

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**XIII-as faktor A alegység ellenes allo- és  
autoantitestek diagnosztikája és klinikai  
következményei három eset kapcsán**

**Kun Mária**

**Témavezető: Prof. Dr. Muszbek László  
akadémikus**



**Debreceni Egyetem  
Laki Kálmán Doktori Iskola  
Debrecen, 2018**

## Tartalomjegyzék

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Rövidítések jegyzéke .....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>1. Bevezetés és irodalmi áttekintés .....</b>                               | <b>6</b>  |
| 1.1. A XIII-as faktor szerkezete és funkciója .....                            | 6         |
| 1.2. FXIII hiány .....   | 9         |
| <b>2. Célkitűzés .....</b>   | <b>16</b> |
| <b>3. Anyagok és módszerek .....</b>   | <b>17</b> |
| 3.1. Fehérje preparálások .....  | 17        |
| 3.2. Az FXIII aktivitás meghatározása .....                                    | 17        |
| 3.3. FXIII antigén meghatározások .....  | 20        |
| 3.4. FXIII aktiválódást/aktivitást gátló hatás erősségének meghatározása ..... | 21        |
| 3.5. FXIII aktiválódást/aktivitást gátló hatás osztályozása .....              | 23        |
| 3.6. Kötődési vizsgálatok .....  | 25        |
| 3.7. Molekuláris genetikai analízis .....                                      | 30        |
| <b>4. Eredmények .....</b>   | <b>33</b> |
| 4.1. Első beteg .....  | 33        |
| 4.1.1. Esetleírás .....  | 33        |
| 4.1.2. FXIII meghatározások és molekuláris genetikai vizsgálat .....           | 34        |
| 4.1.3. Az alloantitest kötődése a XIII-as faktorhoz és alegységeihez .....     | 35        |
| 4.1.4. Az alloantitest FXIII-at gátló kapacitásának meghatározása .....        | 37        |
| 4.1.5. Az alloantitest klasszifikációja .....                                  | 37        |
| 4.2. Második beteg .....   | 41        |
| 4.2.1. Esetleírás és diagnózis .....   | 41        |
| 4.2.2. SPR mérések, kötődési állandók meghatározása .....                      | 43        |
| 4.2.3. Az autoantitest FXIII-at gátló kapacitásának meghatározása .....        | 44        |
| 4.2.4. Az autoantitest klasszifikációja .....                                  | 44        |
| 4.3. Harmadik beteg .....  | 47        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.3.1. Esetleírás és diagnózis .....                                    | 47        |
| 4.3.2. Kötődési paraméterek meghatározása .....                         | 51        |
| 4.3.3. Az autoantitest FXIII-at gátló kapacitásának meghatározása ..... | 52        |
| 4.3.4. Az autoantitest klasszifikációja.....                            | 53        |
| <b>5. Megbeszélés.....</b>  | <b>56</b> |
| <b>6. Összefoglalás.....</b>  | <b>60</b> |
| <b>7. Summary .....</b>   | <b>61</b> |
| <b>8. Irodalomjegyzék.....</b>  | <b>62</b> |
| <b>9. Tárgyszavak.....</b>  | <b>70</b> |
| <b>10. Keywords.....</b>  | <b>70</b> |
| <b>11. Köszönetnyilvánítás.....</b>                                     | <b>71</b> |
| <b>12. Függelék.....</b>  | <b>73</b> |

## Rövidítések jegyzéke

|  |  |
|--|--|
| <b>AP-FXIII</b>                          | XIII-as véralvadási faktor A alegység aktivációs peptid  |
| <b>APTI</b>                              | aktivált parciális tromboplasztin idő  |
| <b>BSA</b>                               | szarvasmarha (bovin) szérumalbumin   |
| <b>BU</b>                                | Bethesda egység (Bethesda Unit)  |
| <b>cFXIII</b>                            | celluláris XIII-as véralvadási faktor  |
| <b>DAB</b>                               | diamino-benzidin   |
| <b>dNTP</b>                              | didezoxi-nukleotid   |
| <b>EDC</b>                               | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid  |
| <b>EDTA</b>                              | etilén-diamin-tetraecetsav   |
| <b>FPLC</b>                              | gyors protein folyadékkromatográfia (fast protein liquid chromatography)                           |
| <b>FXIII</b>                             | XIII-as véralvadási faktor   |
| <b>FXIIIa</b>                            | aktív XIII-as véralvadási faktor   |
| <b>FXIII-A</b>                           | XIII-as véralvadási faktor A alegysége   |
| <b>FXIII-A<sub>2</sub></b>               | XIII-as véralvadási faktor A alegység dimer  |
| <b>FXIII-A<sub>2</sub><sup>*</sup></b>   | enzimatikusan aktív XIII-as faktor A alegység dimer  |
| <b>FXIII-A'</b>                          | trombin által proteolitikusan hasított XIII-as faktor A alegység                                   |
| <b>FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub></b>  | XIII-as véralvadási faktor tetramer szerkezetű formája   |
| <b>FXIII-A'<sub>2</sub>B<sub>2</sub></b> | trombin által proteolitikusan hasított XIII-as faktor tetramer                                     |
| <b>FXIII-A<sub>2</sub><sup>o</sup></b>   | nem proteolitikusan aktivált FXIII-A alegység dimer  |
| <b>FXIII-B</b>                           | XIII-as véralvadási faktor B alegység  |
| <b>cFXIII</b>                            | celluláris FXIII-as faktor   |
| <b>GEÉ</b>                               | glicin-etilészter  |
| <b>GIDH</b>                              | glutamát dehidrogenáz  |
| <b>Gly-O-ET</b>                          | glicin etilészter  |
| <b>HEPES</b>                             | 4-(2-hidroxietyl)-piperazinetán-szulfonsav   |
| <b>HRPO</b>                              | torma-peroxidáz  |
| <b>IA</b>                                | jódacetamid  |
| <b>IC<sub>50</sub></b>                   | 50%-os gátlást eredményező koncentráció  |
| <b>ISTH</b>                              | Nemzetközi Trombózis és Hemosztázis Társaság (International Society on Thrombosis and Haemostasis) |
| <b>IVIG</b>                              | intravénás immunglobulin   |

|   |   |
|---|---|
| <b><math>k_a</math></b>                 | asszociációs sebességi állandó  |
| <b><math>K_A</math></b>                 | egyensúlyi asszociációs állandó   |
| <b><math>K_D</math></b>                 | egyensúlyi disszociációs állandó  |
| <b><math>k_d</math></b>                 | disszociációs sebességi állandó   |
| <b>MEA</b>                              | $\beta$ -merkaptoetanol   |
| <b>NADP</b>                             | nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát  |
| <b>NADH</b>                             | redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid   |
| <b>NADPH</b>                            | redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát   |
| <b>NHS</b>                              | N-hidroxiszukcinimid  |
| <b>PAGE</b>                             | poliakrilamid gélelektroforézis   |
| <b>PBS</b>                              | fiziológiás só tartalmazó foszfát puffer  |
| <b>PCR</b>                              | polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)   |
| <b>PI</b>                               | protrombin idő  |
| <b>PRP</b>                              | trombocita dús plazma   |
| <b>PVDF</b>                             | polivinilidén fluorid   |
| <b>rFXIII-A<sub>2</sub></b>             | rekombináns XIII-as véralvadási faktor A alegység dimer                                       |
| <b>RU</b>                               | rezonancia jel, rezonancia egység (resonance unit; response unit)                             |
| <b>SDS</b>                              | nátrium-dodecil-szulfát   |
| <b>SLE</b>                              | szisztémás lupus erythematosus  |
| <b>SPR</b>                              | felületi plazmon rezonancia (surface plasmon resonance)                                       |
| <b>SSC</b>                              | Tudományos és Standardizációs Bizottság (Scientific and Standardization Committee)            |
| <b>TI</b>                               | trombin idő   |
| <b>TMB</b>                              | tetrametilbenzidin  |
| <b>WHO</b>                              | Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)                                       |
| <b><math>\alpha_2</math>-PI</b>         | $\alpha_2$ -plazmin inhibitor   |
| <b><math>\alpha_2</math>-PI (1-12)</b>  | $\alpha_2$ -plazmin inhibitor N-terminális szekvenciájának megfelelő szintetikus dodekapeptid |
| <b><math>\Delta A/\text{min}</math></b> | 1 percre eső abszorbanciaváltozás   |

# 1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

## 1.1. A XIII-as faktor szerkezete és funkciója

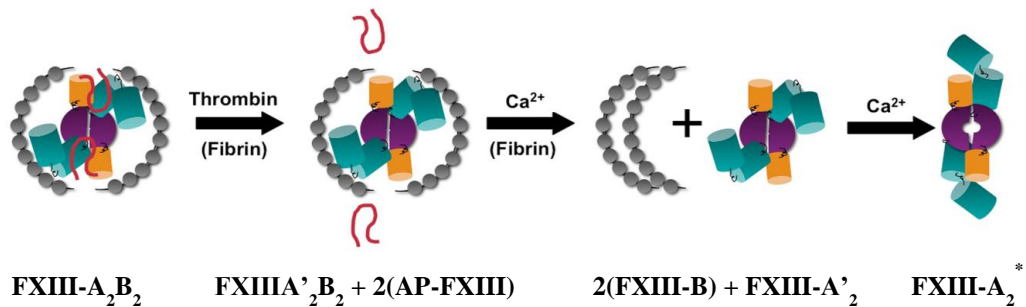
A véralvadás XIII-as faktora (FXIII) in vivo inaktív formában, fibrinogénhez kötődve kering, plazma koncentrációja 14-28 mg/L. Két katalitikus/potenciálisan aktív A alegységből (FXIII-A) és két gátló/stabilizáló B alegységből (FXIII-B) felépülő, 326 kDa molekulatömegű heterotetramer proenzim (FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>). Mindkét alegység elsődleges szerkezetét cDNS klónozással és az aminosav szekvenciák analizálásával határozták meg. Az FXIII alegységei között nagy affinitású kötődést bizonyítottak, a kölcsönhatásra vonatkozó K<sub>d</sub> érték a 10<sup>-10</sup> M nagyságrendű tartományba esik [1, 2].

A 732 aminosavból álló, 83 kDa-os FXIII-A-t, négy struktúrális domén alkotja: β-szendvics, katalitikus központi, β-hordó 1 és β-hordó 2 domén. A molekula N terminális végén egy 37 aminosavból álló aktivációs peptid (AP-FXIII) található. Az FXIII-A felületén lévő Ca<sup>2+</sup> kötőhelyek az aktiváció számára esszenciálisak. A molekula öt szabad –SH csoporttal rendelkezik, melyek nem képeznek diszulfid-hidakat. Döntően csontvelő eredetű sejtek termelik. A plazmában mennyiségének 99%-a FXIII-B-vel komplexben található [2]. Intracellulárisan FXIII-A<sub>2</sub> homodimerként (FXIII-A<sub>2</sub>, cFXIII) megtalálható vérlemezkékben, monocitákban és makrofágokban [1, 3-5]. Egyes tanulmányok szerint előfordul oszteoblasztokban, oszteocitákban és kondrocitákban is [6, 7].

Az FXIII-B 75 kDa molekulatömegű, hepatociták által szintetizált 641 aminosavból álló glikoprotein, mely 8,5% szénhidrátot is tartalmaz. A fehérjét alkotó 10 ismétlődő „sushi” domén mindegyikét 2-2 belső diszulfid-híd tartja össze. Minden egyes domén megközelítőleg 60 aminosavat tartalmaz. A plazmában az FXIII-B mennyisége hozzávetőleg kétszerese az FXIII-A mennyiségének, körülbelül 50%-a szabadon kering. Meghosszabbítja az A alegység élettartamát azáltal, hogy megakadályozza, annak spontán aktivációját és feltehetően degradációját is. Valószínűleg az FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> fibrinogénhez való kötődése is az FXIII-B-n keresztül jön létre [8-12].

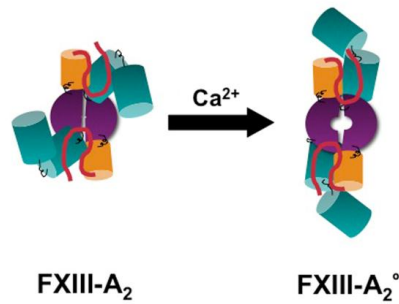
Az FXIII a véralvadás utolsó fázisában aktiválódik és alakul át aktív transzglutaminázzá. Az aktiváció során trombin hatására egy 37 aminosavból álló aktivációs peptid (AP-FXIII) hasad le az A alegység N-terminális végéről (FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>). Ezt követően Ca<sup>2+</sup> jelenlétében a B alegységek disszociálnak és az FXIII-A

eredetileg fedett, aktív helye a szubsztrát számára hozzáférhetővé válik. A folyamat eredményeként kialakul az aktív forma (FXIII-A<sub>2</sub><sup>\*</sup>).



**1. ábra.** A plazma XIII-as faktor (FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) egy többlépcsős folyamatban trombin és Ca<sup>2+</sup> hatására aktív transzglutaminázzá alakul. Az FXIII komplex A alegységéről a trombin lehasítja az AP-FXIII-at, ezután Ca<sup>2+</sup> jelenlétében az FXIII-B alegységek leválnak, majd a hasított FXIII-A dimer (FXIII-A'<sub>2</sub>) enzimatisan aktív konformációt vesz fel (FXIII-A<sub>2</sub><sup>\*</sup>). A zöld és narancssárga hengerek az FXIII-A β-hordó és β-szendvics doménjeit, a lila félkörök a katalitikus domént reprezentálják, míg az AP-FXIII-at piros hurkok jelzik. A hajlított 10 gyöngyszerű alakzat az FXIII-B-t ábrázolja. Az ábra az [1] szám alatt idézett közleményben szereplő komplex ábra egy részlete.

A cFXIII aktivációja fiziológiásan nem proteolitikus aktiváció révén zajlik, melynek során az FXIII-A<sub>2</sub> emelkedett Ca<sup>2+</sup> koncentráció jelenlétében konformációs változáson megy keresztül és enzimatisan aktívvá válik (FXIII-A<sub>2</sub><sup>°</sup>) [1].



**2. ábra. A celluláris XIII-as faktor (FXIII-A<sub>2</sub>) nem proteolitikus aktivációja.** A sejt aktivációja során megemelkedett intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció kiváltja az FXIII-A<sub>2</sub> konformáció változását, amely ennek következtében aktív enzimmé alakul (FXIII-A<sub>2</sub><sup>o</sup>). A zöld és narancssárga hengerek az FXIII-A β-hordó és β-szendvics doménjeit, a lila félkörök a katalitikus domént reprezentálják, az AP-FXIII-et piros hurkok jelzik. Az ábra az [1] szám alatt idézett közleményben szereplő komplex ábra egy részlete.

Az FXIII-A szerkezete a transzglutaminázokra jellemző, aktív centrumában a 314-es pozíciójú cisztein körül az aminosav szekvencia: Gly-Gln-Cys-Trp. A központi doménjében található katalitikus triád (Cys314, His373, Asp396) nem aktivált FXIII-A esetében hozzáférhetetlen a szubsztrátok számára. Az aktivált FXIII (FXIIIa) éppúgy, mint a többi transzglutamináz kémiaiailag egy acil-transzfer reakciót katalizál, amelyben az acil donor egy peptidláncban található glutamin γ-karboxamid-csoportja, az acil akceptor egy primer amin [13-17]. A reakció első lépéseként a glutamin γ-karboxamid-csoportja ammónia felszabadulással járó tioészter kötést létesít az FXIII aktív centrumában található ciszteinnel. Ezt követően a primer amin izopeptid kötéssel összekapcsolódik a glutamin donor peptid szubsztráttal egy nukleofil szubsztitúciós reakció keretében, mely során az aktív enzim szabaddá válik. Ha az acil akceptor primer amin egy peptidben/fehérjében lévő lizin primer aminocsoportja, akkor az eredmény a két peptid lánc kovalens ε(γ-glutaminil)-lizil kötéssel történő keresztkötése. A kialakult kötés egy, a peptid láncre merőleges peptid kötés, amit izopeptid kötésnek hívunk. Míg a glutamin szubsztrátot illetően az enzim meglehetősen specifikus, addig az amin szubsztrát szempontjából kevésbé. A reakcióban résztvevő lizin oldallánccokat több fehérje szolgáltathatja és kis molekulatömegű primer aminok is helyettesíthetik. Megfelelő amin szubsztrát nélkül hidrolízis megy végbe és a glutamin oldallánc deamidálódik [15, 18].

A véralvadásban az FXIIIa fő feladata az újonnan képződött alvadék védelme a véráramlás következtében fellépő nyírófeszültség mechanikai hatásától és a fibrinolitikus rendszer által okozott degradációtól. A fibrin  $\alpha$ - és  $\gamma$ -láncainak keresztkötésével, fibrin  $\gamma$ -lánc dimerek és nagy molekulású  $\alpha$ -lánc polimerek kialakításával mechanikailag stabilizálja az alvadéket. Emellett, a plazmin fő inhibitorát, az  $\alpha_2$ -plazmin inhibitorát ( $\alpha_2$ -PI) az FXIIIa kovalensen a fibrin  $\alpha$ -láncához rögzíti, megakadályozva ezzel a trombus korai, plazmin által történő degradációját [1, 3]. Az FXIIIa inaktivációja a polimorfonukleáris granulociták által szekretált proteolitikus enzimek révén megy végbe [19]. Ennek a folyamatnak a jelentősége abban áll, hogy megakadályozza a túlzottan keresztkötött trombus képződését, melynek létrejötte gátolná a fibrin eliminációját, amikor arra már nincs szükség.

## 1.2. FXIII hiány

Az FXIII hiányt és annak klinikai tüneteit először Duckert és munkatársai írták le 1960-ban [20]. Azóta több mint 500 esetet írtak le, melyekben a fellépő vérzéses rendellenességek oka az FXIII hiánya [21]. Öröklött és szerzett formája egyaránt ismert. Előbbi öröklődési típusa autoszomális recesszív, átlagos gyakorisága az európai és észak amerikai populációban 1:2 millióhoz [22-26]. Olyan közösségekben, ahol a rokonházasságok elterjedtek, a betegség akár 10-20-szor gyakrabban is előfordulhat. Különösen gyakori olyan országban, mint Irán, ahol a rokonházasság mellett feltehetően alapító hatás is érvényesül [21, 27, 28]. Egy 2012-ben közölt osztályozás szerint 0,05 IU/mL alatt beszélhetünk súlyos vérzékenységet okozó FXIII hiányról, 0,05 és 0,3 IU/mL között az FXIII hiány mérsékelt és 0,3 és 0,5 IU/mL között enyhe hemorrhágiás diathesist okoz [29, 30]. Valójában a legtöbb súlyosan vérzékeny FXIII hiányos beteg esetén az FXIII szint 0,01 IU/mL (1%) alatt van. A 0,03 IU/mL és 0,1 IU/mL között lévő FXIII szint már elégséges a spontán hemorrhágiás történések kivédéséhez. Az FXIII hiány egyik első és egyben leggyakoribb, az esetek 80%-ánál megjelenő tünete, csecsemőkorban a köldökcsomónál fellépő, jellegzetesen késleltetett típusú vérzés. Emellett testszerte különböző típusú vérzések jelentkezhetnek, a leggyakrabban megjelenő tüneteket az 1. táblázat foglalja össze. Tekintettel az intracraniális vérzés magas kockázatára (30%) és

az esetleges súlyos következményekre a betegség mielőbbi felismerése és hosszú távú kezelése kulcsfontosságú.

**1. táblázat. Az FXIII hiány leggyakoribb tünetei és azok előfordulásának gyakorisága.**

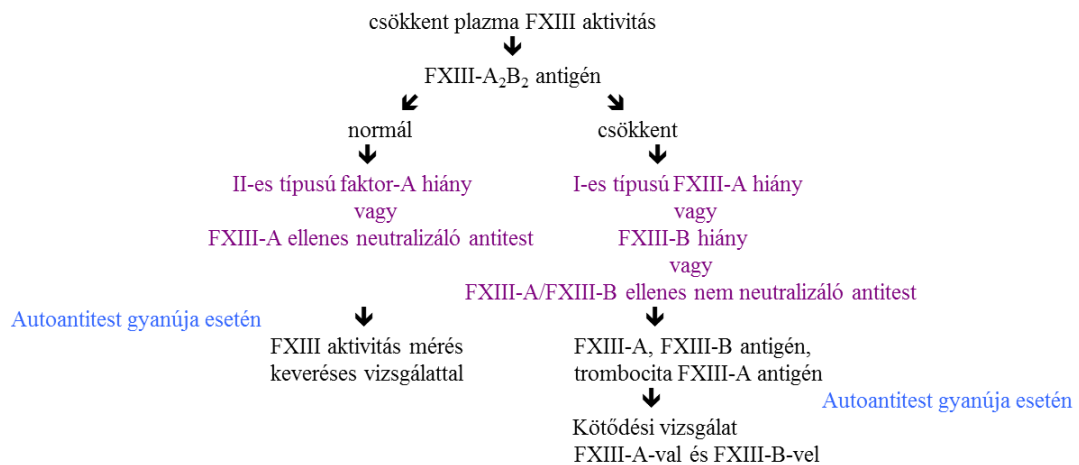
| <b>Tünetek</b>          | <b>Gyakorisága (%)</b> |
|-------------------------|------------------------|
| köldökcsonk vérzés      | 80                     |
| felületes zúzódások     | 60                     |
| bőr alatti bevérzések   | 55                     |
| száj- és fogínyvérzések | 30                     |
| intracraniális vérzések | 30                     |
| izomközti hematómák     | 27                     |
| izületi bevérzések      | 24                     |
| posztoperatív vérzések  | 17                     |
| peritoneális vérzések   | 14                     |
| orrvérzés               | 10                     |

*A táblázat a [21] szám alatt idézett közleményben szereplő egyik táblázat módosított változata.*

Az FXIII nem csak a hemosztázishoz elengedhetetlen. Nélkülözhetetlen a terhesség fenntartásában, részt vesz a sebgyógyulásban és az érújdonképződésben is [1, 21]. Az FXIIIa az angiogenezis egyik kulcs lépését szabályozza az endothel sejtek migrációjának, proliferációjának és életképességének fokozásával, valamint a thrombospondin-1, mint jól ismert antiangiogenetikus faktor szintézisének csökkentésével [31, 32]. A sebgyógyulásban betöltött szerepe elsősorban a fibrolasztokra kifejtett hatásán keresztül valósul meg. Az FXIIIa szignifikánsan fokozza ezen sejtek proliferációját, migrációját és gátolja az apoptózisukat [33, 34]. Az FXIII-A kimutatható a méh hisztiocitáiban [35], az implantációs szövet makrofágjaiban [36] és a placentában [37] is. Terhesség során az FXIII-A antigén szint, valamint az FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigén szint és az FXIII aktivitás csökkenést mutat egészséges nőkben [38, 39]. Az öröklött súlyos FXIII hiányos nők pótló terápia nélkül a várandósság korai szakaszában (első trimeszter) elvesztik a magzatot. Az FXIII nem szükséges a peteéréshez, a megtermékenyítéshez, a megtermékenyített petesejt beágyazódásához és az embrio fejlődéséhez sem. Az FXIIIa nagy valószínűséggel keresztkötésekkel stabilizálja a Nitabuch rétegben lévő fibrint és fibronektint, valamint egyfajta szabályozóként működik az urokináz típusú plazminogén aktivátor indukálta fibrinolízissel szemben. A Nitabuch réteg egyrészt immunológiai barrierként szolgál az embrionális és az anyai szövet találkozásánál, másfelől részt vesz a méhlepény

rögzítésében. Emellett az FXIIIa feltételezhetően szerepet játszik a citotrofoblasztikus héj kialakulásában és angiogenetikus hatásaival hozzájárul a placenta véredény képződéséhez [1, 40-42].

