgálatban 10%-nak találták, egy olasz vizsgálatban 1,9-szeres rizikót állapítottak meg.

Az AT deficiencia molekuláris genetikai háttere, genotípus-fenotípus összefüggések

Az AT deficienciát Egeberg írta le 1965-ben, az első funkcionális defektust, az AT Budapest formát Sas és munkatársai közölték 1974-ben. Az International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) ajánlása alapján az AT deficienciákat kvantitatív I. típusba és kvalitatív II. típusba soroljuk. Az I. típusban az antigén koncentráció és az AT

aktivitás arányosan csökkent, amely a fehérje szintézisének vagy szekréciójának zavarára utal. A II. típust további altípusokra oszthatjuk, annak függvényében, hogy a defektus a fehérje mely funkciójának zavarát érinti, illetve milyen lokalizációban található. A reaktív hely érintettsége esetén II RS (reactive site) altípusról beszélünk, amennyiben a molekula heparin kötő képessége szenved zavart, úgy II HBS (heparin binding site) altípus jelentkezik. A harmadik formában pleiotróp hatás révén alakul ki a funkció veszteség, ez a II PE (pleiotropic effect) altípus.

A veleszületett AT deficiencia általában autoszomális domináns módon öröklődik, azonban a II HBS altípusban a nem teljes penetrancia következtében autoszomális recesszív mintázat is előfordul. Az AT deficiens betegek jelentős része heterozigóta, a mért AT aktivitása 50% körüli. A homozigóta forma az élettel összeegyeztethetetlen, kivéve a II HBS altípust, melyben előfordul homozigóta beteg is. Az AT deficiencia molekuláris háttére rendkívül heterogén. Az eddig talált mutációkat legteljesebben az Antithrombin Mutation Database és a Database of Human Gene Mutation Data (HGMD) adatbázisok tartalmazzák. A legtöbb genetikai defektus II típusú, kvalitatív deficienciát hoz létre.

A HGMD adatbázisa alapján a 215 különböző ismert mutáció több mint fele misszensz mutáció. Kis deléciók és inzerciók 20%-ban illetve 10 %-ban jelentkeznek. Előfordulnak még nonszensz mutációk és molekula érésében fontos szerepet játszó helyeket érintő mutációk. Legritkábban a teljes vagy nagy génszakaszokat érintő deléciók fordulnak elő.

Az I. típust leginkább inzerciók vagy deléciók okozzák az olvasási keret eltolódásával és stop kodon kialakulásával, ritkább a nonszensz mutáció. Mivel ennek következtében instabil mRNS vagy lerövidült AT fehérje képződik, ez az I típus fenotípusos képében jelentkezik. Nagy génszegmentek deléciója is okozhatja az I típusú deficienciát. Egyszeres nukleotid csere a SERPINC1 génben szintén előidézhethet I típusú AT hiányt, mivel a kialakuló aminosav csere következtében a fehérje érése vagy szekréciója zavart szenvedhet.

A II típus kialakulásának oka leggyakrabban misszensz mutáció. A mutáció érintheti a reaktív helyet, azon belül is két kitüntetett régiót. Egyrészt az Ala382 és Ala384 aminosavakat, másrészt a Gly392 (AT Stockholm), Arg393 és Ser394 reziduumokat. A legtöbb misszensz mutáció, mely a II HBS altípust idézi elő, a Pro41 (AT Basel), az Arg47 (AT Padua I.), a Leu99 (AT Budapest 3) és az Arg129 aminosavakat érinti. Az AT Budapest 3 (p.Leu99Phe) előfordulása dél-kelet európai eredetűnek tűnik, ezzel alapító hatás gyanúját keltve. A II PE altípus megjelenése esetén a 402, 404-407, 429 reziduumok érintettek leggyakrabban. Ez a régió felelős az AT molekula strukturális és funkcionális integritásáért.

Az I típusú AT deficiencia homozigóta formája az étellel összeegyeztethetetlen, heterozigóta formában korai életkorban szenvedheti el a beteg a súlyos trombózist. Ugyanez a klinikai kép a II RS és II PE formákban is, a heterozigóta p.Ala384Ser (AT Cambridge II) mutáció kivételével, amely kevésbé súlyos klinikai képet mutat és homozigóta formában is előfordul. Egyesek ezt a formát inkább polimorfizmusként fogják fel. A II HBS altípusban a többi altípussal összehasonlítva a trombózis rizikója alacsonyabb, azonban a II HBS homozigóta formájában a trombózis igen korai életkorban jelentkezik és súlyosságát tekintve hasonló a heterozigóta I típus vagy az egyéb II altípusokban kialakuló klinikai képhez.

A tüneteket okozó AT deficienciákban a TE és/vagy DVT gyakran ismétlődik, a DVT szokatlan helyeken, mint a felső végtag, mezenterialis, renalis, portális, retinális vagy cerebrális vénákban is kialakulhat. Beszámoltak intrakardiális artériás trombózisról. Az AT deficienciát hordozó gravidák trombózis kockázata is jelentősen emelkedett. I típusú deficienciában a becsült rizikó 1:2,8, amely így körülbelül 350-szer magasabb, mint a graviditás okozta rizikó önmagában. Az artériás trombózisok gyakoribb előfordulását is jelezték több vizsgálatban AT deficiens betegekben.

Szerzett AT deficienciák

Terminusra született, egészséges újszülöttek AT koncentrációja a felnőttek értékének 51-75%-a. A máj súlyos éretlensége, koraszülött állapot esetén az AT koncentráció alacsonyabb, mint érett újszülöttekben. Az AT koncentráció 1 éves korra éri a felnőttekére jellemző szintet.

