

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

A XIII-as véralvadási faktor humán könnyben

Dr. Orosz Zsuzsanna Zita

Témavezető:

Prof. Dr. Muszbek László

akadémikus, egyetemi tanár



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011.

TARTALOMJEGYZÉK

Összefoglalás	2
Summary	4
Rövidítések jegyzéke	6
Bevezetés, irodalmi áttekintés	7
Célkitűzések	15
Betegek, anyagok és módszerek	17
Vizsgált betegek	17
Könnyminták gyűjtése	18
Laboratóriumi módszerek	19
A módszerek jellemzése	22
Statisztikai analízis	23
Eredmények	24
A kemilumineszcens FXIII ELISA módszerek analitikai jellemzése	24
FXIII alegységek és komplex egészséges egyének stimulált és nem stimulált könnymintáiban	27
FXIII szintek perforáló keratoplasztikán átesett egyének könnymintáiban	31
Megbeszélés	35
Irodalomjegyzék	41
Tárgyszavak	50
Köszönetnyilvánítás	51
Függelék	52
A szerző témakörben megjelent közleményei	52
Nemzetközi és hazai konferenciákon való részvétel	52

ÖSSZEFOGLALÁS

BEVEZETÉS: A XIII-as véralvadási faktor (FXIII) egy tetramer szerkezetű fehérje (FXIII-A₂B₂), mely két katalitikus A (FXIII-A) és két hordozó/gátló B (FXIII-B) alegységből áll. A véralvadásban alapvető funkciója a képződött fibrinszálcák stabilizálása és fibrinolízistől való védelme. Emellett a FXIII a sebgyógyulásban és az érújdonképződésben is részt vesz. Utóbbi funkciói a plazma mellett az extravasculáris folyadékterekben is fontosak lehetnek.

CÉLKITŰZÉSEK: Igen érzékeny kemilumineszcens ELISA módszerek kidolgozása a FXIII alegységek és komplex mennyiségi meghatározására, és ezek segítségével meghatározni a FXIII komponensek koncentrációját humán könnyben. A továbbiakban célunk volt a FXIII koncentrációk mérése stimulált könnyben ill. perforáló keratoplasztikát követően.

MÓDSZEREK: Nagy érzékenységgű kemilumineszcens ELISA módszereket fejlesztettünk ki a könnyben kis koncentrációban jelen lévő FXIII-A, FXIII-B és FXIII-A₂B₂ antigénszintek mérésére. 60 egészséges önkéntes nem-stimulált és stimulált könnymintáiban, valamint 31 perforáló keratoplasztikán (PKP) átesett beteg könnymintáiban a műtét előtt és azt követően 1 hétig mértük a FXIII koncentrációkat. Közülük 23 beteget 18 hónapig rendszeresen követtünk, a cornea ereződését is vizsgáltuk.

EREDMÉNYEK: Mindhárom ELISA esetében a minimális mérési határ 0,02 µg/L alatt volt, a módszerek összegzett pontatlansága (laboratóriumon belüli hiba) alacsony koncentrációk esetén sem érte el a 12%-ot, a sorozaton belüli hiba pedig 5.5% alatt volt. A tesztekben a FXIII alegységek és a FXIII komplex visszanyerése közel 100% volt. A mérési tartományokban a másodfokú polinomiális kalibrációs görbék kiváló illeszkedést mutattak. Egészséges, nem stimulált könnymintákban állandó, alacsony koncentrációban szabadon megtalálható a FXIII-A és FXIII-B, az alegységek a plazmához viszonyítva erősen csökkent arányban képeznek komplexet. Stimuláció hatására szekretálódott könnyben a FXIII

koncentrációk valamelyest csökkentek, de a mért értékeket össz-fehérje tartalomra normalizálva a koncentrációk nem változtak. 24 órával PKP-t követően a könny FXIII-A koncentrációja 10,4-szeresére, FXIII-B koncentrációja 9,4-szeresére, FXIII-A₂B₂ koncentrációja pedig 20,5-szeresére emelkedett. A totál protein koncentrációra vonatkoztatott FXIII szintek még nagyobb emelkedést mutattak. Az első napot követően a FXIII koncentrációk lassan csökkentek, de még 7 nappal a műtét után is szignifikánsan magasabbak voltak, mint a műtét előtt. A FXIII szintek PKP-t követő emelkedése szignifikánsan nagyobb volt azoknál a betegeknél, akiknél a donor szaruhártya a 18 hónapos követési periódusban beereződött.

KÖVETKEZTETÉS: A FXIII a könny-proteóma alacsony koncentrációjú, de érzékeny kemilumineszcens ELISA-val jól mérhető komponense. A tény, hogy a FXIII mennyisége PKP után megemelkedik, felveti szerepét a szaruhártya sebgyógyulásának folyamatában. Az igen magas FXIII szintek azonban összefügghetnek a transzplantátum későbbi ereződésével.

SUMMARY

BACKGROUND: Blood coagulation factor XIII is a tetramer (FXIII-A₂B₂) consisting of catalytic A (FXIII-A) and carrier/protective B (FXIII-B) subunits. Beside stabilizing fibrin and protecting it from fibrinolysis, FXIII is also involved in wound healing and angiogenesis. Its latter functions could be important in body fluids other than the blood.

AIMS OF THE STUDY: To develop highly sensitive chemiluminescent ELISAs for the measurement of FXIII subunits and their complex and using these methods to determine FXII concentrations in human tears. It was also our aim to measure FXIII concentrations in stimulated tears and in tears collected before and after penetrating keratoplasty (PKP).

METHODS: Highly sensitive chemiluminescent ELISAs were developed to measure low FXIII-A, FXIII-B and FXIII-A₂B₂ antigen concentrations in tiny volumes of tear. Tear samples were collected from 60 healthy volunteers before or after the stimulation of tear secretion. FXIII concentrations were also measured in tears of 31 patients before and after PKP.

RESULTS: For all three assays the limit of quantitation was below 0.02 µg/L, within laboratory imprecision did not exceed 12% even at low concentrations, within run imprecision was under 5.5%. The recovery of the FXIII subunits and complex was close to 100% in the assays. The calibration curves showed an excellent fitting using second order polynomial equation. In non-stimulated tears from healthy volunteers a low, but consistent amount of FXIII-A and FXIII-B was measured, mostly in free uncomplexed form. Following stimulation of tear secretion, FXIII levels moderately decreased, but if normalized to total protein concentration they did not change. 24 hours after PKP FXIII-A, FXIII-B and FXIII-A₂B₂ levels became highly elevated (10.4-fold, 9.4-fold and 20.5-fold, respectively). FXIII levels normalized to total protein concentrations showed even higher elevations. After the first day,

FXIII concentrations gradually decreased, but even on day 7 significantly exceeded pre-surgery levels. The elevation of tear FXIII levels was significantly higher in PKP patients who later developed neovascularization of donor cornea during the 18 months follow-up period than in PKP patients whose cornea remained transparent.

CONCLUSIONS: FXIII-A and FXIII-B are low concentration components of tear proteome, but it can be measured with our hypersensitive chemiluminescent ELISA methods. The fact that their levels become highly elevated after PKP suggests the involvement of FXIII in the healing of corneal wound. However, perioperatively measured high FXIII levels in tears seem to represent a risk of neovascularization.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A XIII-as véralvadási faktorról (FXIII) kapcsolatos rövidítések: AP-FXIII, FXIII aktivációs peptid; cFXIII, celluláris FXIII; FXIIIa, aktív FXIII; FXIII-A, FXIII A alegység; FXIII-A₂, FXIII-A dimer; FXIII-A₂', trunkált FXIII-A dimer; FXIII-A₂*, a FXIII aktív konformációja; FXIII-A₂B₂, plazma FXIII komplex; FXIII-B, FXIII B alegység; pFXIII, plazma FXIII.

Egyéb rövidítések: α_2 -PI, α_2 -plazmin inhibitor; CV, variációs koefficiens (coefficient of variation); BSA, bovin szérum albumin; ECM, extracelluláris mátrix; Egr-1, korai növekedési válasz-1 (early growth response-1) fehérje; ELISA, enzimhez kötött immunoszorbens assay (enzyme-linked immunosorbent assay); ERK, extracelluláris szignál regulálta kináz; GP, glikoprotein; HRPO, torma peroxidáz (horseradish peroxidase); HUVEC, humán umbilikális endothelsejt (human umbilical endothelial cell); K_d, egyensúlyi állandó; mRNS, hírvivő (messenger) ribonukleinsav; PAI-2, plazminogén aktivátor inhibitor-2; PKP, perforáló keratoplasztika; SE, standard hiba (error); TG, transzglutamináz; TSP-1, trombospondin-1; VEGF, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor); VEGFR2, VEGF receptor-2.

BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A XIII-as véralvadási faktor (FXIII), korábbi nevén Laki-Lóránd faktor, a fibrin mechanikai stabilizálásáért felelős faktor, s egyben a fibrinolízis egyik fő regulátora [1]. Az első kutatók, – Laki és Lóránd [2-4] – akik megfigyelték ezt a termolabilis, nem dializálható szérumfehérjét, fibrin stabilizáló faktornak hívták. A Nemzetközi Nomenklatura Bizottság mintegy másfél évtizeddel később – az első fibrin stabilizáló faktor hiányos vérzékeny betegről szóló közlés után – ismerte el véralvadási faktornak. A plazmában heterotetramer szerkezetű (FXIII-A₂B₂) zimogén formában (pFXIII) kering [1, 5, 6], mely két potenciálisan aktív katalitikus A alegységből (FXIII-A) és két hordozó/gátló B alegységből (FXIII-B) áll.

A FXIII-A alegység egy pro-transzglutamináz, a transzglutaminázok (TG) családjába tartozik. A TG-ok családjának minden tagja monomer, a FXIII-A azonban dimer szerkezetű (FXIII-A₂). A 83 kDa molekula tömegű FXIII-A négy fő strukturális domént tartalmaz: β -szendvics, katalitikus régió, β -hordó 1, β -hordó 2. Ezen kívül a molekula N terminális végén egy 37 aminosavból álló aktivációs peptid (AP-FXIII) található, melyet a véralvadás aktivációja során a trombin hasít le. Az A alegység dimerként egyes sejtek citoplazmájában önmagában is megtalálható, ez az úgynevezett celluláris XIII-as faktor (cFXIII). A cFXIII a vérlemezkékben igen nagy mennyiségben található meg [7, 8], koncentrációja a vérlemezke citoplazmájában a plazmakoncentráció 100-150-szerese. A megakariocyták szintetizálják és az újonnan képződő vérlemezkékbe csomagolják a FXIII-A-t [9-11]. Már e sejtek prekursorai is expresszálják [12]. A vérlemezkék mellett a monocytákban [13], csontvelői prekursoraikban [12] és a belőlük származó macrophagokban is megtalálható a FXIII-A. A FXIII-A-t jónéhány monocyta eredetű macrophagban kimutatták, mint például savós üregek macrophagjaiban, alveoláris, tumor-asszociált macrophagokban, nyirokcsomók dendritikus sejtjeiben, kötőszöveti histiocytákban, perivaszkuláris dendritikus macrophagokban, dermális

dendrocytákban, stb. [5, 10]. E sejtekben a FXIII-A szintén citoplazmatikus lokalizációjú, bár macrophaggá differenciálódás során a nucleusból is megjelenik [14]. Ezen kívül a FXIII-A kimutatható chondrocytákban, osteoblastokban és osteocytyákban is [15]. Friss kutatási eredmények szerint egy bronchiális epitheliális sejtvonal is képes a FXIII-A termelésére és szekretálására [16].

A FXIII-B alegység egy kb. 80 kDa-os molekulatömegű glikoprotein (GP), mely tíz rövid diszulfid hidakkal stabilizált ismétlődő szakaszból, úgynevezett sushi-doménekből áll, tipikus mozaik protein. A hepatocytái szintetizálják és szekretálják [17-19]. Ellentétben a FXIII-A-val a plazmában feleslegben található, 50%-a szabadon kering [20]. Egymásnak ellentmondó eredményeket közöltek azzal kapcsolatban, hogy a plazmában lévő szabad FXIII-B monomer [21], vagy dimer [22] formában van-e.

Csontvelő és májtranszplantáció utáni állapotok bizonyították, hogy a FXIII komplexben lévő FXIII-A alegység csontvelői eredetű sejtekből származik [23, 24], de a szintézist a csontvelői funkciók károsodása esetén más, eddig nem pontosan azonosított sejtípusok átvehetik [25, 26]. A plazmában lévő FXIII-B alegység kizárólagosan máj eredetű. A különböző sejtekből származó alegységek a vérben tetramer szerkezetű komplexet képeznek. A FXIII-A₂B₂ referencia tartománya plazmában 14-28 mg/L [27], gyakorlatilag teljes mértékben fibrinogénnal kötött állapotban található ($K_d \sim 10^{-8}$ mol/L), a kötődés Ca^{2+} jelenlététől független [28-30]. A plazma fibrinogén 15%-át kitevő fibrinogén 2 ($\gamma A\gamma'$ fibrinogén) γ' lánc a FXIII fő kötőhelye, mely kötődés a FXIII-B-n keresztül jön létre [31, 32].

A pFXIII-at a véralvadási kaskád utolsó lépésében a thrombin és a Ca^{2+} aktiválja. A reakció első lépésében a thrombin lehasítja az aktivációs peptidet (AP-FXIII) a FXIII-A alegység N terminális végéről. A FXIII-A₂ felszínén lévő Ca^{2+} kötő helyek, melyek közül egy szorosán köti a Ca-ot ($K_d = 0,1$ mM) [33] - szintén nélkülözhetetlenek az aktivációhoz, Ca^{2+}

jelenlétében a gátló B alegységek disszociálnak. Ez az előfeltétele, hogy a trunkált FXIII-A dimer (FXIII-A₂') felvehesse az aktív konformációt (FXIII-A₂*), mely lépés szintén Ca²⁺ igényes folyamat. A képződő aktív transzglutamináz akkor is teljes enzimaktivitású, ha csak egy AP-FXIII szabadul fel [34]. A polimerizálódó fibrin jelenléte a pFXIII aktivációját körülbelül 100-szorosával gyorsítja [28, 35-38]. Az aktiváció az újonnan képződő fibrinszálak felszínén megy végbe, az aktivált molekula továbbra is kötődik szubsztrátjához [39], míg a disszociációt követően a FXIII-B leválik a fibrinről. A pFXIII két típusú alegysége extrém magas Ca²⁺ koncentrációk esetén is disszociálhat és így nem proteolitikus módon is aktiválódhat [40, 41]. Extracelluláris körülmények között a cFXIII Ca²⁺ és thrombin jelenlétében a pFXIII-hoz hasonló módon aktiválódhat, itt azonban értelemszerűen a FXIII-B leválása elmarad. A cFXIII nem proteolitikus aktivációja alacsony Ca²⁺ koncentrációnál is végbemehet, és bizonyították, hogy intracelluláris környezetben (pl. trombocytákban) az aktiváció nem proteolitikus hatásra következik be, az emelkedett intracelluláris Ca²⁺ elegendő a cFXIII aktiválásához [42, 43].