Az ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis) tudományos és standardizációs bizottsága, az SSC (Scientific and Standardization Committee) hivatalos ajánlást tett az FXIII hiány diagnózisára és osztályozására [22], ennek alapján diagnosztikus algoritmus is született [24]. Eszerint elkülönítünk FXIII-A és FXIII-B hiányt. Utóbbi kevésbé súlyos, ezen betegek FXIII aktivitása rendszerint 5-10% közé tehető, ami enyhe vérzékenységet okoz [18, 22, 43-45]. Az FXIII-A hiány I-es típusába a kvantitatív defektusok, míg a II-es típusába a kvalitatív defektusok tartoznak. Előbbire jellemző, hogy a plazmában és a vérlemezkékben mért FXIII aktivitás nem detektálható vagy erősen csökkent. A plazma FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, valamint az FXIII-A antigén szintje is alacsony (vagy detektálhatatlan), mindezek mellett pedig az FXIII-B antigén szintje 30-60% között van. A II-es típusú FXIII-A hiány esetén az FXIII aktivitás csökkent, míg az FXIII-A<sub>2</sub> antigén szint referencia tartományba esik (3. ábra). Az ilyen esetek extrém ritkák, eddig mindössze egy olyan betegről tudunk, akinél a kiváltó mutáció homozigóta formában szerepelt [46]. Az FXIII-A hiány mutációs adatbázisa (2017 novemberi adat) összesen 69 kóroki mutációt regisztrál az FXIII-A génben, ezek közül 34 missense mutáció, 21 inszerció/deléción, 9 splice site mutáció és 5 nonsense mutáció [47]. A mutációk eloszlása a génen egyértelműen mutatja, hogy nincs mutációs forrópont.



**3. ábra. Az FXIII deficienciák diagnosztikájához és osztályozásához használatos algoritmus. Az ábra a [24] szám alatt idézett közlemény egyik ábrájának módosított változata.**

Az FXIII hiány a leginkább aluldiagnosztizált vérzékenység, felismerése speciális diagnosztikai jártasságot igényel, mivel a véralvadási szűrőtesztek, mint a protrombin idő (PI), az aktivált parciális tromboplastin idő (APTI) vagy a trombin idő (TI) nem jelzik. A vérzéses stroke magas kockázata miatt azonban alapvető fontosságú a betegség korai diagnózisa és megfelelő kezelése. A súlyos öröklött FXIII hiányos betegek részére egész életükön át tartó pótló terápia szükséges. Öröklött FXIII hiány esetén a vírus inaktivált plazma FXIII koncentrátummal, Fibrogammin P-vel (Corifact, CLS Behring, Marburg, Németország), illetve a rekombináns FXIII-A készítménnyel (rFXIII-A<sub>2</sub>, Novothirteen, Tretten, Cartidecacog, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dánia) történő profilaxis ajánlott [48-51]. A Fibrogammin P humán vérből előállított, vírus inaktivált, komplex FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>. A rFXIII-A<sub>2</sub>-t specifikusan az öröklött FXIII-A hiány kezelésére fejlesztették ki. Az FXIII-A genetikai információjának élesztőgombákba való átvitelével állítják elő, így vírus- és prionmentes. Bekerülve a keringésbe, a beteg saját szabad FXIII-B-jével alkot stabil komplexet [2].

Az FXIII ellenes antitestek megjelenése nagy kihívást jelent, mivel többnyire nehezen uralható vérzésekkel járnak. Megkülönböztetünk allo- és autoantitesteket. Az alloantitestek öröklött FXIII hiányos betegekben a pótló terápia kapcsán fejlődhetnek ki. Megjelenésük kifejezetten ritka, jelenlegi munkánkat megelőzően mindössze

három közlemény számolt be ilyen esetről, azonban egyikben sem történt meg az alloantitest pontos karakterizálása [52-54]. FXIII ellenes autoantitestek minden előzmény nélkül is megjelenhetnek, súlyos szerzett FXIII hiányt okozva. Az autoantitestek kialakulása gyakran autoimmun [55] vagy malignus betegségekhez [56], ill. krónikus gyógyszeres kezelésekhez (mint például: izoniazid, fenitoin, ciprofloxacín) társul [57], de – különösen idős korban – idiopátiásan is előfordul [58]. Leggyakrabban kiterjedt intramuszkuláris, szubkután és intraperitoneális vérzést okoznak. A legtöbb esetben IgG típusúak az antitestek, melyek az FXIII mindkét alegysége ellen termelődhetnek, jöllehet az FXIII-A ellenes antitestek sokkal gyakoribbak. Vérzékenységet okozó FXIII-B ellenes autoantitestet eddig csak három esetben írtak le [59, 60]. Az első ilyen, 2009-ben megjelent közlés intézetünkben származik [59]. Mindössze egyetlen esetben számoltak be FXIII-B ellenes alloantitest kialakulásáról [52].

Az FXIII ellenes antitestek okozta súlyos vérzékenység, ill. aktuálisan előforduló súlyos vérzés kezelésének nincsenek egységes irányelvei, ezért legtöbbször a kezelés a különböző lehetőségek empirikus alkalmazását jelenti [61]. Magas inhibitor titer esetén az FXIII koncentráció adása hatástalan, sőt alloantitesteknél faktor pótlás esetén az anamnesztikus reakció miatt még emelkedhet is az antitest titer. A terápia célja főként a vérzés kontrollálása, mivel azonban ennek limitáltak a lehetőségei, sokszor csak vérpótlás történik. A megoldás az antitest mihamarabb történő eradikációja. A megkísérelt terápiaik közé tartoznak a szteroidokkal és ciklofoszfamiddal (esetleg ciklosporinnal) történő immunszuppresszió, valamint az antitest eltávolítása immunadszorpcióval. Rituximab (anti-CD20 monoklonális antitest) alkalmazása is hasznos lehet, és időnként intravénás immunglobulin (IVIg) adását is megkísérlik.

Tekintettel az FXIII ellenes antitestek okozta FXIII hiány ritka előfordulására, nagyobb klinikai tanulmányok nem kivitelezhetőek, habár a koncentrált diagnosztikus erőfeszítéseknek köszönhetően az utóbbi időben több, szerzett FXIII hiányos beteget diagnosztizáltak, főként Japánban [60]. Az antitestek alcsoportokba sorolását a 2. táblázat mutatja. A neutralizáló antitest gátolhatja az FXIII aktiválását és/vagy az FXIIIa aktivitást is. A nem-neutralizáló antitest immunkomplexet képez az FXIII-mal és felgyorsítja annak keringésből történő eliminációját. A két hatás kombináltan is előfordulhat. A neutralizáló FXIII-A ellenes inhibitorok gátolhatják a trombin, valamint a  $\text{Ca}^{2+}$  aktiváló hatását (Ia, ill. Ib típus), a már aktív FXIII-at (II-es típus), az

FXIIIa-fibrin kölcsönhatást (III-as típus) vagy összetett módon is kifejthetik hatásukat (IV-es típus). Az FXIII-B ellenes antitest esetében természetesen csak nem neutralizáló hatásról lehet szó. Ezen antitestek a szabad és a komplexben lévő FXIII-B-hez egyaránt kötődnek, s így a potenciálisan aktív FXIII-A alegység eliminációját is meggyorsítják [59].

**2. táblázat. Az FXIII ellenes antitestek csoportosítása.**

| Alegység specificitás | Alcsoport        | Hatás  |
|-----------------------|------------------|--|
| FXIII-A ellenes       | Neutralizáló     | I-es típus: FXIII aktiváció gátlása<br>Ia típus: Az AP-FXIII trombin által történő lehasításának gátlása<br>Ib típus: A hasított FXIII $Ca^{2+}$ indukálta aktivációjának gátlása<br>II-es típus: FXIIIa gátlása<br>III-as típus: Fibrinhez való kötődés gátlása<br>IV-es típus: Összetett neutralizáció |
|                       | Nem-neutralizáló | Felgyorsítja az FXIII eliminációját a keringésből  |
|                       | Kombinált hatású | Felgyorsítja az eliminációt és gátolja az FXIII aktivitást/aktivációt  |
| FXIII-B ellenes       | Nem-neutralizáló | Felgyorsítja az FXIII eliminációját a keringésből  |

*A táblázat a [25] szám alatt idézett közlemény egyik táblázatának módosított változata.*

Az alloantitest kialakulására a korábban hatékony FXIII koncentráttal végzett profilaxis hatástalansága hívja fel a figyelmet. Az FXIII ellenes autoantitestek pedig olyan, döntően nem fiatal egyéneknél fordulnak elő, akiknek korábban nem voltak vérzéses tünetei. A betegről és egészséges személyektől származó plazmák keverékéből végzett FXIII aktivitás mérés önmagában elegendő a neutralizáló antitest detektálására. A nem-neutralizáló antitest jelenlétére az FXIII koncentráttal beadását követő farmakokinetikai vizsgálat (megrövidült féléletidő a plazmában) utal. A neutralizáló antitest titer megállapítására leginkább ajánlott módszer jelenleg a Bethesda-Nijmegen módszer [22, 61, 62]. Ezzel a teszttel kapott eredmények azonban biokémiaileg nem értelmezhetők és a teszt nem nyújt információt az antitest konkrét hatásmechanizmusát illetően. A továbbiakban a pontos besoroláshoz tudnunk kell, hogy az antitest gátolja-e az FXIII trombin és/vagy  $Ca^{2+}$  indukálta aktivációját és/vagy

a már aktivált FXIII transzglutamináz aktivitását. A nem neutralizáló antitestek további karakterizálásához kötődési vizsgálatok szükségesek.

## 2. Célkitűzés

1/ Két FXIII-A ellenes autoantitest okozta szerzett FXIII hiány és egy alloantitesttel kombinálódott öröklött FXIII-A hiány kórtörténetének leírásával terveztük gazdagítani az FXIII ellenes antitestek patológiás jelentőségét leíró irodalmat.

2/ Szerettük volna bemutatni a diagnózishoz vezető laboratóriumi algoritmus alkalmazását.

3/ A neutralizáló antitest titer meghatározására szolgáló Nijmegen-Bethesda módszer mellett, szerettük volna a farmakológiában használt 50%-os gátlást ( $IC_{50}$ ) meghatározó módszert adaptálni az antitest okozta gátlás erősségének mérésére.

4/ Célul tűztük ki az antitestek biokémiai hatásának felderítését, azaz pontos alosztályba sorolásukat.

5/ Célunk volt továbbá egy, az erre a célra még nem használt biokémiai módszer, a felületi plazmon rezonancia (surface plazmon resonance; SPR) bevezetése az antitestek FXIII alegységekhez való kötődésének, affinitásának meghatározására.

Azt gondoljuk, hogy megismervén ezen antitestek támadási pontjait és hatásait, pontosabb képet kaphatunk az FXIII ellenes antitestek okozta vagy általuk súlyosbított FXIII hiány patomechanizmusát illetően, így akár új terápiás lehetőségek kifejlesztéséhez is hozzájárulhatunk a jövőben.

### **3. Anyagok és módszerek**

#### **3.1. Fehérje preparálások**

A tisztított FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-t és FXIII-B-t egészséges véradoktól gyűjtött humán plazmából intézetünkben Lóránd és munkatársai, ill. Chung és munkatársai módszereivel állítottuk elő [63-66]. Az ismételt fagyasztás-olvasztás hatására az FXIII-A leválik a komplexről, majd az FXIII-B-t kromatográfias eljárással tisztítják tovább, ami intézetünkben FPLC (fast protein liquid chromatography, gyors protein folyadékromatográfia) készülékkal történik. Az élesztő sejtekben előállított rFXIII-A<sub>2</sub>-t Éva Olsen doktornőtől (Novo Nordisk, Måløv, Dánia) kaptuk. Normál, illetve beteg plazmából az IgG-t HiTrap protein G HP oszlop segítségével preparáltuk. A tisztítás során az oszlopot ún. kötőpufferrel (20 mM Na-foszfát puffer; pH: 7,0) mostuk át. Ezután a 0,22 µm pórusméretű membránszűrőn átszűrt és kötőpufferrel 5-szörösére hígított szérum mintát átengedtük az oszlopon (áramlási sebesség: 0,5 mL/perc). Ezt követte egy mosási lépés (10-szeres mintatérfogatnyi kötőpufferrel), majd 0,1 M (pH: 2,7) glicin-HCl-el történő eluálás. A mintákat 50-50 µL 1M TRIS/HCl-t (pH: 9,0) tartalmazó kémcsövekbe gyűjtöttük 13 cseppenként, ami közel 0,5 mL végtérfogatot jelentett. A fehérje koncentráció mérése 280 nm-en fotometriásan történt. Az egész folyamatot négyszer ismételtük meg az IgG teljes kikötődése érdekében. Utolsó lépésként a kipreparált IgG-t egy éjszakán át 4 °C-on fiziológias só-t tartalmazó foszfát pufferben (PBS; pH: 7,2) dializáltuk.

#### **3.2. Az FXIII aktivitás meghatározása**

A betegektől származó, 1/10 térfogatú 0,109 M Na-citráttal alvadásgátolt vérmintákból centrifugálással szeparált (4 °C, 1400 g, 20 perc) plazma mintákat felhasználásig -80 °C-on tároltuk. A kanadai betegektől származó plazma mintákat száraz jég között, légi úton szállították Debrecenbe. Az FXIII aktivitás méréseket mosott trombocita szuszpenzióból is elvégeztük, melyet a következők szerint állítottunk elő: először trombocita dús plazmát (PRP) készítettünk a citráttal alvadásgátolt vérminták 120 g-n (15 perc, 37 °C) történő centrifugálásával. A PRP 2/3-at részét leszívtuk, ezt követően a trombocitákat centrifugálással üleptítettük (37

°C, 1400 g, 20 perc), majd háromszor mostuk mosópufferben (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mg/ml glükóz, 10 mM 4-(2-hidroxietyl)-piperazinetyl-szulfonsav (HEPES); pH: 7,4). A mosott trombocitákat 1%-os Triton X-100-al és szonikálással (3 x 10 másodperc) lizáltuk. A lizátumot centrifugáltuk (37 °C, 1400 g, 15 perc) és a felülúszóból mértük az FXIII aktivitást.

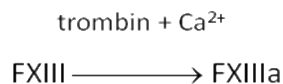
A plazma és trombocita minták FXIII aktivitását az intézetünkben kifejlesztett ammónia felszabadulást mérő teszttel határoztuk meg [67]. Ehhez a Rea-chrom FXIII, ill. Technochrom<sup>®</sup> FXIII reagens készlet néven a Reanal-ker (Budapest, Magyarország) és a Technoclone (Bécs, Ausztria) cégek által forgalmazott kiteket használtuk. A kitek tartalmazzák a meghatározáshoz szükséges reagenseket (aktivátor, detektáló, NADPH, inhibitor, stabilizátor), melyek összetételét a 3. táblázat tartalmazza. A minták FXIII aktivitás méréseihez az aktiváló és a detektáló oldatok 1:1 arányú keverékét használtuk 1/20-ad térfogat stabilizátor oldat hozzáadásával. A plazmában végbemenő FXIIIa hatástól független ammónia képződéssel járó folyamatok miatt némi abszorbancia csökkenés alakulhat ki, mely a valós FXIII aktivitáshoz képest néhány százaléknyi eltérést eredményezhet. Ennek korrigálására negatív kontrollként a kit részét képező vak reagens oldattal készült minta vakot használtuk. Elkészítésekor a stabilizáló oldatot inhibitor oldatra cseréltük és az így kapott értékeket kivontuk a minták értékeiből. A vak reagensben lévő jódotacetamid (IA), mint az aktív centrumban SH csoporttal rendelkező enzimek általánosan használt irreverzibilis gátlószere, megszünteti az FXIIIa enzimaktivitását.

**3. táblázat. Az FXIII aktivitásának spektrofotometriás meghatározására általunk is használt *in vitro* diagnosztikai reagens készlet oldatainak összetétele.**

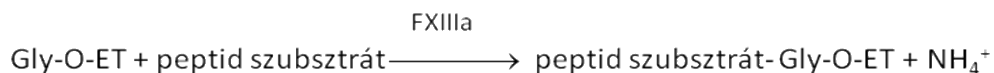
|                                  |             |                                  |             |
|----------------------------------|-------------|----------------------------------|-------------|
| <b>Aktivátor oldat (3 mL-re)</b> |             | <b>Detektáló oldat (3 mL-re)</b> |             |
| Hepes puffer                     | 115 mmol/L  | Hepes puffer                     | 23,1 mmol/L |
| Trombin                          | 46,2 kU/L   | Glicin-etylészter                | 11,6 mmol/L |
| Fibrin inhibitor tetrapeptid     | 4,6 mmol/L  | $\alpha$ -ketoglutarát           | 16,2 mmol/L |
| Polibrén                         | 11,5 mg/L   | PI(1-12) peptid szubsztrát       | 10,1 mmol/L |
| Ditiotreitol                     | 0,26 mmol/L | ADP                              | 1,4 mmol/L  |
| CaCl <sub>2</sub>                | 25 mmol/L   | GIDH                             | 50 kU/L     |
| NADPH                            | 1,61 mmol/L |                                  |             |
|                                  |             |                                  |             |
| <b>NADPH oldat</b>               |             | <b>Stabilizátor oldat</b>        |             |
| NADPH                            | 1,61 mmol/L | Na-azid                          | 5,8 g/L     |
|                                  |             |                                  |             |
|                                  |             | <b>Inhibitor oldat</b>           |             |
|                                  |             | 2-jódotacetamid                  | 23,2 mmol/L |
|                                  |             | Na-azid                          | 5,8 g/L     |

A módszer alapja, hogy a plazmában lévő FXIII-at trombinnal és kalciummal aktiváljuk. Eközben a trombin hatására történő fibrin kiválást egy fibrin polimerizációt gátló tetrapeptiddel akadályozzuk meg. A keletkezett FXIIIa az  $\alpha_2$ -plazmin inhibitor N-terminális szekvenciájának megfelelő dodekapeptid ( $\alpha_2$ -PI(1-12)) kettes pozíciójában lévő glutaminhoz egy amin szubsztrátot (glicin etilészter, Gly-O-ET) köt és ammóniát szabadít fel. Utóbbi mennyiségét a glutamát dehidrogenáz (GIDH) által katalizált, redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfáttá (NADP<sup>+</sup>) történő átalakulásával járó indikátor reakcióban fotometriásan mérjük. A NADPH fogyásának sebessége, azaz 340 nm-en mért abszorbanciájának 5-10 perc között bekövetkező csökkenése arányos az FXIII aktivitással (4. ábra).

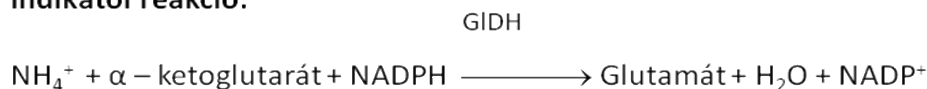
**FXIII aktiválása:**



**Transz glutamináz reakció:**



**Indikátor reakció:**



**4. ábra. Az XIII-as faktor aktivitásának meghatározására általunk is használt módszer elve.** Az FXIII trombin és  $\text{Ca}^{2+}$  hatására aktiválódik. Az FXIIIa által katalizált transz glutamináz reakció során  $\text{NH}_4^+$  keletkezik. Utóbbi a GIDH által katalizált reakcióban  $\alpha$ -ketoglutaráttal lép reakcióba. A reakció során a NADPH NADP<sup>+</sup>-vé alakul. A NADPH 340 nm-en erősen abszorbeál, míg a NADP<sup>+</sup> nem, így a 340 nm-en mért abszorbancia csökkenés az FXIIIa aktivitást tükrözi.

Az FXIII aktivitás meghatározását a Modular EVO P800 (Hitachi, Roche, Basel, Svájc) analizátorral végeztük. A készülék az 1 percre eső átlagos abszorbancia csökkenést ( $\Delta A/\text{min}$ ) automatikusan kiszámítja. Ezt követően a kalibrációs plazma %-os értékére és a hozzá tartozó  $\Delta A/\text{min}$ -re vonatkoztatva megadtuk a FXIII aktivitást. A reakció első 5 percében (lag fázis) történik az FXIII aktiválódása és a mintában lévő endogén ammónia felhasználódása. Amennyiben az FXIII aktivitás 5% alatt volt, a

nagyobb pontosság és reprodukálhatóság elérése érdekében a minta mennyiségét és a mérési tartomány idejét megdupláztuk [18]. Kalibrátorként az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) 1st International Standard Factor XIII Plasma, Human (National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Egyesült Királyság) kalibrátorát használtuk.

Montreáli kollaborációs partnereink az FXIII aktivitás mérésére a Berichrom<sup>®</sup> FXIII tesztet (Siemens, Marburg, Németország) alkalmazták, mely a kinetikus ammónia felszabadulás mérésének másik, kereskedelmi forgalomban elérhető módosított változata [68]. Ez abban különbözik a fent leírt módszertől, hogy oligopeptid szubsztrátként egy a  $\beta$ -kazeinben lévő FXIIIa szubsztrát glutamin körüli szekvenciájához hasonló dekapeptidet és az indikátor reakcióban redukált nikotinamid-adenin-dinukleotidot (NADH) alkalmaz. Emellett ez a reagens készlet nem tartalmazza a IA jelenlétében végzett plazma vak meghatározáshoz szükséges inhibitor reagenst, amelyet így a felhasználóknak kellett elkészíteni [69].

