

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Az V-ös faktor Leiden mutációjának trombomodulin
függő hatása a XIII-as faktor aktivációra, a fibrin- és
az alfa-2-plazmin inhibitor közti keresztkötések
kialakulására valamint a fibrinolízis folyamatára**

Dr. Koncz Zsuzsa

Témavezető:

Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2012

AZ V-ÖS FAKTOR LEIDEN MUTÁCIÓJÁNAK TROMBOMODULIN FÜGGŐ HATÁSA A XIII-AS FAKTOR AKTIVÁCIÓRA, A FIBRIN- ÉS AZ ALFA-2-PLAZMIN INHIBITOR KÖZTI KERESZTKÖTÉSEK KIALAKULÁSÁRA VALAMINT A FIBRINOLÍZIS FOLYAMATÁRA

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Koncz Zsuzsa

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 Dr. Ajzner Éva, M.D., Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja, helyszíne: 2012. október 31. 11:00 óra, a DE OEC
Gyermekegyógyászati Intézet könyvtára

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Balla György, akadémikus
bírálok:	Prof. Dr. Losonczy Hajna, Ph.D. Dr. Pfliegler György, Ph.D.
tagok:	Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora Dr. Ajzner Éva, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja, helyszíne: 2012. október 31. 14:00 óra, a DE OEC I. sz.
Belgyógyászati Klinika tanterme

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A hemosztázis kettős feladattal bír: egyrészt folyékony állapotban tartja a vért az érpályán belül, másrészt az érfal sérülése esetén a vérzés mielőbbi megszüntetésére törekszik, hogy a vérvesztéséget minimalizálja. A normál hemosztázis a természetes prokoaguláns és antikoaguláns rendszerek finom szabályozását igényli.

Mind a prokoaguláns mind pedig az antikoaguláns rendszerben bekövetkehetnek olyan elváltozások, melyeket szerzett vagy öröklött tényezők idézhetnek elő. A vérzéses klinikai tünetekkel járó örökletes betegségek már évszázadok óta ismertek, viszont a trombózist okozó örökletes tényezők többsége csak az elmúlt fél évszázadban került leírásra. Ezek az öröklött trombofiliák magukba foglalják az aktivált protein C (APC) rezisztenciát okozó V-ös faktor Leiden mutációját (FV_{Leiden}), a protrombin G20210A allél jelenlétét, a protein C, protein S és antitrombin III deficienciákat. A kaukázusi populációban a familiáris trombofilia leggyakoribb oka az APC rezisztenciát előidéző FV_{Leiden} mutáció, mely heterozigóta állapotban 5-8-szoros, míg homozigótaság esetén akár 50-80-szoros vénás tromboembóliás rizikótényezőt jelent. E pontmutáció a FV nehéz láncának az 506-os pozíciójában bekövetkező arginin glutamin cserét (p.Arg506Gln) eredményezi, melynek következtében az APC elsődleges hasítási helye elvész. Az 506-os aminosav helyén történő hasítás szükséges a másik két trombin hasítási hely expozíciójához, amelyek hasítása az aktív (FVa) teljes inaktiválásához vezet. FV_{Leiden} mutáció esetén a FVa prokoaguláns aktivitás down-regulációja csökkent illetve a FV kofaktor aktivitása az APC katalizált VIII-as faktor inaktivációban szintén gátolt, aminek következtében a trombin generáció APC okozta csökkenése elmarad.

A trombin egyik fontos szubsztrátja a véralvadás XIII-as faktora (FXIII), melyet először Laki és Lóránd írtak le 1948-ban mint "fibrin stabilizáló faktort". A FXIII egy

protranszglutamináz, mely két formában található meg a szervezetben. A plazmában levő forma két katalitikus A alegységből (FXIII-A) és két gátló/stabilizáló B alegységből (FXIII-B) felépülő heterotetramer formában (A_2B_2) kering. A másik forma a celluláris FXIII, mely csak két A alegységet tartalmaz homodimer formában (FXIII- A_2); megtalálható a trombociták, a monociták és a makrofágok citoplazmájában. A FXIII-A öt szerkezeti doménből épül fel: egy aktivációs peptidből (AP-FXIII), egy β -szendvics doménből, egy katalitikus „core” doménből és két β -hordó doménből. A katalitikus domén tartalmazza a katalitikus aktivitásért felelős triádot (Cys314, His373 és Asp396), mely a nem-aktivált FXIII-ban rejtve van, így a szubsztrátjai számára nem hozzáférhető.

A FXIII-A génjében több polimorfizmust írtak le, amelyek közül öt aminosav cserével jár. Feltételezett trombo-protéktív hatása miatt a FXIII-A Val34Leu a legkiterjedtebben tanulmányozott polimorfizmus. A polimorfizmus jelentősége abban áll, hogy csupán három aminosavra van a trombin hasítási helyétől az aktivációs peptidben, ezért a FXIII trombin által történő aktivációját befolyásolja. A Leu34 variáns esetében az aktivációs peptid 2.5X gyorsabban szabadul fel, mint a Val34 esetében, és bár a fibrinogén maga is fokozza a katalitikus hatékonyságot, ez a hatás független a fibrinogén szinttől. A gyorsabb aktiválódás következtében a Leu34 variáns esetében gyorsabb a fibrin α - és γ -lánc keresztkötések illetve az α_2 -PI-fibrin közti keresztkötések kialakulása. Korábban azt is kimutatták, hogy a Val34Leu polimorfizmus a képződött fibrinháló struktúráját a fibrinogén szinttől függően befolyásolja. Magas fibrinogén koncentrációnál a Leu34 variáns által keresztkötött fibrin vastagabb szálakból áll, a pórusok nagyobbak, könnyebben penetrálhatóak és fogékonyabbak a fibrinolízisre.

A FXIII-B egy glikoprotein, mely 8.5% szénhidrátot tartalmaz. Egy tipikus mozaik protein, amely 2-2 diszulfid híddal összekapcsolt, tíz ismétlődő „sushi” doménből áll.

A két alegység a plazmában komplexet alkot, melynek normál plazmakoncentrációja 14–28 mg/L. A plazmában a FXIII fibrinogénhez kötődve kering (a $K_d \sim 10^{-8}$ mol/L). A FXIII a

plazmában az alvadási kaszkád utolsó lépcsőjében aktiválódik trombin és Ca^{2+} hatására. Első lépésben, a trombin aktiválja a tetramer szerkezetű FXIII-at ($\text{FXIII-A}_2\text{B}_2$) azáltal, hogy a potenciálisan aktív A alegységről (FXIII-A) lehasít egy 37 aminosavból álló aktivációs peptidet. Ezt követően, Ca^{2+} jelenlétében a B alegységek disszociálnak, a hasított FXIII-A (FXIII-A') pedig konformáció változáson megy keresztül és aktív transzglutaminázzá (FXIIIa) alakul. A fibrin jelenléte az aktivációs folyamatot 80-100-szorosára gyorsítja. A FXIII aktivációja a fibrin felszínén történik, majd a keletkezett FXIIIa a fibrinalvadékhoz kötődve marad. A FXIII-B hiányában, a celluláris FXIII aktivációjához nem szükséges proteolitikus hasítás, hanem az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció megemelkedése elegendő az aktív konfiguráció kialakulásához.