A FXIIIa egy transzglutamináz (protein-glutamin: amin γ -glutamiltranszferáz; EC 2.3.2.13). A többi aktív TG-hoz hasonlóan acil-transzfer reakciót katalizál, mely során egy primér amin kötődik egy peptidben lévő glutamin oldalláncához. Amennyiben a primér amin egy peptidben lévő lizin oldallánc ϵ -amino csoportja, a két peptidlánc között $\epsilon(\gamma$ -glutamil)lizil keresztkötés (un. izopeptid kötés) képződik [44, 45]. A FXIIIa elsődleges szubsztrátjai a fibrin és az α_2 -plazmin inhibitor (α_2 -PI) [46, 47]. A fibrin keresztkötése során igen gyorsan γ -lánc dimerek és α -lánc- α_2 -PI heterodimerek képződnek, az α -lánc polimerizációja lényegesen lassabban megy végbe. Emellett 23 további FXIIIa szubsztrátot írtak már le, melyek között vannak véralvadási faktorok (pl. V-ös faktor), a fibrinolitikus rendszer tagjai (pl. lipoprotein (a), plazminogén), adhézis és extracelluláris mátrix fehérjék (pl. thrombospondin,

vitronectin, fibronectin), intracelluláris citoskeletáris fehérjék (pl. actin, miosin) és mások (pl. α -2 macroglobulin).

A FXIIIa a keresztkötésekkel mechanikusan erősebb, nyíróhatásnak jobban ellenálló szerkezetű alvadékot képez és meggátolja az újonnan képződött fibrinnek az alvadással párhuzamosan aktiválódó fibrinolízis által történő gyors degradációját. A FXIII tehát védi az újonnan képződött fibrint a degradációtól, a fibrin keresztkötés és az α_2 -PI - fibrin keresztkötés fokozza az endogén és szöveti plazminogén aktivátor által indukált fibrinolízis elleni rezisztenciát [48]. A túlzott mértékben keresztkötött fibrinláncok, illetve az egyéb proteinek és a fibrinláncok között történő keresztkötés azonban a thrombus nemkívánatos hosszú idejű perzisztálásához vezethet [49, 50]. A FXIIIa-nak eddig nem sikerült inhibitorát kimutatni a plazmában. Az intézetünkben közölt eredmények szerint a fibrinalvadékban megjelenő és aktiválódó polimorfonukleáris granulocyta által szekretált proteolitikus enzimek (pl. elasztáz, katepszin-G, matrix metalloproteáz-9) degradálják az inaktivált FXIIIa-t [51]. Ez a folyamat a kezdeti fázisban nem gátolja a fibrin keresztkötését, azonban megakadályozhatja a túlzottan keresztkötött thrombus képződését és ezzel segítheti a fibrin eliminációját, amikor arra már nincs szükség [52].

A FXIII hiánya súlyos vérzési rendellenességhez vezet [53, 54], mely nők esetében korai ismétlődő vetéléssel és a betegek jelentős százalékában a sebgyógyulás rendellenességeivel párosul [53, 55, 56]. Autoszómális recesszíven öröklődik, jellegzetes tünete csecsemőkorban a késleltetett köldök vérzés. Gyakoriak az intracraniális, intramusculáris és subcután vérzések.

A FXIII esszenciális szerepét a sebgyógyulásban transzgén egerekben is bizonyították. FXIII-A knock-out egerek sebgyógyulási ideje nagymértékben megnyúlt, mely inkomplett re-epithelizációval, perzisztáló necrotizáló sebbel és abnormális hegképződéssel járt, FXIII-A szubsztitúció esetén a gyógyulási folyamat rendben végbement [57]. A helyileg alkalmazott

kezelés FXIII koncentráttal krónikus vénás lábszárfekélyben jótékony hatásának bizonyult [58-61]. Egyes posztoperatív állapotokban is megfigyelték a sebészi sebek gyógyulására gyakorolt előnyös hatást FXIII koncentráttal adása esetén [62-64]. Gyulladásos bélbetegségekben, – mint a colitis ulcerosa vagy a Crohn betegség – ahol nagyobb a FXIII veszteség és felhasználás a gyulladt szövetekben, a szubsztitúció szintén javította a gyógyulási hajlamot [65-67].

A sebgyógyulás fő lépései a fibrin-háló kialakulása, macrophag invázió, fibroblast migráció és proliferáció, extracelluláris mátrix (ECM) képződése és angiogenezis. A FXIII ebben a folyamatban az ECM proteinek keresztkötésével, endothel sejtekre, fibroblastokra és macrophagokra kifejtett hatásával vesz részt (Muszbek et al. accepted. Phys Rev). A FXIIIa a bőr fibroblastjaihoz kötődve fokozza azok migrációját, csökkenti apoptózisukat, monocyták és epithel sejtek proliferációját, migrációját is fokozza, apoptózisukat szintén gátolja [68-70]. Ezen hatások a thrombospondin-1 (TSP-1) down-regulációján és a c-Jun valamint Egr-1 up-regulációján keresztül mennek végbe. Az alternatív útvonalon, például interleukin-4 által aktiválódott monocyták és macrophagok nagymértékben növelik a FXIII-A expressziót [71], emellett a cFXIII szerepet játszik a monocyták által végzett receptor mediált phagocytosisban is [10, 72]. Mivel az apoptotikus sejtek és sejttörmelékek eltávolítása a sebgyógyulás fontos lépése, a FXIII-A deficiens betegek monocytáinak és macrophagjainak csökkent fagocytózisa szintén hozzájárulhat a sebgyógyulás defektusához.

A FXIII szerepe a sebgyógyulásban részben proangiogenikus hatásának is köszönhető. Az érújdonképződés komplex lépések együttese, a sebgyógyulástól a tumor növekedésig igen sok patofiziológiai folyamatban játszik lényeges szerepet. A FXIII részt vehet az endothelsejt-vérlemezke kapcsolat kialakításában [73], aktív formájában pedig fokozza a humán umbilikális endothelsejtek (HUVEC) migrációját, csökkenti apoptózisukat [68]. A FXIIIa nem hat a vasculáris endotheliális növekedési faktor (VEGF) szekréciójára, sem a

VEGF fehérje szintjét, sem pedig a VEGF receptor-2 (VEGFR2) messenger ribonukleinsav (mRNS) szinteket nem befolyásolja. Ezzel szemben a sejtekben a thrombospondin-1 (TSP-1) mRNS szinte teljes eltűnését indukálja, és jelentősen csökkenti a TSP-1 szintjét a tápfolyadékban. A TSP-1 egy multifunkcionális, homotetramer szerkezetű glycoprotein, mely endothel sejtek proliferációjának, migrációjának gátlásával és apoptózisuk indukálásával gátolja az angiogenesisist [74-76]. A FXIII szerepét az angiogenesisben állatmodellekben is bizonyították: FXIII knock-out egerekben az érújdonképződés mértéke elmarad a normál társaikhoz képest [77]. Nyulakon a FXIIIa injekciója a cornea subepitheliális rétegébe 36 órán belül gazdag kapilláris hálózat létrejöttét indukálta, emellett a kezelés hatására a szaruhártya keratocytaiból és a stroma szálcsaiból eltűnt a TSP-1 [68]. Úgy tűnik tehát, hogy a FXIII proangiogén hatását legalábbis részben a TSP-1 down-regulációján keresztül fejti ki. A biokémiai mechanizmus, mellyel a FXIIIa érújdonképződést indukál, részben tisztázott: vitronectin receptorhoz kötődve keresztbe köti azt a VEGFR2-vel [69], így az Akt apoptózist reguláló fehérje és az ERK kináz foszforilációjához és aktivációjához, valamint a c-Jun és Egr-1 transzkripciós faktorok up-regulációjához vezet. Az Akt kináz az inzulin-szerű növekedési faktorok által mediált sejt-túlélést, az Egr-1 mediált útvonal a sejt proliferációt segíti, a c-Jun over-expressziója pedig a TSP-1 down-regulációjához kapcsolható [69, 77]. Mindezek alapján a FXIII koncentrátum helyi alkalmazása az angiogenesis elősegítésével támogatja a rossz regenerációs hajlamot mutató sebek gyorsabb begyógyulását, míg a FXIIIa által indukált érújdonképződés gátlásával az antitumor terápiában nyílnak új lehetőségeink.

Bár a FXIII extravasculáris terekben is kifejti hatását, megjelenéséről plazmán kívüli folyadékterekben keveset tudunk. Intézetünkben bronchoalveoláris mosófolyadékban vizsgálták a FXIII megjelenését. Kimutatták, hogy normál esetben az alveoláris felszíni folyadékrétegben csak cFXIII található, gyulladásos bronchoalveoláris megbetegedésekben

azonban az alveoláris felszíni folyadékrétegben megjelenik a pFXIII is, a cFXIII mennyisége pedig szignifikánsan emelkedik [78]. Intézetünkben egy másik extracelluláris folyadéktérben, liquorban is kimutatták a FXIII-at [79]. A FXIII megjelenését könnyben korábban nem vizsgálták, az irodalomban egyetlen ilyen témájú közleményt sem találtunk. Tekintettel arra, hogy a fibrinolízisnek komoly szerepe van a könny homeostasisában, feltételeztük, hogy a FXIII is megtalálható a könnyben, s szerepe lehet a könny fiziopatológiás folyamataiban.

Normál körülmények között a szaruhártyának nincs vérellátása, így nincs közvetlen kapcsolatban a vérrel, bár a fibrinogén és a fibrinolitikus rendszer egyes komponensei megjelennek a könnyben, és egyensúlyi helyzetük megtartása fontosnak tűnik a könny homeostasisának megtartásában. Az egyik ilyen fontos szereplő a plazminogén, mely a fibrinolitikus enzim, a plazmin proenzime. A plazminogén deficiencia fő klinikai tünete egy súlyos látásromlást okozó szembetegség, a conjunctivitis lignosa, mely fibringazdag álhártya képződésével jár a tarzális kötőhártya felszínén, ezzel fekélyek kialakulásához és a corneális epithelium hiperplastikus elváltozásához vezet [80, 81]. Azon transzgén egerekben, melyekben a plazminogén gén hiányzik, az emberi megbetegedéshez megjelenésben és szövettanilag igen hasonló conjunctivális elváltozások láthatók [82]. Nagyon valószínű, hogy plazminogén hiánya, így következetesen az aktív formája - a fő fibrinolitikus enzim - plazmin hiánya nem megfelelő fibrin-eliminálódást, és így pseudomembrán képződést eredményez. Ismert, hogy a kötőhártya és a szaruhártya epithel sejtjei plazminogén aktivátorokat termelnek, melyek szintén megjelennek a könnyben [83-86]. A plazminogén aktivátor inhibitor-2 (PAI-2) is kimutatható az egészséges humán corneális epitheliumban [87] és normál könnyben [88]. A szaruhártya sebgyógyulása plazminogén hiányos egerekben nem megfelelő, súlyos gyulladásos válasszal, retrocorneális fibrin depositumok lerakódásával, corneális hegszövet képződéssel és gyakran stromális neovaszkuarizációval jár [89]. Kombinált fibrinogén és plazminogén hiányos egerekben azonban a szaruhártya

sebggyógyulása normális. A fibrin(ogén) lerakódás és a fibrinolitikus rendszer egyensúlya fontos szerepet játszik a corneális homeostasis megtartásában, a FXIII szabályzó hatása ebben a mechanizmusban még nem ismert.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Mivel a FXIII a vérárvadáson kívül hatását extravasculáris folyadékterekben is kifejti, bizonyítottan szerepe van a sebgyógyulásban és az érújdonképződésben, kíváncsiak voltunk, hogy a stimulált és nem stimulált körülmények között nyert könnyben megjelenik-e, s ha igen milyen koncentrációban.
2. Mivel a gyűjthető könnyminták térfogata igen limitált, és előkísérleteink szerint a benne lévő FXIII komplex és alegységek mennyisége töredéke a plazmában található, a plazma FXIII koncentrációk mérésére alkalmas módszerek nem elég érzékenyek a könny FXIII tartalmának a meghatározásához. Ezért célunk volt olyan hiperérzékeny enzimhez kötött immunoszorbens módszerek (ELISA) fejlesztése és evaluálása melyek segítségével biztonsággal meghatározható a FXIII-A, FXIII-B és FXIII-A₂B₂ koncentrációja emberi könnyben.
3. A könny a plazmán kívüli folyadékterek között is különleges, hiszen a saját vérellátással nem rendelkező szaruhártyát táplálja és védi, ezért a könnyben megjelenő FXIII különös fontosságú lehet a lokális sebgyógyulás és érújdonképződés szempontjából. Célkitűzéseink között szerepelt megvizsgálni, hogyan változnak a FXIII szintek könnyben perforáló keratoplasztika (PKP) utáni állapotokban és e változások hatással vannak-e a donor szaruhártya későbbi állapotára, illetve a transzplantáció sikerességét befolyásoló tényezők-e.

BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgált betegek

A vizsgálatainkba 60 egészséges egyént vontunk be: 21 nőt és 39 férfit, medián életkoruk 28 év (interkvartilis tartomány: 24-47 év). Egyiküknek sem volt gyulladt vagy sérült a szeme, nem használtak semmilyen szemcseppet, műkönnyet, nem hordtak kontaktlencsét. Az allergiás és száraz szemű egyéneket kizártuk a vizsgálatból. Ezekről az önkéntesektől stimulált és nem stimulált könnymintákat gyűjtöttünk, a könny FXIII-A, FXIII-B, FXIII-A₂B₂ valamint totál protein koncentrációjának a meghatározására. A totál protein mennyiséget minden könnymintából lemértük, azonban néhány könnymintából a nyert minta kis térfogata miatt csak két FXIII paramétert tudtunk meghatározni. Így a vizsgált mintaszám FXIII-A esetében 52, FXIII-B és FXIII-A₂B₂ esetében 50-50 volt. Ezen alcsoportokban a férfi:nő arány 33:19, 32:18, illetve 31:19 volt, az átlagéletkorok és az interkvartilis tartományok megegyeztek a teljes csoportéval.