### **3.3. FXIII antigén meghatározások**

Az FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, az FXIII-A, a totál és a szabad FXIII-B antigén szintek mérése ELISA technikával történt. A plazma FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigén meghatározást egy, az intézetünkben korábban kifejlesztett egylépéses ELISA módszerrel végeztük. A sztreptavidinnel fedett mikrolemezeken 0,5 mol/L NaCl-ot, 0,05% Tween 20-at és 5 g/L szarvasmarha szérumalbumint (BSA) tartalmazó 0,15 mol/L (pH: 7,2) foszfát pufferrel hígított plazma mintákhoz (70  $\mu$ L), biotinált FXIII-B ellenes elfogó (70  $\mu$ L) és torna-peroxidázzal (HRPO) jelzett FXIII-A ellenes detektáló (70  $\mu$ L) monoklonális antitesteket adtunk. A keveréket 1 órán keresztül inkubáltuk, majd mosást követően (3 x 300  $\mu$ L foszfát puffer) tetrametilbenzidint (TMB, 200  $\mu$ L, 0,1 mg/L) és 0,006%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmazó foszfát puffert (0,05 mol/L, pH: 5) adtunk a mikrolemez vályúiba. 30 perc múlva a reakciót H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-el (2 mol/L, 50  $\mu$ L) állítottuk le és a kialakult abszorbanciát 450 nm-en iEMS Reader MF microplate készüléken (Labsystem, Budapest, Magyarország) mértük [70]. Az FXIII-A antigén szint mérésekor ugyancsak sztreptavidinnel fedett mikrolemezt, biotinált elfogó és HRPO jelzett detektáló monoklonális antitesteket használtunk, de itt az antitestek két különböző FXIII-A epitóppal reagáltak [71]. A totál FXIII-B antigén meghatározás az előbbiekhöz hasonlóan megy végbe azzal a különbséggel, hogy mindkét monoklonális antitest

FXIII-B ellenes. A két FXIII-B ellenes antitest különböző epitópok ellen irányult és a szabad, ill. komplexben lévő FXIII-B-hez egyformán kötődött. A plazmában lévő szabad FXIII-B alegység meghatározására a totál FXIII-B mérésénél alkalmazott biotinált, elfogó antitestet olyan monoklonális antitestre cseréltük, amely kizárólag csak a szabad FXIII-B-hez kötődik, a komplexben lévővel nem reagál. Kalibrátorként az FXIII komplex és az A alegység esetében ugyanazt a WHO kalibrátort használtuk mint az FXIII aktivitás mérésénél. A totál FXIII-B méréséhez kalibrátorként 40 egészséges egyéntől gyűjtött plazma keverékét, szabad FXIII-B meghatározáshoz pedig ismert koncentrációjú tisztított FXIII-B alegységet használtunk.

### **3.4. FXIII aktiválódást/aktivitást gátló hatás erősségének meghatározása**

Az FXIII aktiválódást/aktivitást gátló immunglobulinok mennyiségének meghatározása két módszert használtunk:

- 1/ Az alvadási faktor ellenes gátlótestek hagyományosan használt Bethesda módszer Nijmegen féle módosításának FXIII-ra való alkalmazását [22, 62].
- 2/ A maximális gátló hatás felének eléréséhez szükséges IgG koncentráció (IC<sub>50</sub>) meghatározását.

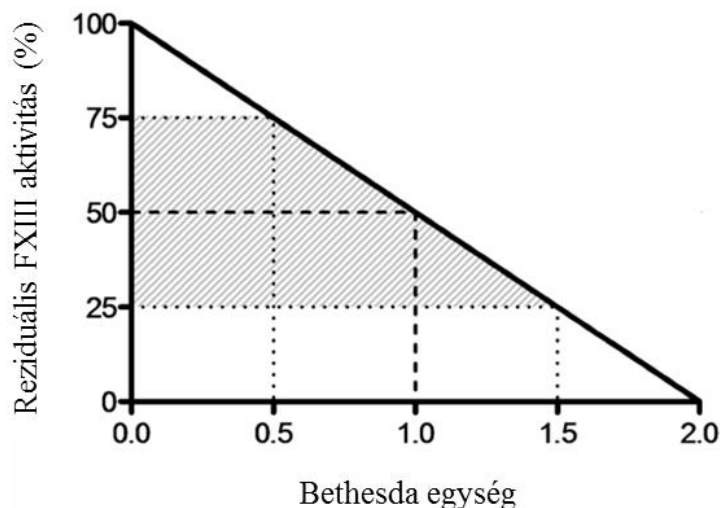
*1/ Az inhibitor erősségének meghatározása Bethesda Nijmegen módszerrel.*

A Bethesda-Nijmegen eljárás során a beteg plazma több különböző hígítását egy ismert FXIII aktivitású 0,1 M imidazollal pufferelt (pH: 7,4) kontroll plazmához keverjük 1:1 arányban (1-es cső). A kontroll csőben (2-es cső) a beteg plazma helyett az adott faktorra deficiens plazmát használunk. A keverékeket 37 °C-on, két órán keresztül inkubáljuk, majd meghatározzuk az FXIII aktivitást. Amennyiben a beteg plazma FXIII aktivitása nem 0, akkor erre korrigálni kell. Ezt követően a kapott értékekből kiszámoljuk a reziduális aktivitást az alábbi képlet alapján:

$$\text{Reziduális FXIII aktivitás} = (\text{FXIII aktivitás 1-es cső} / \text{FXIII aktivitás 2-es cső}) \times 100$$

Az eredményt a 5. ábrán lévő grafikonról olvassuk le és Bethesda egységekben (BU) fejezzük ki. 1 Bethesda egységnek 50%-os reziduális faktor aktivitás felel meg. A BU kiszámításához azt a plazma hígítást használjuk, mely esetében a reziduális aktivitás

25-75% között van. A grafikonról leolvasott eredményt a hígítás fokával szorozzuk (5. ábra).



**5. ábra. Grafikon a Bethesda egység kiszámítására a reziduális FXIII aktivitásból.**

*2/ Az inhibitor erősségének mérése  $IC_{50}$  meghatározással.*

Az  $IC_{50}$  meghatározáshoz kontrollként egészséges egyénektől származó normál IgG-t, pufferként 50 mM HEPES-t és 100 mM NaCl-ot tartalmazó oldatot (pH: 7,4), valamint a betegek plazmájából nyert IgG-t használtuk. A tisztított FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-t (1. és 2. beteg esetében: 4,2  $\mu$ g/mL, 3. beteg esetében: 8,3  $\mu$ g/mL) inkubáltuk a betegekből preparált, ill. normál IgG különböző koncentrációival 60 percig, 37 °C-on, ezt követően trombinnal (20 U/mL) és CaCl<sub>2</sub>-vel (10 mM) aktiváltuk az FXIII-at, majd lemértük a transzglutamináz aktivitást a Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Svájc) fotométer segítségével. Az abszorbanciákat 10 percen keresztül detektáltuk, 20 másodpercenként. A mérés 6. percétől kezdve kiszámoltuk az 1 percre eső abszorbancia változásokat ( $\Delta A/min$ ), és ezen értékekből meghatároztuk az FXIII aktivitást. A kapott FXIII aktivitás értékeket %-os formában adtuk meg úgy, hogy a normál IgG jelenlétében mért aktivitás értéket tekintettük 100%-nak. Az  $IC_{50}$  értékét a [www.ic50.tk](http://www.ic50.tk) szoftver segítségével számítottuk ki. Ez a módszer az inhibitornak az FXIII aktiválásra és az FXIIIa aktivitásra kifejtett kombinált hatását méri.

### 3.5. FXIII aktiválódást/aktivitást gátló hatás osztályozása

*1/ A betegek IgG-jének a hatása az FXIII trombinnal történő proteolitikus aktivációjára*

A betegek IgG-jének az aktivációs peptid trombin által történő lehasítására kifejtett hatását Western blotting módszerrel vizsgáltuk. Az FXIII-at (1. beteg esetében: 4,16 µg/mL, 2. és 3. beteg esetében: 14,3 µg/mL) normál és beteg IgG-vel (1. beteg: 2,9 mg/mL, 2. beteg: 400 µg/mL, 3. beteg: 1 mg/mL) 37 °C-on 1 órán keresztül inkubáltuk. (A betegek esetében az inhibitor erősségének a mérése alapján maximális gátló hatást biztosító IgG koncentrációkat választottunk.) Ezután trombin (1. beteg: 20 U/mL, 2. beteg: 2,5 U/mL, 3. beteg: 5 U/mL) és CaCl<sub>2</sub> (10 mM) hozzáadása után a 2,5., 5., 10., 15. és 20. percben mintákat vettünk ki, melyekhez egyenlő térfogatú kétszeres töménységű nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) tartalmazó mintapuffert (20% glicerin, 4% SDS, 125 mM Tris-puffer; pH: 6,8) adtunk. A mintákat 2% β-merkaptóetanollal (MEA) redukáltuk. A különböző időkben kivett mintákból 40 ng-nyi FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-t SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS PAGE) 7,5%-os gélben futtattuk, majd a gélből a fehérjéket polivinilidén fluorid (PVDF) membránra elektroblottoltuk. Az aspecifikus kötődések elkerülése érdekében az immunreakció kivitelezése előtt a membránt 3%-os zselatin oldattal blokkoltuk. A detektáláshoz birka anti-humán FXIII-A (Affinity Biologicals, Ancaster, Kanada) antitestet és a Vectastain cég ABC kit-jét (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornia, USA) használtuk fel. Ennek alapja, hogy a bekötődött FXIII-A ellenes antitestet biotinált birka IgG ellenes nyúlban termelt antitesttel jelöltük, melyhez avidin-biotinált peroxidáz komplex kapcsolódott. A kötődött peroxidáz előhívása diamino-benzidin (DAB) kromogén szubsztráttal és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel történt, a képződött barna csapadék a reakciót tovább erősítő CoCl<sub>2</sub> jelenlétében szürke színű lett. A trombin által hasított, SDS gélben gyorsabban vándorló hasított FXIII-A (FXIII-A') és a nem hasított FXIII-A arányának kvantitatív meghatározása denzitométerrel (GS-800 Calibrated Imaging Densitometer, Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA) történt.

## *2/ A betegek IgG-jének kombinált hatása a trombinnal hasított FXIII $Ca^{2+}$ indukálta aktivációjára és az aktív FXIII-ra*

E kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy a beteg IgG-je a  $Ca^{2+}$  indukálta FXIII aktivációt és/vagy az FXIIIa-t gátolja-e. A méréseket a Tecan Infinite M200 készülékkel végeztük. A kísérlet során alkalmazott detektáló oldatot ezen mérésekhez annyiban módosítottuk, hogy a  $CaCl_2$ -t a detektáló oldat tartalmazta és a NADPH feloldása is abban történt.

50 mM HEPES-t és 100 mM NaCl-ot tartalmazó pufferben 4,2  $\mu$ g/mL FXIII- $A_2B_2$ -ről az aktivációs peptidet 10 percen keresztül 37 °C-on trombinnal (20 U/mL) proteolitikusan lehasítottuk ( $Ca^{2+}$  nem volt a rendszerben). Ezután a trunkált (FXIII- $A'$ -t tartalmazó) FXIII-at beteg, illetve normál IgG-vel (1. beteg: 2,92 mg/mL, 2. beteg: 0,4 mg/mL, 3. beteg: 1 mg/mL) 1 órán át inkubáltuk. Ezt követően 20 mM  $CaCl_2$ -t is tartalmazó detektáló oldat hozzáadása után mértük a transzglutamináz aktivitást (a  $CaCl_2$  végkoncentrációja 10 mM volt). A mérések negatív kontrolljait 1 mM jóadacetamid jelenlétében mértük. Ez a kísérleti elrendeződés a beteg szervezetében képződött antitestnek az FXIII-B  $Ca^{2+}$ -indukálta leválására, az FXIII- $A'$ -nak az aktív enzim kialakulásához szükséges  $Ca^{2+}$ -indukálta konformáció változásra, illetve az aktivált FXIII aktivitására kifejtett kombinált hatását mutatja. A beteg IgG-jével történő előinkubáció után mért FXIII aktivitást a normál IgG-vel történő előinkubáció után mért FXIII aktivitás %-ában fejeztük ki.

## *3/ A betegek IgG-jének hatása a trombinnal és $Ca^{2+}$ -mal aktivált FXIII (FXIIIa) aktivitására*

Az előzőekben tárgyalt két, egymást nem kizáró lehetőséget a következő kísérletben vizsgáltuk tovább. Ennek keretében az FXIII (4,2  $\mu$ g/mL) komplexet trombinnal (20 U/mL) és  $CaCl_2$ -vel (10 mM) 10 percig 37 °C-on előaktiváltuk, majd ezt követően az előbbieket szerint a beteg IgG-jével, ill. normál IgG-vel egy órán át inkubáltuk és lemértük az FXIIIa aktivitást. Az aktiváló és detektáló oldatok összetétele annyiban módosult, hogy ebben az esetben az aktiváló oldat tartalmazta a szükséges  $CaCl_2$ -t és a NADPH feloldása  $CaCl_2$ -t már nem tartalmazó detektáló oldatban történt. A beteg IgG-jével történő előinkubáció után mért FXIII aktivitást itt is a normál IgG-vel történő előinkubáció után mért FXIII aktivitás %-ában fejeztük ki.

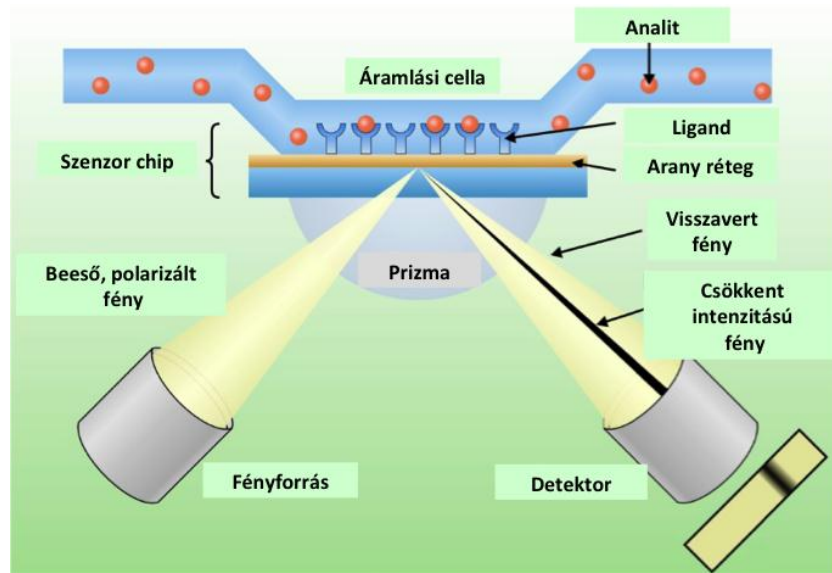
### 3.6. Kötődési vizsgálatok

A harmadik beteg kapcsán tájékoztató vizsgálatként a beteg plazmájából ELISA technikával mért antitest titer meghatározást Kanadában végezték. rFXIII-mal fedett lemezre a beteg plazma különböző hígításait vitték fel. Az előhíváshoz inkubációt követően peroxidázzal jelzett kecske anti-humán IgG-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) használtak. A kezdeti plazmahígítás 1:50 arányú volt és a titer definiálásánál a további hígításokat ehhez viszonyítva határozták meg (például a 2-es titer 100-szoros hígításnak felelt meg).

Laboratóriumunkban a betegek plazmáiból preparált IgG-k és az FXIII kölcsönhatásának vizsgálatát felületi plazmon rezonancia mérésével végeztük el. A felületi plazmonok egy fém felületén a vezetési elektronok együttes mozgásához kapcsolódó elektronsűrűség hullámok, melyek fény (elektromágneses sugárzás) hatására, megfelelő körülmények között rezgésbe hozhatók, vagyis gerjeszthetők [72]. Kísérleteinkhez Biacore X (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Svédország) és Biacore 3000 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) felületi plazmon rezonanciát mérő készülékeket használtunk. Az előbbi egy félautomata rendszer, mely manuális injektálást igényel és a készülékben használatos szenzor chipet két részre, cellára képes osztani. Az utóbbi ezzel szemben automata injektálást tesz lehetővé és egy chipen négy cella kialakítására alkalmas. A szenzor chipet vékony aranyréteggel bevont üveglemezek. Az SPR technika kifejezetten alkalmas különböző biomolekuláris kölcsönhatások jellemzésére [73]. Előnyei közé tartozik, hogy valós időben határozható meg a biomolekuláris kölcsönhatások kinetikája, a molekulák kötődése jelölés nélkül is nyomon követhető, és akár gyenge kölcsönhatások elemzését is lehetővé teszi.

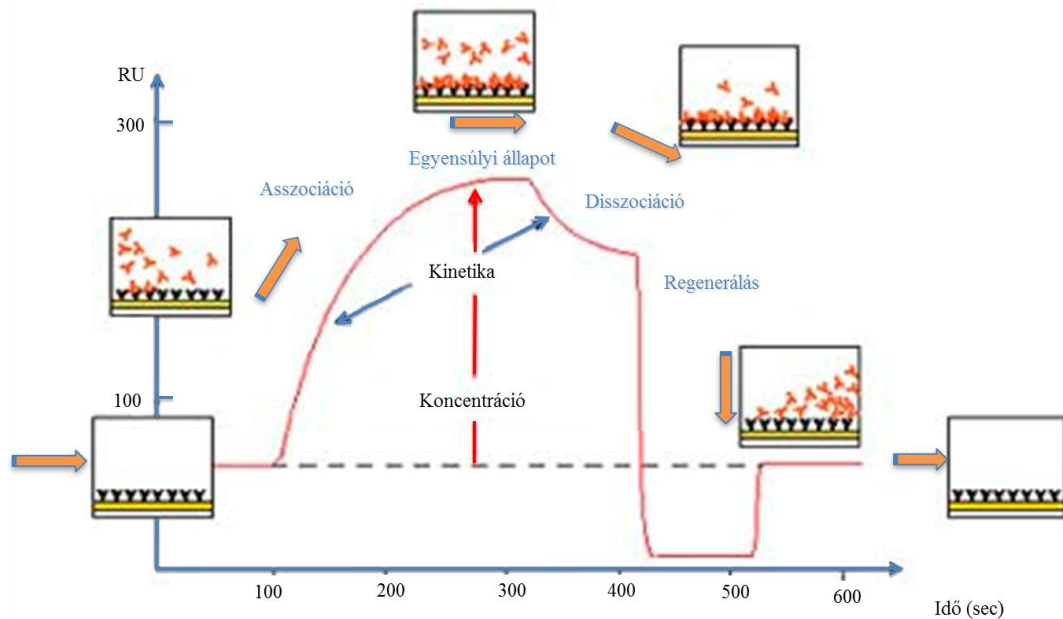
A készülékekben egy 760 nm hullámhosszú fényt emittáló dióda polarizált fényvel világítja meg a chip felületét, ezzel gerjesztve az aranyrétegben a felületi plazmonokat. A fényt egy félhenger alakú prizma fókuszálja a szenzor chip felületére, mely fölött a készülék egyedi pumparendszere segítségével folyadékáramlást hoz létre. Az affinitási reakció egyik komponensét a szenzor chip felületére immobilizáljuk, ezt nevezzük ligandnak. A másik komponenst pedig átáramoltatjuk a szenzor chip felületén, ezt nevezzük analitnak. A cellák külön-külön (single channel módban) és együttesen (multi channel módban) is használhatók. Így lehetővé válik ugyanannak az analit oldatnak egyszerre legalább két különböző ligandot tartalmazó felületen történő

analízise. A mérés során a chipet az egyik oldalról a teljes visszaverődés szögén belül, széles beeső szögtartományban lézertípussal világítjuk meg, amely az üveg felső határán teljes visszaverődést szenved. Ennek során az elektromágneses hullám kismértékben, fokozatosan csökkenő intenzitással behatol a túldalalon lévő közegbe, mely a fémrétegre és a felette lévő keskeny rétegre korlátozódik. A beeső fény egy bizonyos szög mellett kölcsönhatásba lép az aranyrétegben lévő felületi plazmonokkal, így létrejön a felületi plazmon rezonancia. Ekkor az adott beesési szöghöz tartozó fény elnyelődik, intenzitása csökken. A visszavert sugár egy detektorra vetődik (6. ábra). A csökkent intenzitással visszavert fénynek a chip felületével bezárt szöge az úgynevezett SPR szög. Ez a szög függ a chip felületének az állapotától az oda kötődött anyag mennyiségétől, mely megváltoztatja a lokális törésmutatót. Ha kialakul a kötés a ligand és az analit között, megváltoznak a felületi körülmények, beleértve a lokális törésmutatót, amely hatással van a plazmon hullámok rezonancia feltételeire, így a kötődés során a rezonanciához tartozó szög eltolódik, változik az SPR szög. Ezt érzékeli a készülék és a kölcsönhatás mértékét kifejező rezonancia jellel (resonance unit; RU) alakítja, ami arányos a felülethez kötődött anyag mennyiségével [74-76].



**6. ábra.** Az SPR alapú készülék működési elve. A készülék az SPR szög változást detektálja, melynek értéke függ a felületi plazmon rezonancia mértékétől. Az ábra a [77] szám alatt idézett közlemény egyik ábrájának módosított változata.