Mint a transzglutaminázok általában, a FXIIIa is egy acil-transzfer reakciót katalizál, amiben egy peptidláncban levő glutamin γ -karboxamid csoportja az acil donor, és egy primér amin az acil akceptor. Ha a szubsztrát primér amin egy másik peptidlánc ϵ -amino csoportja az így kialakult izopeptid kötés a peptidláncok kovalens keresztkötését eredményezi.

A FXIIIa legfontosabb szubsztrátja a fibrin és az α_2 -plazmin inhibitor (α_2 -PI). Emellett számos más fehérje szubsztrátja is van, így például a véralvadás V-ös faktora, a plazminogén aktivátor inhibitor-2, a plazminogén, a lipoprotein(a), a trombin aktiválta fibrinolízis inhibitor (TAFI), adhezív proteinek (von Willebrand faktor, fibronectin, vitronectin, trombospondin), citoskeletális fehérjék (aktin, miozin). Többségük keresztkötésének azonban nincs fiziológiai jelentősége.

A FXIII fontos szerepet játszik a hemosztázisban, a sebgyógyulásban és a terhesség fenntartásában. A hemosztázisban betöltött szerepe az alvadék végleges szerkezetének kialakításában és a fibrinolízis szabályozásában érvényesül. A fibrinszálak keresztkötése illetve a fibrin polimerek és az α_2 -PI közti keresztkötések kialakítása révén stabilizálja a fibrinalvadékot, növeli az ellenállását a keringő vér nyíróerejével szemben és védi azt a gyors fibrinolitikus degradációtól.

A FXIIIa által történő fibrinszálak keresztkötése a γ -láncok közti dimerizációt és nagy molekulatömegű α -lánc polimerek kialakulását eredményezi. A γ -láncok dimerizációja egy gyors folyamat, ami az egyik γ -lánc 406-os pozíciójában levő lizin és egy másik γ -láncon 398-as vagy 399-es pozícióban levő glutamin közötti intermolekuláris kapcsolat kialakulását jelenti. Az α -láncok glutamin és lizin csoportjai között jóval lassabban alakulnak ki többszörös keresztkötések, melyek α -oligomerek és nagy molekulatömegű α -polimerek megjelenését eredményezik. Az α -polimerek kialakulása a fibrin alvadéknak stabilitást kölcsönöz, fokozza az alvadék erősségét, rigiditását és ellenállóképességét, a γ -dimerek fokozzák a fibrinháló merevségét.

A FXIIIa elméletileg három mechanizmus révén vesz részt a fibrinolízis szabályozásában: 1/ A fibrin α -polimerek kialakítása révén direkt hatással van az alvadék fibrinolízissel szembeni ellenállására, 2/ A fibrinszálak keresztkötése révén csökkenti a plazminogén fibrinhez való kötődését, ezáltal gátolja a szöveti plazminogén aktivátor (tPA) által történő plazminogén aktivációt, 3/ Az α_2 -PI fibrinhez történő kötése révén megvédi az alvadékot a fibrinolitikus enzim, a plazmin által történő gyors proteolitikus degradációtól.

Az α_2 -PI a plazmin legfőbb fiziológiás inhibitora, mely a fibrin polimerizációt követően FXIIIa hatására gyorsan a fibrin α -láncjaihoz kötődik, majd az így képződött heterodimerek beépülnek az α -polimerekbe. Az α_2 -PI a szerpín családba tartozó, 491 aminosavból felépülő fehérje, melyet a máj termel és szekretál. A szekretált α_2 -PI N-terminálisan metionint tartalmaz (Met1- α_2 -PI). A plazmában egy proteáz, az antiplazmin hasító enzim (APCE) az N-terminus felől lehasít róla egy 12 aminosavból álló oligopeptidet, így a Met1- α_2 -PI Asn1- α_2 -PI izoformává alakul. Mind a Met1- α_2 -PI, mind az Asn1- α_2 -PI izoforma megtalálható a humán plazmában, arányuk 3:7. Míg az Asn1- α_2 -PI izoforma kitűnő szubsztrátja a FXIIIa-nak, 2-es pozícióban lévő Gln csoportja révén acil donorként viselkedik a transzglutamináz reakcióban, addig a Met1- α_2 -PI izoforma kevésbé jó szubsztrát, mivel a potenciális szubsztrát Gln fedve van, s így nem hozzáférhető a FXIIIa számára. A

fibrinalvadék kialakulása során az Asn1- α_2 -PI Gln2 csoportja a fibrin(ogén) Lys303-al képez keresztkötést, ez a Lys reziduum nem vesz részt az α -láncok polimerizációjában. Az α_2 -PI-nak a fibrin α -láncokba való beépülése megelőzi a fibrin α -láncok keresztkötődését. A keresztkötött α_2 -PI teljes mértékben megőrzi plazmin gátló aktivitását, ezért hatékonyan megvédi a fibrinalvadékot a plazmin által történő emésztéstől. A fibrin α -láncának C terminális doménjén levő lizin reziduumok FXIIIa által történő keresztkötése csökkenti a plazminogén és a tPA számára a kötőhelyeket, ennek következtében a plazminogén aktivációt, ezáltal is védve az alvadékot a proteolízistól.

A humán tPA ~70 kDa molekulatömegű, egyláncú glikoprotein, melyet az endotélsejtek szekretálnak a vérbe, ahol 80%-a 1-es típusú plazminogén aktivátorhoz (PAI-1) van kötve, a fennmaradó 20% pedig szabadon kering. Enzimaktivitással rendelkezik, a plazminogén plazminná történő átalakulását katalizálja. Szerkezetében „kringle-domén” található, ami kulcsfontosságú a tPA-fibrin közti interakcióban, mivel a maximális enzim aktivitás szempontjából elengedhetetlen a tPA fibrinhez, mint kofaktorához való kötődése. A fibrin jelenléte erőteljesen fokozza a tPA plazminogén iránti affinitását, ezáltal a plazminogén aktivációja háromszorosára fokozódik. A tPA, akárcsak a többi plazminogén aktivátor, a plazminogén Arg561-Val560 kötését hasítja, melynek következtében plazmin keletkezik. A plazmin szerkezeti felépítésében öt „kringle-domén” vesz részt; az aktív centrum pedig a C-terminális részén található, mely a szerin-proteázokra jellemző katalitikus triádot (Ser741, His603, Asp646) tartalmazza. Az aktív plazmin a fibrinszálakat keresztirányba, a peptid kötésben lévő lizin karboxil-csoportok mentén hasítja. A folyamat előrehaladtával egyre több C-terminális lizin oldallánc válik szabaddá, ahová további plazminogén és tPA képes bekötődni. A tPA-plazminogén-fibrin komplex kialakulása pedig pozitív visszacsatolást jelent a plazmin generáció szempontjából, ami a fibrinolízis fokozódásához vezet.