A Debreceni Egyetem Szemészeti Klinikáján 31 perforáló keratoplasztika műtéten átesett egyén könnymintáiból is elvégeztük a FXIII meghatározásokat. Ebben a csoportban a férfi:nő arány 14:17, átlagéletkoruk 64 év (interkvartilis tartomány: 49-75 év). 17 esetben bullosus keratopathia, 5 egyénnél szemet ért sérülés utáni heges gyógyulás, 5 beteg esetében szaruhártya disztrófia, 3 betegnél corneális fekély, 1 esetben pedig keratoconus miatt volt szükség a szaruhártya-transzplantációra. A 31 egyén közül 11 esetben az átültetés ismételt keratoplasztika műtétet jelentett. Az átültetést követően a betegek egy hétig a klinikán tartózkodtak, bennfekvésük ideje alatt egyiküknél sem jelentkezett korai kilökődési reakció. Közülük 23 egyént tudtunk 18 hónapig rendszeresen követni. A váratlan események kivételével a betegek a műtét után 1 és 3 hónappal, majd 3 havonta jelentek meg ellenőrzésen,

melyek alkalmával az általános szemészeti állapotukat regisztráltuk, figyelmet fordítva a donor cornea ereződésére-erezettségére.

A kutatást a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával végeztük. A vizsgálat teljes mértékben megfelel a Helsinkai Deklaráció etikai elveinek, minden egyén tájékozott beleegyezését adta a vizsgálatban való részvételhez.

Könnyminták gyűjtése

A könnymintákat atraumatikus módon üvegapilláris csövekbe gyűjtöttük. A mintavétel helyi érzéstelenítés nélkül az alsó laterális könnymeniscusból történt, reggel 7 és 8 között. A könnymintákat minden esetben 1 percig gyűjtöttük. Tapasztalataink szerint összesen 8,5 µL egészséges, nem stimulált könnyre volt szükség a FXIII-A, FXIII-B, FXIII-A₂B₂ és totál protein koncentrációk biztonságos meghatározásához. A betegektől származó minták esetében a FXIII komplex és alegységek koncentrációi magasabbak voltak, ezekben az esetekben akár 4 µL könny is elég lehet meghatározások elvégzéséhez.

Az egészséges egyénektől mindkét szemből gyűjtöttünk mintát, szükség esetén a könnymintavételt fél óra pihenés után megismételtük. A levett mintákat alacsony fehérje kötésű –LoBind- csövekben (Eppendorf, Hamburg, Germany) +4 °C-on tároltuk legfeljebb 5 napig, míg a fenti méréseket elvégeztük. Előkísérleteinkben kimutattuk, hogy a könny vizsgált alkotóelemeinek a koncentrációja legalább 10 napig nem változik. A könnymintákat hígítatlanul, stabilizáló nélkül, +4 °C-on tárolva az eredetileg mért FXIII-A, FXIII-B és FXIII-A₂B₂ koncentrációk 99,4%-át, 98,5%-át és 98,5%-át mértük vissza 10 nap elteltevel.

Az egészséges önkéntesektől stimulált könnymintát is gyűjtöttünk, a stimulációt 80%-os ethanol orrba cseppentésével végeztük [90]. Mivel az egészségesek könnymintáiban elővizsgálataink során nem találtunk sejtes elemeket, ezeket a könnyeket nem centrifugáltuk.

A keratoplasztikán átesett egyénektől a minták gyűjtése az egészségesekhez hasonlóan történt, etil-alkoholos stimulációt esetükben nem alkalmaztunk. A transzplantált betegeknél éretelemszerűen csak az érintett szemből gyűjtöttünk könnymintát. A mintavételt a műtét előtt és a műtét után 1., 2., 4., 7. nappal a reggeli lokális terápia (steroid és neomycin cseppek) alkalmazása előtt, valamint az ellenőrző vizsgálatok alkalmával végeztük. Utóbbi esetekben a betegek könnymintáját lecentrifugáltuk, hogy eltávolítsuk a sejtes elemeket és a sejttörmeléket, és a felülúszót használtuk a meghatározásokhoz.

Laboratóriumi módszerek

A könny total protein koncentrációjának mérését 1 μ L, fiziológiás sóval 20x-osra hígított mintából bicinchoninsavas meghatározással (bicinchoninic acid protein assay; BCA módszer) végeztük (BCA Protein Assay Reagent, Thermo Scientific, Rockford, IL). A kalibrációs sor elkészítéséhez bovin szérum albumint (BSA) használtunk.

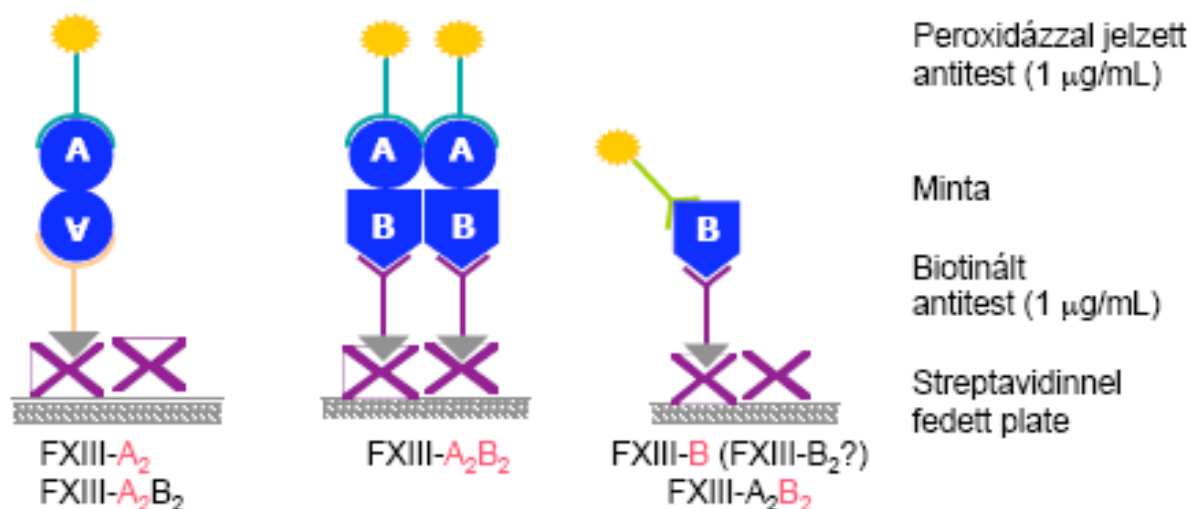
A könnyben lévő FXIII alegységek és komplex meghatározásához a plazmában lévő FXIII kimutatására alkalmas, laboratóriumunkban korábban kifejlesztett ELISA módszerek antitestjeit alkalmaztuk [27, 91]. A FXIII-A₂B₂ meghatározására biotinált monoklonális FXIII-B alegység ellenes elfogó antitestet és torna-peroxidázzal (HRPO) jelölt monoklonális FXIII-A alegység ellenes detektáló antitestet használtunk. Hasonlóképpen biotinált elfogó és HRPO-val jelzett detektáló monoklonális antitesteket alkalmaztunk a FXIII-A illetve FXIII-B mérésére szolgáló módszereknél is. A FXIII-A és FXIII-B mérésére szolgáló módszerek esetében az elfogó és detektáló antitestek az antigén molekulák különböző epitópjai ellen

irányultak. Ezek az antitestek mind a szabad, mind a komplexben lévő FXIII alegységet felismerik, vagyis méréseink során a totál FXIII-A és FXIII-B koncentrációkat határoztuk meg.

Mivel a könnyben a FXIII koncentrációja igen alacsony, és a rendelkezésünkre álló minta mennyisége is limitált, hiperszenzitív chemilumineszcens micro-ELISA módszereket fejlesztettünk ki. Az érzékenység növekedését egyrészt Lumigen PS-atto (Lumigen, Southfield, MI) peroxidáz szubsztrát alkalmazásával, másrészt a reakció-térfogat csökkentésével 384 lyukú streptavidin-fedett mikrolemezeket (Greiner, Frickenhausen, Germany) használva érték el. A reakció elve és menete mindhárom ELISA (FXIII-A, FXIII-B, FXIII-A₂B₂) esetében megegyező (lásd 1. ábra).

1. ábra:

ELISA módszerrel történő pFXIII és FXIII alegység meghatározások elve:

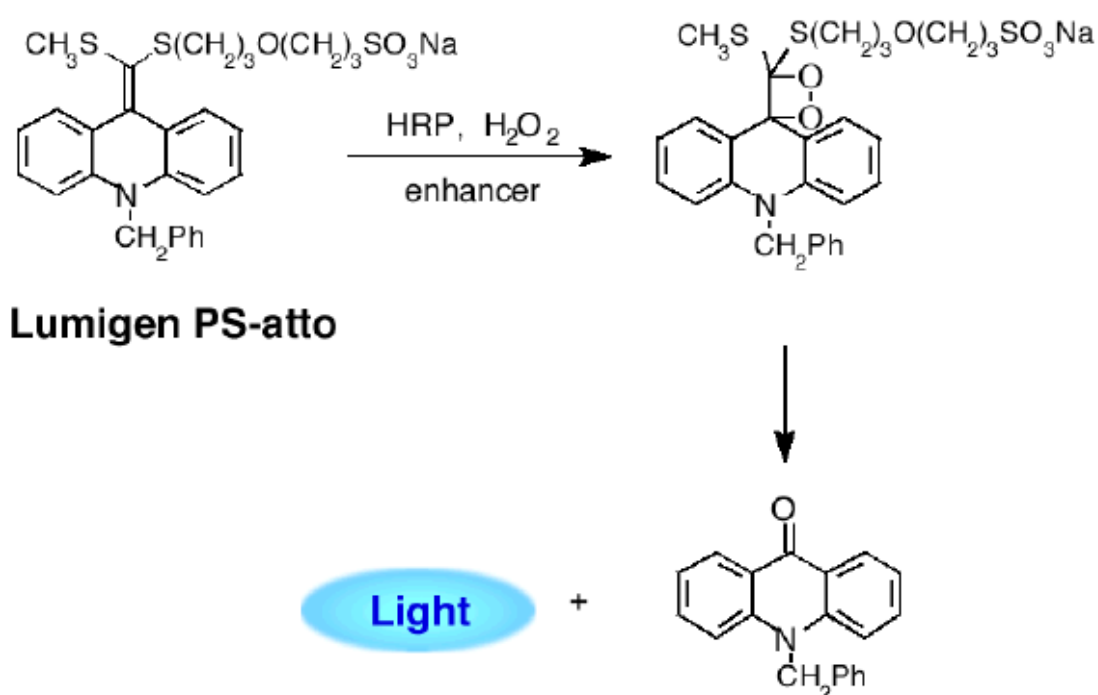


Elővizsgálataink tapasztalatai alapján a következő módon hajtottuk végre a reakciókat: 50 µL 1 µg/mL-es koncentrációjúra hígított biotinált elfogó antitestet 1 órán át szobahőn inkubáltunk streptavidinnel fedett mikrolemezben. A hígító puffer 0,5 mol/L NaCl-ot, 5 mg/mL BSA-t, 0,5 g/L Tween 20-at, 15 mmol/mL-es foszfát puffert tartalmazott, pH-ja 7,2

volt. Az inkubációs idő leteltével 5x alaposan mostuk a mikrolemezt. A mosó puffer 0,5 mol/L NaCl-ot, 0.5 g/L Tween 20-at, 15 mmol/mL-es foszfát puffert tartalmazott, pH-ja 7,2 volt. A lemezbe ezután 2,5 µL, hígító pufferrel 50 µL-re hígított könnymintát mértünk, és 1 órán át inkubáltuk. Újabb alapos mosások (5x) után 50 µL hígító pufferrel 0,5 µg/mL-es koncentrációjúra hígított HRPO jelzett detektáló antitestet pipettáztunk a mikrolemezbe. Ismét 1 óra inkubálást ötszöri alapos mosás követett, majd 50 µL a forgalmazó utasításainak megfelelően elkészített – a szobahőmérsékletű szubsztrát két komponensét egyenlő arányban összemért, fényérzékenysége miatt sötétben tartott – Lumigen PS-atto peroxidáz szubsztrátot pipettáztunk a mikrolemezbe. A szubsztrát reakció az 2. ábrán látható.

2. ábra:

A Lumigen PS-atto szubsztrát reakciója:



A kemilumineszcens jelet 5 percen belül Infinite M200 (Tecan, Mannedorf, Switzerland) microlemez leolvasóval (microplate reader) mértük. A kalibrációs görbék elkészítéséhez REA-clot referencia plazma N (Reanal, Budapest, Hungary) hígító pufferrel készített különböző hígításait használtuk. A referencia plazma megadott FXIII-A₂B₂ és FXIII-A koncentrációját (20,84 mg/L és 10,63 mg/L) a WHO nemzetközi standard plazmával - WHO International Standard, Blood Coagulation Factor XIII, Plasma, Human (National Institute for Biological Standards and Control, Potters bar, UK), míg FXIII-B tartalmát (19,04 mg/L) laboratóriumunkban preparált tisztított FXIII-B alegységgel végzett kalibrációval határoztuk meg [92, 93].

A módszerek jellemzése

A kis térfogat miatt kevert gyűjtött minták mennyisége sem lett volna elegendő a módszerek pontatlanságának ellenőrzéséhez, így könnyminta helyett a referencia plazma különböző hígításait használtuk a FXIII komplex és alegységek meghatározására alkalmas hiperszenzitív kemilumineszcens ELISA módszerek analitikai jellemzéséhez. A reprodukálhatósági vizsgálatokat a The National Committee for Clinical Laboratory Standard (jelenleg Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI, Wayne, PA) EP5-A2 irányelveinek megfelelően végeztük: 20 napig minden nap két párhuzamos méréssel meghatároztuk ugyanazon minták koncentrációját. A kimutathatósági és minimális mérési határok megállapítása a CLSI EP-17-A protokoll leírásának megfelelően történt. A kimutathatósági határok meghatározásához Linnet és Kondratovich részben nemparametrikus módszerét választottuk [94].

A visszanyerési vizsgálatokat a következőképpen végeztük: különböző koncentrációjú nagy tisztaságú FXIII-A₂-t [93], FXIII-B-t [92], vagy FXIII-A₂B₂-t [41] tartalmazó oldatot

adtunk a könnymintákhoz. A kiegészítő oldatok 90 µg/L vagy 400 µg/L FXIII-A₂-t, 210 µg/L vagy 820 µg/L FXIII-B-t illetve 150 µg/L vagy 730 µg/L FXIII-A₂B₂-t tartalmaztak hígító pufferrel hígítva. Ezeket az oldatokat 10x-esre hígítottuk kevert gyűjtött könnymintával. A kevert gyűjtött könny FXIII-A₂ koncentrációja 1,86 µg/L, FXIII-B koncentrációja 4,48 µg/L FXIII-A₂B₂ koncentrációja 0,87 µg/L volt. A visszanyerést a számított és mért hozzáadott FXIII hányadosaként százalékban fejeztük ki.