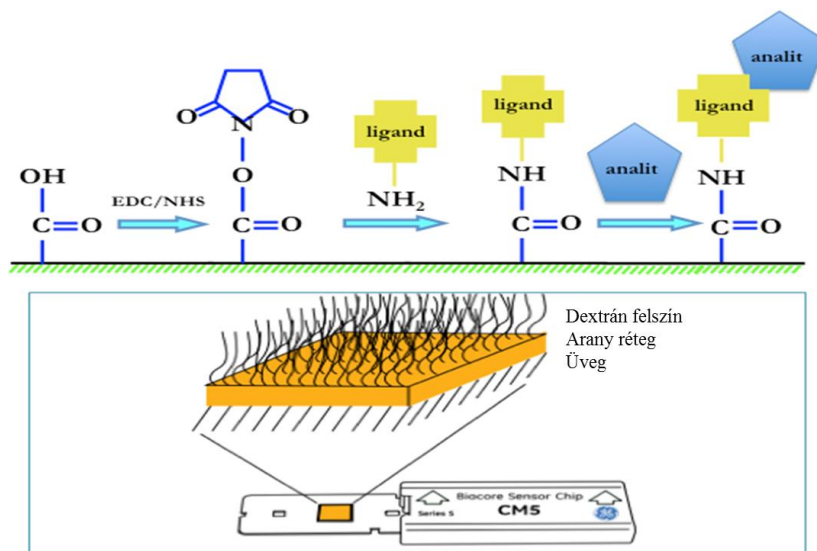
A legtöbb fehérje esetében 1 RU növekedést a jelben körülbelül 1 pg/mm<sup>2</sup> felületi koncentráció változás hoz létre [78]. Az RU értékei szenzorgram formájában jelennek meg az idő függvényében, melyen öt fázist különítünk el. 1. *Alapvonal*: kezdetben nincs változás a jelben, ekkor még, csak a puffer áramoltatása történik. 2. *Asszociációs fázis*: az analit az immobilizált ligandhoz kötődik, az RU érték fokozatosan növekszik. Utóbbi mindaddig tart, míg a kölcsönhatás el nem ér egy egyensúlyi állapotot, mikor a felületen már nem képes több analit bekötődni az adott koncentrációnál. 3. *Egyensúlyi fázis*: az analit kötődésének és a komplex disszociációjának mértéke megegyezik, az RU érték nem változik. 4. *Disszociációs fázis*: az injektálás befejeztével ismét puffer áramlik a felület felett, és a kölcsönható partnerek az interakció erősségétől függően disszociálnak, az RU érték csökken. 5. *Regenerálás*: A felületen maradt, le nem disszociált analit molekulákat regenerálás során távolítjuk el. Ekkor a regeneráló oldat hatására az összes analit disszociál, a jel visszatér az alapvonal szintjéhez [78, 79] (7. ábra).



7. ábra. Egy jellegzetes szenzorgram képe. Az ábra a [78] szám alatt idézett közlemény egyik ábrájának módosított változata.

Méréseinkhez karboximetilált dextransz mátrixot hordozó chipet (CM5: GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Svédország vagy CMD: XantTec, Düsseldorf, Németország, a két chip között nincs különbség) használtunk. A chip felületén a

készülék típusától függően több cellára osztható, melyekre különböző ligandok köthetők fel. A ligandok immobilizálása a dextrans mátrixhoz aminocsoportokon keresztül kovalensen történt az „amine coupling protocol” szerint. Az 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) és N-hidroxiszukcinimid (NHS) 1:1 arányú keverékével történő felszínaktiválás után létrejövő reaktív szukcinimid észterek spontán reagálnak a ligand aminocsoportjaival (8. ábra). A szabadon maradt aktív észtereket etanolaminnal blokkoljuk [80]. Eredményeink kiértékelése a Biacore Evaluation szoftverrel (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Svédország) történt, melynek során görbét illesztettünk a szenzorgram asszociációs és disszociációs szakaszaira. Az illesztett görbék segítségével megkaptuk a vizsgált kölcsönhatás kinetikáját és meghatároztuk: a reakcióra jellemző asszociációs sebességi állandót ( $k_a$ ), disszociációs sebességi állandót ( $k_d$ ), egyensúlyi asszociációs állandót ( $K_A$ ) és egyensúlyi disszociációs állandót ( $K_D$ ) [79]. Bár a módszer egyetlen koncentrációból is lehetővé teszi ezen paraméterek leírását, a nagyobb pontosság érdekében több különböző koncentrációt (5 vagy 6) alkalmazva végeztük a méréseket. A kapott állandók átlagát véve jellemeztük a vizsgált molekulák közti interakciót. Az SPR mérésekhez és az analit oldatok hígításához használt általános futtató puffer; 10 mM HEPES-t, 150 mM NaCl-t, 3 mM EDTA-t és 0,005v/v% surfactant (pH: 7,4) tartalmazott. Elkészítéséhez HPLC tisztaságú vizet használtunk, majd az elkészült oldatot 0,22  $\mu$ m pórusú szűrőn szűrtük át, ezt követően pedig 10 perc ultrahangos kezeléssel buborék mentesítettük. A nem specifikus jelek kiszűrése érdekében minden mérésnél kontroll cellát alkalmaztunk, melyre olyan ligandot immobilizáltunk, amihez nem kötődik a vizsgált analit. Ez BSA volt az első két betegminta vizsgálata során, a harmadik betegminta analízisekor normál IgG-t használtunk kontroll ligandként. A kontroll cellákon kapott RU értékeket a BIAEvaluation szoftver segítségével kivonjuk a mérő cellákon kapott RU értékekből. Minden méréssorozatot legalább kétszer végeztünk el. Több kísérleti elrendezésben is dolgoztunk, vizsgáltuk az antitestek kötődését az FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-hez, a rFXIII-A<sub>2</sub>-hez és a plazmából tisztított FXIII-B-hez is. Kísérleteink során 10  $\mu$ L/perc áramlási sebességet alkalmaztunk. A regenerálási lépésekhez a gyártó által ajánlott oldatok közül, a 0,8 M-os MgCl<sub>2</sub> bizonyult a leghatásosabbnak, így ezt alkalmaztuk.



8. ábra. A szenzor chip aktiválásának, a ligand felkötésének, a ligand-analít kapcsolódásának sematikus képe. A felszín aktiválása EDC:NHS keverékével történik, felkötjük a ligandot, majd áramoltatjuk az analitot tartalmazó mintaoldatot. Az ábra [81] szám alatt idézett közlemény két ábrájának módosított változata.

### 3.7. Molekuláris genetikai analízis

Az első beteg esetében a kanadai laboratóriumban nem tudták kimutatni a genetikai hibát. A beérkezett, -80 °C-on tárolt DNS mintákból elvégeztük a F13A1 teljes génjének fluoreszcens direkt szekvanciáját, majd ezt követően a beteg szüleitől származó DNS mintákból célzott génszekvenálás történt. A kódoló régiók és az exon-intron határok felszorzósítása a GeneAmp2700 típusú PCR készülék (Applied Biosystems, Foster City, USA) segítségével valósult meg. Az alkalmazott primerek megegyeznek a FACTOR XIII Registry Database oldalon található referencia szekvenciában jelölt oligonukleotidokkal (4. táblázat).

*4. táblázat. Az amplifikációhoz használt oligonukleotid primerek.*

|     | Forward                     | Reverse                     |
|-----|-----------------------------|-----------------------------|
| E1  | 5'-TACTCCCAGCAACTGGTTGC-3'  | 5'-CTGGCTCATAGGGTGCAGG-3'   |
| E2  | 5'-CATGCCTTTTCTGTGTCTTC-3'  | 5'-CTGGACCCAGAGTGGTGG-3'    |
| E3  | 5'-GATTATTTTCTTCAACCCTTG-3' | 5'-TCTACAATGCAACCCATGG-3'   |
| E4  | 5'-AATGGCTTGTGAAATCAACC-3'  | 5'-GAAAATAAATGTCTGCCTC-3'   |
| E5  | 5'-GTTTGGTAATAGTCACTATG-3'  | 5'-CAATAACAAATTTTAAGTGGC-3' |
| E6  | 5'-GCTTGCAGAGTGAACACTAG-3'  | 5'-GCAAATGACAGGTGTAACAG-3'  |
| E7  | 5'-CCTTCTCACTTCTCACGGAC-3'  | 5'-AATGTCTTAGAGTGAAGTTCC-3' |
| E8  | 5'-GCTGGTGATGTGTTTAGCTG-3'  | 5'-CATCAGCCAATGCCATTGTC-3'  |
| E9  | 5'-ATTACAGGCATGAGCCACTG-3'  | 5'-TCAGCAATGAAGCAAGTTCC-3'  |
| E10 | 5'-TGGACAGAATTGGAGATGAC-3'  | 5'-AAACAGCACTTTCCTCCAGC-3'  |
| E11 | 5'-ATGATGGCTAATGCTCTCC-3'   | 5'-GAACTCATCTCTGAGTGAC-3'   |
| E12 | 5'-TTGCCTGTCATTATCTCTGG-3'  | 5'-GACAGCGAGTCTCACAAAG-3'   |
| E13 | 5'-AAGTCTTGATGCCAGGCCTG-3'  | 5'-TCTGTTCCAGGATGAGACGC-3'  |
| E14 | 5'-GCTGCTAATGACCTGCATTC-3'  | 5'-ACAGCTCTGCACTGCCTG-3'    |
| E15 | 5'-GATCTCCGAACCTCTCCTC-3'   | 5'-ATGCCAGGGTTCATCTCAGC-3'  |

A polimeráz láncreakcióhoz (PCR) szükséges összetevők a következők voltak (50 µL végtérfogathoz): 5 pmol forward és reverse primer (TIB MOLBIOL, Berlin, Németország), 100 ng genomiális DNS templát, 0,25 mM didezoxi-nukleotid (dNTP) mix (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA), 25 U/mL GoTaq Hot Start polimeráz (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Life Technologies, Kalifornia, USA) és 10 µL PCR puffer (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). A PCR reakció első fázisában (denaturáció) a magas hőmérséklet hatására a bázisokat összetartó hidrogénkötések felszakadnak, a DNS kéttős hélix szétválik. Az így kialakult DNS szálak templátként szolgálnak a specifikus primerek bekötődéséhez, (forward és reverse) hibridizációjához (annealing vagy kapcsolódási fázis), majd a DNS polimeráz közreműködésével megkezdődik az új DNS lánc szintézise (polimerizáció).

A polimeráz láncreakció protokollját az 5. táblázatban foglaltuk össze. A kapcsolódási fázis a 4-es és 13-as exonok esetén 57 °C-on, a 9-es és 15-ös exonok esetén 61 °C-on, a többi exon esetén 55 °C-on ment végbe. A mintákat 95 °C-on 10 percig denaturáltuk, ezután ciklusonként a következő fázisok váltják egymást: 1 perces denaturáció (95 °C), 1 perces kapcsolódási fázis, majd egy szintén 1 perces polimerizációs fázis 72 °C-on [82]. Végül egy 7 perces 72 °C-on végbemenő polimerizációval zárul a folyamat, ezután a készülék 4 °C-on tárolja a mintákat.

**5. táblázat. A szekvenáló reakció protokollja.**

|                  | Denaturáció |    | 40 ciklus          |    |    | Polimerizáció |
|------------------|-------------|----|--------------------|----|----|---------------|
| Hőmérséklet (°C) | 95          | 95 | 55 vagy 57 vagy 61 | 72 | 72 |               |
| Idő (perc)       | 10          | 1  | 1                  | 1  | 7  |               |

*A mintákat a megfelelő hőmérsékleten, a megfelelő ideig kezelve sikerült felsokszorozítani a DNS templátot.*

A PCR termékek ellenőrzése GelRed-et (Izinta Kereskedelmi Kft, Budapest, Magyarország) tartalmazó, 3%-os agaróz gélelektroforézissel történt. A PCR termékek tisztításához és a direkt szekvenáláshoz a Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit-jét (Applied Biosystem, Foster City, USA) és ABI PRISM 3130 DNA szekvenátort (Applied Biosystem, Foster City, USA) alkalmaztuk. A szekvenáláshoz használt

primerek megegyeztek az amplifikálásnál használt primerekkel. A szekvenált termékek kapilláris elektroforézise és fluoreszcens detektálása az Avant Genetic Analyzer készülékkel történt (Applied Biosystem, Foster City, USA), az elektroferogramok értékeléséhez a Sequencing Analysis 5.3.1 szoftvert használtuk. A nukleotidok és aminosavak számozása a hagyományos számozás szerint végeztük.

## 4. Eredmények

### 4.1. Első beteg

#### 4.1.1. Esetleírás

Az első beteg egy súlyos, öröklött FXIII hiányban szenvedő fiatal nő volt. Betegségét 1994 márciusában diagnosztizálták Kanadában, ekkor mindössze három éves volt. A kórlefeljárás kapcsolatos adatokat kollaborációs partnerünk Prof. Dr. Georges E. Rivard (Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Kanada) szolgáltatta, a beteg állapotáról egy korábbi publikációban rövid említést is tettek [83]. Anamnézisben zúzóadások, kis sebektől származó elhúzódó vérzések szerepeltek. A diagnózis felállításakor a plazmában lévő FXIII aktivitás rendkívül alacsony, 0,01 IU/mL (1%) alatt volt. A plazma FXIII-A<sub>2</sub> antigén értékét <0,07 IU/mL-nek (<7%) mérték. Szülei unokatestvérek voltak. Az anya FXIII aktivitása 0,54 IU/mL, az apáé 0,77 IU/mL volt. A beteg a rendszeres profilaxis kezdete előtt egy kisebb haematoma kezelésére kapott plazma eredetű FXIII koncentrátumot (Fibrogammin<sup>®</sup>, CSL Behring, Ottawa, Kanada). Mivel a szülők aggódtak a plazma eredetű koncentrátum biztonságosságát illetően ezt követően az apa és az apai nagymama vállalták a plazma donor szerepét a rendszeres profilaxishoz. 1994 júniusa és 1995 júliusa közötti időszakban a megelőzőként adott havi egy plazma transfúzió elegendő volt a hosszabb vérzésmentes időszakok eléréséhez. A 15 mL/kg szülői plazma transfúzió után a beteg FXIII aktivitása 0,26 IU/mL-re emelkedett. Sajnos 1995 júliusára a rendszeres profilaxis ellenére spontán haematomák megjelenéséről számoltak be, melyek az ekkor már alkalmazott Fibrogammin<sup>®</sup> (40 IU/kg) hatására sem szívódtak fel. A plazma FXIII koncentráció a Fibrogammin beadása után egy nappal később már csak 0,025 IU/mL volt, ami felvetette az alloantitest képződés lehetőségét. A beteg anti-FXIII aktivitása 6,6 BU volt, ekkor a profilaktikus kezelést leállították. Az elsődleges cél az inhibitor eradikációja lett, amit először intravénás immunoglobulin adásával kíséreltek meg. A beteg egy hónapos eltéréssel két alkalommal 4 napon át 0,5 mg/kg/nap immunoglobulint kapott. A második IVIG infúzió után az antitest titer 0,76 BU-ra csökkent. Az immuntolerancia ezt követően 1 évig állt fenn. A betegnél 1996 januárjában egy fejsérülést követően intracranialis vérzés alakult ki, innentől kezdve a terápiát dexamethasone és Fibrogammin<sup>®</sup> (90 IU/kg) alkotta. Ezt követően a faktor

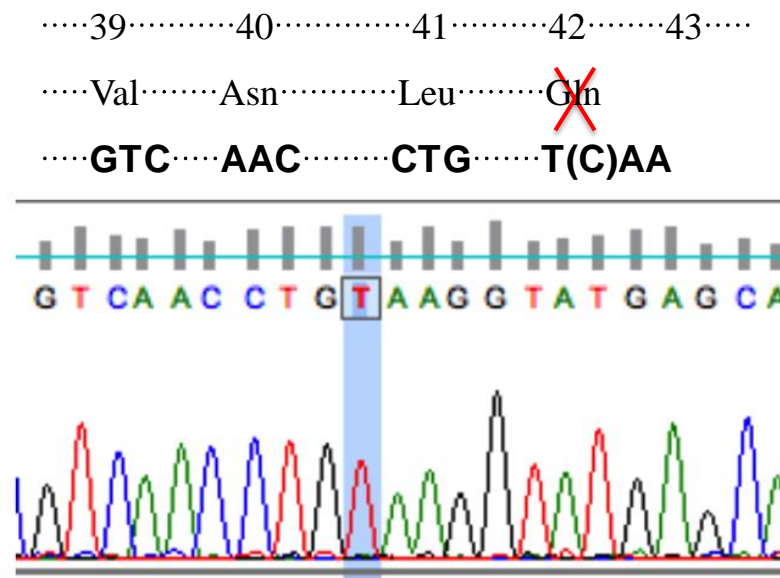
VIII inhibitor eliminálására kidolgozott Malmö-protokoll alapján [84] kísérelték meg az immuntolerancia indukciót, ami magas dózisu FXIII, ciklofoszfamid és IVIG adásának a kombinációját jelentette. Ettől kezdve egy éven át a beteg 33 IU/kg Fibrogammint kapott 7-10 naponként. FXIII aktivitás, a Fibrogammin beadása előtt és után 0,1 IU/mL ill. 0,45 IU/mL körül volt. Egy év múlva azonban már csökkent biológiai választ kaptak. Ezt újabb Malmö-protokoll követte. A beteg klinikailag jó állapotban volt, de fokozatosan, egyre magasabb dózisu Fibrogammin adására (60 IU/kg, kétszer egy héten, 3 évig, majd 100 IU/kg kétszer egy héten, 4 hónapig) volt szükség. 2000-ben újabb immuntolerancia indukciós kezelést végeztek, melynek során az előbbi protokollt immunabszorpcióval, plazmaferezissel és prednizzonnal egészítették ki, de immuntolerancia nem alakult ki. A betegnek az igen magas dózisu FXIII pótlás (napi 30 IU/kg) ellenére kezdetben számos spontán vérzése volt, melyek gyakorisága idővel csökkent, de ezen periódus alatt Bethesda-Nijmegen módszerrel és ELISA-val is igazolhatóan jelen volt a gátlótest. 2006-ban beütötte a fejét, ekkor azonnali 200 IU/kg Fibrogammin kezelést kapott, amit dexametasonnal kiegészítve 6 óránként, további két alkalommal megismételtek. Az agyi CT többszörös intracerebrális vérzést mutatott. A balesetet követően a beteg kómába esett, majd 24 óra múlva életét veszítette. Tekintettel arra, hogy a beteg molekuláris genetikai diagnosztikája és antitestjének karakterizálása életében nem történt meg, de mélyfagyasztott plazma és DNS minták rendelkezésre álltak, a kanadai partner felkért bennünket tudományos kollaboráció keretében e vizsgálatok retrospektív elvégzésére, amit 2013-ban kezdtük meg.

#### ***4.1.2. FXIII meghatározások és molekuláris genetikai vizsgálat***

Az első beteg esetében, a kanadai laboratórium által rendelkezésünkre bocsátott plazmamintákból végzett FXIII aktivitás mérés eredményei egybehangoztak a korábban Kanadában kapott eredményekkel. Az FXIII aktivitás (<0,01 IU/mL), az FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigén és az FXIII-A antigén szintek (mindkettő <0,001 IU/mL) detektálási határ alattiak voltak. Az FXIII-B antigén szintet 0,46 IU/mL-nek mértük, ami mérsékelt csökkenést (referencia tartomány: 0,64-1,35 IU/mL) jelent.

A molekuláris genetikai analízis a 2-es exonban egy nonsense mutáció jelenlétét tárta fel. Egy citozin→timin csere történt a 127. nukleotid pozícióban, mely a fehérjében korai STOP kodont eredményezett (p.Gln42STOP; 9. ábra). A proband

esetében a teljes F13A1 gén, míg szülei esetében célzottan csak a 2-es exon fluoreszcens direkt szekvenálását végeztük el. A kimutatott homozigóta kóroki mutáció egy rendkívül rövid, funkcióját ellátni képtelen peptid szintézisét eredményezi, ami feltehetően gyorsan lebomlik. A szülőkben ugyanez a mutáció heterozigóta formában fordult elő. Emellett a proband esetében még három korábban ismert polimorfizmus is kimutatható volt, homozigóta formában: c.103G>T (p.Val34Leu), c.1704A>G, (p.Glu567Glu), c.1954G>C (p.Glu651Gln).



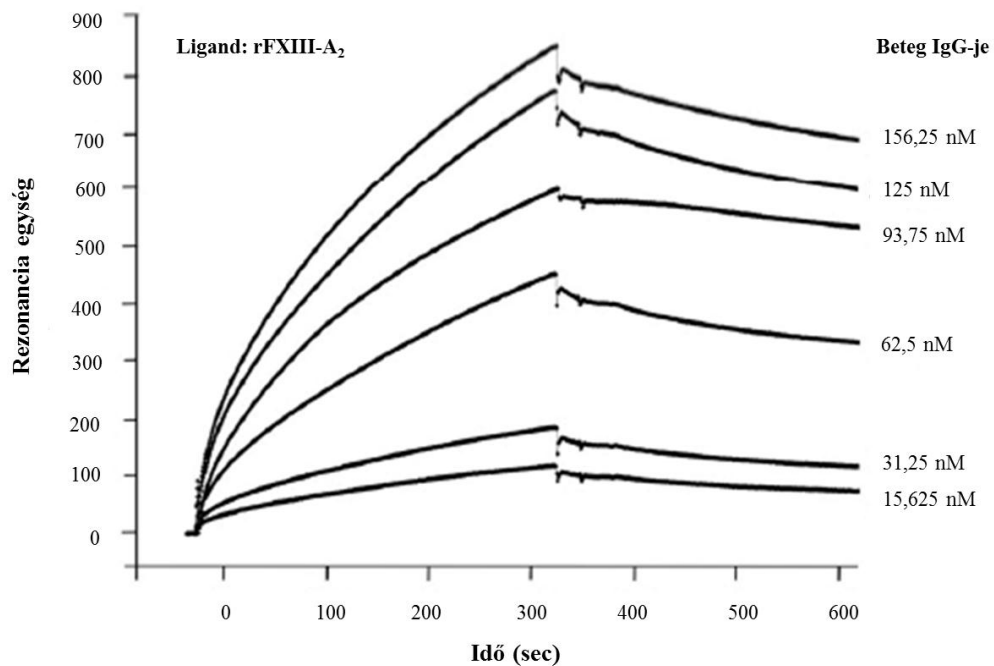
**9. ábra.** Az első beteg genetikai eltéréseinek (c.127C>T, p.Gln42X) elektroferogramja.

#### **4.1.3. Az alloantitest kötődése a XIII-as faktorhoz és alegységeihez**

Az első beteg plazmájából preparált IgG-vel elvégzett SPR méréseknél elsőként rFXIII-A<sub>2</sub>-t (10. ábra), majd FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-t, végül FXIII-B<sub>2</sub>-t használtuk ligandként, analitként pedig az izolált IgG-t különböző koncentrációkban (15,625 nM, 31,25 nM, 62,5 nM, 93,75 nM, 125 nM és 156,25 nM). Kontrollként a ligand helyett BSA-t alkalmaztunk. Ellenőriztük, hogy az egészséges egyénekből preparált IgG nem kötődik sem az FXIII komplexhez, sem pedig annak alegységeihez. A K<sub>A</sub> érték rekombináns FXIII-A<sub>2</sub> esetén 8,24 x 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>-nek, a K<sub>D</sub> 1,44 x 10<sup>-8</sup> M-nak adódott, ami erős kötődést jelent. Az asszociációs és disszociációs sebességi állandók értékei:

$k_a=4,82 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  és  $k_d=5,68 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Nagyságrendileg szinte teljesen azonos eredmények születtek komplex FXIII ligandként történő alkalmazásával is;  $K_A=1,05 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_D=1,31 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $k_a=8,17 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_d=9,07 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . A hasonló eredmények és annak fényében, hogy a B alegység esetében nem sikerült kötődést kimutatnunk a beteg IgG-jéhez, elmondhatjuk, hogy az alloantitestek az FXIII-A-hoz kötődtek és komplex forma esetében is az A alegységen keresztül történt a kapcsolódás.