Májbetegségekben a hepatikus funkció károsodása a csökkent AT képzést vonja maga után. Nefrózis szindróma vagy egyéb renális vagy enterális fehérjevesztő állapotok szintén alacsony AT koncentrációhoz vezetnek a felgyorsult elimináció következtében. Az alacsony AT koncentráció a fehérje konszumpciójának, felhasználódásának következménye is lehet, így szeptikus állapotokban, disszeminált intravaszkuláris koagulációban, kiterjedt tromboembóliában, trombotikus mikroangiopátiákban, transzfúzió okozta akut hemolitikus állapotban, malignus betegségekben is csökkent a szintje. A szerzett AT deficienciák egy részében, így például májelégtelenségben az alacsonyabb szinten regulált hemosztázis (véralvadási faktorok szintjének csökkenése) miatt a véralvadás trombotikus irányú eltolódása csak esetenként fordul elő.

Gyógyszeres terápia is indukálhat AT szint csökkenést. Ismert az antikoncipiensek és az ösztrogén terápia AT csökkentő hatása. A hosszú ideig adagolt nem frakcionált heparin (UFH) az AT mérsékelt csökkenését okozza, mivel a trombin-AT komplexek képződése a

plazmában jelentősen fokozódik. Az L-aszparagináz terápia szintén az AT szint csökkenésével jár, mert a fehérje megreked intracellulárisan a májsejtek endoplazmatikus retikulumában.

Az AT deficienciák laboratóriumi diagnosztikája

Az AT deficienciák diagnosztikájának első lépése a keringésben az AT koncentráció csökkenése vagy funkcióképtelen molekula kimutatása. Emiatt első vonalbeli tesztként funkcionális vizsgálatot célszerű végezni. A korábban használt alvadási tesztek hígított szérum vagy defibrinált plazma trombinra kifejtett hatását mérték. E rendszerben a trombin fibrinogént alvasztó hatását használták detektáló rendszernek (alvadási teszt). Ez a módszer azonban igen nehézkes, pontatlan, nem automatizálható, a rutin felhasználásra alkalmatlan.

Ma a kromogén (amidolitikus) módszerek terjedtek el a gyakorlatban, amelyek az AT trombinra vagy FXa-ra kifejtett gátlásán alapulnak. A reakció során trombin/FXa specifikus tri- vagy tetrapeptid szubsztrátot alkalmazunk, mely megfelel az AT P1-P3 illetve P1-P4 szekvenciájának, így természetes szubsztrátként szolgál a két aktivált alvadási faktor számára. A peptidok, melyek a trombin, illetve az FXa a szubsztrátjai C-terminális végükön paranitroanlin (pNA) vagy 5-amino-2-nitrobenzoesav (ANBA) csoportot hordoznak. A reakció során a trombin/FXa lehasítja a pNA vagy ANBA csoportot, ezek szabad állapotban színes termékek 405 nm-en spektrofotometriásan mérhetőek.

Heparin jelenlétében a reakció igen gyorsan játszódik le, ez a heparin kofaktor (hc) AT aktivitás. A gátlás heparin hiányában lassabban történik, ez az úgynevezett progresszív (p) AT aktivitás. Mivel a hc AT aktivitás az AT deficienciák mindegyik altípusában csökkent, így alkalmas azok diagnosztizálására. A reakció során a hígított plazmához trombin/FXa-t adunk, olyan mennyiségben, hogy az a plazmában lévő AT-hoz viszonyítva feleslegben legyen. Az AT-trombin/FXa komplex kialakulása után megmaradt szabad trombin/FXa aktivitása fordítottan arányos a plazma AT aktivitásával. Mindezek következtében a kromogén szubsztrátból lehasadó, 405 nm-en fotometrálnálható pNA/ANBA mennyisége is fordítottan arányos a plazma AT aktivitásával. Az abszorbancia változás megfelelő kalibrációs görbe alkalmazásával kinetikus és végpontos módszerrel egyaránt alkalmas az AT funkcionális aktivitásának mérésére. A kereskedelmi forgalomban elérhető kalibrátorok bevizsgálásához rendelkezésre áll a gyártók számára WHO nemzetközi standard (International Standard Antithrombin, Plasma, NIBSC; Potters Bar, UK).

Korábban a trombin gátlásán alapuló tesztekben humán trombin használtak. A humán trombin reakcióba lép a heparin kofaktor II-vel, ezáltal ezek a tesztek kevésbé voltak

érzékenyek az AT deficienciára. A manapság kereskedelemben forgalmazott tesztek már nem humán, hanem szarvasmarha eredetű trombint tartalmaznak, amely kevésbé lép reakcióba a heparin kofaktor II-vel. A FXa egyáltalán nem reagál ezzel a gátló fehérjével. Az AT deficienciák klasszifikációjához szükséges az antigén meghatározása is. Korábban ennek kivitelezése elektro-immundiffúziós és radiál-immundiffúziós technikával történt. Mindkettő időigényes és nem túl pontos technika, ezért alkalmazásuk a gyakorlatban nem terjedt el. Manapság a latex-szel érzékenyített immunonefelometriás módszer a legelterjedtebb az AT antigén koncentrációjának meghatározására.

Az AT aktivitás és antigén referencia tartományának Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; Wayne, PA, USA) C28-A3 irányelve szerinti meghatározása eddig nem történt meg. Az irodalomban és a forgalmazók használati utasításában kissé eltérő „normál” tartományok találhatók. A legtöbb laboratórium alsó limitként a 80% aktivitást (0,8 IU/ml) fogadja el. Eddigi ismereteink szerint az emelkedett AT aktivitásnak nincs klinikai relevanciája.

Az AT aktivitás és koncentráció meghatározása akut trombotikus eseményt követő három hónapon belül nem ajánlott. Ezen időszak alatt a referencia tartományon belül mért értékek az AT deficienciát kizárhatják, azonban referencia tartomány alatti értékek nem bizonyítanak AT deficienciát.