A fibrinolízis lecsengéséért inhibitorok felelősek, melyek közül fontosabb a már korábban említett α_2 -PI, továbbá a PAI-1 és a TAFI. A fibrin felszínéhez kötődött plazmint az

α_2 -PI csak lassan képes inaktiválni (a féléletideje kb. 10-100 sec), mivel a plazminnak a lizinkötő helye és az aktív centruma is foglalt; ezzel szemben a szabad plazmint gyorsan inaktiválja (féléletideje 0,1 s). Az endotélsejtek és hepatociták által termelt PAI-1 szintén a szerpinek családjába tartozik, legnagyobb mennyiségben a trombocitákban található meg, és a trombocita aktiváció során szekretálódik. Legfontosabb szerepe a fibrinolízis gátlása a vérlemezke dugó kialakulása során.

A TAFI a legújabban felfedezett fibrinolízis inhibitor, mely összekötő kapocs a koaguláció és fibrinolízis között. A TAFI ~60 kDa molekulatömegű egyláncú protein, melyet prokarboxipeptidáz U, prokarboxipeptidáz B vagy prokarboxipeptidáz R néven is ismerünk. A TAFI legfőbb aktivátora a trombin, a trombomodulin jelenléte 1000-szeresére fokozza trombin által történő aktivációját. A TAFI-t a tripszin és plazmin is képes aktiválni. Fiziológias körülmények között az aktív forma meglehetősen instabil (féléletideje kb. 10 perc). Az aktivált TAFI (TAFIa) egy olyan karboxipeptidáz, ami a részlegesen degradált fibrinben C-terminálissá váló, a plazmin, plazminogén és tPA számára kötőhelyül szolgáló lizin és arginin oldalláncokat hasítja le, ezáltal gátolva a fibrinolízist.

A FV_{Leiden} mutáció trombin generáción túlmutató közvetett hatásai kevésbé ismertek. Ismert, hogy az APC profibrinolitikus hatással is bír, ami a down-regulált trombin generáció miatt a TAFI csökkent aktivációján keresztül valósul meg. A FV_{Leiden} mutáció csökkenti az APC-re adott profibrinolitikus választ is. A mutációt hordozó egyéneknél fokozódik a trombin generáció és a TAFI aktiváció, így a fibrinolízis folyamata is gátolt. A FV_{Leiden} TAFI aktivációra gyakorolt hatása TM koncentráció függő. Ezek a mechanizmusok feltehetően részt vesznek a FV_{Leiden} mutációval járó fokozott trombóziskészség kialakításában.

CÉLKITŰZÉSEK

Mivel a FV_{Leiden} mutációnak a fibrinalvadék keresztkötéseinek kialakulására kifejtett hatását eddig nem vizsgálták és a fibrinolízisre gyakorolt hatása is csak részben ismert, ezért célunk volt megvizsgálni:

1. A FV_{Leiden} mutáció FXIII aktivációjára kifejtett hatását rekombináns humán TM (rhTM) jelenlétében és hiányában.
2. A FV_{Leiden} mutáció hogyan befolyásolja az aktív FXIII által katalizált fibrin keresztkötések (γ -dimerek, α -polimerek) kialakulását.
3. Az α_2 -PI és a fibrin láncok közti keresztkötések képződését hogyan befolyásolja a FV_{Leiden} jelenléte.
4. A FV_{Leiden} mutáció fibrinolízisre gyakorolt hatását, és ebben a FXIII szerepét rhTM jelenlétében és hiányában.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálati alanyok

Tizenöt egészséges, ismert FV genotípusú (5 vad, 5 FV_{Leiden} heterozigóta, 5 FV_{Leiden} homozigóta) önkéntest (3 férfit és 12 nő, életkoruk: 17-67 év) válogattunk be a kísérleteinkbe. Kizárási kritériumot jelentett a személyes anamnézisben szereplő trombózis illetve bármilyen vérzékenységgel járó kórkép. Egyik résztvevő sem volt antikoaguláns terápián és a vérvételt megelőző két hétben nem szedtek gyógyszert. A véralvadás szűrőtesztjei mindegyik önkéntes esetében a normál tartományban voltak és a fibrinogén-, a FXIII aktivitás és antigén szintjük is a referencia tartományon belül volt. Tekintettel arra, hogy a FXIII aktiváció sebességét az FXIII-A alegység egy gyakori polimorfizmusa, a Val34Leu polimorfizmus is befolyásolja, ezért a vizsgálatokhoz valamennyi esetben FXIII-A Val34 genotípusú egyéneket

választottunk. A FV_{Leiden} mutáció és a FXIII-A Val34Leu polimorfizmus genotipizálása korábban közölt, standard PCR módszerrel történt.

A kutatás a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával történt. A vizsgálat teljes mértékben megfelel a Helsinki Deklaráció etikai elveinek, minden egyén írásos és szóbeli tájékoztatást követően írásos beleegyezését adta a vizsgálatban való részvételhez.

Plazma minták előkészítése

Egyénenként 18 mL vért vettünk a könyökhajlati vénából 2 mL 0.105 M-os trinátrium-citrát tartalmú csőbe. A vérvételhez 21G-s 0.8 x 38 mm átmérőjű tűt (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) használtunk. A véralvadás intrinszik útjának aktivációját 50 µg/mL kukorica tripszin inhibitorral (Gentaur, Brussels, Belgium) gátoltuk, melyet közvetlenül a vérvétel után adtuk hozzá a teljes vérmennyiséghez. A citrát tartalmú vérmintákat 1,400 g-n, 20 percen át centrifugáltuk, az így nyert trombocita-szegény plazma (PPP) felső kétharmadát egy másik centrifugacsőbe pipettáztuk, majd ezt ismét azonos módon lecentrifugáltuk. A második centrifugálás során nyert plazma felső kétharmadát, mint trombocita-depletált plazmát (PDP) használtuk fel kísérleteinkhez. Elektronikus trombocita számláló a PDP-ben nem mutatott ki trombocitát, mikroszkóp alatt elvétele láttunk 1-1 sejtet.