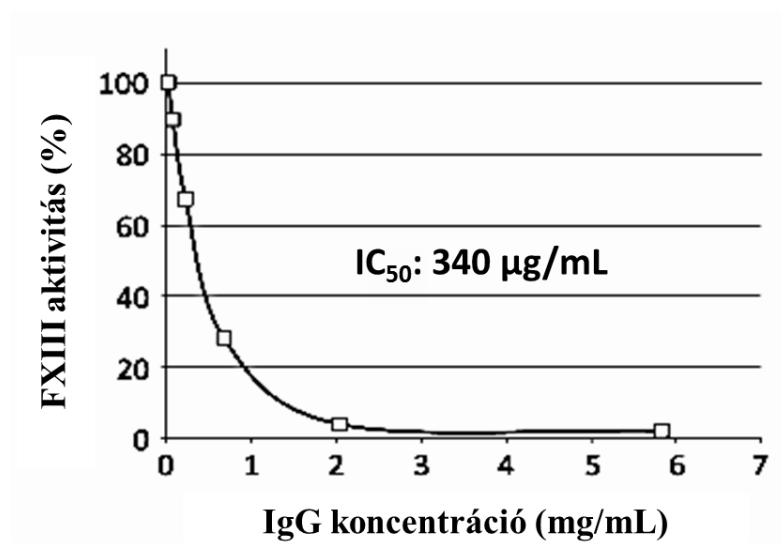
Mivel az IgG preparálás során totál IgG-t nyertünk és ezen kísérletekben az antitestet, mint analitot használtuk, amelynél nem ismert a specifikus FXIII-A ellenes antitest aránya. Így a kapott  $K_a$  érték valamivel alacsonyabb lehet a valós értéknél. A későbbiekben izolált IgG-t alkalmaztuk ligandként és FXIII-at analitként.



**10. ábra.** Az összesített SPR szenzorgram demonstrálja a beteg IgG-jének kötődését a rFXIII-A<sub>2</sub>-hez. Ligand: rFXIII-A<sub>2</sub>, Analit: beteg IgG-je különböző koncentrációkban.

#### 4.1.4. Az alloantitest FXIII-at gátló kapacitásának meghatározása

Az inhibitor titer Bethesda-Nijmegen módszerrel történő meghatározása a kanadai laboratóriumban történt. A gátló kapacitás egzakt mérésére a farmakológiában használt 50%-os gátló hatást eredményező inhibitor koncentráció ( $IC_{50}$ ) meghatározását használtuk. Ismereteink szerint ezt az eljárást mi vezettük be először alvadási faktor ellenes inhibitor mennyiségi meghatározására. A félhatásos gátló koncentráció  $340 \mu\text{g/mL}$ -nek bizonyult és  $2 \text{ mg/mL}$ -es IgG koncentráció felett már csaknem teljes gátlás volt tapasztalható (11. ábra). Egészséges egyénektől származó gyűjtött plazmából preparált IgG nem volt hatással az FXIII aktivitásra.



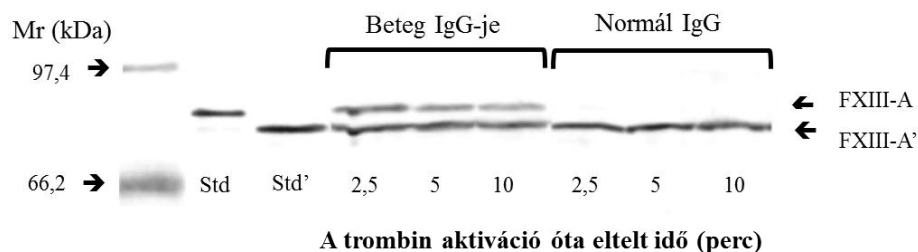
11. ábra. A 1. beteg plazmájából preparált IgG-nek az FXIII aktivációjára és az FXIIIa aktivitására kifejtett kombinált gátló hatásának kvantitatív értékelése.

#### 4.1.5. Az alloantitest klasszifikációja

Az előbbi kísérleti elrendeződés informál a gátló hatás erősségéről, azonban nem tesz különbséget aközött, hogy a beteg IgG-jével mért gátlás a már aktivált FXIII vagy az aktiváció különböző lépései gátlásának, esetleg mindkettőnek tulajdonítható. A továbbiakban olyan kísérleteket végeztünk, melyekben módunkban állt az alloantitest hatását szeparáltan vizsgálni.

A pFXIII aktivációjának első lépése az aktivációs peptid trombin által történő lehasítása. Az első beteg IgG-jének erre az aktiválódási lépésre kifejtett hatását Western blotting technikával elemeztük, melynek eredménye a 12. ábrán látható. A blotton az első két pozícióban lévő standardok, a nem aktivált  $83 \text{ kDa}$

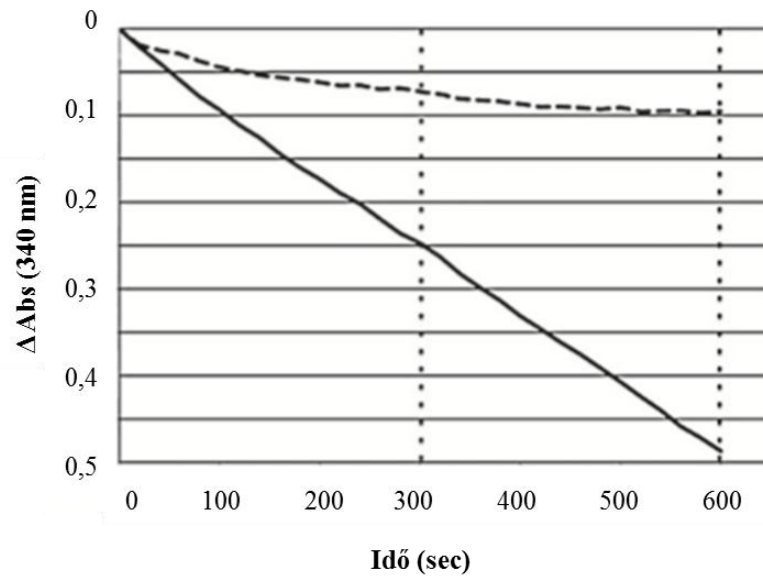
molekulatömegű FXIII-A (Std) és a trombin által hasított, 79 kDa-nyi formájának (Std') megfelelő sávok láthatók. Normál IgG jelenlétében az FXIII trombin által történő hasítása már 2,5 perc alatt teljesen végbement (12. ábra). Ezzel szemben a beteg IgG jelenlétében az AP-FXIII lehasítása nem ment végbe maradéktalanul, ezt jelzik az aktivált és nem aktivált FXIII-A-nak megfelelő dupla sávok. Az idő előrehaladtával ugyan csökkent a nem hasított FXIII-A-nak megfelelő sáv inenzitása, de még a 10. percen is jelentős mennyiségben volt kimutatható. A beteg IgG-je tehát gátolta az aktivációs peptid lehasítását. A Western blotton végzett kvantitatív denzitometriás elemzés azt mutatta, hogy az alloantitest jelenlétében 5 perc múlva az FXIII-A 31%-a intakt maradt (6. táblázat).



**12. ábra.** Az alloantitest gátló hatása az FXIII-A trombin által történő hasítására. A trombin hatását normál IgG és a beteg plazmájából preparált IgG jelenlétében egyaránt vizsgáltuk. A Western blotton jól látható, hogy az alloantitest akadályozta a hasított FXIII-A kialakulását. Minden alkalommal 40 ng FXIII-at vittünk fel a géltre. Std: FXIII-A, Std': FXIII-A'.

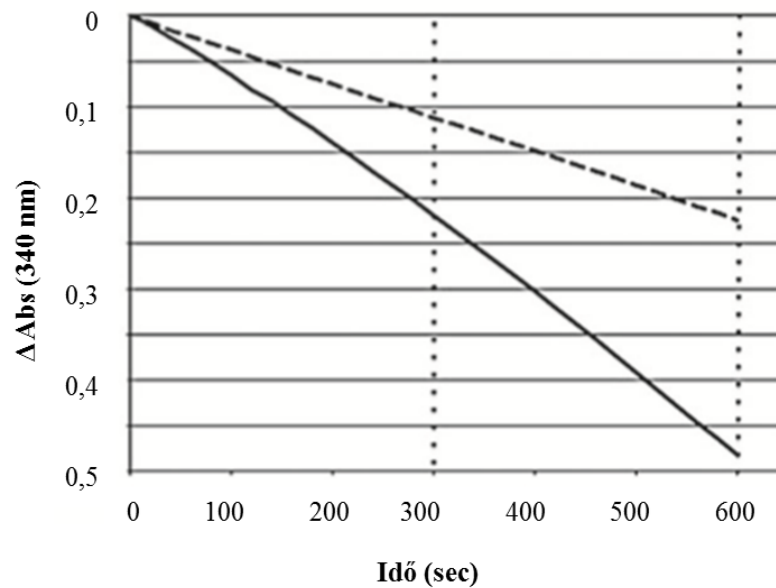
A következőkben az alloantitestnek az FXIII  $\text{Ca}^{2+}$ -indukálta kombinált hatásokra és az FXIIIa aktivitására kifejtett hatását vizsgáltuk. E kísérletek során az FXIII-A aktivációs peptidjét eközetesen trombinnal lehasítottuk. Az így keletkezett csonkolt FXIII komplexet (FXIII-A'<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) inkubáltuk a beteg IgG-jével, valamint normál IgG-vel és  $\text{Ca}^{2+}$  hozzáadása után mértük az enzim transzglutamináz aktivitását. Ily módon lehetőségünk nyílt együtt vizsgálni, hogy az alloantitest gátolja-e az FXIII aktiváció  $\text{Ca}^{2+}$  indukálta lépéseit (a B alegységek disszociációja és az FXIII-A' dimer enzimatikusan aktív konformációvá történő átalakulása), valamint az aktív FXIII aktivitását. Az egészséges önkéntesektől származó normál IgG még a legmagasabb koncentrációban sem mutatott gátló hatást, így az antitestek pontosabb karakterizálását célzó FXIII méréseknél megfelelő kontrollnak bizonyult. A beteg szervezetében

képződött alloantitest a normál IgG-vel kapott értékhez képest igen jelentősen, 9%-ra csökkentette a mért FXIII aktivitást (13. ábra, 6. táblázat).



**13. ábra.** Az alloantitest kombinált hatása a trombin által proteolitikusan hasított FXIII aktiválására és az FXIIIa aktivitására. Az ábrán a folytonos vonallal jelzett görbe a normál IgG-vel mért FXIII aktivitás spektrofotometriás monitorozását mutatja 340 nm-en. A szaggatott vonallal jelölt görbe pedig az alloantitest jelenlétében kapott eredményt szemlélteti. Az FXIII aktivitás mérésének intervalluma a függőleges pontozott vonalak, 300-600 másodperc között volt.

Az utolsó kísérletsorozatban kíváncsiak voltunk az antitestek aktivált FXIII aktivitására kifejtett hatására. Az alloantitest jelenléte a trombinnal és  $\text{Ca}^{2+}$ -mal teljesen aktivált FXIII transzglutamináz aktivitását 57%-kal csökkentette (14. ábra, 6. táblázat).



**14. ábra.** Az alloantitest hatása a teljesen aktivált FXIII transzglutamiáz aktivitására. Az ábrán a folytonos vonallal jelzett görbe a normál IgG-vel mért értékeket mutatja, a szaggatott vonallal jelölt görbe pedig az antitesttel kapott eredményeket szemlélteti. Az FXIII aktivitás mérésének intervalluma a függőleges pontozott vonalak, 300-600 másodperc között volt.

**6. táblázat.** Az 1. beteg plazmájából preparált IgG hatása az FXIII aktivációjára és az FXIIIa aktivitására

|  | Gátlás mértéke |
|--|----------------|
| Trombin hasítás gátlása  | 31%            |
| A $\text{Ca}^{2+}$ indukálta aktiválás és FXIIIa aktivitás kombinált gátlása | 91%            |
| A trombin és $\text{Ca}^{2+}$ által aktivált FXIII (FXIIIa) gátlása          | 57%            |
| FXIII aktiváció és FXIIIa aktivitás kombinált gátlása                        | 99%            |

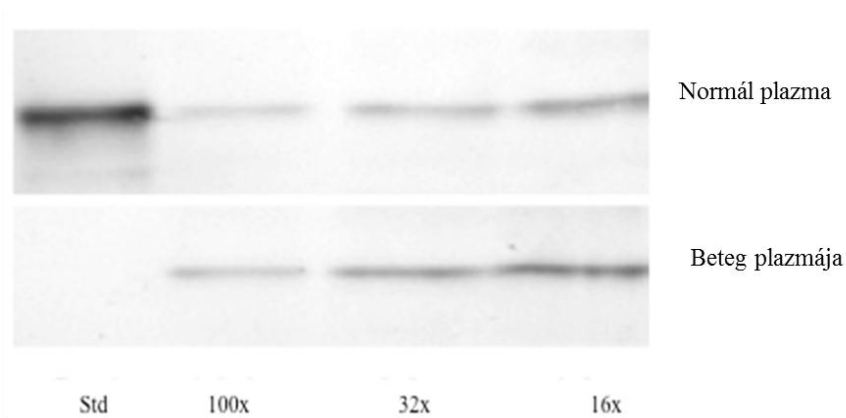
A táblázatban feltüntetett értékek telített IgG koncentrációnál mért gátlás mértékét jelentik.

## 4.2. Második beteg

### 4.2.1. Esetleírás és diagnózis

A második beteg egy 75 éves férfi volt, aki 2014 októberében került felvételre izomközti vérzésekkel a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézetébe. A betegnek korábban semmilyen vérzéses tünete nem volt. A rutin hemosztázis szűrőtesztek, mint a PI, APTI, TI, valamint a PFA-100 záródási idők és  $\alpha_2$ -plazmin inhibitor aktivitás értékei mind referencia intervallumban maradtak. Az FVIII aktivitás (196%), a von Willebrand faktor risztocetin kofaktor aktivitás (232%) és antigén szint (221%) emelkedettek voltak. A beteg plazmájában IgM-típusú antifoszfolipid antitestet is kimutattak. A negatív szűrőtesztek és a korábbi vérzéses anamnézis hiánya, felvetették az FXIII hiány szerzett formájának lehetőségét, így a kivizsgálás ebben az irányban folytatódott.

Valóban, az FXIII aktivitás kezdetben 2%-nak adódott, az idő előrehaladtával folyamatosan alacsony, de mérhető maradt, 1-4% között változott. Ezzel szemben az FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> és FXIII-A<sub>2</sub> antigén szintje mérhetetlenül alacsony (<0.1%) volt. Ez az eltérés azt sugallta, hogy az autoantitest jelenléte a plazmában interferál a két antigén meghatározási módszerével, mivel mindkettőnél anti-FXIII-A monoklonális antitestet használtunk. Ezt úgy magyarázhatjuk, hogy a betegben lévő autoantitest kötődik az FXIII-A-hoz és lefedi a detektáló antitestként használt monoklonális antitest epitópját, így akkor is ha az antigén jelen van nem mutatható ki. Ezt a hipotézist bizonyította, hogy Western blottinggal a beteg plazmájában a kontrollhoz hasonló mennyiségű FXIII-A-t mutattunk ki (15. ábra). Ez az eredmény arra hívja fel a figyelmet, hogy FXIII ellenes autoantitestek jelenlétében az FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, ill. FXIII alegységek mérése nem megbízható és Western blotting technikával kell kiegészíteni a diagnosztikai eljárásokat.



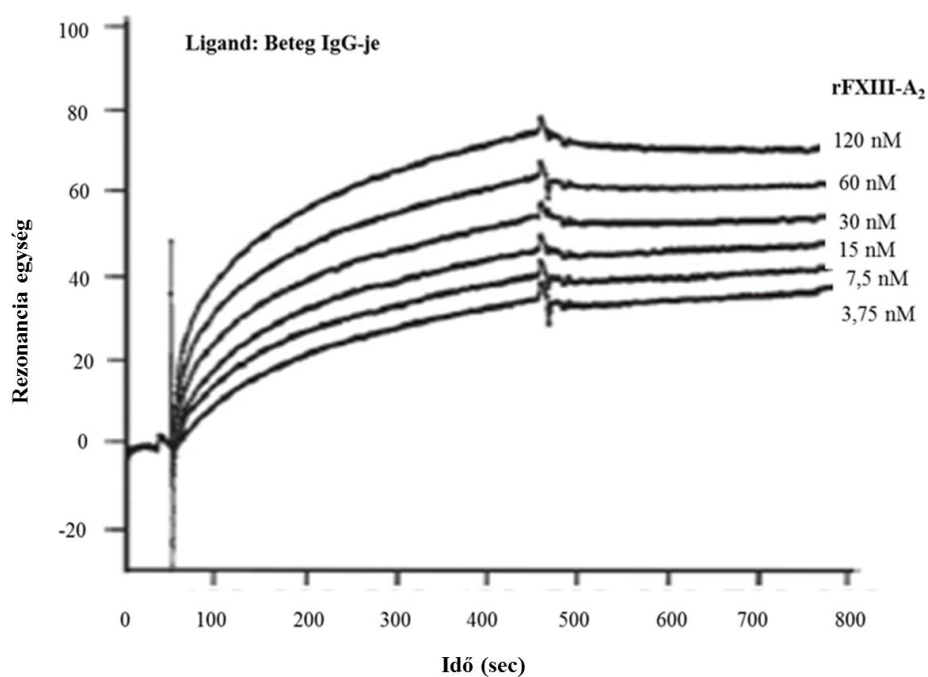
**Különböző plazma hígítások**

**15. ábra.** Az FXIII-A kimutatása normál, illetve a 2. beteg plazmájából Western blotting technikával. A plazma minták különböző hígításait azonos térfogatú 2-szeresen koncentrált SDS mintapufferrel kezeltük, majd SDS PAGE-val és Western blottinggal analizáltuk. A PVDF membránra átvitt fehérjék immundetektálása FXIII-A ellenes birka IgG-vel történt. Az immunreakciót biotinált birka IgG ellenes antitesttel és avidin biotinált peroxidáz komplex-el tettük láthatóvá. Std: rFXIII-A<sub>2</sub>.

A beteg plazmájában az FXIII-B antigén szintje 30% volt. A trombociták lizátumában meghatározott FXIII aktivitása (117%), és az FXIII-A antigén szintje (128%) normál volt. A neutralizáló autoantitest jelenléte keveréssel vizsgálatokkal igazolódott, az inhibitor titer 63,2 BU volt. A kezelés során szteroidok és ciklofoszfamid (200 mg intravénásan 5 napig, majd 100 mg orálisan 10 napig), valamint rituximab (hetente 700 mg, 4 hétig) kombinált adásával kísérelték meg az autoantitest eltávolítását. Ezenfelül a beteg friss fagyasztott plazmát, NovoSeven, illetve tranexámsavat kapott. Egy hónap után a férfit tünetmentesen otthonába bocsátották, azonban az ekkor mért FXIII aktivitás 3% és az antitest titer 23 BU volt. Két héttel később a beteg súlyos retroperitoneális vérzés okozta shock-kal (hemoglobin: 48 g/L) visszakerült a debreceni klinikára. A kezelőorvosok minden igyekezte ellenére (NovoSeven és tranexámsav, ill. folyamatos transzfúzió adása mellett) a beteg 2014 decemberében elhalálozott.

#### 4.2.2. SPR mérések, kötődési állandók meghatározása

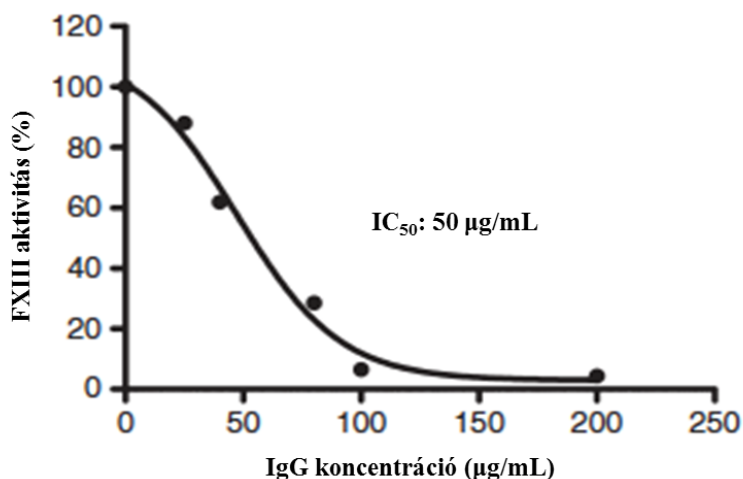
Az SPR technikával történő kötődési vizsgálatokban analitként rFXIII-A<sub>2</sub>-t, FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-t és FXIII-B<sub>2</sub>-t használtunk a 16. ábrán látható koncentrációkban. Ligandként a beteg plazmájából preparált IgG szolgált. rFXIII-A<sub>2</sub> esetében a következő kinetikai paramétereket mértük:  $K_A=1,96 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_D=6,72 \times 10^{-10} \text{ M}$ ,  $k_a=5,77 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_d=3,93 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> esetében a mérési eredmények hasonlóak voltak ( $K_A=7,00 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_D=1,04 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $k_a=4,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_d=1,07 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ). Ennek alapján elmondhatjuk, hogy az autoantitest nagy affinitással kötődött mind a rekombináns, mind pedig a komplex FXIII-hoz és az FXIII-B jelenléte a komplexben nem befolyásolta a kötődés erősségét. FXIII-B-t használva analitként nem kaptunk kötődést.



16. ábra. Az SPR szenzorgramok demonstrálják a rFXIII-A<sub>2</sub> kötődését a beteg IgG-jéhez. Ligand: a beteg IgG-je, Analit: rFXIII-A<sub>2</sub>.