Sokszor szükséges antikoagulált betegek AT szintjének meghatározása. K vitamin antagonisták, így a warfarin és az acenokumarol szedése során az AT szintje némileg emelkedhet, míg a nem frakcionált heparin csökkenti annak koncentrációját. A kis molekulású heparin (LMWH) nincs hatással az AT szintre. Emiatt a tartós antikoagulálásra szoruló betegek AT deficienciájának kizárása orális antikoaguláns terápia alatt nem ajánlott, illetve UFH alkalmazása alatt az AT deficiencia nem erősíthető meg. Elfogadható kompromisszum a betegek átállítása LMWH terápiára a vérvételt megelőző 10 napon át.

CÉLKITŰZÉS

1. Az AT deficiencia diagnosztikájában kétféle szűrőtesztet, az anti-FIIa és hc-anti-FXa tesztet alkalmaznak. A kétféle szűrőteszt alkalmazását az egyes AT deficiencia altípusok felismerésére eddig még nem vizsgálták. Bennünket különösen érdekelt, hogy a II HBS altípust milyen hatékonysággal ismerik fel a szűrőtesztek, tekintettel arra, hogy az általunk vizsgált kelet-magyarországi populációban messze ez a leggyakoribb AT deficiencia. Ennek eldöntésére egy anti-FIIa és két hc-anti-FXa teszt diagnosztikai hatékonyságának a vizsgálatát tűztük ki célul molekuláris genetikai vizsgálatokkal bizonyított homozigóta és heterozigóta II HBS típusú AT deficiens betegek plazma mintáin.
2. A II-es típusú AT deficienciák differenciál diagnosztikájában II HBS típus diagnózisa elvileg a hc-anti-FXa és p-anti-FXa AT aktivitás meghatározás eltérő eredményein alapulhat. Ezen altípusban a heparin kofaktor aktivitás csökken, míg a p aktivitás normál marad. Mindaddig azonban nem rendelkezünk jól reprodukálható automatizálható p-anti-FXa meghatározáson alapuló módszerrel. Ezért célul tűztük ki olyan anti-FXa módszer kidolgozását és evaluálását, mely kis módosítással mind a hc-anti-FXa, mind a p-anti-FXa aktivitás mérésére alkalmas. Terveztük továbbá a nemzetközi standardoknak megfelelő referencia tartomány megállapítását a két módszerre.
3. További célunk volt a kidolgozott hc-anti-FXa és p-anti-FXa meghatározások II HBS típust felismerő diagnosztikai hatékonyságának tesztelése molekuláris genetikai vizsgálatokkal bizonyított AT deficiens betegek plazma mintáin. Amennyiben a p-anti-FXa módszer hatékonynak bizonyul, terveztük annak beillesztését egy, az AT deficiencia diagnózisára és klasszifikációjára kialakítandó diagnosztikai algoritmusba.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgált referencia populáció

A referencia populációba 188 egészséges, 18 éves életkort betöltött önkéntest választottunk. Az önkéntesek egészségi állapotát kérdőíves vizsgálattal mértük fel. Az akut betegségben szenvedőket és a korábban artériás vagy vénás trombózison átesetteket a vizsgálatból kizártuk. Előzetes kizárási kritériumként szerepelt a gyógyszeresedés is, kivéve a hipertónia kezelésére használt gyógyszereket. A referencia populációból kizártuk az orális antikoncepciót szedő vagy egyéb hormonpótló terápiában részesülő nőket is. A vizsgálatban végül 104 nő és 84 férfi vett részt, átlagos életkoruk 34 év volt, az interkvartilis tartomány 26-41 év közé esett.

A vizsgált betegpopuláció

A hc-anti-FXa és hc-anti-FIIa tesztek összehasonlításának vizsgálatába 37 beteget vontunk be, 9 beteg II HBS homozigóta, 20 beteg II HBS heterozigóta, 1 beteg II PE, 7 beteg I típusú AT deficienciában szenvedett. A hc-anti-FXa és p-anti-FXa teszt diagnosztikai hatékonyságának tesztelése során 78 beteg mintáit dolgoztuk fel. 18 beteg II HBS homozigóta, 51 beteg II HBS heterozigóta, 1 beteg II PE, 8 beteg I típusú AT deficiens volt. A vizsgálatba bevontunk a betegek elsőfokú rokonai közül 24 egészséges egyént is. A mutáció jelenlétét, illetve hiányát minden esetben intézetünk Molekuláris Genetikai Laboratóriumában fluoreszcens DNS szekvenálással bizonyítottuk.

A kutatás a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottságának és a Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Kórház és Egyetemi Oktatókórház Intézményi Kutatás Etikai Bizottságának jóváhagyásával történt. A vizsgálat teljes mértékben megfelel a Helsinki Deklaráció Etikai elveinek, minden önkéntes résztvevő írásos és szóbeli tájékoztatást követően írásos beleegyezését adta a vizsgálatban való részvételhez.

Mintagyűjtés

A vérvétel éhgyomorral történt a könyökhajlati vénából 0,105 M-os trinátrium-citrát tartalmú csőbe (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Ezt követően a plazmát kétszeri centrifugálással (1500 g, 15 perc, 23 °C) leválasztottuk, majd felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

Az AT aktivitás meghatározása

Az AT meghatározások általános módszertana alapján a mérendő plazmában lévő AT a feleslegben hozzáadott trombin/FXa-t aktivitásával arányosan gátolja. A maradék trombin/FXa a reakcióelegyhez adott specifikus szubsztrátról mennyiségével arányos koncentrációjú színes terméket hasít le. A spektrofotometriás módszerrel mérhető színes termék mennyisége fordítottan arányos a plazma AT aktivitásával.

Trombin alapú heparin kofaktor aktivitás meghatározás

A trombin alapú heparin kofaktor aktivitást Dade Behring Berichrom antitrombin III teszttel (Siemens Healthcare, Marburg, Germany) Dade Behring BCS koagulométeren (Siemens Healthcare, Marburg, Germany) végeztük. A teszt szarvasmarha eredetű trombin és Tos-Gly-Pro-Arg-5-amino-2-nitrobenzoesav izopropilamid szubsztrátot tartalmaz.