FV izolálása kevert plazmákból

Dahlbäck és munkatársai által leírt módszer alapján, részlegesen tisztított FV-t izoláltunk FV vad és FV_{Leiden} homozigóta egyének kevert plazmájából. Genotípusonként 3-3 egyéntől, egyénenként 35 mL vért vettünk savas-citrát-dextróz tartalmú Vacutainer csövekbe (ACD-B, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), majd a fent leírt centrifugálási eljárással PDP-t nyertünk. Az azonos genotípusú PDP mintákat összekevertük, majd minden 10 mL plazmához 1 tabletta proteáz-inhibitor koktélt (Complete, Mini, EDTA-free, Roche

Diagnostics, Indianapolis, IN) adtunk. Ezt követően bárium-citráttal adszorbeáltuk a plazmát a K vitamin függő alvadási faktorok eltávolítása érdekében. A plazmához 10 mL-enként csöpögtetve 0.8 mL 1 M BaCl₂-t adtunk és az elegyet egy óráig folyamatosan kevertük. Ezután a bárium-citrátot 10 perces, 6,000 g-n történt centrifugálással eltávolítottuk. Következő lépésként PEG-6,000-el (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) történő frakcionálást végeztünk, a felülúszóhoz szilárd PEG-6,000-et adva 80 g/L-s végső koncentrációban. Egy órás kevertetést követően a csapadékot 6,000 g-n, 10 percen át tartó centrifugálással távolítottuk el. A megmaradt felülúszóhoz ismételt szilárd PEG-6,000-t adtunk 120 g/L-s végkoncentrációban és az előbbi lépést (keverés, centrifugálás) megismételtük. A FV tartalmú plazma-precipitátumot 120 g/L PEG-6,000 tartalmú desztillált vízzel kétszer átmostuk. A teljes preparációs folyamatot 4 °C-n végeztük. A vad FV és homozigóta FV_{Leiden} tartalmú precipitátumokat immundepletált FV hiányos plazmában (Technoclone, Bécs, Ausztria) oldottuk fel a kiindulási plazmatérfogat 1/10-ében. Az így kapott oldat FV aktivitását egy lépéses alvadási teszttel határoztuk meg, majd FV hiányplazmával történt további hígítással az aktivitást mindkét genotípus esetében 90%-ra állítottuk be.

FXIII aktivációja a különböző FV_{Leiden} genotípusú plazmákban

Mivel plazmában a FXIII aktivációja a fibrin felszínen megy végbe és a FXIIIa a fibrinhez kötődve marad, ezért kísérleteinkben a FXIII aktivációját az alvasztás során nyert fibrinalvadékokban vizsgáltuk. A fibrinalvadékokat a szöveti faktor útvonal aktivációja révén nyertük. Az aktivációt elvégeztük rekombináns humán trombomodulin (rhTM, American Diagnostica, Stamford, CT) jelenlétében és hiányában egyaránt. Az rhTM koncentráció kiválasztásánál az volt a célunk, hogy a trombingeneráció gátlása megközelítőleg 50%-os legyen a FV vad típusú plazmákban. A kísérleteinkhez kiválasztott rhTM koncentrációt (1.5 nM-os végkoncentráció) előzetes kísérletek során teszteltük FV vad típusú plazmákon, melyekben az rhTM jelenléte átlagosan 45.4%-al (40-61%) csökkentette a trombingenerációt.

A trombingenerációt Thrombin S-2238 nevű kromogén szubsztrát (Chromogenix, Lexington, MA) felhasználásával mértük.

150 μ L PDP-hez 10 μ L phys. NaCl-t és 40 μ L aktivátor koktélt adtunk, s az elegyet 37 °C-on különböző ideig inkubáltuk, majd a reakciót azonos térfogatú gátló koktéllal állítottuk le. Az aktivátor koktél Technothrombin TGA RC Low (Technoclone GmbH, Bécs, Ausztria) volt, melyet 7.5 nM rhTM-et tartalmazó, vagy nem tartalmazó 62.5 mM CaCl₂-ban oldottunk fel. A feloldott Technothrombin TGA RC Low ~5 pM rekombináns humán TF-t, Tris-Hepes-NaCl pufferben oldott alacsony koncentrációjú foszfolipidet tartalmazott. A koaguláció során keletkezett trombin és FXIIIa aktivitásának blokkolására, ill. a fibrinolízis megakadályozására használt gátló koktél összetétele a következő volt: 20 mM benzamidin, 0.1 mM D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginin chloromethyl ketone (PPACK), 2 mM iodoacetamid, 50 mM ϵ -aminokapronsav, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA 50 mM HEPES puffer (pH 7.5). Az aktivátor koktél által indukált reakciót különböző időintervallumok után leállítottuk. Amennyiben az adott időintervallum alatt alvadék képződött, azt centrifugálással szeparáltuk, majd háromszor alaposan átmostuk fiziológiás sóoldattal és SDS-PAGE minta-pufferben feloldottuk.

SDS-PAGE és Western blotting technika

Az alvadékokban képződött fibrin keresztkötéseket (α -polimerek, γ -dimerek) SDS-PAGE technikával 10%-os gélben vizsgáltuk; az elektroforézist követően a gélen levő fibrint Coomassie-kék (R250) festékkal tettük láthatóvá. A képződött fibrin γ -dimerek relatív mennyiségét GS-800 Kalibrált Denzitometeren (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) kvantitatív denzitometriával határoztuk meg. Az α -lánc oligomerek-polimerek képződését hasonlóképpen kvantitatív denzitometriával követtük.

A FXIII-A aktivációját, illetve α_2 -PI és fibrin közti keresztkötések keletkezését

Western blotting technikával követtük. Az SDS-PAGE ezekben az esetekben 7.5 %-os gélben történt. A FXIII-A, ill. a trombin által hasított, azaz proteolitikusan aktivált formájának (FXIII-A') detektálására antitestként birka anti-human FXIII-A affinitás kromatográfiával tisztított antitestet (Affinity Biologicals, Ancaster, Canada) használtunk. A detektálás nyúlban termelt biotinált birka-ellenes IgG-vel és avidinhez kötött biotinált peroxidáz komplex-szel (Vectastain ABC kit komponensek, Vector, Burlingame, CA, USA) történt; az immunreakciót megnövelt érzékenységgű kemilumineszcenciás módszerrel (ECL Plus+, Amersham, Little Chalfont, UK) hívtuk elő. A FXIII-A' relatív mennyiségének a meghatározása ez esetben is kvantitatív denzitometriás analízissel történt. Az egyes mintákban levő FXIII-A' mennyiségét a fibrin alvadékban maximálisan képződő FXIII-A' mennyiségéhez viszonyítva, %-os arányban fejeztük ki. Ahhoz, hogy összehasonlítsuk az rhTM-nek a FXIII aktiváció sebességére gyakorolt hatását a különböző FV_{Leiden} genotípusú plazmákban, kiszámoltuk azt az időt, ami a FXIII 50%-os aktivációjához szükséges ($T_{1/2}$) rhTM hiányában ($T_{1/2}$ rhTM-) és annak jelenlétében ($T_{1/2}$ rhTM+).