### 4.2.3. Az autoantitest FXIII-at gátló kapacitásának meghatározása

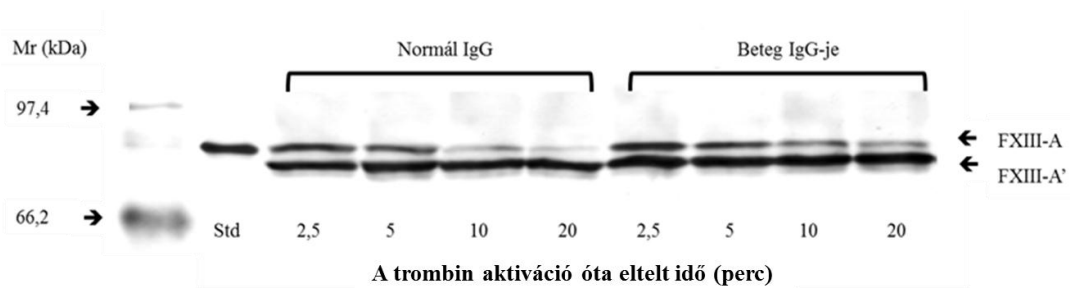
A 15. ábrán bemutatott Western blotting kísérlet eredménye már azt sugallta, hogy az autoantitest az FXIII kiürülését a keringésből szignifikánsan nem gyorsítja, így inkább neutralizáló típusba sorolható. A 17. ábrán jól látható az FXIII aktiváció és az FXIIIa aktivitás kombinált gátlásának IgG koncentráció függése. Az  $IC_{50}$  értéke 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  volt és körülbelül 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -es IgG koncentrációnál már teljes gátlás volt tapasztalható, ami lényegesen alacsonyabb a normál IgG szintnél (6,9-14,0 g/L).



17. ábra. A 2. beteg plazmájából preparált IgG FXIII aktivációjára és aktivitására kifejtett kombinált gátló hatásának kvantitatív értékelése.  $IC_{50}$  meghatározás.

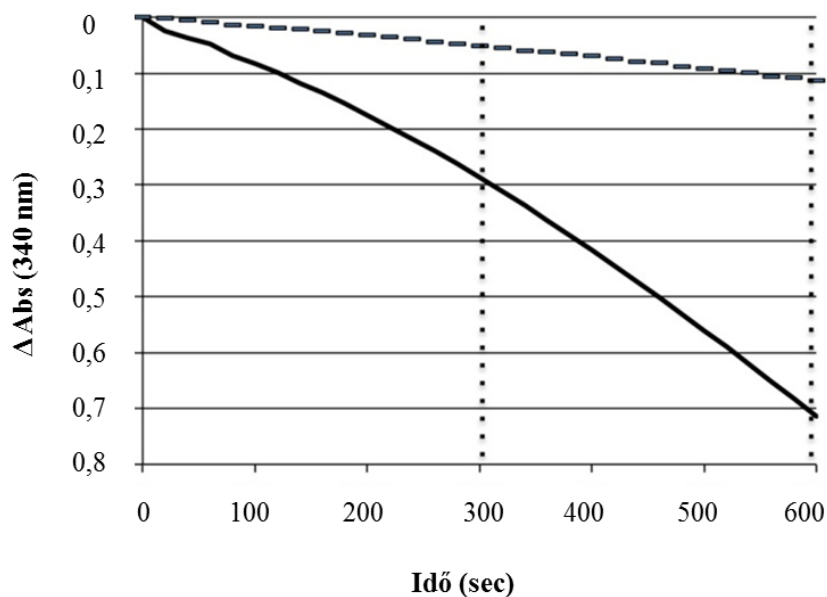
### 4.2.4. Az autoantitest klasszifikációja

Az IgG hatásának további elemzése a módszerekben és az 1. betegnél leírtak szerint történt. A második betegnél az IgG hatása a plazma FXIII aktivációjának első lépésére, vagyis a trombin által történő hasításra már sokkal kevésbé érvényesült, mint az első beteg esetében. A 18. ábrán az aktiváció után különböző időkben kivett minták membrán képei láthatóak. Megfigyelhető, hogy a beteg IgG-jének jelenlétében valamivel ugyan lassabban alakultak ki a hasított formák, mint a normál IgG jelenlétében, de az eltérés minimális.



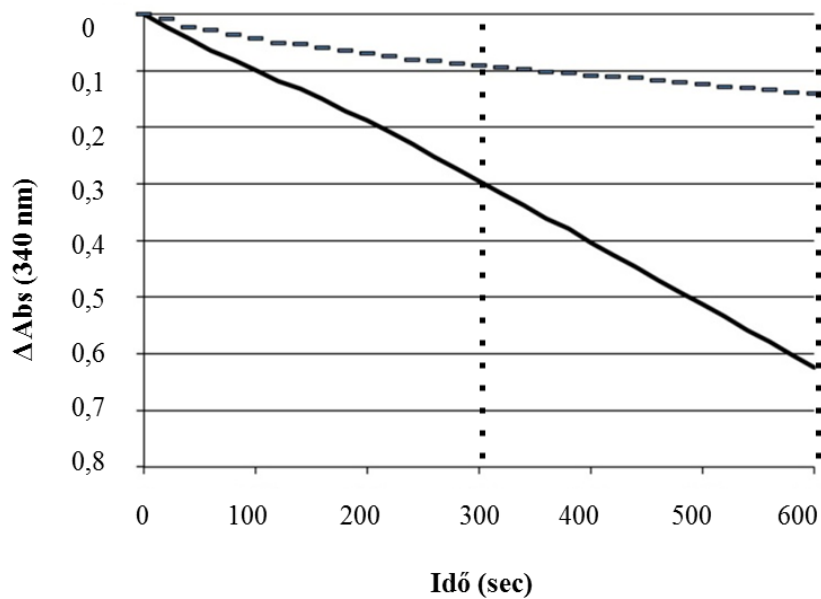
**18. ábra.** Az AP-FXIII lehasítása trombinnal normál IgG és a 2. beteg IgG-jének jelenlétében Western blotting technikával követve. Az egyes sávok 40 ng plazma FXIII-nak felelnek meg. Std: standard FXIII.

A következő kísérletben az aktivációs peptidet  $\text{Ca}^{2+}$  mentes közegben trombinnal lehasítottuk, majd beteg, ill. normál IgG-vel együtt inkubáltuk és  $\text{Ca}^{2+}$  hozzáadása után mértük a transzglutamináz aktivitást. A trombinnal proteolitikusan aktivált FXIII-nak (FXIII-A'<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) a vizsgált antitesttel történő inkubálása jelentősen, 14%-ra csökkentette (86%-os gátlás) az FXIII aktivitást (19. ábra).



**19. ábra.** Az autoantitest kombinált hatása a trombin által proteolitikusan hasított FXIII aktiválására és az FXIIIa aktivitására. Az ábrán a folytonos vonallal jelzett görbe a normál IgG-vel mért FXIII aktivitás spektrofotometriás monitorozását mutatja 340 nm-en. A szaggatott vonallal jelölt görbe pedig az autoantitest jelenlétében kapott eredményt szemlélteti. Az FXIII aktivitás mérésének intervalluma a függőleges pontozott vonalaknak megfelelően, 300-600 másodperc között volt.

Ebből azonban nem derül ki, hogy a hatás az FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> Ca<sup>2+</sup> által indukált aktiválását vagy az aktivált forma (FXIIIa) transzglutamináz aktivitását, esetleg mindkettőt gátolja. A lehetőségek között a beteg IgG-nek az FXIIIa-ra kifejtett hatásának vizsgálatával tettünk különbséget. A 20. ábrán ismertetett eredményeink szerint ebben az esetben a neutralizáló autoantitestek igen jelentősen gátolták az FXIIIa transzglutamináz aktivitását. A beteg IgG-je által kifejtett gátlás mértéke 85%-os volt.



**20. ábra.** A normál IgG-nek és a 2. beteg IgG-jének hatása a trombinnal és Ca<sup>2+</sup>-mal aktivált FXIII-ra (FXIIIa-ra). Az ábrán a folytonos vonallal jelzett görbe a normál IgG-vel mért értékeket mutatja, a szaggatott vonallal jelölt görbe pedig az autoantitesttel kapott eredményeket szemlélteti. Az FXIII aktivitás mérésének intervalluma a függőleges pontozott vonalak által bezárt intervallumban (300-600 másodperc között) volt.

### **4.3. Harmadik beteg**

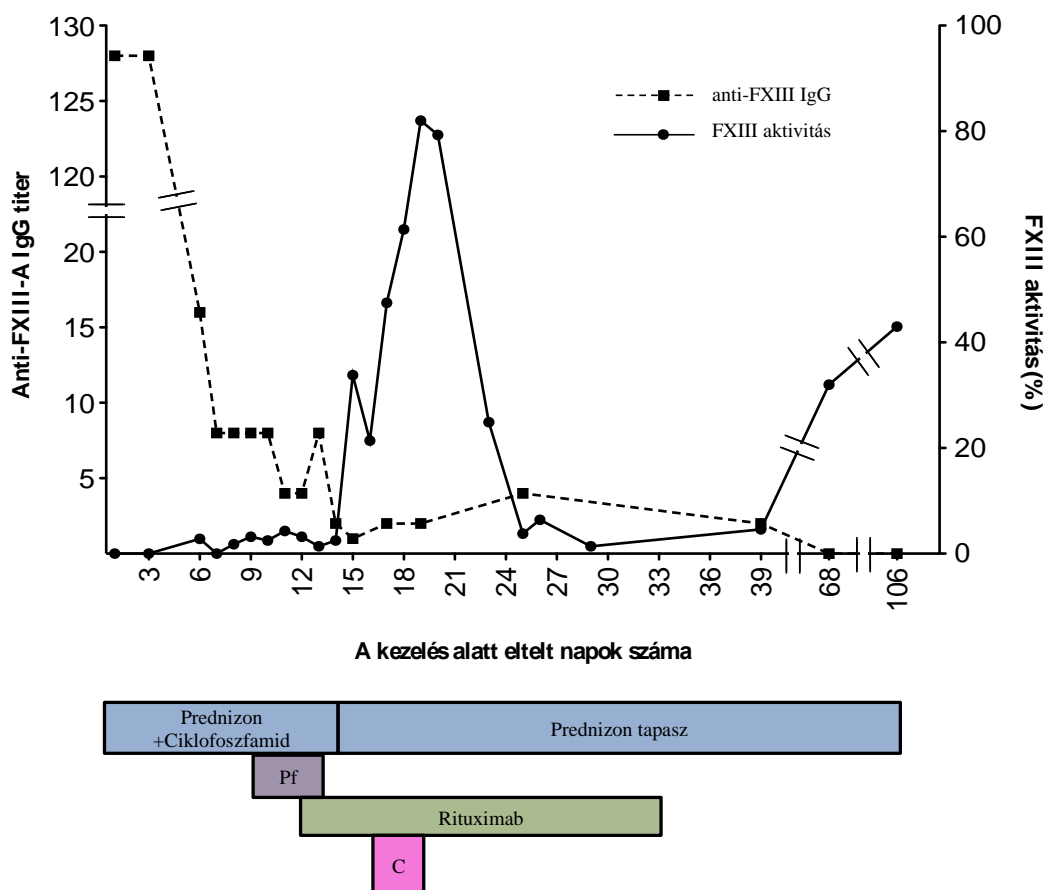
#### ***4.3.1. Esetleírás és diagnózis***

A harmadik beteg egy 82 éves nő volt, aki 2014 áprilisában került felvételre a bal szemére korlátozódó, egyre súlyosbodó látáskieséssel a montreali Centre Hospitalier Universitaire Saint-Justine Kórházba. Az elvégzett koponya computer tomográfias vizsgálat kiterjedt bal oldali nyakszirti vérzéses stroke jelenlétét mutatta (21. A ábra), ami végül a bal szemén teljes látásvesztést eredményezett. Nem sokkal később nagy kiterjedésű bevérzést figyeltek meg a jobb karján (21. B ábra). Anamnézisében szerepelt néhány műtéti beavatkozás, (térd-, és csípőprotézis, máj infiltrációval komplikált adenocarcinoma eltávolítás) melyek abnormális vérzés nélkül zajlottak le. Felvételnél a rutin laboratóriumi paraméterekben - beleértve a vérképet és a koagulációs szűrőteszt eredményeit - nem találtak eltérést. Az alvadék koncentrált urea oldatban feloldódott, ami felvetette a csökkent FXIII aktivitás és az esetleges autoantitest képződés lehetőségét. Korábban Montréalban 16 BU feletti FXIII-at gátló antitest titer mértek. Az antitest eliminálását célzó terápia prednizon és ciklofoszfamid kezeléssel indult, melyet később plazmaferezissel, ill. rituximabbal egészítettek ki. Egy rövid ideig a beteg nagy dózisú plazma FXIII koncentrátumot is kapott átmeneti sikerrel (részletesebben lásd a 22. ábrán). Az FXIII aktivitás a 68. naptól már meghaladta a 30%-ot, a beteg tünetmentes volt és otthonába távozott. Néhány hónap múlva azonban adenocarcinómája kiújult, betört az extra- és intrahepatikus epeutakba, állapota erősen romlott és feltehetően szепtikus shockban halálozott el. A beteg különböző időpontokban levett mintáit a kanadai kollaborációs partnertől a beteg halála után kaptuk meg elemzésre.



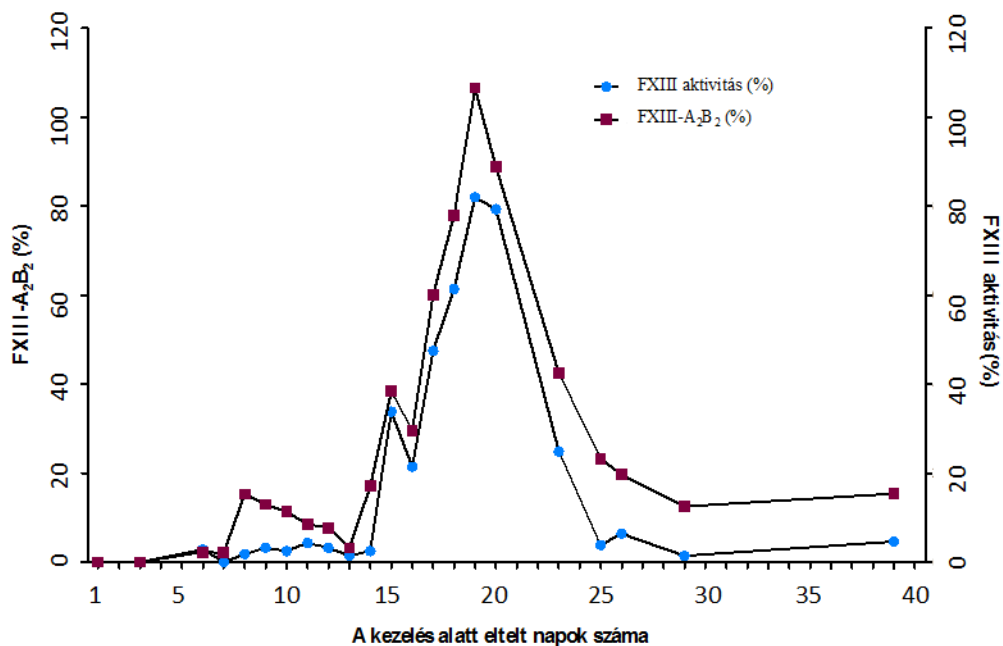
**21. ábra.** Az FXIII deficiencia klinikai következményei a harmadik betegnél. (A) A koponya computer tomográfias vizsgálata bal oldali nyakszirti vérzéses stroke-ot mutatott. (B) A beteg jobb karján kiterjedt hematóma keletkezett.

Kanadában a kezelés során folyamatosan mérték az FXIII aktivitást és ELISA módszerrel az inhibitor titer. A kezdetben magas autoantitest titer (1:128) prednizon és ciklofoszfamid (1-14. napig, majd csak prednizon tapasz) hatására a 6. npra szignifikánsan csökkent (1:4-1:16 között). Ezzel párhuzamosan az első napon a detektálási limit alatt lévő FXIII aktivitás minimálisan emelkedett ugyan, de továbbra is alacsony szinten ingadozott (1,4%-4,3% között). A terápiát időközben plazmaferezissel (9-14. napig) és rituximabbal (12-33. napig, hetente) egészítették ki. Látványos FXIII aktivitás emelkedést észleltek a 15. napon, miközben az antitest szint csökkent. Itt meg kell említenünk, hogy ez a csökkenés még mindig erős antitest jelenlétet takar, mivel a titer meghatározásakor a kezdeti hígítás (1:50) viszonylag nagy mérekkü volt. Ebben az időszakban kezdték el a pótló terápiát (16-19. napig) 1250 IU humán plazmából származó FXIII koncentrátum, Corifact (CSL Behring, King of Prussia, Pennsylvania, USA) adásával, aminek a hatására az FXIII aktivitás élesen emelkedett 82%-ig. A szubsztitúció megszűnését követően erőteljes csökkenés volt tapasztalható annak következtében, hogy az FXIII féléletideje 2 npra csökkent. A 39. napon az FXIII 4,6% volt, és a 68., valamint a 106. napon már elérte a 30% feletti értékeket (22. ábra).



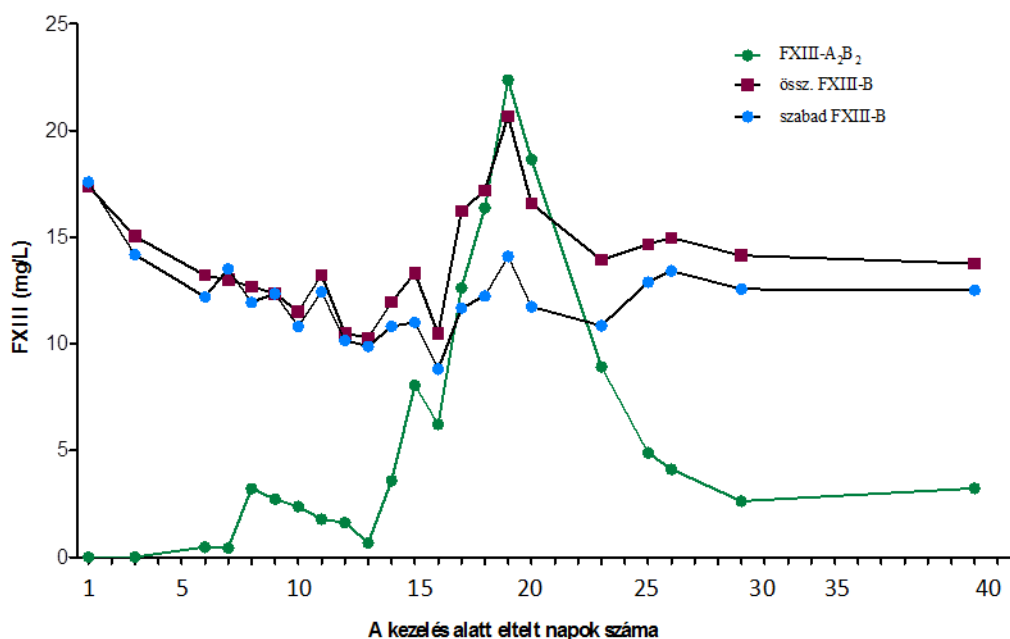
**22. ábra.** A kezelés alatt mért anti-FXIII IgG szint és FXIII aktivitás értékei az idő előrehaladtával. Az FXIII aktivitás emelkedése és az inhibitor titer csökkenése a kezelés hatékonyságát jelzi. A grafikon alatt az alkalmazott terápiás eljárásokat tüntettük fel. Pf: plazmaferezis, C: Corifact.

Az FXIII antigének mérése az első naptól a 39. napi mintáig történt meg. Általánosságban elmondható, hogy a harmadik betegnél az FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigén szint értéke tendenciájában követte az FXIII aktivitását, de rendszerint magasabb volt (23. ábra). Ez nagy valószínűséggel az autoantitest kombinált hatásából eredeztethető. Kötődve a XIII-as faktorhoz az antitest felgyorsítja annak eliminációját a keringésből, így csökkentve az antigén szintet. Ezen felül az autoantitest gátolhatja az FXIII aktiválódását és az FXIIIa aktivitást is, ami az antigén szintnél alacsonyabb FXIII aktivitást eredményez.



**23. ábra.** A plazmából mért FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigén szint és FXIII aktivitás értékei az idő előrehaladtával.

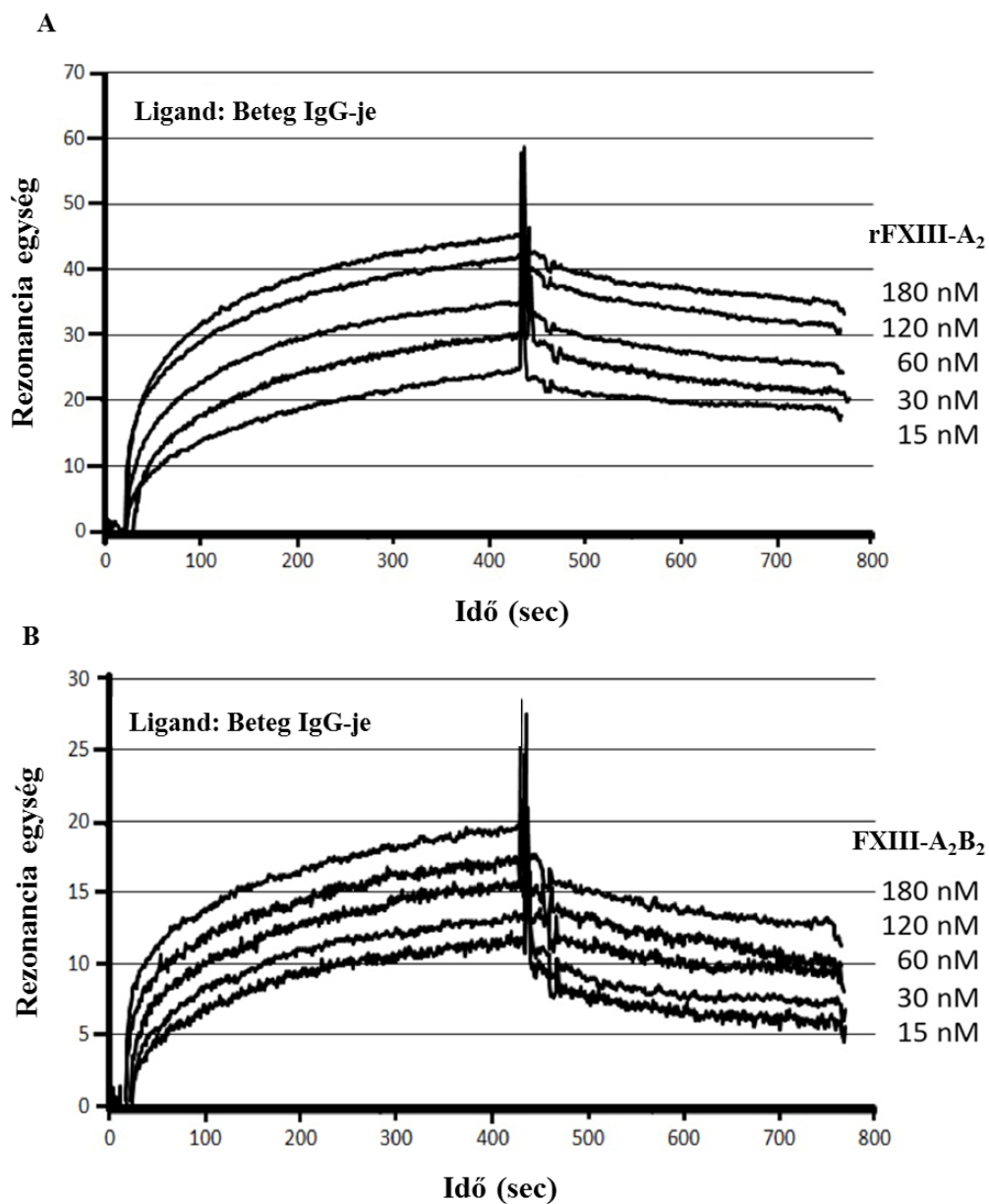
Az első napokban a szabad és totál FXIII-B antigén szintek gyakorlatilag azonosak voltak, köszönhetően a keringésben alacsony FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> szintnek. (Egészséges egyéneknél a szabad FXIII-B körülbelül 50-60%-a a totál FXIII-B-nek.) A szubsztitúciós terápiát követően viszont ez megváltozott, s a két érték eltért, a totál FXIII-B szint jóval megemelkedett a szabadhoz képest. Mivel a későbbi szakaszban is jelentős mennyiségű FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> volt jelen a plazmában a totál FXIII-B antigén szint valamivel magasabb maradt, mint a szabad FXIII-B (24. ábra).