Eljárás:

1. 6-szoros plazmahígítás készítése
2. 20 μ l hígított plazma
3. 20 μ l fiziológias NaCl
4. 180 μ l trombin reagens
5. Inkubáció 3 percig
6. 30 μ l szubsztrát reagens
7. mérés 85 másodpercig 405 nm-en

A kapott $\Delta A/\text{min}$ értékből a kalibrációs görbe alapján számítható a plazma AT aktivitása.

Az öt pontos kalibrációs görbét Standard Human Plasma (Siemens Healthcare, Marburg, Németország) sorozat hígításaiból készítettük el 0-125%-os AT aktivitás tartományban.

FXa alapú heparin kofaktor aktivitás meghatározás

Kétféle tesztet használtunk vizsgálataink során. Az egyik hc-anti-FXa méréssorozat az Innovance Antithrombin kittel (Siemens Healthcare, Marburg, Németország) BCS koagulométeren (Siemens Healthcare, Marburg, Németország) végeztük (hc-anti-FXa1). A teszt humán eredetű FXa-t és benziloxi-karbonil-D-Leu-Gly-Arg-ANBA-metilamid-acetát szubsztrátot tartalmaz.

Eljárás:

1. 30 μ l Tris-HCl pH 8,0 puffer

2. 10 μ l 4-szeresre előhígított plazma
3. 80 μ l 1,0 U/mL FXa-t és 1,5 IU/mL heparint tartalmazó reagens
4. Inkubáció 3 percig
5. 80 μ l 2,4 mM szubsztrát oldat
6. mérés 60 másodpercig 405 nm-en

A kapott $\Delta A/\text{min}$ értékből a kalibrációs görbe alapján számítható a plazma AT aktivitása.

A második tesztként a saját fejlesztésű Antitrombin H+P (Labexpert, Debrecen, Magyarország) kittel végeztük a méréseket (hc-anti-FXa2). A kifejlesztett eljárás mind a heparin kofaktor mind a progresszív antitrombin aktivitás meghatározására alkalmas. A módszer kifejlesztését és levizsgálását az eredmények fejezetben írjuk le részletesen, itt csak a már rutinszerűen alkalmazott módszert adjuk meg.

A teszt szarvasmarha eredetű FXa-t (Enzyme Research Laboratories, Swansea, Egyesült Királyság) és CS-11(32) szukcinil-Ile-Glu(γ PIP)-Gly-Arg-pNA HCl szubsztrátot (HYPHEN, BioMed, Neuville, Franciaország) tartalmazott. A heparint a Sigma-Aldrich cégtől (St Louis, MO, USA) szereztük be.

Eljárás:

1. 10 μ l 1 U/mL heparint tartalmazó hígító pufferrel 10-szeresre előhígított plazma
2. 40 μ l 1 U/mL heparint tartalmazó hígító puffer
3. 50 μ l 12 nkat/mL FXa hígító pufferben oldva
4. Inkubáció 1 percig
5. 50 μ l 1,25 mg/mL-es szubsztrát oldat
6. mérés 60 másodpercig 405 nm-en

A kapott $\Delta A/\text{min}$ értékből a kalibrációs görbe alapján számítható a plazma AT aktivitása.

A hígító puffer összetétele: 50 mM Tris-HCl, 175 mM NaCl, 7,5 mM EDTA pH 8,4.

A vizsgálatok első részében, amikor a trombin és FXa alapú teszteket hasonlítottuk össze az hc-anti-FXa AT meghatározások kalibrálásához a World Health Organization AT reference plasma-t (National Institute for Biological Standards and Control, Potter Bar, Egyesült Királyság) használtuk. Amikor a heparin kofaktor anti-FXa (hc-anti-FXa) és a progresszív anti-FXa (p-anti-FXa) meghatározások párhuzamos kalibrációjára volt szükség a referencia intervallum megállapításához szükséges 188 plazma értékeit használtuk fel a HemosIL Calibration plasma (Instrumentation Laboratory, Milan, Olaszország) rekálibrációjához. A

cég által megadott hc-anti-FXa érték csak 2%-kal tért el a referencia populáció segítségével megállapított kalibrációs értéktől.

Progresszív antitrombin aktivitás meghatározása

Az általunk kifejlesztett p-anti-FXa AT teszt ugyanazon az elven alapul, mint a hc-anti-FXa AT teszt, de kisebb plazma hígítást, hosszabb inkubációs időt alkalmazunk. A mérőrendszer nem tartalmaz heparint, helyette heparin antagonistá polibrént (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) használunk.

Eljárás:

1. 10 µl plazma
2. 40 µl 10 µg/mL polibrént tartalmazó hígító puffer
3. 50 µl 12 nkat/mL FXa hígító pufferben oldva
4. Inkubáció 5 percig
5. 50 µl 1,25 mg/mL-es szubsztrát oldat
6. mérés 60 másodpercig 405 nm-en

A kapott $\Delta A/\text{min}$ értékből a kalibrációs görbe alapján számítható a plazma AT aktivitása.

A referencia populáció átlagos p-anti-FXa aktivitását 100%-nak tekintve megállapítottuk a HemosIL Calibration plasma (Instrumentation Laboratory, Milan, Olaszország) p-anti-FXa aktivitását és ezt használtuk fel a kalibrációs görbe elkészítésénél.

AT antigén meghatározása

Az AT antigént immunonefelometriás módszerrel határoztuk meg a BN ProSpec[®] System AT-III (Siemens Healthcare, Marburg, Németország) tesztjével.

Módszer evaluálás

Kereskedelmi forgalomban hozzáférhető HemosIL[™] Normal Control és Low Abnormal Control plazmák (Instrumentation Laboratory, Milano, Olaszország) felhasználásával meghatároztuk a kifejlesztett hc-anti-FXa és p-anti-FXa tesztek reprodukálhatóságát. A vizsgálatot a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; Wayne, PA, USA) EP15-A2 protokollja alapján végeztük. 20 napon keresztül naponta egyszer duplikátumban mértük a két különböző aktivitású kontrollt.