Statisztikai analízis

Az eredmények eloszlásának elemzését Kolmogorov-Smirnov és Shapiro-Wilk próbákkal végeztük. A férfiak és nők közti, valamint a keratoplasztikán átesett betegeknél a donor cornea ereződésének jelenléte és hiánya esetén mért a FXIII koncentrációk között a különbség szignifikanciáját Mann-Whitney U-tesztel számítottuk. Az egészséges önkéntesektől származó stimulált és nem stimulált könnyminták FXIII és totál protein tartalma közti különbségeket Wilcoxon féle előjeles rang próbával vizsgáltuk. Ugyanezt a tesztet használtuk a keratoplasztikán átesett egyének műtét előtt és különböző idővel a műtét után mért FXIII és totál protein mennyiségek összehasonlításakor a statisztikailag szignifikáns különbségek kiszámításához. A FXIII szintek korfüggését Pearson korrelációval vizsgáltuk. A statisztikai elemzéseket a Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 13.0, Chicago, IL) programmal végeztük.

EREDMÉNYEK

A kemilumineszcens FXIII ELISA módszerek analitikai jellemzése

A kimutathatósági határ a FXIII-A meghatározás esetében 0,014 µg/L, a FXIII-B esetében 0,019 µg/L, a FXIII-A₂B₂ esetében pedig 0,016 µg/L volt. Mivel ezeknél a koncentrációknál a mért értékek eltérései az EP-17-A CLSI protokollban megadott 25%-os hibahatár alatt voltak – FXIII-A meghatározás esetében 12,8%, FXIII-B esetében 15,8%, FXIII-A₂B₂ esetében pedig 14,3% – a minimális mérési határokat mindhárom esetben a kimutathatósági határokkal megegyezőnek tekinthetjük.

A módszerek összegzett pontatlansága – laboratóriumon belüli pontatlanság – az alacsony koncentrációk mérésénél egyik FXIII antigén assay esetében sem haladta meg a 12%-ot, a magas koncentráció-tartományokban pedig minden esetben 5,5 % alatti volt (1. táblázat).

1. táblázat:

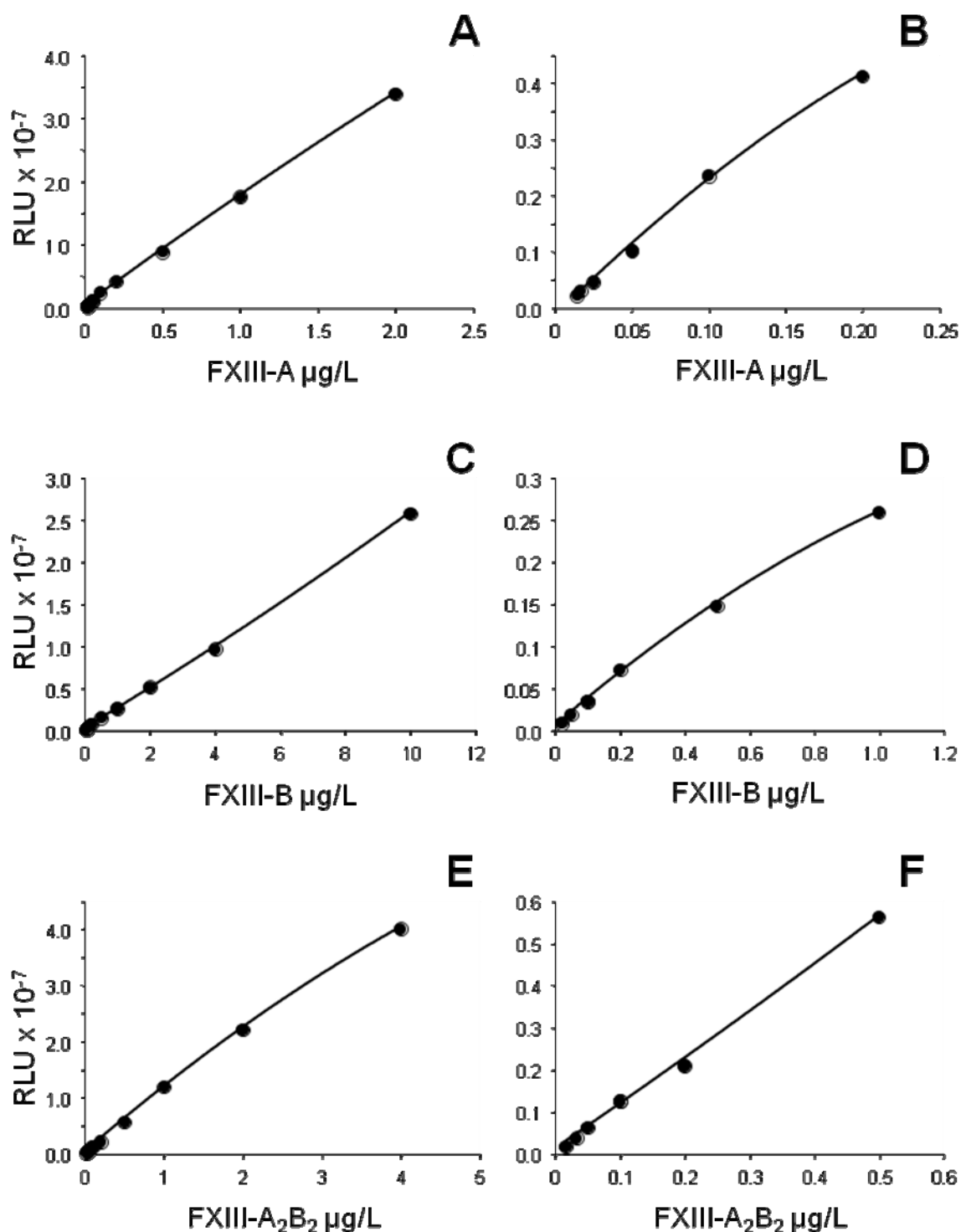
A FXIII antigéneket meghatározására kifejlesztett kemilumineszcens ELISA módszerek pontatlansága:

Variábilis	Koncentráció	Átlag (µg/L)	Sorozaton belüli CV%	Napok közti CV%	Laboratóriumon belüli CV%
FXIII-A	Alacsony	0,10	6,6	9,9	11,9
	Magas	1,01	4,4	1,9	4,8
FXIII-B	Alacsony	0,20	11,0	3,6	11,6
	Magas	2,01	4,5	2,9	5,4
FXIII-A ₂ B ₂	Alacsony	0,11	7,2	5,0	8,8
	Magas	0,98	4,5	2,2	5,0

A számításokat az EP5-A2 CLSI irányelveinek megfelelően végeztük (20 nap, naponta 2 hígításból párhuzamos mérés).

3. ábra:

A FXIII-A (A, B), FXIII-B (C, D) és FXIII-A₂B₂ (E, F) kemilumineszcens ELISA módszerek kalibrációs görbéi:



A kalibrációs görbék alacsonyabb régióit kinagyítva külön is ábráztuk (B,D,F). Az eredményeket relatív lumineszcens egységben (relative luminescence units; RLU) fejeztük ki. A kalibrációs görbéket meghatározó egyenletek és az r^2 értékek a következők: $y = -0,0645x^2 + 1,811x + 0,0124$, $r^2 = 0,9996$ (FXIII-A); $y = 0,0022x^2 + 0,2331x + 0,0139$, $r^2 = 0,9997$ (FXIII-B); $y = -0,0532x^2 + 1,2128x - 0,0051$, $r^2 = 0,9998$ (FXIII-A₂B₂).

A módszerek mérési tartománya igen széles, mindhárom esetben a minimális mérési határtól indul, FXIII-A₂ assay esetén 0,014-2,0 µg/L, a FXIII-B meghatározásnál 0,019-10,0 µg/L, a FXIII-A₂B₂ ELISA-nál pedig 0,016-4,0 µg/L (3. ábra A, C, E). Mivel a teljes mérési tartományt mutató ábrákon nehezen értékelhető a kalibrációs görbék alacsony koncentrációjú régiója, ezért ezeket a részeket kiemelve külön, nagyobb méretben is ábráztuk (3. ábra B, D, F). Az alacsonyabb mérési tartomány az egészséges könnyminták alacsony FXIII komplex és alegységek koncentrációinak meghatározásánál fontos, míg a teljes széles mérési tartomány lehetővé teszi a magas FXIII koncentrációjú betegminták mérését egyetlen hígítás elkészítésével. A megadott mérési tartományokban a másodfokú polinomiális görbék kiváló illeszkedést mutatnak, az eredmények kiszámításához ezek egyenleteit használtuk.

A visszanyerési vizsgálatok eredménye megközelítőleg 100% volt mindhárom FXIII antigént kimutató módszer esetében (2. táblázat).

2. táblázat:

A FXIII-A₂, FXIII-B and FXIII-A₂B₂ analitikai visszanyerése az egyes FXIII ELISA módszerek esetében:

Analit	Hozzáadott FXIII mennyisége (µg/L)	Visszanyerés %-ban
FXIII-A ₂	9	106
	40	106
FXIII-B	21	98
	82	107
FXIII-A ₂ B ₂	15	95
	73	95

A visszanyerést a hozzáadott FXIII vagy FXIII alegységek és a mért értékek százalékos arányában fejeztük ki.

Az anti-FXIII-A és anti-FXIII-B monoklonális antitest kombinációról, melyet a FXIII komplex kimutatására használunk, korábbi vizsgálatok bizonyították, hogy specifikus, vagyis csak a FXIII komplex mennyiségét méri [27]. Hasonlóképpen a FXIII-A meghatározást nem zavarja a FXIII-B alegység jelenléte, és a FXIII-B kimutatást nem befolyásolja a FXIII-A₂ jelenléte. A módszerek specificitását az is jól bizonyítja, hogy FXIII-A és FXIII-B immundepletált plazmamintákból nem tudtunk FXIII-A-t, FXIII-B-t, ill. FXIII-A₂B₂ komplexet sem kimutatni. Az immunabszorpcióval előállított, FXIII-A hiányos plazmát az Affinity Biologicals (Affinity Biologicals, Ancaster, Canada) cégtől szereztük be, míg az immunabszorpcióval laboratóriumunkban előállított FXIII-B plazmát Katona Éva tanárnőtől kaptuk.

FXIII alegységek és komplex egészséges egyének stimulált és nem stimulált könnymintáiban

A 3. táblázatban az egészséges egyének stimulált és nem stimulált könnyében mért FXIII-A, FXIII-B, FXIII-A₂B₂ és totál protein koncentrációk, valamint az egy perc alatt gyűjthető könny térfogata látható. A FXIII-ra vonatkozó eredményeket a totál protein koncentrációra normalizálva is megadtuk, µg FXIII komplex vagy alegység/g totál protein formában kifejezve. Az egy perc alatt könnyel szekretált FXIII mennyiséget szintén megadtuk µg FXIII komplex vagy alegység/min formában. Kolmogorov-Smirnov és Shapiro-Wilk próbával is bizonyítottuk, hogy mindhárom FXIII paraméter értékei nem-Gaussi, vagyis nem normál eloszlásúak, a hisztogramok alacsony koncentrációk irányába tolódtak el (4. ábra, 4. táblázat). Nem-stimulált, és stimulált könnyben sem találtunk korfüggést, ill. szignifikáns nemek közti különbséget a FXIII alegységek és komplex vonatkozásában.

3. táblázat

FXIII komplex és alegységek koncentrációi egészséges egyénektől származó könnymintákban, ill. az egy perc alatt szekretált FXIII komplex és alegységek mennyisége:

Analit	Egység	Nen-stimulált könny medián (IQR)	Stimulált könny medián (IQR)
FXIII-A (n=52)	μg FXIII-A/L	2,13 (1,26-3,40)	1,26 (0,71-2,14)*
	μg FXIII-A/g protein	0,29 (0,18-0,43)	0,22 (0,13-0,50)
	μg FXIII-A/min	5,58 (3,30-8,36)	24,77 (13,82-49,86)‡
FXIII-B (n=50)	μg FXIII-B/L	7,22 (3,37-11,93)	5,43 (2,04-12,65)
	μg FXIII-B/g protein	0,86 (0,63-1,20)	1,10 (0,43-1,98)
	μg FXIII-B/min	17,26 (9,95-31,66)	112,69 (34,87-253,47)‡
FXIII-A ₂ B ₂ (n=50)	μg FXIII-A ₂ B ₂ /L	0,67 (0,41-0,94)	0,42 (0,08-0,66)†
	μg FXIII-A ₂ B ₂ /g protein	0,10 (0,07-0,14)	0,08 (0,01-0,14)
	μg FXIII-A ₂ B ₂ /min	1,98 (1,23-1,98)	8,24 (1,4-15,34) ‡
Totál protein (n=60)	g/L	8,16 (5,42-11,69)	4,98 (3,88-6,50)‡
	g totál protein/min	21,58 (14,83-32,38)	107,32 (71,01-159,12)‡
Könnyszekréció (n=60)	μL/perc	3 (2-4)	21 (14-33)‡

IQR: interquartilis tartomány.

Az ugyanattól az egyéntől származó könnyből mért protein és FXIII koncentrációkat, ill. egy perc alatt mért könnyszekréció értéket használtuk a μg FXIII/g totál protein, ill. μg szekretált FXIII/min értékek kiszámításához.

* $p=0,002$, † $p=0,012$, ‡ $p<0,001$ a nem stimulált könnyben mért értékekhez viszonyítva.