Az α_2 -PI és fibrinszálak közt kialakuló keresztkötéseket szintén Western blotting technikával vizsgáltuk. Elsődleges antitestként kecske anti-humán α_2 -PI affinitás kromatográfiával tisztított antitestet (Affinity Biologicals, Ancaster, Canada) használtunk. Az immunreakció detektálása és előhívása ugyanúgy történt mint FXIII-A esetében azzal a különbséggel, hogy itt másodlagos antitestként nyúlban termelt biotinált kecske-ellenes IgG-t használtunk. Az α_2 -PI-fibrin α -lánc közti heterodimerek relatív mennyiségének a meghatározása ez esetben is kvantitatív denzitometriával történt. Az egyes plazmamintákban kialakult heterodimerek relatív mennyiségét a maximálisan képződött α_2 -PI-fibrin α -lánc közti heterodimerek %-ában fejeztük ki. Az összehasonlítás érdekében ebben az esetben is $T_{1/2}$ értékeket (az 50%-os heterodimerizációhoz szükséges időintervallumokat) számoltunk.

In vitro alvadék lízis vizsgálatok

A tPA által indukált alvadék lízist turbidimetriás módszerrel vizsgáltuk. A fibrinolízist a plazmához adott 10 μ L tPA-val (American Diagnostica, Stamford, CT; végkoncentráció: 5 nM) indukáltuk, melyet közvetlenül az aktivátor koktél előtt adtunk a plazmához. A lízis vizsgálatokat elvégeztük rhTM jelenlétében is hiányában is. Egyes kísérletekben a TAFIa-t 25 μ g/mL krumból izolált karboxipeptidáz inhibitorral (CPI; Sigma, St. Louis, MO) gátoltuk. Amennyiben a FXIIIa aktivitást kívántuk gátolni az lízis vizsgálatok során, 2 mM iodoacetamidot adtunk a rendszerünkhöz. Az alvadás és lízis folyamatát turbidimetriás módszerrel követtük „microplate reader” segítségével 37 °C-on, 405 nm-es hullámhosszon, 2 órán keresztül. Az eredmények kvantitatív értékeléséhez az 50%-os lízishez szükséges időt (a maximális turbiditástól az 50%-os feltisztulásig eltelt időt) számoltuk ki.

Statisztikai analízis

A statisztikai vizsgálatokat GraphPad Prism program (La Jolla, CA, USA) segítségével végeztük. A genotípusok között rhTM hiányában és jelenlétében kapott különbségeket Kruskal-Wallis-féle variancia-analízissel hasonlítottuk össze. Az eredmények közti különbségek szignifikanciáját Mann-Whitney U-teszttel számítottuk ki; eredményeinket $p < 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

1. A FV_{Leiden} mutáció rhTM-től függő hatása a FXIII aktivációra

1.1. Az rhTM hatása a FXIII aktivációra különböző FV genotípusú plazmákban

A FV_{Leiden} genotípusra nézve 5 vad, 5 heterozigóta és 5 homozigóta egyén plazmájában vizsgáltuk a FXIII aktivációját, majd az individuálisan kapott eredményeket átlagoltuk és genotípusonként csoportosítottuk. A FXIII aktivációjának kinetikájáról a

Western blot képek kvantitatív denzitometriás értékelésével kaptunk információt. Az egyes mintákban kapott FXIII-A' mennyiségeket a plazmában maximálisan aktiválódott FXIII-A mennyiséghez viszonyítottuk, az arányt %-ban fejeztük ki. Ahhoz, hogy összehasonlíthassuk a rhTM-nek a FXIII aktivációra gyakorolt hatását a különböző genotípusok esetén, kiszámoltuk azt az időt, ami a plazmában levő FXIII 50%-ának aktivációjához szükséges TM hiányában ($T_{1/2}$ rhTM-) illetve annak jelenlétében ($T_{1/2}$ rhTM+).

Az rhTM hiányában végzett kísérletek során nem észleltünk számottevő különbséget a FXIII aktiváció időbeni lefolyásában az egyes genotípusok között; a $T_{1/2}$ értékek között sem volt szignifikáns különbség. A FV vad típusú egyének plazmájában a FXIII aktiváció időben jelentősen lelassul rhTM jelenlétében. A TM ezen hatása a heterozigóta és homozigóta egyének esetén elhanyagolható mértékű. A FXIII aktivációja során mért $T_{1/2}$ értékek jelentősen megnyúltak rhTM jelenlétében a vad típusú plazmákban, szemben a heterozigóta- és homozigóta plazmákban észlelt kismértékű változással, a genotípusok közti különbségek azonban nem voltak szignifikánsak, ami az alacsony esetszámmal és a nagyfokú individuális variabilitással magyarázható. Ezt bizonyítja, hogy amennyiben a hetero- és homozigótákat egy csoportként kezeltük, a FV_{Leiden} hordozók és FV vad típusú egyének közti különbség szignifikánssá vált. Mivel az interindividuális variabilitás zavarhatja az rhTM genotípustól függő hatásának megítélését, ezért minden egyénnél külön kiszámoltuk az rhTM által előidézett $T_{1/2}$ megnyúlást a FXIII aktivációjában, azaz az rhTM jelenlétében ($T_{1/2}$ rhTM+) és annak hiányában ($T_{1/2}$ rhTM-) mért $T_{1/2}$ értékek közti különbséget ($T_{1/2}$ rhTM+)-($T_{1/2}$ rhTM-). A $T_{1/2}$ rhTM+ és $T_{1/2}$ rhTM- értékek közti különbség szignifikánsan nagyobb volt a FV vad típusú egyéneknél, mint a FV_{Leiden} heterozigóta és homozigóta csoportokban (szám szerint 175 sec, 39 sec illetve 25 sec). A hetero- és homozigóták között is észleltünk különbséget, de ez nem volt statisztikailag szignifikáns.

1.2. rhTM hatása a FXIII aktivációra izolált vad típusú FV-tel illetve FV_{Leiden}-nel kiegészített FV hiányplazmában

Az alvadék kialakulását befolyásoló plazma komponensek individuális különbségeinek kiküszöbölése érdekében, valamint a kapott eredmények megerősítése céljából, FV vad és FV_{Leiden} homozigóta egyének kevert plazmaiból FV-t izoláltunk, majd ezzel kiegészítettük a kereskedelembe kapható FV hiányplazmát, melyből a FV-öt immunabszorpcióval teljes mértékben eltávolították. Az így kapott plazmákban is megvizsgáltuk, hogy a különböző genotípusú FV hogyan befolyásolja az rhTM FXIII aktivációra gyakorolt hatását. Ez esetben a FV kivételével valamennyi plazma komponens azonos volt. rhTM hiányában FV_{Leiden} tartalmú plazmában a FXIII aktivációja valamivel korábban következett be, mint a vad FV-öt tartalmazó plazmában, ami azzal lehet összefüggésben, hogy a részlegesen tisztított két különböző genotípusú FV preparátum összetétele némileg eltért egymástól. A vad típusú FV-tel pótolta FV hiányplazmában a rhTM jelenléte szignifikánsan lelassította a FXIII aktivációját; a $T_{1/2}$ értékek közötti különbség 185 sec volt. Amikor a hiányplazmát homozigóta FV_{Leiden}-nel egészítettük ki az rhTM FXIII aktivációt késleltető hatása sokkal szerényebben érvényesült, a $T_{1/2}$ értékek közti különbség 65 sec volt.