Meghatároztuk a hemoglobin, bilirubin és lipémia okozta interferenciákat a CLSI C56-A protokollja alapján. A mintákhoz ismert hemoglobin koncentrációjú sejtlizátumot,

DMSO-ban oldott bilirubint (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és Intralipidet (Baxter, Deerfield Park, IL, USA) adtunk és sorozathígítások vizsgálatával meghatároztuk azok interferenciáját.

Meghatároztuk a plazma jelentősebb, nem AT eredetű p-anti-FXa aktivitását. Ehhez AT deficiens plazmát (Enzyme Research Laboratories, Swansea, Egyesült Királyság) használtunk. Ismert, hogy az α_1 -antitripszin és az α_2 -makroglobulin heparintól független anti-FXa aktivitással bír, ezért tisztított α_1 -antitripszin és α_2 -makroglobulin (mindkettő Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) anti-FXa aktivitását is megmértük.

A referencia tartományokat a CLSI EP28-A3c protokollja szerint határoztuk meg, a parametrikus és nem parametrikus módszerrel kapott eredményeket egyaránt megadtuk.

Statisztikai analízis

A statisztikai vizsgálatokat és számításokat GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) 5.0a és SPSS v16a (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) szoftverrel végeztük. A referencia populáció eredményeinek eloszlását megvizsgáltuk Lilliefors szerint korrigált Kolmogorov-Smirnov és Shapiro-Wilk tesztekkel. A populáció elemzésére átlag, medián, szórás (standard deviáció; SD), interkvartilis tartomány (IQR) és teljes tartomány értékeket határoztunk meg. A betegek alcsoportjai közötti különbségek elemzésére Student-féle t-próbát alkalmaztunk.

EREDMÉNYEK

Anti-FIIa és hc-anti-FXa heparin kofaktor AT aktivitás összehasonlítása AT deficiens betegpopuláción

A két különböző hc-anti-FXa teszt (hc-anti-FXa1: Siemens; hc-anti-FXa2: Labexpert) gyakorlatilag megegyező eredményeket adott minden AT deficiens beteg esetében. Az anti-FIIa és az hc-anti-FXa tesztek eredményei I típusú deficienciában és az egyetlen II PE altípusban szintén nem mutattak szignifikáns eltérést. Minden, ezekbe a betegcsoportokba tartozó beteg AT aktivitása a referencia tartomány alsó határaként elfogadott 80%-os limit alá esett. Ezzel szemben a II HBS heterozigóta csoportban egyetlen kivételtől eltekintve az anti-FIIa teszt eredménye a referencia tartományba esett (76-128%), ugyanakkor a hc-anti-FXa aktivitás minden esetben a referencia tartomány alatt volt (hc-anti-FXa1: 55-73%, hc-anti-FXa2: 46-74%). A II HBS homozigóta betegcsoportban egy kivétellel az anti-FIIa eredménye a referencia tartomány alatt volt (48-80%). Ezek a betegek egyöntetűen p.Leu99Phe mutációt hordoztak. A II HBS homozigóta csoportban az hc-anti-FXa tesztek eredménye lényegesen alacsonyabb volt, 13-25% között hc-anti-FXa1 estében, illetve 9-23% között hc-anti-FXa2 kittel mérve. Az antigén szintek e csoportban a referencia tartomány alsó negyedében, vagy kissé alatta voltak. Az hc-anti-FXa tesztek eredményei a II HBS heterozigóta és homozigóta csoportokat világosan elkülönítik.

Kromogén p-anti-FXa teszt fejlesztése

A hc- és a p-anti-FXa aktivitás mérése több pontban eltér egymástól. Utóbbi esetben a reakció elegyhez hozzáadott heparint neutralizáló polibrén lehetővé teszi a heparinnal kezelt betegek p-anti-FXa aktivitásának mérését, illetve az esetleges heparin szennyeződést is közömbösíti. Heparin hiányában az FXa gátlása az AT által lassú, így aztán az inkubációs időt meghosszabbítottuk és a plazma hígítás mértékét lecsökkentettük annak céljából, hogy jól mérhetővé tegyük az aktivitást. A végső beállításokat ötszörös plazmahígításban és 300 másodperc inkubációs időben határoztuk meg. Így összességében a hc-anti-FXa aktivitás méréséhez képest az eredeti plazmahígítást tizedére csökkentettük, az inkubációs időt ezzel szemben ötszörösére növeltük. A változtatásokkal elértük, hogy normál és csökkent AT tartalmú plazma által az FXa-ra kifejtett gátló hatás heparin hiányában is jól mérhetővé vált. A meghatározott kísérleti körülmények között elvégeztük a kalibrációs sorozat mérését 0-125%-os tartományban.

A p-anti-FXa teszt evaluációja

A teszt reprodukálhatósága kiváló, még a laboratóriumon belüli pontosság is 4% alatt marad. A hc-anti-FXa teszt vizsgálatok során hasonlóan jó eredményeket kaptunk, a patológiás és normál kontroll esetében laboratóriumon pontossága 4,47%, ill. 1,86% volt.

Az interferencia vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a hemoglobin 500 mg/L-ig, a bilirubin 200 μ mol/L-ig és a triglicerid 10 mmol/L-ig nem zavarja a meghatározást.

Az AT hiányplazmában hc-anti-FXa aktivitása nem volt mérhető. Ezzel szemben a p-anti-FXa aktivitás a referencia populáció átlag értékéhez viszonyítva 20,4% aktivitást mutatott. Meghatároztuk tisztított, a plazmakoncentrációnak megfelelő α_1 -antitripszin és az α_2 -makroglobulin FXa-t gátló hatását. 2,0 mg/mL α_1 -antitripszin átlagosan a referencia populáció eredményeihez viszonyítva 9,5%-os, ugyanilyen koncentrációjú α_2 -makroglobulin pedig 4,0%-os gátló aktivitást mutatott.

hc- és p-anti-FXa aktivitás referencia tartományának meghatározása

Mindkét aktivitás a referencia populációban Lilliefors szerint korrigált Kolmogorov-Smirnov (hc-anti-FXa d:0,043, p:0,2; p-anti-FXa d:0,058, p:0,2) és Shapiro-Wilk (hc-anti-FXa d:0,994, p:0,634; p-anti-FXa d:0,989, p:0,154) teszttel is normál eloszlást mutatott. Kieső értékek nem voltak.