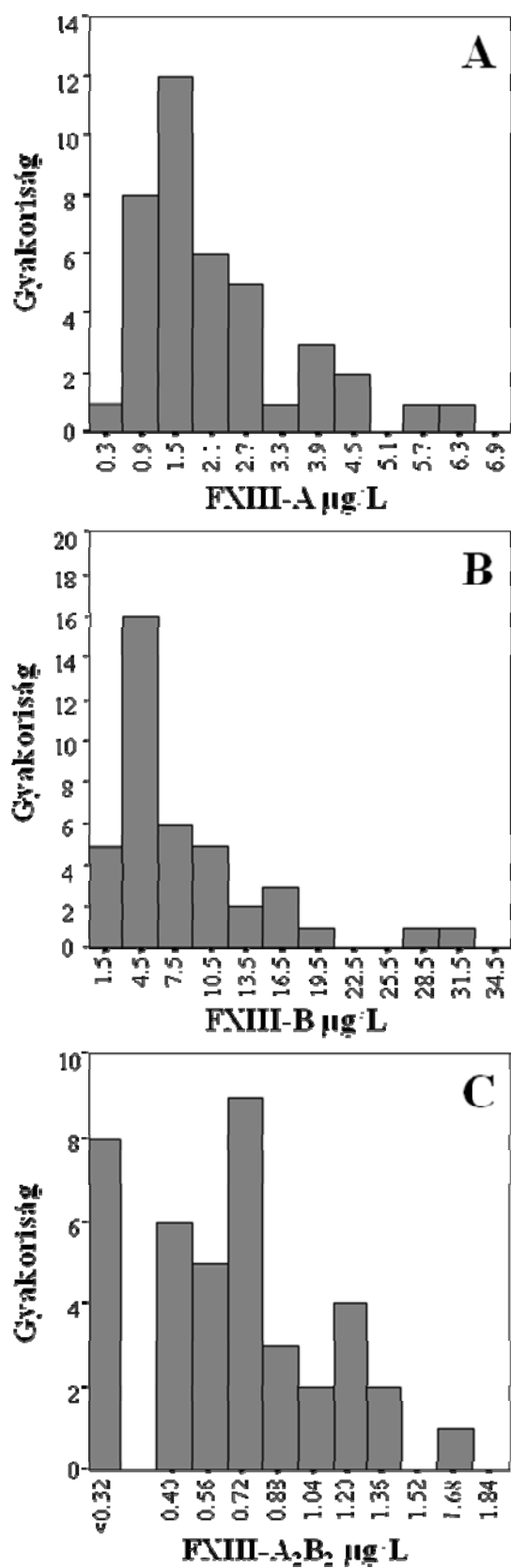
4. táblázat:

A normál eloszlás statisztikai próbáinak eredményei:

Analit	Kolmogorov-Smirnov teszt (p)	Shapiro-Wilk próba (p)
FXIII-A	0,002	0,000
FXIII-B	0,001	0,000
FXIII-A ₂ B ₂	0.008	0,000

4. ábra:

Egészséges egyének nem stimulált könnymintáiban mért FXIII-A (A), FXIII-B (B) and FXIII-A₂B₂ (C) értékek eloszlása:



A nem stimulált könnyminták alacsony térfogata arra utal, hogy a könnymintavétel nem okozta a könny szekréció jelentős stimulációját. A mintákban az általunk mért totál protein koncentrációk mind stimulált, mind nem stimulált könny esetében jól korrelálnak az irodalomban közöltekkel [90, 95].

Nem stimulált könnyben következetesen alacsony mennyiségű FXIII-A és FXIII-B alegység mérhető, a táblázatban megadott értékek $2,66 \times 10^{-11}$ mol/L FXIII-A-nak illetve $8,70 \times 10^{-11}$ mol/L FXIII-B-nek felelnek meg. A FXIII- A_2B_2 értékek mediánja igen alacsony, az esetek 16%-ában a FXIII komplex koncentrációja a minimális mérési határ alatt volt. A könnyben a FXIII alegységek csak viszonylag kis mennyisége képez komplexet az adott körülmények között, a táblázatban megadott FXIII- A_2B_2 medián értéke egyenlő $0,21 \times 10^{-11}$ mol/L-el, ami azt jelenti, hogy a mért totál FXIII-A alegységnek csak a 16% van komplex formában.

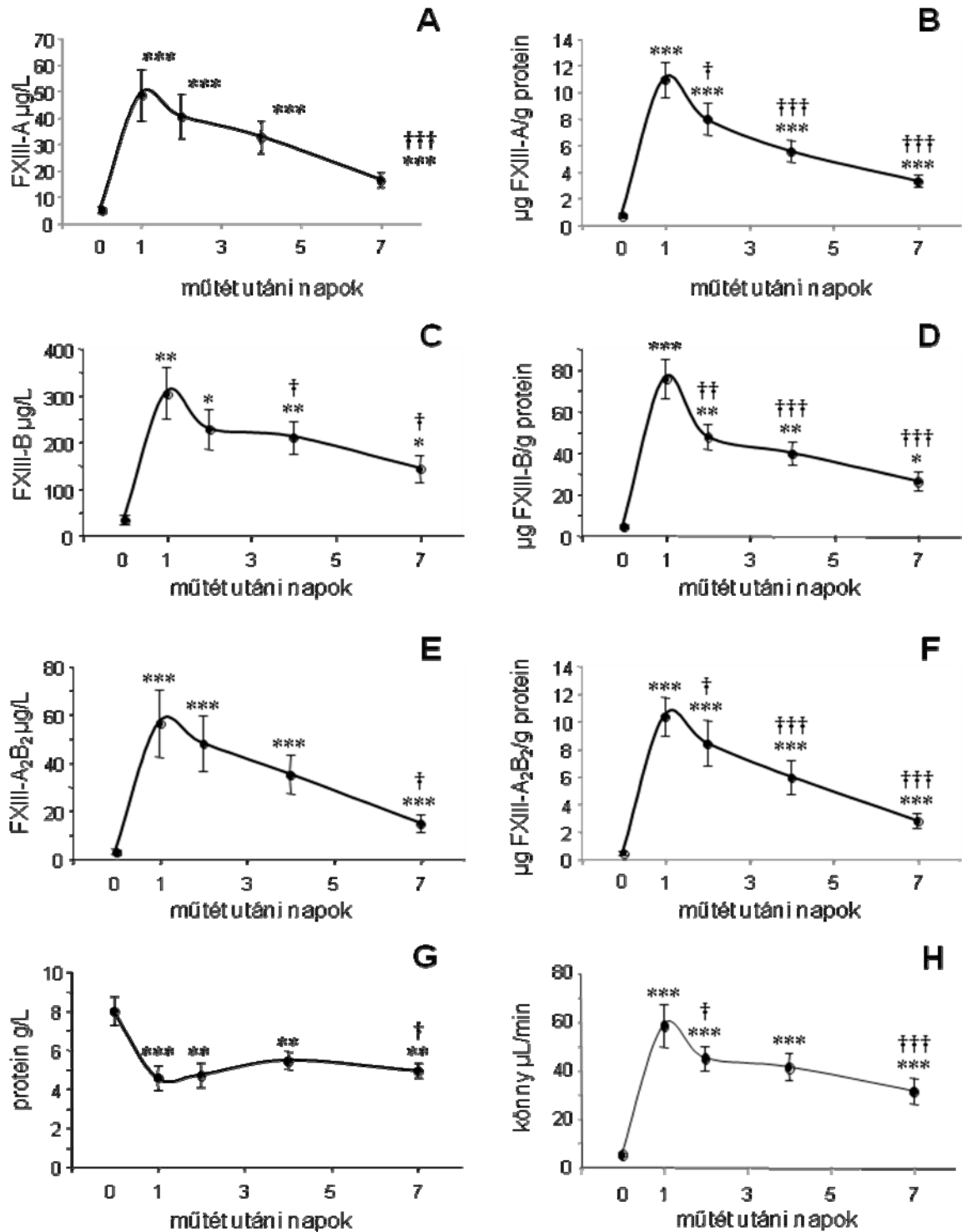
Stimulált könnyben a mért FXIII alegységek és komplex valamint a totál protein koncentrációk alacsonyabbak voltak, mint nem-stimulált könnyben, s a FXIII-B kivételével a különbségek szignifikánsnak bizonyultak (3. táblázat). A FXIII szinteket a könnyek protein tartalmára vonatkoztatva azonban nem találtunk szignifikáns különbséget a stimulált és nem stimulált könnymintákban meghatározott értékek között.

Az 5. ábrán látható a FXIII alegységek és komplex, valamint a totál protein koncentráció és könny szekréció változása könnyben PKP-t követően. A műtét előtti szintekhez képest 24 órával a transzplantációt követően a könny FXIII-A koncentrációja 10,4-szeresére (5. A ábra), FXIII-B koncentrációja 9,4-szeresére (5. C ábra) a FXIII- A_2B_2 koncentráció pedig 20,5-szeresére (5. E ábra) emelkedett. A könny szekréció jelentősen fokozódott (5. H ábra), a totál protein tartalom pedig csökkent (5. G ábra), ami hígabb könny

fokozott termelődésének köszönhető. Következésképpen a FXIII szintek totál protein koncentrációra vonatkoztatott eredményei még nagyobb emelkedést mutattak: FXIII-A esetében az emelkedés 16,9-szeres, FXIII-B esetében 17,7-szeres, míg FXIII-A₂B₂ esetében 25,7-szeres volt (5. B, D, F ábrák). Az első 24 óra után az emelkedett FXIII szintek fokozatosan csökkentek, de még hét nappal a műtét után is szignifikánsan magasabb értékeket mértünk, mint operáció előtt. A műtét utáni első naphoz képest a csökkenés mértéke FXIII-A, FXIII-B és FXIII-A₂B₂ esetében különböző időben érte el a szignifikáns szintet, a 7. napon azonban a koncentrációk mindhárom paraméter esetében szignifikánsan alacsonyabbak voltak mint a műtét után 24 órával.

5. ábra

FXIII-A (A,B), FXIII-B (C,D) és FXIII-A₂B₂ (E,F) szintek valamint a könnysekréció és totál protein koncentráció változása perforáló keratoplasztikát követően:



A FXIII-A (A,B), FXIII-B (C,D) és FXIII-A₂B₂ (E,F) szinteket $\mu\text{g FXIII/L}$ (A,C,E) és $\mu\text{g FXIII/g}$ könnyfehérje (B,D,F) értékekben is kifejeztük. A totál protein koncentrációk (G) és a könnysekréció (H) változását is ábrázoltuk. Az ábrán az átlagokat a hozzájuk tartozó standard hibákat (SE) tüntettük fel. A szignifikanciaszintek meghatározásánál a műtét előtti napon és az azt követő napokon mért értékeket hasonlítottuk össze (* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,005$, *** $P \leq 0,001$), ill. a műtétet követő 24 óra múlva mért értékekhez hasonlítottuk az ezt követő napokon mért értékeket († $P \leq 0,05$, †† $P \leq 0,005$, ††† $P \leq 0,001$).

A 23 követett esetből 10 donor szaruhártyán volt ereződés megfigyelhető 3-12 hónappal a perforáló keratoplasztikát követően. A betegeket a transzplantátum állapota – ereződött és nem ereződött – szerint két csoportra osztottuk és a két csoportban az első héten mért FXIII szinteket összehasonlítottuk. Eredményeink az 5. táblázatban és a 6. ábrán láthatók.

5. táblázat

FXIII komplex és alegységek műtét előtt mért koncentrációi perforáló keratoplasztikán átesett egyéneknél ereződött és nem ereződött donor szaruhártya esetén:

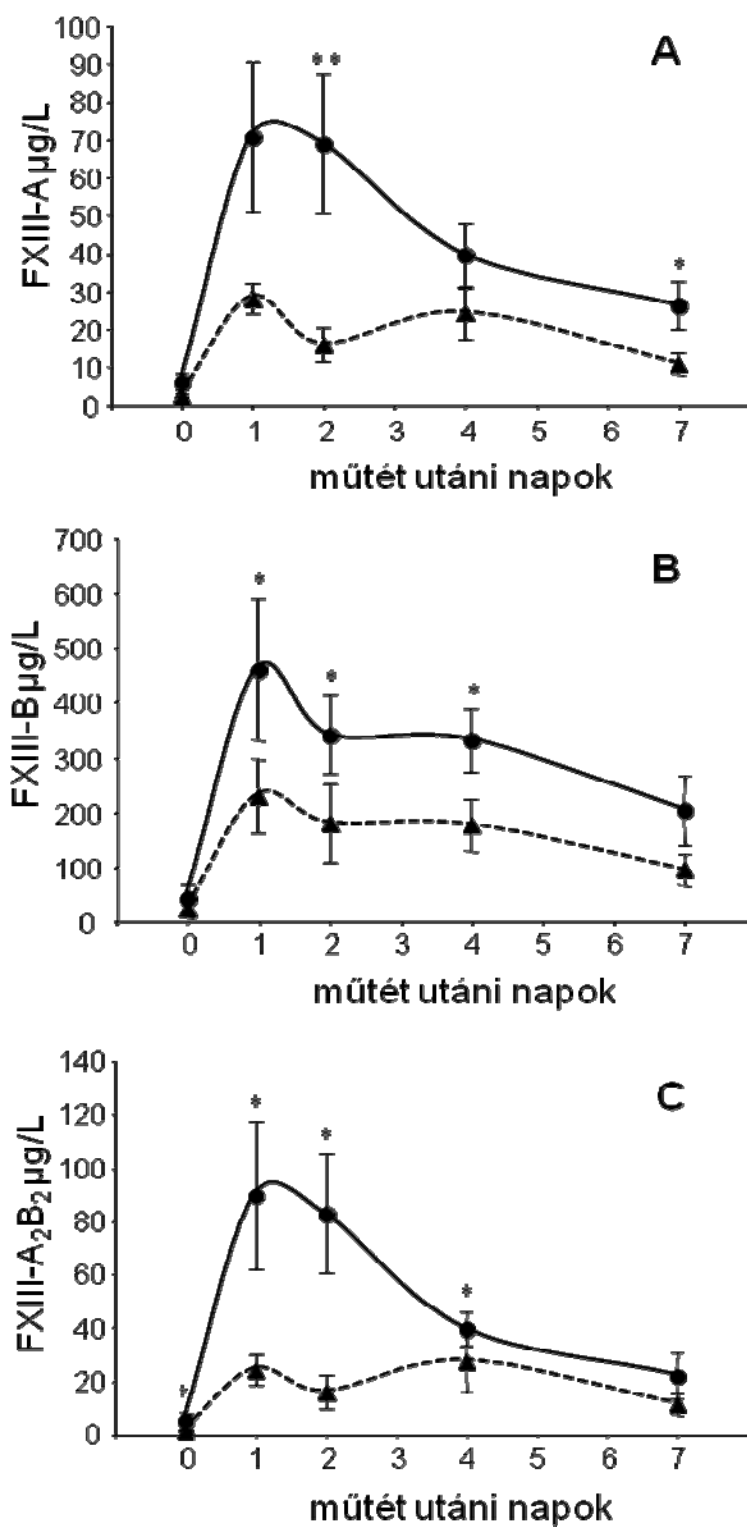
Analit	Nem-ereződött transzplantátum n=13 (átlag ± SE)	Ereződött transzplantátum n=10 (átlag ± SE)	p
FXIII-A (µg/L)	2,31 ± 0,45	5,94 ± 2,12	0,133
FXIII-B (µg/L)	21,70 ± 16,30	41,56 ± 25,11	0,194
FXIII-A ₂ B ₂ (µg/L)	0,94 ± 0,37	4,67 ± 2,98	0,026

SE: standard hiba (standard error)

Azon betegek esetében, akiknél a donor szaruhártya a későbbiekben a követési idő alatt beereződött, már a műtét előtt mért FXIII szintek is magasabbak voltak. A kis esetszám következtében a különbség csak a FXIII komplex esetében volt szignifikáns. A műtét után a FXIII-A, FXIII-B alegység és FXIII komplex koncentrációk nagyobb emelkedése az ereződött csoportban szignifikánsan nagyobb volt, mint a nem ereződött csoportjban (6. ábra).