2. A FV_{Leiden} mutáció rhTM-től függő hatása a FXIIIa által katalizált fibrin keresztkötések kialakulására

Munkánk következő részében azt vizsgáltuk, hogy az rhTM jelenléte hogyan befolyásolja a különböző FV genotípusú egyének plazmaiban a fibrin keresztkötések kialakulását. FV vad típusú egyének plazma mintáiban az rhTM egyértelműen késleltette a fibrin γ -dimerek kialakulását, míg a FV_{Leiden} homozigóták plazma mintáiban ez a hatás jelentős mértékben csökkent. Az rhTM-nek a fibrin α -polimerek képződésére gyakorolt

hatása hasonló tendenciájú, mint a γ -dimerizáció esetében. Mivel az α -láncok polimerizációja időben lassúbb folyamat, ezért a teljes polimerizáció nem fért bele a kísérleteink időkeretébe és így az α -láncok keresztkötését nem tudtuk a teljes polimerizáció százalékában kifejezni. A FXIII aktivációjának értékeléséhez hasonlóan meghatároztuk az összes γ -lánc 50%-ának γ -dimérré történő alakulásához szükséges időt ($T_{1/2}$). A FV vad típusú egyének plazmáiban jelentős különbséget észleltünk az rhTM nélkül és annak jelenlétében mért $T_{1/2}$ értékek között; míg a FV_{Leiden} hordozók esetében ez a különbség minimális volt. A FV_{Leiden} homozigóta plazmákban az rhTM még kevésbé lassította le a γ -láncok dimerizációját mint a heterozigótákban, a két genotípus között azonban a különbség nem volt szignifikáns.

3. A FV_{Leiden} mutáció rhTM függő hatása az aktív FXIII által szabályozott α_2 -PI és fibrin közti keresztkötések képződésére

A fenti eredmények birtokában, illetve annak ismeretében, hogy az aktivált FXIII a fibrinolízis egyik legfőbb szabályozója, kutatásunk következő fázisában különböző FV genotípusú egyéneknél megvizsgáltuk az rhTM fibrinolízisre gyakorolt hatását.

3.1 Az rhTM hatása az α_2 -PI-fibrin keresztkötések képződésére különböző FV genotípusú egyénekből származó plazmákban

FV vad típusú egyének plazmáiban rhTM jelenlétében α_2 -PI-fibrin α -lánc közti heterodimerek kialakulása szignifikánsan később kezdődik és lassabban zajlik le, mint rhTM hiányában; ugyanakkor szignifikáns különbséget észleltünk a nagy molekulatömegű α_2 -PI tartalmú polimerek megjelenésében is. Ezzel ellentétben, a FV_{Leiden} plazma mintákban eltűnik az rhTM nélküli és az azt tartalmazó plazmaminták közti különbség; sőt egyetlen mutáns allél jelenléte is szignifikánsan csökkentette az rhTM hatását.

Az α_2 -PI-fibrin α -lánc közti heterodimerek 50%-ának kialakulásához szükséges rhTM jelenlétében és hiányában mért $T_{1/2}$ közti különbségeket is kiszámoltuk. A FV vad típusú egyének és a FV_{Leiden} heterozigóták illetve homozigóták között észlelt különbségek szignifikánsak voltak, viszont a két FV_{Leiden} hordozó csoport közti különbség ez esetben sem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. Amennyiben az rhTM-nek az α_2 -PI-fibrin α -lánc heterodimerek és oligomerek kialakulására gyakorolt hatását együtt vizsgáltuk, a FV_{Leiden} mutáció a fentiekhez hasonlóan befolyásolta az eredményeket.

3.2. Az rhTM hatása az α_2 -PI-fibrin keresztkötésre izolált vad típusú FV-tel illetve FV_{Leiden}-nel kiegészített FV hiány plazmában

A FXIII aktivációnál leírt kísérletekhez hasonlóan az alvadék kialakulását befolyásoló plazma komponensek individuális különbségeinek kiküszöbölése érdekében, valamint a kapott eredmények megerősítése céljából, ez esetben is FV vad és FV_{Leiden} homozigóta egyének kevert plazmáiból FV-öt izoláltunk, majd ezzel kiegészítettük a FV hiány plazmát. Az így kapott plazmákban is megvizsgáltuk, hogy a különböző genotípusú FV hogyan befolyásolja az rhTM α_2 -PI-fibrin keresztkötésre gyakorolt hatását. Abban az esetben, amikor a hiány plazmát vad típusú FV-al egészítettük ki, az rhTM szignifikánsan lelassította az α_2 -PI fibrinhez való keresztkötését. Amennyiben a hiány plazmához homozigóta FV_{Leiden}-t adtunk, az rhTM-nek e késleltető hatása minimális mértékben érvényesült.

4. Az rhTM FV_{Leiden} függő hatása a tPA indukálta fibrinolízisre

Mivel az α_2 -PI fibrinhez való keresztkötődése jelentősen befolyásolja az alvadék lízisét, ezért a következőkben az rhTM-nek a tPA indukált lízis folyamatára kifejtett hatását vizsgáltuk FV vad és FV_{Leiden} homozigóta egyének plazmaiban. rhTM hiányában nem tapasztaltunk különbséget a két genotípus között. Az rhTM jelenléte mindkét genotípus esetén

szignifikánsan megnyújtotta az alvadék lízis idejét, azaz a fibrinolízis mértékét csökkentette, bár az rhTM FV_{Leiden} homozigóták esetén szignifikánsan hatékonyabb volt, mint a FV vad típusú egyéneknél. rhTM hatására a FV_{Leiden} homozigóta egyének plazmájában az 50%-os lízis szignifikánsan, mintegy 40 perccel később következett be, mint a FV vad típusú egyének plazmájában.

Ismert, hogy a TM TAFI aktivációra kifejtett hatásán keresztül befolyásolja a fibrinolízist. Annak bizonyítására, hogy a TM α_2 -PI-fibrin keresztkötésre kifejtett hatásának szintén fontos szerepe van a fibrinolízis szabályozásában, in vitro lízis vizsgálatokat végeztünk TAFIa inhibitor jelenlétében, illetve olyan feltételek mellett is, amikor a TAFIa-t és FXIIIa-t egyszerre gátoltuk. A TAFIa gátlása mellett, az rhTM hatására felgyorsult a fibrinolízis a FV vad típusú egyénektől származó plazmákban, míg a FV_{Leiden} mutáció esetén ez a gyorsulás elmaradt. Ennek háttérében az állhat, hogy rhTM jelenlétében a vad típusú FV-öt tartalmazó plazmákban a FXIII aktiváció lelassulása miatt a FXIIIa által katalizált α_2 -PI-fibrin keresztkötés is lelassul, míg ezek a hatások FV_{Leiden} esetén nem érvényesülnek. A lassúbb FXIII aktiváció szerepét az rhTM jelenlétében - TAFIa gátlása mellett - felgyorsult fibrinolízisben úgy bizonyítottuk, hogy a lízis vizsgálatokat TAFIa és FXIIIa együttes gátlása mellett is elvégeztük. Ez esetben - az rhTM jelenlététől függetlenül - a FXIIIa gátlása miatt a lízis mindegyik plazma mintában jelentősen felgyorsult, és az egyes genotípusok közötti különbség is eltűnt.