A hc-anti-FXa referencia tartománya parametrikus módszerrel 82-118%, nem parametrikus módszerrel 81-117%. A p-anti-FXa aktivitás parametrikus módszerrel 82-118%, nem parametrikus módszerrel 84-117%.

AT deficienciában szenvedő betegek antigén koncentrációjának, hc- és p-anti-FXa aktivitásának összehasonlítása

A vizsgált betegpopuláció jelentős hányada II HBS típusú deficienciában szenved, amelyet nagyrészt a p.Leu99Phe (AT Budapest 3) mutáció idéz elő. Magyarországon ez a II HBS típusú deficienciában szenvedő betegek domináns mutációja. Intézetünkben 2010-2013 között diagnosztizált AT deficiens betegek 81%-a II HBS deficienciában szenvedett, melyet 88%-ban a p.Leu99Phe mutáció okozott. A munkánk során így megvizsgált populációban 18 homozigóta és 43 heterozigóta p.Leu99Phe mutációt hordozó beteget találtunk, míg 3 beteg heterozigóta volt a p.Pro41Leu (AT Basel) és 5 beteg a p.Arg47His (AT Padua) mutációra nézve, amelyek szintén II HBS típusú deficienciát idéznek elő.

A homozigóta p.Leu99Pro mutációt hordozó homozigóta betegek hc-anti-FXa aktivitása igen alacsony (átlag: 13,1%, medián: 12%, teljes tartomány: 8-26%). Ezzel

szemben a p-anti-FXa aktivitásuk lényeges magasabb, átfedést mutat a referencia tartománnyal (átlag: 78,4%, medián: 77%, teljes tartomány: 64-106%). Az AT antigén koncentrációja megfelel a p-anti-FXa aktivitás eredményeinek (átlag: 76,4%, medián: 79%, teljes tartomány: 51-98%). A II HBS típusú homozigóta betegcsoportban mind a p-anti-FXa aktivitás, mind az antigén koncentráció kissé alacsonyabb, mint a referencia populációban, ami arra enged következtetni, hogy a molekula heparin kötési zavara mellett némileg befolyásolt a fehérje szintézise vagy szekréciója is.

A p.Leu99Phe heterozigóta státuszban a hc-anti-FXa aktivitás a heterozigóta állapotban megfelelő mértékben csökkent (átlag: 50,8%, medián: 51%, teljes tartomány: 34-65%), míg a p-anti-FXa aktivitás csak némi jelzett csökkenést mutat (átlag: 90,5%, medián: 90%, teljes tartomány: 66-111%). Ugyanakkor a hc- és p-anti-FXa aktivitás között átfedés nincs. Ebben a csoportban az antigén koncentráció átlaga és medián értéke 99% (teljes tartomány: 78-118%). A II HBS deficienciában szenvedő, egyéb mutációt hordozó betegek száma túl alacsony a statisztikai következtetések levonásához. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy ebben a kombinált csoportban, melyben p.Pro41Leu és p.Arg47His heterozigóta betegeket találunk, a hc-anti-FXa aktivitás a heterozigóta státusznak megfelelően a referencia tartomány alatt található, míg a p-anti-FXa aktivitás a referencia tartományon belül vagy a fölött van az AT antigén koncentrációhoz hasonlóan.

Az I típusú AT deficienciában szenvedő 8 beteg, illetve az egyetlen II PE típusú AT deficiens beteg anti-FXa aktivitási eredményei a referencia tartomány alá esnek csakúgy, mint I típus esetében az antigén koncentrációk értékei.

A p-anti-FXa/hc-anti-FXa hányados szerepe a II HBS típusú AT deficienciák diagnosztizálásában

A fenti eredmények azt sugallják, hogy a hc- és p-anti-FXa aktivitások összehasonlítása hatékony eszköz lehet a II HBS altípusú AT deficiencia diagnosztikájában.

A II HBS heterozigóta betegcsoportban a p/hc anti-FXa aktivitások hányadosainak értéke (átlag: 1,78, medián: 1,74, teljes tartomány: 1,54-2,21) az egészséges populáció adataiból számított referencia intervallum (0,87-1,14) felső határértéke felett van. A heterozigóta csoport egyértelműen elkülöníthető az egészséges, vad típusú rokonoktól is (átlag és medián: 1,03, teljes tartomány: 0,92-1,09).

A homozigóta II HBS betegcsoport p/hc anti-FXa aktivitásokból számított hányadosai nagyon magasak (átlag: 6,76, medián: 6,57, teljes tartomány: 3,23-9,63), lényegesen magasabbak, mint a heterozigótákra jellemző értékek.

Az I típusú AT deficienciában szenvedő betegek p-anti-FXa aktivitásai rendre magasabbak, mint a hc-anti-FXa aktivitásaik. Emiatt az aktivitási értékekből kapott hányados is kissé magasabb (átlag: 1,24, medián: 1,21, teljes tartomány: 1,16-1,35), mint az a referencia populációban illetve az egészséges rokonok körében tapasztalt, így megállapítható, hogy az I. típusú AT deficiens betegek p- és hc-anti-FXa aktivitásaiból számított hányados a referencia tartomány felső határértéke felett található.