6. ábra

FXIII koncentrációk változása perforáló keratoplasztikán átesett egyéneknél a műtét előtt és műtétet követően ereződött és nem ereződött donor szaruhártya esetében:



Az ábrán az átlagokat és a standard hibáikat (standard error; SE) tüntettük fel. A két csoport összehasonlításakor észlelt szignifikáns különbségeket jelöltük (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$). Ereződött cornea: ●—●, nem ereződött cornea ▲- - -▲.

MEGBESZÉLÉS

Mivel a könnyminták térfogata limitált, és a benne lévő FXIII alegységek és komplex koncentrációja alacsony, a laboratóriumunkban korábban kifejlesztett gyors, egylépéses szendvics-ELISA módszerek, melyeket eredetileg a plazmában lévő FXIII komplex [27], és FXIII-A [91] meghatározására dolgoztak ki, nem voltak elég érzékenyek az ebben a testfolyadékban történő mérésekhez. Emellett nem létezett jól bevizsgált módszer a FXIII-B mérésére. A következő változtatásokkal igen érzékeny, jól reprodukálható stabil módszereket fejlesztettünk ki a FXIII-A, FXIII-B alegységek és FXIII-A₂B₂ koncentrációk meghatározására könnyben:

1. A kromogén szubsztrát helyett chemilumineszens szubsztrátot, Lumigen PS-atto-t használtunk a peroxidáz aktivitás mérésére, megnövelve ezzel a reakció szenzitivitását.
2. Átlátszó helyett nem transzparens fehér mikrolemezt használtunk a lumineszcens reakció megfelelő értékelése, az átfénylés kiküszöbölése érdekében.
3. A plazmában való kimutatásra szolgáló módszerben a szendvics, mely a két antitest közé befogott antigén, egy órás inkubációs idő alatt alakul ki az egy lépésben összeállított oldatban. Ehelyett az egylépéses reakció helyett többlépésessé tettük a reakciót, a lépések között egy órás inkubációs időket alkalmazva, vagyis lépésenként történt az elfogó antitest felkötése a streptavidin-fedett plate felszínére, a FXIII antigén kötődése az elfogó antitesthez és a detektáló antitest kötődése a felszínhez kötött komplexben lévő antigénhez. Az egyes lépések között alaposan mostuk a lemezt. Ezek a változtatások egyrészt jelentősen

csökkentették a háttérrel, másrészt lehetővé vált a teljesebb komplexképződés az antigén és az antitestek között, így a módszer érzékenysége tovább nőtt.

4. A könny kis mennyiségéhez alkalmazkodva a reakciót 96 lyukú mikrolemez helyett 384 lyukú streptavidin fedett mikrolemezen végeztük, így csökkentve a reakcióterfogatot.

A plazmában való kimutatásra szolgáló módszerekhez képest [27, 91] ezekkel a változtatásokkal a kimutathatósági, esetünkben egyben a minimális mérési határokat a FXIII-A₂B₂ assay esetében 1/59-ed részére, a FXIII-A meghatározásnál 1/25-öd részére csökkentettük. Az érzékenység hasonló növekedését értük el a FXIII-B alegységet kimutató módszer esetén is. A módszerek igen nagy érzékenysége lehetővé tette, hogy az egy egyéntől származó kis térfogatú nem stimulált könny mintákból is biztonsággal meghatározzuk a FXIII koncentrációkat. Itt jegyezzük meg, hogy intézetünkben közel húsz évvel ezelőtt történtek kezdeti vizsgálatok a könny transzglutamináz aktivitásának a meghatározására, a használt aktivitásméréssel igen alacsony transzglutamináz aktivitást lehetett kimutatni, mely thrombin hatására nem fokozódott [96], azaz nem FXIII-nak volt tulajdonítható. A FXIII és alegységei könnyben történő mérését éppen az általunk kifejlesztett igen érzékeny új módszerek tették lehetővé.

A FXIII-A és FXIII-B koncentrációja könnyben sokkal kisebb, mint a plazmában [20, 91]. Számításaink szerint a könny FXIII-A tartalma 1/5200-ad része a plazmáénak (11 mg/L) [27, 91]. A plazma FXIII-B koncentrációja 21 mg/L [20], vagyis a FXIII-B könny: plazma arány 1:2900. A FXIII-B: FXIII-A moláris arány könnyben 3.5, ami majdnem duplája a plazmában található FXIII-B: FXIII-A aránynak (2:1). Könnyben a FXIII-A-nak csak 16%-a képzett komplexet a FXIII-B-vel. Ez ellentétben áll a plazmában megfigyelttel, ahol a FXIII alegységek több mint ezerszer magasabb koncentrációban találhatók meg, mint a

könnyben, és a FXIII-A₂ szinte kizárólag komplex formában fordul elő. A FXIII-A és FXIII-B koncentrációinak mediánja nem stimulált könnyben (3. táblázat) 1.33×10^{-11} mol/L FXIII-A₂-nek és 4.35×10^{-11} mol/L FXIII-B₂-nek felel meg. Ezeket az adatokat, és a laboratóriumunkban megállapított $0,16 \times 10^{-9}$ mol/L-es egyensúlyi állandó (K_d) értéket használva a FXIII-A₂B₂ számított elméleti értéke $0,27 \times 10^{-11}$ mol/L [97], miszerint elméletileg a FXIII-A alegység 20%-a van komplexben. A FXIII-A₂B₂ mért koncentrációja 0,67 µg/L, azaz $0,21 \times 10^{-11}$ mol/L volt. A mért értékekből történő számításaink szerint normál könnyben a FXIII-A alegység 16%-a található komplex formában, a mért és számított értékek jól egyeznek egymással. Ha a plazmában mért FXIII alegység koncentrációkkal végezzük el a számításokat, FXIII-A alegység a mérésekkel megegyezően a kalkulációk szerint is a gyakorlatilag 100%-ban komplexként fordul elő a keringésben. Ezek a felismerések azt sugallják, hogy a különbségek a plazma és a könny között egyszerűen a könnyben lévő FXIII alegységek alacsony koncentrációinak köszönhetők, ami miatt az adott egyensúlyi állandónak megfelelő komplexképződés kismértékű, és nem merül fel egy, a komplexképződést gátló komponens jelenléte.

A FXIII a plazmában jelentős feleslegben található: a normál plazma szintek kb 5%-a már elégséges ahhoz, hogy betöltse szerepét a normál hemostasisban. A FXIII féléletideje plazmában 9-12 nap [98-100], a nem stimulált könny megújulási ideje viszont 8-16% percenként [101, 102]. Ennélfogva tehát a szemünkben található szaruhártya teljes felületét folyamatosan mossa a mindig frissen termelődő szabad FXIII-A alegységet tartalmazó könny.

Azt, hogy pontosan hogyan kerül a könnybe a XIII-as véralvadási faktor, jelen munkánk során nem vizsgáltuk, a lehetséges utakat azonban megpróbáljuk felvázolni. A könnyfilm három rétegből áll, az epithel sejtek rétegével érintkező kocsonyás nyálkaréteg (mucinózus fázis), a proteinek és más vízdoldékony molekulák vizes oldatát tartalmazó vizes fázis és a felszíni olajos fázis [103, 104]. A vizes fázis adja a könnyfilm vastagságának nagy

részét, az olajos fázis védi a könnyfilmet a párolgástól. A mucinózus és vizes fázist egyes szerzők nem különítik el [104, 105]. A könnyben található víz, sók és fehérjék nagy részét a fő és a járulékos könnymirigyek szekretálják, bár a kötőhártya epithel sejtjei is termelhetnek proteineket, illetve a conjunctivális erek is átereszthetnek minor komponenseket [104]. A lipidek nagy része a Meibom mirigyből származik. A FXIII-A alegység kimutatható monocytákban és különböző macrofágokban, mint a histiocytákban és dendritikus sejtekben, így a kötőhártya szöveti macrophagjainak [106] lehet szerepe a könnyben lévő FXIII-A produkciójában. Mivel egy bronchiális epithel sejtvonal is képes FXIII-A alegységet szintetizálni [16], a corneális epithel sejteket is érdemes lehet megvizsgálni, hogy termelnek-e FXIII-A-t. A FXIII-A alegység a FXIII-A₂B₂ komplex részeként a plazmából is átszűrődhet, és a komplex disszociálhat a könnyben lévő körülmények között. A FXIII-B alegység szintézise a máj hepatocytáira lokalizálható, melyek a keringésbe szekretálják a fehérjét. A szabad FXIII-B transszudációja, és kisebb mennyiségben a conjunctivális erekből származó FXIII-A₂B₂ lehet a legvalószínűbb forrása a könnyben talált FXIII-B alegységeknek.

Amint azt más tanulmányokban is leírták [90, 103, 107], mi is azt találtuk, hogy a könnysekreáció nazális stimulációjának hatására a megnövekedett könnytermeléssel párhuzamosan a totál protein tartalom csökkent, hasonló csökkenést észleltünk a FXIII alegységek és komplex koncentrációi esetén is. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a megemelkedett könnyprodukciónak hígító hatása lehet felelős stimulált könnyben a csökkent FXIII szintekért. Stimuláció hatására a termelődő könny mennyisége sokszorosára emelkedik [95], vizsgálatainkban 7x magasabb lett, mint a bazális könnytermelés. Így annak ellenére, hogy stimulációt követően a koncentrációk csökkentek, a könnyben 1 perc alatt megjelenő FXIII-A és FXIII-B alegységek mennyisége 4,5-5x nagyobb, mint nem stimulált körülmények között, vagyis stimuláció során több FXIII kerül kapcsolatba a szaruhártya és a kötőhártya epithelsejt rétegével.

Szaruhártya átültetés után a FXIII-A, FXIII-B és FXIII-A₂B₂ szintek óriási emelkedését tapasztaltuk, mely 24 órával a műtéti beavatkozás után tetőzött, majd fokozatosan csökkent, de a FXIII szintek még egy hét múlva is szignifikánsan emelkedettek voltak. Hangsúlyozni kell, hogy a műtétet követő első héten a FXIII szintek emelkedése ellenére a totál protein koncentrációk szignifikánsan csökkentek. A perforáló keratoplasztika után mért első napi csúcs FXIII-A és FXIII-B koncentrációk a plazmaszintek 0,5%-ának illetve 1,5%-ának felelnek meg. Keratoplasztika utáni állapotokban a termelődő könny mennyisége jelentős mértékben megnő [108], esetünkben a műtét utáni első napon 12-szeresre, a hetedik napon pedig még mindig 6x több könny termelődött, mint operáció előtt. Úgy tűnik tehát, hogy a sebészi sebet folyamatosan tekintélyes mennyiségű FXIII-at tartalmazó könny mossa.

Ismert, hogy a kalcium már millimoláris koncentrációban proteolízis nélkül is képes aktiválni a FXIII-A₂-t, míg FXIII komplex esetében ilyen körülmények között nem következik be aktiváció [42, 43, 93]. A könnyben megtalálható a Ca, koncentrációja 0,36-0,79 mmol/L [109]. Így nagyon valószínű, hogy a könnyben lévő FXIII-A₂-nek legalábbis egy része non-proteolitikusan aktiválódik. Gyulladásos körülmények között, amikor a véralvadási rendszer egyéb komponensei is átszivároghatnak a tágtult vérerekből, lehetséges, hogy thrombin képződik, és proteolitikusan is aktiválja a FXIII-at. A gyulladás során megjelenő granulocyták által termelt elasztáz szintén indukálhatja a FXIII proteolitikus aktivációját [110]. Mivel az aktivált FXIII könnyen kötődik sejtek felszínéhez, a megkötött, így helyben maradó FXIIIa aktuális koncentrációja akár lényegesen magasabb is lehet, mint amit a könnyben mértünk.

Mivel az extracelluláris térben jelen lévő aktív FXIII segíti a sebgyógyulást, a FXIII és alegységeinek megjelenése egy plazmán kívüli folyadéktérben, mint a könny, komoly szerepet tölthet be a helyi szöveti regeneráció folyamatában. A FXIII könnyben egy helyi

„hormonszerű” hatással rendelkezhet, és a sejtekre gyakorolt direkt hatásán keresztül segítheti a szaruhártya kisebb sérüléseinek és sebeinek gyógyulását. Normál körülmények között a saját érhálózatral nem rendelkező cornea sebei ereződés nélkül gyógyulnak, bár egyes patológiás esetekben a sérült szaruhártya beereződése a sebészi beavatkozások utáni gyógyulási folyamat egyik fő látásromlást okozó komplikációja. Figyelembe véve a FXIII proangiogenikus hatását feltételezzük, hogy igen magas koncentrációjú FXIII jelenléte káros is lehet a szaruhártyasebek gyógyulásának folyamatában. Mint arra már utaltam, ha nyulak kötőhártyájába nagy mennyiségű aktív FXIII-at iniciáltak, a nyulak szaruhártyája beereződött [68]. Saját vizsgálatainkban, azon a betegek esetében, akiknél a donor szaruhártya beereződését tapasztaltuk a 18 hónapos követési idő alatt, lényegesen magasabbak voltak az átültetés előtt és után mért FXIII koncentrációk, mint akiknél a donor cornea tiszta, ereződésmentes maradt. A jelentős időbeli eltérés a FXIII szintek mérése és a beültetett szaruhártya ereződésének kezdete között, melyet a műtét után 3-12 hónappal észleltünk, úgy tűnik, kizárja a direkt kapcsolatot. Azonban az átültetés előtt mért magasabb FXIII koncentrációk és a műtetre, mint stimulusra adott fokozottabb válaszkészség, mely a FXIII szintek nagyobb mérvű emelkedését jelenti, arra utal, hogy a könny magasabb FXIII szintje és a stimulusokra adott fokozott FXIII szint emelkedés a perforáló keratoplasztikát követően a szaruhártya ereződés rizikófaktora lehet.