MEGBESZÉLÉS

A TM a FXIII aktivációt direkt és indirekt mechanizmus révén képes befolyásolni. Fibrinogén hiányában magas koncentrációjú trombin szükséges a tisztított rendszerben történő FXIII aktiválásához; a trombin FXIII aktiváló képességét a trombomodulinnal való komplex

képződés csökkenti. Amennyiben fibrinogén jelen van, a FXIII aktivációja különféleképpen módosul. A polimerizálódó fibrin 100-szorosára fokozza a FXIII aktivációját a plazmában és a FXIII aktiváció a polimerizált fibrin felszínén megy végbe. Egyértelmű korreláció van a fibrinképződés és a FXIII aktiváció között, a fibrinképződés beindulását igen gyorsan követi a FXIII aktivációja. A fibrinhez való kötődés felgyorsítja a FXIII-A-ban az Arg37-Gly38 peptidkötés trombin által indukált hasítását. Ennek köszönhető, hogy plazmában jóval alacsonyabb trombin koncentráció is elégséges a FXIII aktivációjához, mint tisztított, fibrinogén-mentes rendszerben.

Plazma körülmények között a TM direkt és indirekt mechanizmusok révén fejti ki hatását a FXIII aktivációra. A direkt mechanizmus során a TM verseng a fibrinnel a trombin exosite 1 kötőhelyéért. A trombin exosite 1 fibrinhez való kötődése esszenciális a FXIII-A trombin katalizálta hasításának felgyorsulásában. A TM gátolva a trombin fibrinhez való kötődését, gátolja a fibrin felszínen történő gyors FXIII aktivációt. A TM FXIII aktivációt befolyásoló hatása egy indirekt mechanizmus révén is érvényesülhet. A TM felerősíti a protein C trombin indukálta aktivációját. Az APC proteolitikusan hasítja a FVa-t és FVIIIa-t, és ezáltal leregulálja a trombin generációt; a csökkent trombin generáció pedig csökkent/késleltetett FXIII aktivációhoz vezet.

Eredményeink szerint FV vad típusú egyének plazmájában az rhTM szignifikánsan lassította a FXIII aktivációt, és ennek következtében a fibrin láncok keresztkötését, valamint az α_2 -PI fibrinhez való kovalens kötését. A TM-nak ez a fibrin stabilizációt lassító hatása FV_{Leiden} mutációt hordozó egyének plazmaiban nem, vagy csak lényegesen kevésbé érvényesült. Ha a TM direkt hatása, azaz a FXIII trombin indukálta aktivációjának direkt gátlása érvényesülne, a FXIII aktiváció lassítása a FV genotípustól függetlenül bekövetkezne. Mivel ez csak a FV vad típus esetén észlelhető, eredményeink arra engednek következtetni, hogy plazmában nem a TM direkt hatása érvényesül, hanem az APC útvonalon keresztül a trombin generáció csökkenésének és a fibrinképződés gátlásának van elsődleges szerepe a

lassúbb FXIII aktivációban és keresztkötés képződésben. FV_{Leiden} mutáció esetében a trombin generáció és a fibrin képződés APC útvonalon keresztül érvényesülő down-regulációja elvész, ill. sokkal kevésbé hatékony, így az rhTM FXIII aktivációt és a fibrin valamint az α_2 -PI keresztkötődést lassító hatása csak kismértékben érvényesül.

Az általunk végzett kísérletek során találtunk ugyan különbséget a FV_{Leiden} hetero- és homozigóták között, de ez statisztikailag nem bizonyult szignifikáns eltérésnek. Ez részben a vizsgálati alanyok kis számával magyarázható. A FV_{Leiden} homozigóták számát az adott feltételek mellett (trombózis mentes anamnézis, illetve FXIII-A Val34Leu polimorfizmusra nézve vad genotípus) nem tudtuk növelni. A vizsgálatban résztvevő öt homozigóta egyént közel 3000 egyén vizsgálatának eredményeként sikerült beválogatni. Másrészt a kísérleti körülmények beállításánál a FV_{Leiden} mutáció hatásának kimutatása volt az elsődleges szempont és nem a heterozigóta ill. homozigóta állapot közti különbség vizsgálata. A kísérleti feltételek változtatásával lehetett volna találni olyan koncentráció viszonyokat, melyeknél a heterozigóták és homozigóták közti különbség markánsabb, ez esetben azonban a kis vizsgálati szám miatt a vad típus és a heterozigóták közti különbség statisztikai szignifikanciáját elveszíthettük volna.

In vitro körülmények között, és transzgén egerekben in vivo is igazolták, hogy a FV_{Leiden} mutáció protrombotikus hatása részben a fibrinolízis gátlása révén valósul meg. A TAFI és a FXIII a fibrinolízis két kulcsfontosságú down-regulátora, utóbbi antifibrinolitikus hatása az α_2 -PI-nak a fibrinhez való keresztkötése révén érvényesül. A TAFI-t a trombin aktiválja, TM jelenléte pedig 1000-szeresére gyorsítja fel az aktiváció folyamatát. A TAFI a részlegesen emésztett fibrinről lehasítja a C-terminálisan szabaddá váló lizin oldalláncokat, melyek a hatékony plazminogén aktivációhoz szükségesek. A TM bonyolult mechanizmus révén szabályozza a TAFI-t. Egyrészt fokozza a trombin által történő TAFI aktiváció sebességét, másrészt a PC aktiválásán keresztül csökkenti a trombin generációt, ami a kevesebb rendelkezésre álló trombin miatt csökkent TAFI aktivációhoz vezet. A TM-nak e

hatásai koncentráció-függőek, vagyis alacsony TM koncentráció mellett a TAFI aktiváció fokozódása dominál, míg a magas TM koncentráció, az APC FV-re gyakorolt hatásán keresztül a trombin generáció csökkenésének kedvez, ami csökkent TAFI aktivációval jár. Ennek megfelelően, míg az alacsony TM koncentráció antifibrinolitikus/protrombotikus, addig magas TM koncentráció profibrinolitikus/antitrombotikus hatással bír. FV_{Leiden} mutáció esetében az antitrombotikus hatás csökkent, vagyis a TAFI aktiváció magasabb TM koncentrációknál észlelt gátlása elvész. A TM FXIII aktivációra és a fibrin illetve α_2 -PI keresztkötésre kifejtett hatását is befolyásolja a FV_{Leiden} mutáció. FV_{Leiden} hordozók esetében elmarad a TM FXIII aktivációt és fibrin illetve α_2 -PI keresztkötődést lassító hatása. Ez magyarázza, hogy FV_{Leiden}-t tartalmazó plazmában a lízis idő rhTM jelenlétében bekövetkező megnyúlása, azaz a fibrinolízis csökkenése, kifejezettebb volt, mint vad típusú FV-öt tartalmazó plazmákban. A fenti mechanizmus a FV_{Leiden} mutáció okozta fokozott tromboembóliás rizikónak egy új biokémiai mechanizmusát jelenti.