Diagnosztikai algoritmus AT deficienciában

Eredményeink és az irodalom alapján megalkottunk egy algoritmust az AT deficienciák laboratóriumi diagnózisára és klasszifikálására. A 80% felett mért hc-anti-FXa aktivitás kizárja az AT deficienciát. A 80% alatt mért aktivitás esetén a szerzett okokat gondosan ki kell zárni és a vizsgálatot meg kell ismételni. Ismételten 80% alatti eredmény esetén további vizsgálat szükséges. Ismételten 70-80%-os aktivitás esetén a diagnózis biztonsággal csak molekuláris genetikai vizsgálattal állapítható meg. <70% esetén az AT deficiencia diagnózisa biztos. Ezt követően AT antigén meghatározással lehet elkülöníteni az I-es és II-es típusú deficienciát. II-es típusú deficiencia esetén p-anti-FXa meghatározást végzünk. Csökkent érték esetén a II RS és II PE típusok molekuláris genetikai vizsgálattal különítendőek el. Normál p-anti-FXa aktivitás ez esetben II HBS típust bizonyít, különösen emelkedett p/hc anti-FXa arány esetén.

MEGBESZÉLÉS

A II HBS altípus klinikai fenotípusa lényegesen eltér az I típusú és az egyéb II altípusú AT deficienciák klinikai megjelenésétől. A heterozigóta II HBS altípusú AT deficiencia mérsékelt súlyosságú trombózis hajlammal jár, hasonlóan a heterozigóta FV Leiden mutációhoz. Az altípus homozigóta formája az étellel összeegyeztethető, ugyanakkor súlyos, korai életkorban kialakuló, esetenként csecsemőkori trombózissal jár. A II HBS altípus differenciálása a többi típustól, azon belül a homozigóta és heterozigóta állapot elkülönítése jelentős klinikai relevanciával bír. Érdekes, hogy a II HBS AT deficiencia (elsősorban az AT Budapest 3) csak Magyarországon gyakori, egy-egy új esetet ma is leírásra érdemesnek tartanak. Tapasztalataink szerint a környező országokban (Szerbia, Horvátország, Ausztria) az európai átlagnál valamivel nagyobb számban fordul elő, ez azonban összefügghet a külhoni magyar etnikummal.

Az öröklött AT deficiencia diagnosztizálása laboratóriumi módszert igényel. Elsőként választandó a kromogén funkcionális heparin kofaktor AT teszt. A kereskedelmi forgalomban számos különböző AT teszt hozzáférhető. A tesztek alapvetően két típusra oszthatók aszerint, hogy az aktivitás méréséhez az AT molekula két fő célnzime, a trombin vagy az FXa közül melyik gátlását vizsgálják. Az AT-FIIa illetve az AT-FXa komplexek kialakulása eltér egymástól. Míg a FXa molekula esetében a pentaszacharid kötődése által kiváltott allosztérikus hatás szükséges az AT molekula inhibitor aktivitásának jelentős fokozásához, addig a trombin inaktiválásához ez az allosztérikus változás nem feltétlenül szükséges, esetleg nem is kívánatos. Ugyanakkor szükséges a legalább 18 cukoralegységet tartalmazó heparin molekula, mely mind a trombinhoz, mind az AT-hez kötődve hídképzéssel lehetőséget teremt a két molekula összekapcsolódására, ezáltal elősegítve a trombin inaktivációját. Ez lehet az oka annak, hogy a heparin kötőhelyet érintő mutáció hatása sokkal inkább befolyásolja a heparin jelenlétében elvégzett hc-anti-FXa tesztet, mint az anti-FIIa tesztet.

Vizsgálatainkban elvégeztük a kétféle típusú tesztet öröklött AT deficienciában szenvedő betegeken. A tesztek között lényeges eltérés a plazmahígítás fokában és az inkubációs időkből nem volt. Eredményeink azt mutatták, hogy az anti-FIIa eljárást alkalmazó teszt a heterozigóta II HBS deficiencia felismerésére általában nem képes, de esetenként még a homozigóta formát sem diagnosztizálhatja. Ezzel szemben a hc-anti-FXa eljárással a heterozigóták is diagnosztizálhatók. Ennek alapján olyan populációkban, ahol a II HBS típusú mutációk gyakoriak, így Magyarországon és feltehetőleg néhány szomszédos országban is, az AT deficiencia szűrőtesztjeként a hc-anti-FXa eljárás ajánlott. Az AT

deficienciát okozó mutációk spektruma országonként lényegesen eltérő lehet. A brit és spanyol populációban leggyakrabban a mérsékelt trombofilia kockázatot jelentő p.Ala384Ser (Cambridge II) mutáció fordul elő, ami inkább polimorfizmusnak tekinthető. Ennek diagnosztikájára a hc-anti-FXa eljárásnál talán szenzitívebb az anti-FIIa teszt, de a mutációs fenotípus kimutatásához még ez sem elég érzékeny, megbízható kimutatása molekuláris biológiai módszerektől várható.

A heparin kötőhelyet érintő mutációnak nincs hatása a p-anti-FXa és anti-FIIa funkciókra. Heparin hiányában végzett kromogén anti-FXa teszt használhatóságát a II HBS deficiencia diagnosztikájában említik az irodalomban, azonban megfelelően evaluált tesztet még nem közöltek. Egyes kereskedelmi forgalomban hozzáférhető tesztek a használati utasításban említik a p-anti-FXa aktivitás mérésének lehetőségét, de nem adnak iránymutatást annak kivitelezésére.

Az általunk fejlesztett hc-anti-FXa aktivitást mérő tesztet módosítással alkalmassá tettük a p-anti-FXa aktivitás meghatározására. A változtatásokkal lehetővé tettük, hogy egymást követően meghatározható legyen a hc-, majd annak csökkenése esetén a p-anti-FXa aktivitás. Az eredetileg a hc-anti-FXa aktivitás meghatározásához elegendő 60 másodperces inkubációs időt megnöveltük az ötszörösére. Ez az időtartam elegendő az AT progresszív aktivitásának kifejtéséhez. Ezzel párhuzamosan tízszeresére növeltük a reakcióelegyben az AT koncentrációt. A plazmahígításhoz használt pufferben a heparint heparin antagonistá polibrénnel helyettesítettük. Mind a hc-anti-FXa, mind a p-anti-FXa teszt reprodukálhatósága kiváló. A hemoglobin, bilirubin és triglicerid magasabb koncentrációban sem zavarja a meghatározást. A módszert Siemens BCS (Siemens Healthcare, Marburg, Németország) és Ceveron (Technoclone, Bécs, Ausztria) koagulométerekre adaptáltuk.