Végeredményben elmondhatjuk, hogy extravasalis folyadéktérben, a könnyben kimutathatók a szabad FXIII alegységek és FXIII komplex. Az igen érzékeny általunk kifejlesztett kemilumineszcens ELISA módszerek alkalmasak néhány mikroliter alacsony FXIII koncentrációjú mintában a FXIII alegységek és komplex mérésére, így ezek a módszerek alkalmasak a könny és valószínűleg más egyéb testfolyadékok FXIII tartalmának a meghatározására. Ezek a módszerek ígéretes eszközök lehetnek a könnyben lévő FXIII monitorozására patológiás körülmények között is.

60 egészséges önkéntes könnymintájából meghatároztuk a normál könny FXIII alegységeinek a koncentrációját. A FXIII-A és FXIII-B koncentrációk medián értékei 2.13 $\mu\text{g/L}$ és 7.22 $\mu\text{g/L}$ voltak. A komplex képződés az alegységek között ilyen kis koncentrációknál a disszociációs állandónak megfelelően a plazmához viszonyítva kismértékű, a FXIII-A-nak mindössze 16%-a volt komplexben. A fehérje tartalomra normalizált FXIII szintek nem változnak a könnyben stimuláció hatására, így lehetőségünk nyílik az összehasonlításra az egyes patológiás állapotokban termelődő könnyel, ahol természetesen stimulált a könnytermelés. Keratoplasztikát követően a könny FXIII koncentrációi igen nagymértékben emelkednek. Az emelkedés még kifejezettebb azokban az esetekben, amikor a betegek követése során a donor szaruhártya későbbi ereződését figyeltük meg. Felvetődik, hogy a normál könnyben jelen lévő FXIII szerepet játszhat a szaruhártya mikrosérüléseinek gyógyulásában, a cornea transzplantáció után mért emelkedett mennyiségű FXIII pedig segítheti a corneális seb gyógyulási folyamatát. Egy bizonyos koncentráció felett azonban a FXIII angiogenesisist segítő, így a beültetett szaruhártya transzparenciáját rontó érújdonképződést indukáló hatása is előtérbe kerülhet.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Muszbek L, Bagoly Z, Bereczky Z, Katona E: **The involvement of blood coagulation factor XIII in fibrinolysis and thrombosis.** *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008, **6**(3):190-205.
2. Laki K, Lorand L: **On the Solubility of Fibrin Clots.** *Science* 1948, **108**(2802):280.
3. Lorand L: **A study on the solubility of fibrin clots in urea.** *Hung Acta Physiol* 1948, **1**(6):192-196.
4. Lorand L: **Fibrin clots.** *Nature* 1950, **166**(4225):694-695.
5. Muszbek L, Yee VC, Hevessy Z: **Blood coagulation factor XIII: structure and function.** *Thromb Res* 1999, **94**(5):271-305.
6. Komaromi I, Bagoly Z, Muszbek L: **Factor XIII: novel structural and functional aspects.** *J Thromb Haemost* 2011, **9**(1):9-20.
7. Buluk K: **[An unknown action of blood platelets; preliminary communication].** *Pol Tyg Lek (Wars)* 1955, **10**(6):191.
8. Luscher EF: **[Fibrin-stabilizing factor from thrombocytes].** *Schweiz Med Wochenschr* 1957, **87**(39-40):1220-1221.
9. Adany R, Antal M: **Three different cell types can synthesize factor XIII subunit A in the human liver.** *Thromb Haemost* 1996, **76**(1):74-79.
10. Adany R, Bardos H: **Factor XIII subunit A as an intracellular transglutaminase.** *Cell Mol Life Sci* 2003, **60**(6):1049-1060.
11. Malara A, Gruppi C, Rebuzzini P, Visai L, Perotti C, Moratti R, Balduini C, Tira ME, Balduini A: **Megakaryocyte-matrix interaction within bone marrow: new roles for fibronectin and factor XIII-A.** *Blood* 2011, **117**(8):2476-2483.
12. Adany R, Kiss A, Muszbek L: **Factor XIII: a marker of mono- and megakaryocytopoiesis.** *Br J Haematol* 1987, **67**(2):167-172.
13. Muszbek L, Adany R, Szegedi G, Polgar J, Kawai M: **Factor XIII of blood coagulation in human monocytes.** *Thromb Res* 1985, **37**(3):401-410.
14. Adany R, Bardos H, Antal M, Modis L, Sarvary A, Szucs S, Balogh I: **Factor XIII of blood coagulation as a nuclear crosslinking enzyme.** *Thromb Haemost* 2001, **85**(5):845-851.
15. Nurminskaya M, Kaartinen MT: **Transglutaminases in mineralized tissues.** *Front Biosci* 2006, **11**:1591-1606.

16. Perrio MJ, Ewen D, Trevethick MA, Salmon GP, Shute JK: **Fibrin formation by wounded bronchial epithelial cell layers in vitro is essential for normal epithelial repair and independent of plasma proteins.** *Clin Exp Allergy* 2007, **37**(11):1688-1700.
17. Ichinose A, McMullen BA, Fujikawa K, Davie EW: **Amino acid sequence of the b subunit of human factor XIII, a protein composed of ten repetitive segments.** *Biochemistry* 1986, **25**(16):4633-4638.
18. Ikematsu S: **An approach to the metabolism of factor XIII.** *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi* 1981, **44**(7):1499-1505.
19. Nagy JA, Henriksson P, McDonagh J: **Biosynthesis of factor XIII B subunit by human hepatoma cell lines.** *Blood* 1986, **68**(6):1272-1279.
20. Yorifuji H, Anderson K, Lynch GW, Van de Water L, McDonagh J: **B protein of factor XIII: differentiation between free B and complexed B.** *Blood* 1988, **72**(5):1645-1650.
21. Carrell NA, Erickson HP, McDonagh J: **Electron microscopy and hydrodynamic properties of factor XIII subunits.** *J Biol Chem* 1989, **264**(1):551-556.
22. Seelig GF, Folk JE: **Noncatalytic subunits of human blood plasma coagulation factor XIII. Preparation and partial characterization of modified forms.** *J Biol Chem* 1980, **255**(18):8881-8886.
23. Poon MC, Russell JA, Low S, Sinclair GD, Jones AR, Blahey W, Ruether BA, Hoar DI: **Hemopoietic origin of factor XIII A subunits in platelets, monocytes, and plasma. Evidence from bone marrow transplantation studies.** *J Clin Invest* 1989, **84**(3):787-792.
24. Wolpl A, Lattke H, Board PG, Arnold R, Schmeiser T, Kubanek B, Robin-Winn M, Pichelmayer R, Goldmann SF: **Coagulation factor XIII A and B subunits in bone marrow and liver transplantation.** *Transplantation* 1987, **43**(1):151-153.
25. Inbal A, Muszbek L, Lubetsky A, Katona E, Levi I, Karpatis L, Nagler A: **Platelets but not monocytes contribute to the plasma levels of factor XIII subunit A in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation.** *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004, **15**(3):249-253.
26. Kiesselbach TH, Wagner RH: **Demonstration of factor XIII in human megakaryocytes by a fluorescent antibody technique.** *Ann N Y Acad Sci* 1972, **202**:318-328.

27. Katona E, Haramura G, Karpati L, Fachel J, Muszbek L: **A simple, quick one-step ELISA assay for the determination of complex plasma factor XIII (A2B2).** *Thromb Haemost* 2000, **83**(2):268-273.
28. Greenberg CS, Miraglia CC: **The effect of fibrin polymers on thrombin-catalyzed plasma factor XIIIa formation.** *Blood* 1985, **66**(2):466-469.
29. Greenberg CS, Shuman MA: **The zymogen forms of blood coagulation factor XIII bind specifically to fibrinogen.** *J Biol Chem* 1982, **257**(11):6096-6101.
30. Loewy AG, Dahlberg A, Dunathan K, Kriel R, Wolfinger HL, Jr.: **Fibrinase. II. Some physical properties.** *J Biol Chem* 1961, **236**:2634-2643.
31. Uitte de Willige S, Standeven KF, Philippou H, Ariens RA: **The pleiotropic role of the fibrinogen gamma' chain in hemostasis.** *Blood* 2009, **114**(19):3994-4001.
32. Mosesson MW: **Fibrinogen and fibrin structure and functions.** *J Thromb Haemost* 2005, **3**(8):1894-1904.
33. Lewis BA, Freyssinet JM, Holbrook JJ: **An equilibrium study of metal ion binding to human plasma coagulation factor XIII.** *Biochem J* 1978, **169**(2):397-402.
34. Hornyak TJ, Shafer JA: **Role of calcium ion in the generation of factor XIII activity.** *Biochemistry* 1991, **30**(25):6175-6182.
35. Greenberg CS, Achyuthan KE, Rajagopalan S, Pizzo SV: **Characterization of the fibrin polymer structure that accelerates thrombin cleavage of plasma factor XIII.** *Arch Biochem Biophys* 1988, **262**(1):142-148.
36. Janus TJ, Lewis SD, Lorand L, Shafer JA: **Promotion of thrombin-catalyzed activation of factor XIII by fibrinogen.** *Biochemistry* 1983, **22**(26):6269-6272.
37. Lewis SD, Janus TJ, Lorand L, Shafer JA: **Regulation of formation of factor XIIIa by its fibrin substrates.** *Biochemistry* 1985, **24**(24):6772-6777.
38. Naski MC, Lorand L, Shafer JA: **Characterization of the kinetic pathway for fibrin promotion of alpha-thrombin-catalyzed activation of plasma factor XIII.** *Biochemistry* 1991, **30**(4):934-941.
39. Shemirani AH, Haramura G, Bagoly Z, Muszbek L: **The combined effect of fibrin formation and factor XIII A subunit Val34Leu polymorphism on the activation of factor XIII in whole plasma.** *Biochim Biophys Acta* 2006, **1764**(8):1420-1423.
40. Credo RB, Curtis CG, Lorand L: **Ca²⁺-related regulatory function of fibrinogen.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978, **75**(9):4234-4237.
41. Lorand L, Credo RB, Janus TJ: **Factor XIII (fibrin-stabilizing factor).** *Methods Enzymol* 1981, **80 Pt C**:333-341.

42. Muszbek L, Haramura G, Polgar J: **Transformation of cellular factor XIII into an active zymogen transglutaminase in thrombin-stimulated platelets.** *Thromb Haemost* 1995, **73**(4):702-705.
43. Muszbek L, Polgar J, Boda Z: **Platelet factor XIII becomes active without the release of activation peptide during platelet activation.** *Thromb Haemost* 1993, **69**(3):282-285.
44. Iismaa SE, Holman S, Wouters MA, Lorand L, Graham RM, Husain A: **Evolutionary specialization of a tryptophan indole group for transition-state stabilization by eukaryotic transglutaminases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(22):12636-12641.
45. Iismaa SE, Mearns BM, Lorand L, Graham RM: **Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders.** *Physiol Rev* 2009, **89**(3):991-1023.
46. Lorand L, Konishi K, Jacobsen A: **Transpeptidation mechanism in blood clotting.** *Nature* 1962, **194**:1148-1149.
47. Sakata Y, Aoki N: **Cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin by fibrin-stabilizing factor.** *J Clin Invest* 1980, **65**(2):290-297.
48. Reed GL, Hough AK: **The contribution of activated factor XIII to fibrinolytic resistance in experimental pulmonary embolism.** *Circulation* 1999, **99**(2):299-304.
49. Francis CW, Marder VJ: **Increased resistance to plasminic degradation of fibrin with highly crosslinked alpha-polymer chains formed at high factor XIII concentrations.** *Blood* 1988, **71**(5):1361-1365.
50. Francis CW, Marder VJ: **Rapid formation of large molecular weight alpha-polymers in cross-linked fibrin induced by high factor XIII concentrations. Role of platelet factor XIII.** *J Clin Invest* 1987, **80**(5):1459-1465.
51. Bagoly Z, Haramura G, Muszbek L: **Down-regulation of activated factor XIII by polymorphonuclear granulocyte proteases within fibrin clot.** *Thromb Haemost* 2007, **98**(2):359-367.
52. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komáromi I, Katona É: **Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions.** *Physiol Rev* 2011, **accepted**.
53. Duckert F, Jung E, Shmerling DH: **A hitherto undescribed congenital haemorrhagic diathesis probably due to fibrin stabilizing factor deficiency.** *Thromb Diath Haemorrh* 1960, **5**:179-186.

54. Schroeder V, Durrer D, Meili E, Schubiger G, Kohler HP: **Congenital factor XIII deficiency in Switzerland: from the worldwide first case in 1960 to its molecular characterisation in 2005.** *Swiss Med Wkly* 2007, **137**(19-20):272-278.
55. Ivaskevicius V, Seitz R, Kohler HP, Schroeder V, Muszbek L, Ariens RA, Seifried E, Oldenburg J: **International registry on factor XIII deficiency: a basis formed mostly on European data.** *Thromb Haemost* 2007, **97**(6):914-921.
56. Karimi M, Berezky Z, Cohan N, Muszbek L: **Factor XIII Deficiency.** *Semin Thromb Hemost* 2009, **35**(4):426-438.
57. Inbal A, Lubetsky A, Krapp T, Castel D, Shaish A, Dickneite G, Modis L, Muszbek L: **Impaired wound healing in factor XIII deficient mice.** *Thromb Haemost* 2005, **94**(2):432-437.
58. Herouy Y, Hellstern MO, Vanscheidt W, Schopf E, Norgauer J: **Factor XIII-mediated inhibition of fibrinolysis and venous leg ulcers.** *Lancet* 2000, **355**(9219):1970-1971.
59. Hildenbrand T, Idzko M, Panther E, Norgauer J, Herouy Y: **Treatment of nonhealing leg ulcers with fibrin-stabilizing factor XIII: a case report.** *Dermatol Surg* 2002, **28**(11):1098-1099.
60. Peschen M, Thimm C, Weyl A, Weiss JM, Kurz H, Augustin M, Simon JC, Schopf E, Vanscheidt W: **Possible role of coagulation factor XIII in the pathogenesis of venous leg ulcers.** *Vasa* 1998, **27**(2):89-93.
61. Wozniak G, Dapper F, Alemany J: **Factor XIII in ulcerative leg disease: background and preliminary clinical results.** *Semin Thromb Hemost* 1996, **22**(5):445-450.
62. Gierhake FW, Papastavrou N, Zimmermann K, Bohn H, Schwick HG: **[Prophylaxis of post-operative disturbances of wound healing with factor XIII substitution (author's transl)].** *Dtsch Med Wochenschr* 1974, **99**(19):1004-1009.
63. Gierhake FW, Volkmann W, Becker W, Schwarz H, Schwick HG: **[Factor XIII concentration and wound healing].** *Dtsch Med Wochenschr* 1970, **95**(28):1472-1475.
64. Mishima Y, Nagao F, Ishibiki K, Matsuda M, Nakamura N: **[Factor XIII in the treatment of postoperative refractory wound-healing disorders. Results of a controlled study].** *Chirurg* 1984, **55**(12):803-808.
65. Higaki S, Nakano K, Onaka S, Amano A, Tanioka Y, Harada K, Hashimoto S, Sakaida I, Okita K: **Clinical significance of measuring blood coagulation factor**