Annak bizonyítására, hogy a FXIII aktiváció és a fibrin valamint α_2 -PI keresztkötések kialakulása valóban szerepet játszik a TM fibrinolízisre kifejtett hatásában, a lízis vizsgálatokat TAFIa inhibitor jelenlétében, azaz a TAFI aktiváción keresztül ható mechanizmusok kiiktatásával, is elvégeztük. A TAFIa gátlása esetén a FV vad típusú egyének plazma mintáiban rhTM jelenlétében a fibrinolízis folyamata felgyorsult (a lízis idő rövidült), amit a FXIII aktiválódás lelassulása és ennek következtében az α_2 -PI fibrinhez való kovalens kapcsolódásának a késleltetése magyaráz. FV_{Leiden} mutáció esetén a TM-nak az α_2 -PI fibrin keresztkötés kialakulását lassító hatása elmaradt, és az rhTM jelenlétében és hiányában mért lízis idők közel azonosak voltak. Amennyiben a TAFIa gátlás mellett FXIIIa inhibitorral gátoltuk az α_2 -PI keresztkötődését, azaz mindkét fibrinolízist gátló mechanizmust kiiktattuk, a fibrinolízis rhTM jelenlététől függetlenül jelentősen felgyorsult és eltűnt a FV genotípusok közti különbség is. Ezek az eredmények megerősítik a FXIII aktiváción és az α_2 -PI-fibrin

keresztkötések kialakulásán keresztül ható mechanizmus fontosságát a FV_{Leiden} mutáció antifibrinolitikus hatásában

Összegzésként elmondható, hogy FV vad típusú egyénekben a TM lassítja a trombin által indukált FXIII aktivációt, a fibrin láncok keresztkötését és az α_2 -PI fibrinhez történő keresztkötését. E hatás a trombin generáció APC útvonalon keresztül történő down-regulációja révén érvényesül. A FV_{Leiden} mutáció a TM eme hatásait megszünteti, ami (a TAFI aktivációra kifejtett hatás mellett) szerepet játszhat a mutáció antifibrinolitikus/protrombotikus hatásában.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az V-ös faktor Leiden mutációja (FV_{Leiden}) egy relatíve gyakori mutáció a kaukázusi populációban, mely heterozigóták esetén 5-8-szoros, homozigótákban 50-80-szoros vénás tromboembóliás rizikót jelent. FV_{Leiden} esetén a FVa és a FV APC indukálta proteolitikus hasítása gátolt, így a trombin generáció csökkenése és a prokoaguláns aktivitás down-regulációja elmarad, illetve és a FV antikoaguláns hatása is gátolt. A FV_{Leiden} trombin generáción túlmutató közvetett hatásai kevésbé ismertek, így pl. a mutációnak a XIII-as faktor (FXIII) aktivációra, az alvadék keresztkötéseinek kialakulására gyakorolt hatását eddig nem vizsgálták.

Munkánkban tizenöt egészséges, ismert FV_{Leiden} genotípusú egyén plazmájában a véralvadás fiziológiás, extrinszik útját rekombináns humán szöveti faktort, foszfolipidet és Ca^{2+} -ot tartalmazó oldattal aktiváltuk rhTM jelenlétében és hiányában. A különböző időközökben nyert alvadékokat SDS-PAGE és Western blotting technikákkal analizáltuk, majd a FXIII aktiválódás, a fibrin keresztkötések illetve az alfa-2-plazmin inhibitor (α_2 -PI) és fibrin közti keresztkötések kialakulásának mértékét kvantitatív denzitometriával értékeltük. Kísérleteinket tisztított, vad típusú FV-tel illetve homozigóta mutáns FV_{Leiden} -nel kiegészített FV hiányos plazmákkal is elvégeztük. A rhTM-nek a tPA-val indukált alvadék lízisre kifejtett in vitro hatását turbidimetriás módszerrel vizsgáltuk FV vad típusú és FV_{Leiden} homozigóta egyénektől nyert plazmákban.

A FV vad típusú egyének plazmájában a rhTM jelentősen lelassította a FXIII aktivációját, a fibrin γ -láncok dimerizációját illetve a α_2 -PI-fibrin α -lánc közti heterodimerek/oligomerek kialakulását. Az rhTM-nak ez a hatása FV_{Leiden} hordozók esetében csak elhanyagolható mértékben érvényesült. A rhTM lelassította a tPA-indukált alvadék lízisét és ez a hatás kifejezettebb volt a FV_{Leiden} hordozó egyének plazmájában. Amennyiben a trombin által aktiválható fibrinolízis inhibitor aktív formájának (TAFIa) hatását

karboxipeptidáz gátló szer hozzáadásával felfüggesztettük, rhTM jelenlétében a lízis idő a FV vad típusú plazmákban jelentősen megrövidült, ami a lassúbb α_2 -PI-fibrin keresztkötések kialakulásával magyarázható. Ez a hatás a FV_{Leiden} hordozók esetében nem volt megfigyelhető.

A FV_{Leiden} hordozók plazmájában az rhTM-nek a FXIII aktivációra, a fibrin láncok keresztkötésére, illetve a α_2 -PI-fibrin keresztkötések kialakulására kifejtett késleltető hatása nem érvényesül, és ez az alvadék fibrinolízisének gátlásához vezet. Eredményeink a FV_{Leiden} mutáció trombózis hajlamot fokozó hatásának új biokémiai mechanizmusára világítanak rá.

Iktatószám: DEENKÉTK/261/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Koncz Zsuzsa

Neptun kód: OMGAM6

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Bagoly, Z., **Koncz, Z.**, Hársfalvi, J., Muszbek, L.: Factor XIII, clot structure, thrombosis.
Thromb. Res. 129 (3), 382-387, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2011.11.040>
IF:2.44 (2011)
2. **Koncz, Z.**, Bagoly, Z., Haramura, G., Mezei, Z.A., Muszbek, L.: Thrombomodulin-dependent effect of factor V Leiden mutation on the cross-linking of alfa2-plasmin inhibitor to fibrin and its consequences on fibrinolysis.
Thromb. Res. 130 (3), 528-534, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2012.05.019>
IF:2.44 (2011)
3. **Koncz, Z.**, Bagoly, Z., Haramura, G., Mezei, Z.A., Muszbek, L.: Thrombomodulin-dependent effect of factor V Leiden mutation on factor XIII activation.
Thromb. Res. 129 (4), 508-513, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2011.06.030>
IF:2.44 (2011)

Összesített impakt faktor: 7.32

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 7.32

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.08.27