**24. ábra.** A plazmában mért FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, össz- és szabad FXIII-B antigén szintek változása az idő előrehaladtával. Mivel a szabad FXIII-B-t nincs értelme a normál %-ában kifejezni, az összehasonlíthatóság érdekében az ábrán az FXIII antigének tömegkoncentrációit tüntettük fel.

#### 4.3.2. Kötődési paraméterek meghatározása

A 25. ábra a harmadik beteg IgG-jével kapott SPR szenzorgramokat mutatja. Az autoantitest és a rFXIII-A<sub>2</sub> interakciója a következő paraméterekkel jellemezhető:  $k_a=1,52 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$ ,  $k_d=5,72 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ,  $K_A=2,66 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_D=6,76 \times 10^{-9} \text{ M}$ . A kötődési konstansok FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> esetén:  $k_a=1,41 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$ ,  $k_d=8,17 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ,  $K_A=1,65 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_D=1,34 \times 10^{-8} \text{ M}$ . Az előző két beteg IgG-jéhez hasonlóan az antitest az FXIII-B-hez itt sem mutatott kötődést. Az eredmények tisztán demonstrálják, hogy a harmadik általunk vizsgált autoantitest is nagy affinitással kötődik mind a rFXIII-A<sub>2</sub>-hez, mind az FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-hez, a kötődés az A alegységen keresztül jön létre és a B alegység jelenléte nem befolyásolja azt.

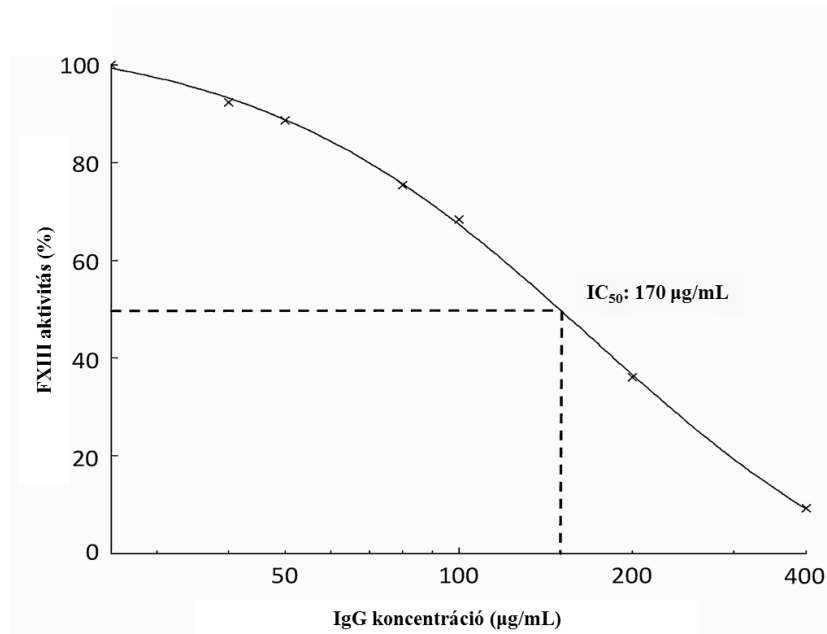


25. ábra. Az SPR szenzorgramok demonstrálják a rFXIII-A<sub>2</sub> és az FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> kötődését a beteg IgG-jéhez. Ligand mindkét esetben a beteg IgG-je, az analit (A) a rFXIII-A<sub>2</sub>, (B) az FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>.

#### 4.3.3. Az autoantitest FXIII-at gátló kapacitásának meghatározása

A harmadik beteg IgG-je 170 µg/mL-es koncentrációban alkalmazva érte el az 50%-os gátló hatást (26. ábra) és 500 µg/mL-es koncentrációnál már teljesen legátolta az FXIII aktivitását. Az alacsony IC<sub>50</sub> érték ez esetben is azt mutatja, hogy a

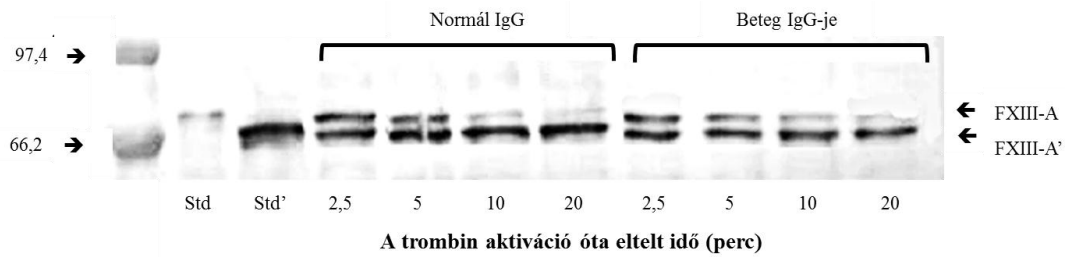
plazmában lévő autoantitest koncentrációja jóval meghaladja az FXIII teljes gátlásához szükséges mennyiséget.



**26. ábra.** A 3. beteg plazmájából preparált IgG FXIII aktivációjára és aktivitására kifejett kombinált gátló hatásának kvantitatív értékelése. IC<sub>50</sub> meghatározás.

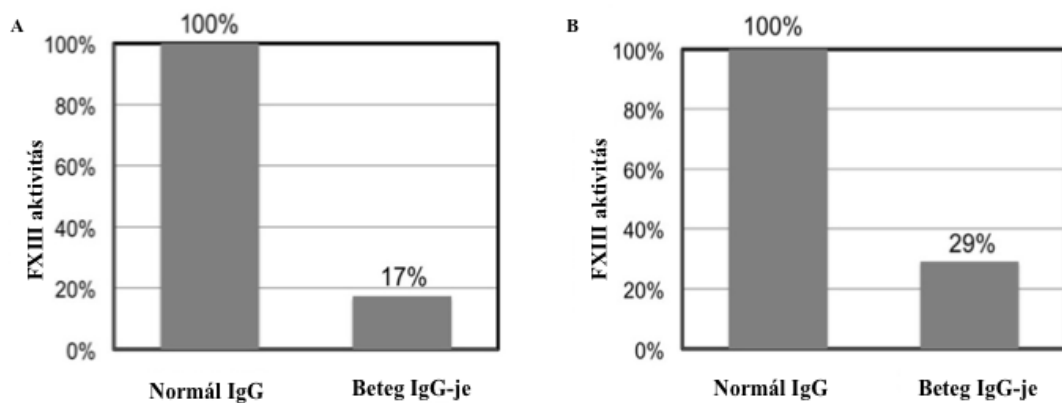
#### **4.3.4. Az autoantitest klasszifikációja**

A 3. betegből származó IgG-nek az FXIII-A thrombinnal történő hasítására kifejtett hatását az előző betegek esetében leírt módon Western blotting technikával vizsgáltuk. Az elkészült blot képen az FXIII-A aktivált (Mr: 83 kDa) és nem aktivált (Mr: 79 kDa) formái jól elkülönültek. A harmadik beteg esetében nem volt különbség a normál és a beteg IgG-vel kapott sávok között, azaz az autoantitest nem gátolta az AP-FXIII trombin által történő lehasítását (27. ábra).



**27. ábra.** Az AP-FXIII lehasítása trombinnal normál IgG és a 3. beteg IgG-jének a jelenlétében Western blotting technikával követve. Az egyes sávok 40 ng plazma FXIII-nak felelnek meg. Std: standard FXIII-A, Std': FXIII-A'.

Az autoantitest az FXIIIa<sub>2</sub>B<sub>2</sub> Ca<sup>2+</sup> indukálta aktivációjára és az aktív FXIII aktivitására kifejtett kombinált hatását a 28. A ábra mutatja. A normál IgG-vel kapott értéket 100%-nak véve, az FXIII aktivitás 17%-ra csökkent (83%-os gátlás). Végül megvizsgáltuk, hogy az autoantitest gátolja-e a trombinnal és kalciummal előaktivált FXIII transzglutamináz aktivitását. A beteg IgG-je a normál IgG-hez viszonyítva 29%-ra csökkentette az FXIIIa aktivitását (71%-os gátlás, 28. B ábra).



**28. ábra.** A beteg IgG-jének hatása az FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> Ca<sup>2+</sup> indukálta aktivációjára és az FXIIIa aktivitására. (A) a trombinnal hasított FXIII-at a beteg IgG-jének jelenlétében Ca<sup>2+</sup>-mal aktiváltuk és mértük a keletkezett FXIIIa aktivitását. Az eredmény a Ca<sup>2+</sup> indukálta aktivációra és az FXIIIa aktivitásra kifejtett kombinált gátló hatást tükrözi. (B) az aktivált FXIII (FXIIIa) aktivitásának gátlása. Az ábrán feltüntetett értékek telített IgG koncentrációnál fennálló maximális gátlás mértékét jelölik.

7. táblázat. Az általunk vizsgált betegek adatait összesítő táblázat.

|  | Öröklött FXIII hiány - alloantitest   |  |   |
|--|---|--|---|
|  | 1. beteg  | 2. beteg   | 3. beteg  |
| <b>általános adatok</b>                          | 3 éves korában diagnosztizálták a FXIII hiányt (F13A1 homozigóta mutáns: p.Gln42STOP)   | 75 éves férfi, tünet: intramuszkuláris vérzés  | 82 éves nő, bal oldali nyakszirti lebebenyben vérzéses stroke   |
| <b>korábbi anamnézis</b>                         | elhúzódó kötőszöveti vérzések   | nincs vérzékenységi anamnézis  | térd és csípő protézis, adenocarcinoma eltávolítás abnormális vérzés nélkül   |
| <b>legmagasabb inhibitor titer</b>               | 6,6 BU  | 63,2 BU  | 16 BU   |
| <b>kezdeti FXIII aktivitás</b>                   | <1%   | 2%   | 2%  |
| <b>FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigén</b>  | <0.1%   | <0.1% *  | <0.1%   |
| <b>FXIII-A antigén</b>                           | <0.1%   | <0.1% *  | <0.1%   |
| <b>FXIII-B antigén</b>                           | 46%   | 30%  | 50-60%  |
| <b>terápia</b>                                   | plazma eredetű FXIII koncentrátum, IVIG, immun tolerancia indukció, immunabszorpció   | szteroidok, ciklofoszfamid, rituximab, FFP, NovoSeven, tranexámsav, transzfúzió  | prednizon, ciklofoszfamid, plazmaferezis, rituximab, corifact (FXIII koncentrátum)  |
| <b>ligand analít</b>                             | FXIII-A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> , rFXIII-A <sub>2</sub>   | beteg IgG-je   | beteg IgG-je  |
| <b>kötődési állandók</b>                         | K <sub>a</sub> (FXIII-A <sub>2</sub> ) = 8,24 x 10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup> ,<br>K <sub>a</sub> (FXIII-A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> ) = 1,05 x 10 <sup>8</sup> M <sup>-1</sup> | K <sub>a</sub> (FXIII-A <sub>2</sub> ) = 1,96 x 10 <sup>9</sup> M <sup>-1</sup> ,<br>K <sub>a</sub> (FXIII-A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> ) = 7 x 10 <sup>9</sup> M <sup>-1</sup> | K <sub>a</sub> (FXIII-A <sub>2</sub> ) = 2,66 x 10 <sup>8</sup> M <sup>-1</sup> ,<br>K <sub>a</sub> (FXIII-A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> ) = 1,65 x 10 <sup>8</sup> M <sup>-1</sup> |
| <b>felgyorsult clearance</b>                     | igen  | nem  | igen  |
| <b>IC<sub>50</sub></b>                           | 340 µg/mL   | 50 µg/mL   | 170 µg/mL   |
| <b>trombin hasítás</b>                           | 31%-os gátlás   | csekély gátlás   | nincs hatás   |
| <b>Ca<sup>2+</sup>-indukálta kombinált hatás</b> | 91%-os gátlás   | 86%-os gátlás  | 83%-os gátlás   |
| <b>FXIIIa gátlása</b>                            | 57%-os gátlás   | 85%-os gátlás  | 71%-os gátlás   |
| <b>antitest típusa</b>                           | kombinált hatású FXIII-A ellenes IgG típusú alloantitest  | IV-es típusú neutralizáló autoantitest (FXIII-A ellenes IgG), elsődleges hatás a FXIIIa gátlása  | kombinált hatású FXIII-A ellenes IgG típusú autoantitest  |
| <b>kimenet</b>                                   | többszörös intracerebrális vérzés †   | retroperitonealis vérzés †   | a vérzés megszűnt, de az antitest titer magas a FXIII aktivitás alacsony maradt, a beteg néhány hónap múlva adenocarcinoma miatt elhunyt  |

\* Az ELISA-val mért antigén szintek nem valósak, a betegben lévő anti-FXIII-A antitest interferál az ELISA-ban használt antitesttel. Western blottinggal normál FXIII-A szintet kaptunk. † A beteg elvérzett.

## 5. Megbeszélés

Intézetünk munkatársai összegezték az FXIII ellenes antitesteket és következményeit leíró originális közleményeket [85] a Journal of Thrombosis and Haemostasis felkérésére. Eddig 48 olyan beteget leíró közlemény jelent meg, melyben a vérzékenységi tüneteket FXIII ellenes autoantitest okozta. Az FXIII autoantitestekkel kapcsolatban további öt összefoglaló közlemény jelent meg [57, 86-89]. A japán eseteket összegző közleményen [86] kívül az esetek többsége nő volt. A nem japán esetek korösszetétele azt mutatta, hogy van egy 40 év alatti döntően nőkből álló fiatalabb korosztály és egy 60 év feletti korosztály. Az előző csoportban az autoantitestek megjelenése gyakran autoimmun megbetegedésekhez társul, míg az idősebb korosztályban gyakran idiopátiás.

Az összefoglalóban analizált 47 anti-FXIII-A autoantitestet prezentáló esetből 7 beteg alapbetegsége volt SLE. Ezen kívül az egyetlen FXIII-B ellenes autoantitest háttérében is SLE volt. 1 beteg esetében reumás lázhoz, 1 esetben rheumatoid arthritishez társult a FXIII-A ellenes antitest, 1-1 esetben emelkedett reuma faktor szintet, ill. IgM típusú antifoszfolipid antitestet detektáltak. 3 esetben feltehetően autoimmun eredetű hypothyreosisban fordult elő FXIII-A ellenes autoantitest. Malignus betegséghez ritkábban társult FXIII-A ellenes antitest. Egy-egy krónikus myelomonocytás leukémiás, non-Hodgkin's lymphomás és adenocarcinomás betegről számoltak be. Ezenkívül egy betegben diagnosztizáltak MGUS-t.

Az általunk analizált két autoimmun FXIII hiányban szenvedő beteg esetét a 7. táblázatban összegeztük. Mindketten az idős korosztályból kerültek ki (75 éves férfi és 82 éves nő) és utóbbi esetben az autoantitest malignus megbetegedéshez társult. A férfi betegnél az említett betegcsoportban igen gyakori súlyos izomközti vérzés dominálta a klinikai képet, míg az idős hölgy esetében az öröklött FXIII-A deficienciában gyakori, az FXIII-A ellenes autoantitest esetében ritkábban előforduló [85] intracraniális vérzés volt az első, de igen súlyos vérzéses tünet.

A lány gyermek esetében genetikailag is diagnosztizált öröklött súlyos FXIII-A hiány talaján, pótló terápia hatására képződött alloantitest okozta a korábban határos szubsztitúciós kezelés hatástalanságát és a következményes, nehezen menedzselhető súlyos vérzékenységet, köztük két intracraniális vérzést. Öröklött FXIII hiányban képződött alloantitestek előfordulása, ellentétben pl. a haemophilia A-val, ahol az

alloantitestek gyakorisága 30% körül van [90], szerencsére rendkívül ritka. Az általunk leírt esettel együtt összesen 4 ilyen betegről számolt be az irodalom [85].

Az FXIII hiány általában, az autoimmun FXIII hiány és az FXIII ellenes alloantitestek megjelenése pedig különösen aluldiagnosztizált, sokan az FXIII hiányt a leginkább aluldiagnosztizált vérzékenységnek tartják. Az öröklött FXIII hiány diagnózisának felállítására és klasszifikációjára kidolgozott ISTH SSC irányelvek megjelenése az utóbbi években lényegesen javított az öröklött forma diagnosztikájának hatékonyságán. Az FXIII ellenes antitestek diagnosztikájára ugyanez nem mondható el. Három esetünk kapcsán követtünk egy olyan diagnosztikai algoritmust, mely biztosítja a korrekt diagnózist és az FXIII ellenes antitestek klasszifikációját, s mely példaként szolgálhat az ezzel kapcsolatos irányelvek jövőbeni kimunkálásánál. A diagnosztikus/klasszifikációs folyamatba eddig e célra nem használt új eljárásokat is bevezettünk. Megerősítettük, hogy a Nijmegen-Bethesda eljárás alkalmas az FXIII-A ellenes neutralizáló antitestek jellemzésére, jóllehet az eredmények biokémiailag nehezen értelmezhetők. A neutralizáló antitestek gátló kapacitásának a meghatározására bevezettük a farmakológiában jól ismert  $IC_{50}$  meghatározást, ami lehetővé teszi annak becslését, hogy FXIII koncentráttal semlegesíthető-e az antitest. Eseteinkben az antitestek gátló kapacitása messze túlhaladta a beadható FXIII koncentráttal mennyiségét.

A neutralizáló antitestek klasszifikációjának további lépése(i) annak megállapítása, hogy az antitest az FXIII aktivációjára, ill. annak milyen lépéseire hat, ill. befolyásolja-e a már aktivált FXIIIa transzglutamináz aktivitását. Erre egy három lépcsős módszert dolgoztunk ki. Először Western blotting technikát alkalmazva megvizsgáltuk, hogy gátolja-e az FXIII-A trombinnal történő hasítását, azaz az AP-FXIII lehasítását, ami elengedhetetlen a további aktivációs lépésekhez. Ezt követően vizsgáltuk, hogy a trombin hasítás eredményeképpen létrejött FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> Ca<sup>2+</sup> indukálta aktiválódására milyen hatással van az antitest. Az utóbbi eljárás a Ca<sup>2+</sup> hatására létrejött FXIII-B disszociációját, az FXIII-A' dimer aktív konformációjának a kialakulását és a keletkezett FXIIIa aktivitását együttesen teszteli. Végül az FXIIIa transzglutamináz aktivitásának gátlását teszteltük, ami azt is mutatja, hogy a Ca<sup>2+</sup> hatás esetleges gátlása mennyire köszönhető az FXIIIa gátlásának, ill. mennyire a Ca<sup>2+</sup> indukálta aktiváció gátlásának. Ezen algoritmus alkalmazásával a gátló antitestek osztályozhatók. A diagnosztizált FXIII-A ellenes alloantitest többszörös gátló hatást

fejtett ki, egyaránt gátolta az FXIII-A trombinnal történő hasítását, a  $\text{Ca}^{2+}$  indukálta aktivációt és az FXIIIa aktivitását. Mivel ugyanakkor felgyorsította a beadott FXIII koncentrációjának eltűnését a plazmából, így kombinált típusú antitestként diagnosztizáltuk. A 2. beteg esetében az autoantitest elsődleges hatása az FXIIIa gátlása volt, ezért II-es típusú antitest is lehetne. Mivel csekély mértékben, de az FXIII-A trombinnal történő hasítását is gátolta, így végeredményben a többszörös gátló hatásnak megfelelő IV-es típusba soroltuk. A gátló hatás a 3. beteg esetében elsődlegesen az FXIIIa gátlását jelentette, de itt az FXIII eliminációja is felgyorsult, ezért kombinált típusú autoantitestnek kategorizáltuk.

Az FXIII ellenes antitestek jellemzésének egy fontos adata, hogy melyik FXIII alegységhez kötődik, ill. hogy milyen a kötődés affinitása. E célra először alkalmaztuk az SPR technikát. Mindhárom esetben megállapítottuk, hogy az antitestek nem kötődtek az FXIII-B-hez, míg az FXIII-A<sub>2</sub>-höz és az FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-höz megközelítőleg hasonló affinitást mutattak. Az FXIII-B jelenléte a komplexben tehát nem befolyásolta az antitest kötődését az FXIII-A-hoz. Az alloantitest esetében még az FXIII-at és nem az IgG-t használtuk ligandként, ezért itt az általunk közölt cikkben a  $K_D$ -t adtuk meg. Az autoantitestek esetében már az IgG volt a ligand így a  $K_A$  pontosan meghatározható volt. Ettől függetlenül megállapítható volt, hogy az allo/autoantitestek igen nagy affinitással kötődtek az FXIII-A-hoz. Az SPR alkalmazását egyéb alvadási faktor ellenes antitestek jellemzésére is ajánljuk.