- XIIIa regularly and continuously in patients with Crohn's disease.** *J Gastroenterol Hepatol* 2006, **21**(9):1407-1411.
66. Lorenz R, Born P, Olbert P, Classen M: **Factor XIII substitution in ulcerative colitis.** *Lancet* 1995, **345**(8947):449-450.
 67. Seitz R, Leugner F, Katschinski M, Immel A, Kraus M, Egbring R, Goke B: **Ulcerative colitis and Crohn's disease: factor XIII, inflammation and haemostasis.** *Digestion* 1994, **55**(6):361-367.
 68. Dardik R, Solomon A, Loscalzo J, Eskaraev R, Bialik A, Goldberg I, Schiby G, Inbal A: **Novel proangiogenic effect of factor XIII associated with suppression of thrombospondin 1 expression.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, **23**(8):1472-1477.
 69. Dardik R, Loscalzo J, Eskaraev R, Inbal A: **Molecular mechanisms underlying the proangiogenic effect of factor XIII.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**(3):526-532.
 70. Dardik R, Krapp T, Rosenthal E, Loscalzo J, Inbal A: **Effect of FXIII on monocyte and fibroblast function.** *Cell Physiol Biochem* 2007, **19**(1-4):113-120.
 71. Torocsik D, Bardos H, Nagy L, Adany R: **Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**(18):2132-2139.
 72. Sarvary A, Szucs S, Balogh I, Becsky A, Bardos H, Kawai M, Seligsohn U, Egbring R, Lopaciuk S, Muszbek L *et al*: **Possible role of factor XIII subunit A in Fcγ and complement receptor-mediated phagocytosis.** *Cell Immunol* 2004, **228**(2):81-90.
 73. Dardik R, Shenkman B, Tamarin I, Eskaraev R, Harsfalvi J, Varon D, Inbal A: **Factor XIII mediates adhesion of platelets to endothelial cells through α(v)β(3) and glycoprotein IIb/IIIa integrins.** *Thromb Res* 2002, **105**(4):317-323.
 74. Lawler J: **Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth.** *J Cell Mol Med* 2002, **6**(1):1-12.
 75. Mirochnik Y, Kwiatek A, Volpert OV: **Thrombospondin and apoptosis: molecular mechanisms and use for design of complementation treatments.** *Curr Drug Targets* 2008, **9**(10):851-862.
 76. Nor JE, Mitra RS, Sutorik MM, Mooney DJ, Castle VP, Polverini PJ: **Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway.** *J Vasc Res* 2000, **37**(3):209-218.

77. Dardik R, Leor J, Skutelsky E, Castel D, Holbova R, Schiby G, Shaish A, Dickneite G, Loscalzo J, Inbal A: **Evaluation of the pro-angiogenic effect of factor XIII in heterotopic mouse heart allografts and FXIII-deficient mice.** *Thromb Haemost* 2006, **95**(3):546-550.
78. Katona E, Nagy B, Kappelmayer J, Baktai G, Kovacs L, Marialigeti T, Dezso B, Muszbek L: **Factor XIII in bronchoalveolar lavage fluid from children with chronic bronchoalveolar inflammation.** *J Thromb Haemost* 2005, **3**(7):1407-1413.
79. Csapo A, Katona E, Szucs G, Haramura G, Muszbek L: **Factor XIII in cerebrospinal fluid.** *J Thromb Haemost* 2009, **7**(S2):PP-Mo-205.
80. Schuster V, Hugle B, Tefs K: **Plasminogen deficiency.** *J Thromb Haemost* 2007, **5**(12):2315-2322.
81. Mehta R, Shapiro AD: **Plasminogen deficiency.** *Haemophilia* 2008, **14**(6):1261-1268.
82. Drew AF, Kaufman AH, Kombrinck KW, Danton MJ, Daugherty CC, Degen JL, Bugge TH: **Ligneous conjunctivitis in plasminogen-deficient mice.** *Blood* 1998, **91**(5):1616-1624.
83. Tozser J, Berta A: **Urokinase-type plasminogen activator in rabbit tears. Comparison with human tears.** *Exp Eye Res* 1990, **51**(1):33-37.
84. Pandolfi M, Astedt B, Dyster-Aas K: **Release of fibrinolytic enzymes from human cornea.** *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1972, **50**(2):199-205.
85. Rijken DC, Wijngaards G, Welbergen J: **Immunological characterization of plasminogen activator activities in human tissues and body fluids.** *J Lab Clin Med* 1981, **97**(4):477-486.
86. Hayashi K, Sueishi K: **Fibrinolytic activity and species of plasminogen activator in human tears.** *Exp Eye Res* 1988, **46**(2):131-137.
87. Williams DL, Risse B, Kim S, Saunders D, Orlin S, Baker MS, Jensen PJ, Lavker RM: **Plasminogen activator inhibitor type 2 in human corneal epithelium.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, **40**(8):1669-1675.
88. Csutak A, Silver DM, Tozser J, Steiber Z, Bagossi P, Hassan Z, Berta A: **Plasminogen activator inhibitor in human tears after laser refractive surgery.** *J Cataract Refract Surg* 2008, **34**(6):897-901.
89. Kao WW, Kao CW, Kaufman AH, Kombrinck KW, Converse RL, Good WV, Bugge TH, Degen JL: **Healing of corneal epithelial defects in plasminogen- and fibrinogen-deficient mice.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998, **39**(3):502-508.

90. Berta A: **Standardization of tear protein determination: the effects of sampling, flow rate and vascular permeability.** In: *The precorneal tear film in health, disease and contact lens wear*. Edited by Holly F. Lubbock, TX: Dry Eye Institute; 1986: 418-435.
91. Katona EE, Ajzner E, Toth K, Karpati L, Muszbek L: **Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates.** *J Immunol Methods* 2001, **258**(1-2):127-135.
92. Chung SI, Lewis MS, Folk JE: **Relationships of the catalytic properties of human plasma and platelet transglutaminases (activated blood coagulation factor XIII) to their subunit structures.** *J Biol Chem* 1974, **249**(3):940-950.
93. Polgar J, Hidasi V, Muszbek L: **Non-proteolytic activation of cellular protransglutaminase (placenta macrophage factor XIII).** *Biochem J* 1990, **267**(2):557-560.
94. Linnet K, Kondratovich M: **Partly nonparametric approach for determining the limit of detection.** *Clin Chem* 2004, **50**(4):732-740.
95. Fullard RJ, Tucker DL: **Changes in human tear protein levels with progressively increasing stimulus.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991, **32**(8):2290-2301.
96. Hidasi V, Muszbek L: **Transglutaminase in human lens.** *Blood Coagul Fibrinolysis* 1992, **3**:806a.
97. Wilkinson KD: **Quantitative analysis of protein-protein interactions.** *Methods Mol Biol* 2004, **261**:15-32.
98. Brackmann HH, Egbring R, Ferster A, Fondu P, Girardel JM, Kreuz W, Masure R, Miloszewski K, Stibbe J, Zimmermann R *et al*: **Pharmacokinetics and tolerability of factor XIII concentrates prepared from human placenta or plasma: a crossover randomised study.** *Thromb Haemost* 1995, **74**(2):622-625.
99. Fear JD, Miloszewski KJ, Losowsky MS: **The half life of factor XIII in the management of inherited deficiency.** *Thromb Haemost* 1983, **49**(2):102-105.
100. Rodeghiero F, Tosi A, Di Bona E, Castaman G: **Clinical pharmacokinetics of a placenta-derived factor XIII concentrate in type I and type II factor XIII deficiency.** *Am J Hematol* 1991, **36**(1):30-34.
101. Mishima S, Gasset A, Klyce SD, Jr., Baum JL: **Determination of tear volume and tear flow.** *Invest Ophthalmol* 1966, **5**(3):264-276.
102. Mathers WD, Daley TE: **Tear flow and evaporation in patients with and without dry eye.** *Ophthalmology* 1996, **103**(4):664-669.

103. Berta A: **Enzymology of the Tears**. Boca Raton: CRC Press; 1992.
104. Tiffany JM: **The normal tear film**. *Dev Ophthalmol* 2008, **41**:1-20.
105. McCulley JP, Shine W: **A compositional based model for the tear film lipid layer**. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1997, **95**:79-88; discussion 88-93.
106. Hingorani M, Metz D, Lightman SL: **Characterisation of the normal conjunctival leukocyte population**. *Exp Eye Res* 1997, **64**(6):905-912.
107. Fullard RJ, Snyder C: **Protein levels in nonstimulated and stimulated tears of normal human subjects**. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990, **31**(6):1119-1126.
108. Schuller S, Knorr M, Steuhl KP, Thiel HJ: **Lacrimal secretion of human epidermal growth factor in perforating keratoplasty**. *Ger J Ophthalmol* 1996, **5**(5):268-274.
109. Uotila MH, Soble RE, Savory J: **Measurement of tear calcium levels**. *Invest Ophthalmol* 1972, **11**(4):258-259.
110. Bagoly Z, Fazakas F, Komaromi I, Haramura G, Toth E, Muszbek L: **Cleavage of factor XIII by human neutrophil elastase results in a novel active truncated form of factor XIII A subunit**. *Thromb Haemost* 2008, **99**(4):668-674.

TÁRGYSZAVAK

Faktor XIII

Faktor XIII alegységek

Könny

ELISA

Kemilumineszcens immunoassay

Szaruhártya átültetés

Perforáló keratoplasztika

Sebgyógyulás

Cornea ereződés

Érűjdonképződés

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Prof. Dr. Muszbek László akadémikusnak, hogy biztosította számomra a kutatásokhoz szükséges feltételeket, munkámat folyamatosan figyelemmel kísérte, értékes tanácsaival irányította és mind szakmailag, mind erkölcsileg messzemenőig támogatott.

Köszönöm Dr. Berta András professzor úrnak értékes tanácsait és hozzájárulását ahhoz, hogy a kutatásokhoz a Debreceni Egyetem OEC Szemklinika betegeinek könnymintáit felhasználhassam.

Köszönöm Dr. Facskó Andrea tanárnőnek hasznos észrevételeit, állandó támogatását, melyekkel elősegítette értekezésem elkészítését.

Köszönöm laborvezetőmnek, Dr. Katona Évának a nélkülözhetetlen iránymutatást, és a statisztikai elemzésekben nyújtott segítséget.

Köszönet illeti Csapó Judit és Haramura Gizella analitikusokat segítőként munkájukért.

A Klinikai Kutató Központ és a Szemklinika minden dolgozójának köszönöm, hogy munkám során jó légkört biztosítottak.

Külön köszönettel tartozom családomnak támogatásukért, bátorításukért és türelmükért, hogy munkám során mindvégig mellettem álltak és biztosították azt a háttérrel, mely nélkül ez a munka nem születhetett volna meg.

FÜGGELÉK

A szerző témakörben megjelent közleményei:

Orosz ZZ, Katona E, Facskó A, Berta A, Muszbek L: A highly sensitive chemiluminescence immunoassay for the measurement of coagulation factor XIII subunits and their complex in tears. *Journal of Immunological Methods* 2010, **353**(1-2):87-92.

Orosz ZZ, Katona E, Facskó A, Módos L, Muszbek L, Berta A: Factor XIII subunits in human tears; their highly elevated levels following penetrating keratoplasty. *Clinica Chimica Acta* 2011, **412**(3-4):271-276.

Nemzetközi és hazai tudományos konferenciákon tartott előadások:

Orosz ZZ., Katona É., Berta A., Muszbek L.
XIII-as faktor meghatározása könnyben. A Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 54. Nagygyűlése, Debrecen.
2008.09.03-06.

Orosz ZZ., Katona É., Berta A., Muszbek L.
A XIII-as véralvadási faktor alegységeinek megjelenése és mérése könnyben.
Magyar Thrombosis és Haemostasis Társaság Tudományos Napja, Várgesztes.
2008.09.27.

Orosz ZZ., Katona E., Facskó A., Berta A., Muszbek L.
Factor XIII subunits in non-stimulated and stimulated human tears and in tears produced following penetrating keratoplasty.
Euromedlab 2009, Innsbruck, Austria.
2009.06.07-11.
Clin Chem Lab Med 2009; 47; Special Supplement, pp S1-S409. W-B011. DOI
10.1515/CCLM.2009.419.

Orosz ZZ., Katona É., Facskó A., Berta A., Muszbek L.
XIII-as faktor meghatározása nem stimulált, stimulált könnyben és perforáló keratoplasztikát követően./ Factor XIII in non-stimulated and stimulated human tears and in tears produced following penetrating keratoplasty. A Magyar Szemorvostársaság 2009. évi Kongresszusa, 6th Congress of South-East European Ophthalmological Society (SEEOS), 2nd Symposium of Hungarian Association for Research in Vision and Ophthalmology (HARVO), Budapest.
2009.06.25-27.

Orosz ZZ., Katona E., Facskó A., Berta A., Muszbek L.
Factor XIII subunits in non-stimulated and stimulated human tears and in tears produced following penetrating keratoplasty.
XXII Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Boston, MA.
2009.07.11-16.
Journal of Thrombosis and Haemostasis 2009; 7; S2, PP-TH-216.

Orosz ZZ., Katona É., Facskó A., Bárdos H., Ádány R., Berta A., Muszbek L.
Factor XIII in tears and cornea: its possible function in health and disease.
54. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Haemostaseforschung (GTH),
Nürnberg, Germany.
2010.02.24-27.

Orosz ZZ., Katona É., Facskó A., Berta A., Muszbek L.
Új metodika a XIII-as véralvadási faktor könnyből való kimutatására./ Novel methods for the determination of blood coagulation factor XIII in tears.
A Magyar Szemorvostársaság 2010. évi Kongresszusa, 3rd Symposium of Hungarian Association for Research in Vision and Ophthalmology (HARVO), Szeged.
2010.06.24-26.

Orosz ZZ., Katona É., Facskó A., Módos L., Muszbek L., Berta A.
Blood coagulation factor XIII in tears.
6th International Conference on the Tear Film & Ocular Surface: Basic Science and Clinical Relevance. Florence, Italy.
2010.09.22-25.

Orosz ZZ., Bárdos H., Facskó A., Berta A., Ádány R., Muszbek L.
Cellular factor XIII, a transglutaminase, is present in the corneal stroma.
6th International Conference on the Tear Film & Ocular Surface: Basic Science and Clinical Relevance. Florence, Italy.
2010.09.22-25.