Az irodalomban nem találtunk a CLSI C28-3 protokollja alapján AT aktivitásra megállapított referencia tartományt. A gyártók módszertani leírásaiban megadott „normál” tartomány alsó határértéke általában 80% (0,8 IU/mL) körül van. A protokollt követve az északkelet-magyarországi referencia populáción meghatározott referencia tartomány megfelelően korrelált a gyártók által ajánlott referencia tartománnyal.

Az AT deficiencia különböző típusaiban, altípusaiban a VTE kialakulásának, az ezzel járó szövödményeknek a kockázata, a terápiás beavatkozások szükségessége és tartama változó, így fontos az egyes típusok, altípusok elkülönítése. A párhuzamosan elvégzett hc- és p-anti-FXa aktivitások meghatározása, ezek egymáshoz viszonyított arányának értékelése segítséget nyújthat az AT deficienciák diagnosztikájában, az egyes altípusok elkülönítésében. A p-anti-FXa és hc-anti-FXa aktivitás hányadosa alapján az egyes altípusok

valószínűsíthetők. A II HBS heterozigóta betegekben a p/hc anti-FXa hányadosa (tartomány: 1,54-2,21) szignifikánsan magasabb, mint a referencia populációra jellemző arány (tartomány: 0,87-1,14) és egyértelműen elkülöníthető volt e csoport a betegek vizsgálatba bevont egészséges elsőfokú rokonaitól is (tartomány: 0,92-1,09). Igen lényeges szempont a homozigóta és heterozigóta II HBS típusú betegek elkülönítése. Erre a p/hc anti-FXa hányados számítása egyértelmű segítséget nyújt, mivel a homozigóta csoport (tartomány: 3,23-9,63) világosan elkülöníthető a heterozigóta csoporttól.

Az I típusú AT deficienciában szenvedő betegek p/hc anti-FXa hányadosa mérsékelten a referencia tartomány fölött található, de elmarad a II HBS heterozigótákra jellemző értéktől (tartomány: 1,16-1,35). Ezekben a betegekben a hc-anti-FXa aktivitás csökkenése nagyobb fokú, mint a p-anti-FXa aktivitás csökkenése, némi aránytalanság tapasztalható a két érték változásában. Ennek oka az, hogy a plazma p-anti-FXa aktivitásának 20%-ért egyéb fehérjék - elsősorban az α_1 -antitripszin és az α_2 -makroglobulin - a felelősek, és azok aktivitása AT deficienciában nem csökken. Így a plazma p-anti-FXa és hc-anti-FXa aktivitásának csökkenése I típusú deficienciában nem teljesen arányos. Az I típusú AT deficienciában a diagnosztika részét képezi az AT antigén meghatározása, mely ebben a formában az aktivitással arányosan csökken. A II HBS heterozigóta és I típusú betegek elkülönítése a fentiek miatt differenciál diagnosztikai problémát nem jelent, még akkor sem, ha a p/hc anti-FXa hányados nem teszi a diagnózist egyértelművé.

Összefoglalva: megállapítottuk, hogy az AT deficienciák laboratóriumi szűrésére Magyarországon a FXa gátlásán alapuló kromogén teszt a legalkalmasabb és a II HBS típusú deficienciákat csak ez a teszt ismeri fel megfelelően. Olyan kromogén AT aktivitást mérő tesztet fejlesztettünk ki, mely mind a hc-anti-FXa, mind a p-anti-FXa aktivitást jól reprodukálhatóan, megbízhatóan méri. A két aktivitás együttes mérése és a kettő arányának a kiszámítása alkalmas a II HBS típusú AT deficiencia megbízható diagnózisára, s ezen belül a heterozigóták, ill. a homozigóták (esetleg kettős heterozigóták) elkülönítésére, melynek komoly klinikai jelentősége van. Mindez Magyarországon különösen fontos, tekintettel a II HBS típus magas arányára.



Nyilvántartási szám: DEENK/13/2015. PL
Tételszám:
Tárgy: Publikációs Lista

Jelölt: Kovács Bettina
Neptun kód: ZBI9WJ
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kovács, B.**, Bereczky, Z., Selmeczi, A., Gindele, R., Oláh, Z., Kerényi, A., Boda, Z., Muszbek, L.:
Progressive chromogenic anti-factor Xa assay and its use in the classification of antithrombin deficiencies.
Clin. Chem. Lab. Med. 52 (12), 1797-1806, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/ccim-2014-0246>
IF:2.955 (2013)
2. **Kovács, B.**, Bereczky, Z., Oláh, Z., Gindele, R., Kerényi, A., Selmeczi, A., Boda, Z., Muszbek, L.:
The Superiority of Anti-FXa Assay Over Anti-FIIa Assay in Detecting Heparin-Binding Site Antithrombin Deficiency.
Am. J. Clin. Pathol. 140 (5), 675-679, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1309/AJCPVY4Z9XZMFOTH>
IF:3.005
3. Muszbek, L., Bereczky, Z., **Kovács, B.**, Komáromi, I.: Antithrombin deficiency and its laboratory diagnosis.
Clin. Chem. Lab. Med. 48 (Suppl.1), S67-S78, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2010.368>
IF:2.069

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,029

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,029

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományterületi ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.01.19.

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. □ Tel.: (52) 518–600
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: lib.unideb.hu

A kutatás a Nemzeti Fejlesztési Hivatal TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045, az OTKA K78386, PD101120 és az MTA 11003, TKI1227 projekt keretében zajlott.