Egységes irányelv hiányában a betegek kezelése meglehetősen eklektikus. Az FXIII koncentrációjának csak kevés esetben és csak átmenetileg hatása van. Abban általános az egyetértés, hogy az elsődleges cél az antitest eradikációja kell legyen. Ez megkísérelhető az antitest eliminálásával, vagy az antitestet termelő sejtek kiirtásával. Az előbbi eljárások (plazmaferézis, immunabszorpció, plazmacsere) kevésbé tűnnek hatékonynak. Az antitest eltűnése után viszonylag gyorsan újratermelődik. Az immunuszuppresszív szerek prednizon, ciklofoszfamid, ciklosporin, rituximab az esetek egy részében hatásosak. Kiegészítő terápiaként IVIG és tranexámsav alkalmazása is történt. A 7. táblázat összegzi a három betegünk kezelését és a klinikai kimeneteket. Az alloantitest esetében kanadai kollégáink megkísérelték az immuntolerancia kialakítását a Malmö féle protokollt (ciklofoszfamid, IVIG, nagy dózisú FXIII koncentrációját) követve [84]. A három időpontban is megkísérelt immuntolerancia átmeneti egy, ill fél éves javulást hozott, végül naponta csak 30 IU/kg FXIII koncentrációját (ez egyébként öröklött FXIII-A deficiens betegek esetében havonta egy alkalommal adandó dózis) adásával

lehetett a hemosztázist egy ideig elfogadható szinten tartani. A három beteg prognózisa egyaránt rossz volt. Az alloantitest következtében egy kisebb fejsérülés után subdurális és multiplex intracerebrális hematoma okozta a beteg halálát. A 2. beteg retroperitoneális hematoma miatt vérzett el. A 3. beteg klinikai javulást mutatott, de az autoantitest nem tűnt el és a plazma FXIII szintje igen alacsony maradt. A beteg halála előrehaladt adenocarcinoma és szeptikus sokk miatt néhány hónappal később következett be, így nem lehet tudni, hogy az autoantitest milyen következményekkel járt volna. A három eset és az irodalomban közölt számos fatális kimenettel végződő esemény arra utal, hogy szükséges lenne valamiféle a kezelésre vonatkozó ajánlást kidolgozni, másrészt új terápiás megközelítésekre lenne szükség. Úgy gondoljuk, hogy az általunk bevezetett diagnosztikai eljárások, az antitestek jellemzése a jobb diagnosztikai hatékonyság elérése mellett új terápiás lehetőségeket (pl. az antitestek epitóspecifikus gátlása) is felvetnek.

## 6. Összefoglalás

A plazma XIII-as faktora két A és két B alegységből felépülő heterotetramer protranszglutamináz. A véralvadás utolsó fázisában aktiválódik trombin és  $\text{Ca}^{2+}$  együttes hatására. Az aktivált FXIII-as faktor egy transzglutamináz (FXIIIa), melynek fő funkciója a fibrin láncok keresztkötése és az  $\alpha_2$ -plazmin inhibitor fibrin láncokhoz való kötése, így stabilizálva a fibrin alvadékot. Az FXIII részt vesz a sebgyógyulásban, az érújdonképződésben és a terhesség fenntartásában is. Az FXIII hiány öröklött formája egy ritka, súlyos vérzékenység, a vérzéses tünetek FXIII koncentrációjának rendszeres adásával jól megelőzhetők. Az öröklött FXIII hiányt rendkívül ritkán alloantitestek megjelenése súlyosbíthatja és igen nehezen kezelhetővé teszi. Az FXIII ellenes autoantitestek az öröklött FXIII hiányhoz hasonlóan súlyos, de nehezen kezelhető vérzékenységet okoznak. Vizsgálataink célja három beteg esetében az FXIII ellenes antitestek jellemzése, a diagnózis újszerű megközelítésének bemutatása, és a betegség lefolyásának követése volt. Meghatároztuk a plazmában az FXIII aktivitásokat az FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> komplex, FXIII-A, totál és szabad FXIII-B antigén koncentrációkat. Az antitestek és rFXIII-A<sub>2</sub>, valamint FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> közötti interakciók kötődési állandóinak meghatározására SPR-en alapuló technikával történt. A betegek plazmájából előállított IgG-k gátló kapacitását az IC<sub>50</sub> értékkel jellemeztük. Az antitesteknek az FXIII-A trombin általi hasítására kifejtett hatását Western blottinggal követtük nyomon. A  $\text{Ca}^{2+}$  indukálta FXIII aktivációjára és az aktív FXIII aktivitására kifejtett gátló hatást speciális FXIII aktivitás tesztekkel értékeltük. Kimutattuk, hogy vizsgált antitestek nagy affinitással kötődtek a rFXIII-A<sub>2</sub>-hez és az FXIII komplexhez. Az alacsony IC<sub>50</sub> értékek azt mutatták, hogy az antitest plazma koncentrációja sokszorosa annak, ami a normál plazma FXIII aktivitásának teljes gátlásához elegendő lenne. Az általunk vizsgált egyik autoantitest és az alloantitest kombinált hatású antitest alcsoportba sorolható, vagyis neutralizáló és nem neutralizáló hatással egyaránt rendelkezik. A másik vizsgált autoantitestnek IV-es típusú neutralizáló hatása volt, azaz elsődlegesen az FXIIIa-t gátolta. A betegek kezelése igen komoly nehézségekbe ütközött. Még a leginkább eredményes eradikációs terápia is csak átmeneti sikereket eredményezett és az alloantitest, ill. az egyik autoantitest esetében nem lehetett megakadályozni a letális kimenetű vérzést. Reményeink szerint az általunk alkalmazott megközelítés az FXIII ellenes antitestek hatékonyabb diagnosztikáját eredményezik és végső soron jobb terápiás megközelítéshez vezethetnek.

## 7. Summary

Plasma FXIII is a heterotetrameric protransglutaminase consisting of two A and two B subunits. It is activated in the final stage of blood coagulation by the concerted action of thrombin and  $\text{Ca}^{2+}$ . The main function of activated factor XIII, a transglutaminase (FXIIIa), is the stabilization of fibrin clot by crosslinking fibrin chains and covalently attaching  $\alpha_2$ -plasmin inhibitor to fibrin. FXIII also participates in wound healing, in angiogenesis and in maintaining pregnancy. The inherited form of FXIII deficiency is a rare, severe hemorrhagic diathesis. In extremely rare cases inherited FXIII deficiency is complicated by anti-FXIII alloantibodies that make disease management very difficult. Similarly to the inherited form, FXIII deficiency caused by autoantibodies against a FXIII subunit also represent rare, but severe bleeding diathesis, however in this case patients' management is more difficult. The aim of our investigations was to introduce novel approaches into the diagnosis and characterization of anti-FXIII antibodies and to follow the clinical course of three patients with such antibodies. FXIII activities, the concentrations of FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> complex, total and free FXIII-B were determined in the plasma. Binding constants for the interactions of the antibodies with rFXIII-A<sub>2</sub> and FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> were determined by SPR technique. Inhibitory capacities of IgG-s were characterized by IC<sub>50</sub> values, i.e. by the concentration exerting 50% inhibition of FXIII activation/activity. The effect of the antibodies on the truncation of FXIII-A by thrombin was monitored by Western blotting. The inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  induced FXIII activation and FXIIIa activity was assessed by specially modified FXIII activity assays. We demonstrated that each antibody bound to rFXIII-A<sub>2</sub> and FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> with similarly high affinity, the presence of FXIII-B did not affect the strength of the binding. The low IC<sub>50</sub> values indicated that the plasma concentration of the antibodies is many times over the value that would be required for the neutralization of FXIII present in normal plasma. One of the autoantibodies and the alloantibody exerted combined (both neutralizing and non-neutralizing) effect. The primary effect of the other autoantibody was the inhibition of FXIIIa (type IV neutralizing effect). Management of the patients was extremely difficult. Only transient results were achieved even with the relatively most successful eradication therapy and the patient with the alloantibody and a patient with autoantibody died due to lethal hemorrhage. We hope that our approach improves the diagnosis of anti-FXIII antibodies and leads to novel therapeutic initiatives.

## 8. Irodalomjegyzék

1. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komaromi I, Katona E: Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev* 2011, 91(3):931-972.
2. Katona E, Penzes K, Csapo A, Fazakas F, Udvardy ML, Bagoly Z, Orosz ZZ, Muszbek L: Interaction of factor XIII subunits. *Blood* 2014, 123(11):1757-1763.
3. Komaromi I, Bagoly Z, Muszbek L: Factor XIII: novel structural and functional aspects. *J Thromb Haemost* 2011, 9(1):9-20.
4. 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.
5. Schroeder V, Kohler HP: Factor XIII: Structure and Function. *Semin Thromb Hemost* 2016, 42(4):422-428.
6. Nurminskaya M, Kaartinen MT: Transglutaminases in mineralized tissues. *Front Biosci* 2006, 11:1591-1606.
7. Nurminskaya M, Magee C, Nurminsky D, Linsenmayer TF: Plasma transglutaminase in hypertrophic chondrocytes: expression and cell-specific intracellular activation produce cell death and externalization. *J Cell Biol* 1998, 142(4):1135-1144.
8. 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.
9. 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.
10. Nagy JA, Henriksson P, McDonagh J: Biosynthesis of factor XIII B subunit by human hepatoma cell lines. *Blood* 1986, 68(6):1272-1279.
11. 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.

12. Polgar J, Hidasi V, Muszbek L: Non-proteolytic activation of cellular protransglutaminase (placenta macrophage factor XIII). *Biochem J* 1990, 267(2):557-560.
13. Muszbek L, Yee VC, Hevessy Z: Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res* 1999, 94(5):271-305.
14. 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.
15. Muszbek L, Adany R, Mikkola H: Novel aspects of blood coagulation factor XIII. I. Structure, distribution, activation, and function. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1996, 33(5):357-421.
16. Folk JE: Mechanism and basis for specificity of transglutaminase-catalyzed epsilon-(gamma-glutamyl) lysine bond formation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1983, 54:1-56.
17. Lorand L, Conrad SM: Transglutaminases. *Mol Cell Biochem* 1984, 58(1-2):9-35.
18. Katona E, Penzes K, Molnar E, Muszbek L: Measurement of factor XIII activity in plasma. *Clin Chem Lab Med* 2012, 50(7):1191-1202.
19. 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.
20. 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.
21. Karimi M, Bereczky Z, Cohan N, Muszbek L: Factor XIII Deficiency. *Semin Thromb Hemost* 2009, 35(4):426-438.
22. Kohler HP, Ichinose A, Seitz R, Ariens RA, Muszbek L, Factor X, Fibrinogen SSCSOTI: Diagnosis and classification of factor XIII deficiencies. *J Thromb Haemost* 2011, 9(7):1404-1406.
23. Schroeder V, Kohler HP: Factor XIII deficiency: an update. *Semin Thromb Hemost* 2013, 39(6):632-641.
24. Muszbek L, Bagoly Z, Cairo A, Peyvandi F: Novel aspects of factor XIII deficiency. *Curr Opin Hemat* 2011, 18(5):366-372.

25. Muszbek L, Katona É, Diagnosis and management of congenital and acquired FXIII deficiencies. *Semin Thromb Hemost*. 2016,42(4):429-39
26. Hsieh L, Nugent D: Factor XIII deficiency. *Haemophilia* 2008, 14(6):1190-1200.
27. Dorgalaleh A, Naderi M, Hosseini MS, Alizadeh S, Hosseini S, Tabibian S, Eshghi P: Factor XIII deficiency in Iran: a comprehensive review of the literature. *Semin Thromb Hemost* 2015, 41(3):323-329.
28. Dorgalaleh A, Naderi M, Shamsizadeh M: Morbidity and mortality in a large number of Iranian patients with severe congenital factor XIII deficiency. *Ann Hematol* 2016, 95(3):451-455.
29. Peyvandi F, Palla R, Menegatti M, Siboni SM, Halimeh S, Faeser B, Pergantou H, Platokouki H, Giangrande P, Peerlinck K et al: Coagulation factor activity and clinical bleeding severity in rare bleeding disorders: results from the European Network of Rare Bleeding Disorders. *J Thromb Haemost* 2012, 10(4):615-621.
30. Carcao M, Fukutake K, Inbal A, Kerlin B, Lassila R, Oldenburg J, Garly ML, Nugent D: Developing the First Recombinant Factor XIII for Congenital Factor XIII Deficiency: Clinical Challenges and Successes. *Semin Thromb Hemost* 2017, 43(1):59-68.
31. 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.
32. Dardik R, Loscalzo J, Inbal A: Factor XIII (FXIII) and angiogenesis. *J Thromb Haemost* 2006, 4(1):19-25.
33. Inbal A, Lubetsky A, Krapp T, Castel D, Shaish A, Dickneite G, Modis L, Muszbek L, Inbal A: Impaired wound healing in factor XIII deficient mice. *Thromb Haemost* 2005, 94(2):432-437.
34. 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.
35. Adany R, Muszbek L: Immunohistochemical detection of factor XIII subunit a in histiocytes of human uterus. *Histochemistry* 1989, 91(2):169-174.

36. Asahina T, Kobayashi T, Okada Y, Itoh M, Yamashita M, Inamoto Y, Terao T: Studies on the role of adhesive proteins in maintaining pregnancy. *Horm Res* 1998, 50 Suppl 2:37-45.
37. Adany R, Glukhova MA, Kabakov AY, Muszbek L: Characterisation of connective tissue cells containing factor XIII subunit a. *Jl Clin Pathol* 1988, 41(1):49-56.
38. Sharief LA, Kadir RA: Congenital factor XIII deficiency in women: a systematic review of literature. *Haemophilia* 2013, 19(6):e349-357.
39. Sharief LT, Lawrie AS, Mackie IJ, Smith C, Peyvandi F, Kadir RA: Changes in factor XIII level during pregnancy. *Haemophilia* 2014, 20(2):e144-148.
40. Koseki-Kuno S, Yamakawa M, Dickneite G, Ichinose A: Factor XIII A subunit-deficient mice developed severe uterine bleeding events and subsequent spontaneous miscarriages. *Blood* 2003, 102(13):4410-4412.
41. Inbal A, Muszbek L: Coagulation factor deficiencies and pregnancy loss. *Semin Thromb Hemost* 2003, 29(2):171-174.
42. Asahina T, Kobayashi T, Okada Y, Goto J, Terao T: Maternal blood coagulation factor XIII is associated with the development of cytotrophoblastic shell. *Placenta* 2000, 21(4):388-393.
43. Rodeghiero F, Tosetto 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.
44. Izumi T, Hashiguchi T, Castaman G, Tosetto A, Rodeghiero F, Girolami A, Ichinose A: Type I factor XIII deficiency is caused by a genetic defect of its b subunit: insertion of triplet AAC in exon III leads to premature termination in the second Sushi domain. *Blood* 1996, 87(7):2769-2774.
45. Saito M, Asakura H, Yoshida T, Ito K, Okafuji K, Yoshida T, Matsuda T: A familial factor XIII subunit B deficiency. *Br J Haematol* 1990, 74(3):290-294.
46. Morange P, Trigui N, Frere C, Chambost H, Pouymayou C, Uters M, Boucly C, Juhan-Vague I, de Mazancourt P: Molecular characterization of a novel mutation in the factor XIII a subunit gene associated with a severe defect: importance of prophylactic substitution. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009, 20(7):605-606.
47. <http://www.f13-database.de/>

48. Inbal A, Oldenburg J, Carcao M, Rosholm A, Tehranchi R, Nugent D: Recombinant factor XIII: a safe and novel treatment for congenital factor XIII deficiency. *Blood* 2012, 119(22):5111-5117.
49. Korte W: Catridecacog: a breakthrough in the treatment of congenital factor XIII A-subunit deficiency? *J Blood Med* 2014, 5:107-113.
50. Nugent D: Corifact/Fibrogammin(R) P in the prophylactic treatment of hereditary factor XIII deficiency: results of a prospective, multicenter, open-label study. *Thromb Res* 2012, 130 Suppl 2:S12-14.
51. Dreyfus M, Barrois D, Borg JY, Claeysens S, Torchet MF, Arnuti B, Pautard B, Groupe d'Etudes Francophone du F: Successful long-term replacement therapy with FXIII concentrate (Fibrogammin((R)) P) for severe congenital factor XIII deficiency: a prospective multicentre study. *J Thromb Haemost* 2011, 9(6):1264-1266.
52. Wada H, Soury M, Matsumoto R, Sugihara T, Ichinose A: Alloantibodies against the B subunit of plasma factor XIII developed in its congenital deficiency. *Thromb Haemost* 2013, 109(4):661-668.
53. Lorand L, Urayama T, De Kiewiet JW, Nossel HL: Diagnostic and genetic studies on fibrin-stabilizing factor with a new assay based on amine incorporation. *J Clin Invest* 1969, 48(6):1054-1064.
54. Seiving B, Henriksson P, Stenberg P, Nilsson IM: A reversed activity staining procedure for detection of an acquired antibody against factor XIII in a girl with factor XIII deficiency. *Br J Haematol* 1992, 82(2):414-416.
55. Lorand L, Velasco PT, Hill JM, Hoffmeister KJ, Kaye FJ: Intracranial hemorrhage in systemic lupus erythematosus associated with an autoantibody against factor XIII. *Thromb Haemost* 2002, 88(6):919-923.
56. Hayashi T, Kadohira Y, Morishita E, Asakura H, Soury M, Ichinose A: A case of acquired FXIII deficiency with severe bleeding symptoms. *Haemophilia* 2012, 18(4):618-620.
57. Tone KJ, James TE, Fergusson DA, Tinmouth A, Tay J, Avey MT, Kilty S, Lalu MM: Acquired Factor XIII Inhibitor in Hospitalized and Perioperative Patients: A Systematic Review of Case Reports and Case Series. *Transfus Med Rev* 2016, 30(3):123-131.
58. Tosetto A, Rodeghiero F, Gatto E, Manotti C, Poli T: An acquired hemorrhagic disorder of fibrin crosslinking due to IgG antibodies to FXIII, successfully

- treated with FXIII replacement and cyclophosphamide. *Am J Hematol* 1995, 48(1):34-39.
59. Ajzner E, Schlamadinger A, Kerenyi A, Bereczky Z, Katona E, Haramura G, Boda Z, Muszbek L: Severe bleeding complications caused by an autoantibody against the B subunit of plasma factor XIII: a novel form of acquired factor XIII deficiency. *Blood* 2009, 113(3):723-725.
  60. Ichinose A, Osaki T, Souri M, Japanese Collaborative Research Group on AH: Clinical features of 32 new Japanese cases with autoimmune haemorrhage-philic due to anti-factor XIII antibodies. *Haemophilia* 2015, 21(5):653-658.
  61. Muszbek L, Katona E: Diagnosis and Management of Congenital and Acquired FXIII Deficiencies. *Semin Thromb Hemost* 2016, 42(4):429-439.
  62. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E: The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb Haemost* 1995, 73(2):247-251.
  63. Lorand L, Credo RB, Janus TJ: Factor XIII (fibrin-stabilizing factor). *Methods Enzymol* 1981, 80 Pt C:333-341.
  64. 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.
  65. Lorand L, Jeong JM, Radek JT, Wilson J: Human plasma factor XIII: subunit interactions and activation of zymogen. *Methods Enzymol* 1993, 222:22-35.
  66. Schwartz ML, Pizzo SV, Hill RL, McKee PA: Human Factor XIII from plasma and platelets. Molecular weights, subunit structures, proteolytic activation, and cross-linking of fibrinogen and fibrin. *J Biol Chem* 1973, 248(4):1395-1407.
  67. Karpati L, Penke B, Katona E, Balogh I, Vamosi G, Muszbek L: A modified, optimized kinetic photometric assay for the determination of blood coagulation factor XIII activity in plasma. *Clin Chem* 2000, 46(12):1946-1955.
  68. Fickenscher K, Aab A, Stuber W: A photometric assay for blood coagulation factor XIII. *Thromb Haemost* 1991, 65(5):535-540.
  69. Cini M, Legnani C, Frascaro M, Pancani C, Cappelli C, Roderigo G, Valdre L, Cosmi B: Measurement of factor XIII (FXIII) activity by an automatic ammonia release assay using iodoacetamide blank-procedure: no more overestimation in

- the low activity range and better detection of severe FXIII deficiencies. *Clin Chem Lab Med* 2016, 54(5):805-809.
70. 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.
  71. Katona E, 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.
  72. Galbács GI, Felinger A, Csóka B: Illusztrált segédanyag a modern műszeres analitikai kémia oktatásához. In. Edited by Szegedi Tudományegyetem PT; 2013.
  73. Jason-Moller L, Murphy M, Bruno J: Overview of Biacore systems and their applications. *Current protocols in protein science* 2006, Chapter 19:Unit 19 13.
  74. Hegyesi Gy. et al. Bevezetés a biokémiába gyakorlati jegyzet. In. Edited by Tudományegyetem EL; 2013: 97-110.
  75. Ritzeveld M, Sewald N: Real-Time Analysis of Specific Protein-DNA Interactions with Surface Plasmon Resonance. *J Amino Acids* 2012, 2012:816032.
  76. Piliarik M, Vaisocherova H, Homola J: Surface plasmon resonance biosensing. *Methods in molecular biology* 2009, 503:65-88.
  77. Guo X: Surface plasmon resonance based biosensor technique: a review. *Journal of biophotonics* 2012, 5(7):483-501.
  78. Morris PGE: *Biomedical imaging : applications and advances*.
  79. Schasfoort RBM, Tudos AJ: *Handbook of surface plasmon resonance*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2008.
  80. Mol NJd, Fischer MJE: *Surface plasmon resonance : methods and protocols*. New York: Humana; 2010.
  81. *Biacore X Getting Started*. Uppsala Sweden: Biacor AB; 2002.
  82. Katona E, Muszbek L, Devreese K, Kovacs KB, Bereczky Z, Jonkers M, Shemirani AH, Mondelaers V, Ermens AA: Factor XIII deficiency: complete phenotypic characterization of two cases with novel causative mutations. *Haemophilia* 2014, 20(1):114-120.

83. Rivard GE, St Louis J, Lacroix S, Champagne M, Rock G: Immunoabsorption for coagulation factor inhibitors: a retrospective critical appraisal of 10 consecutive cases from a single institution. *Haemophilia* 2003, 9(6):711-716.
84. Nilsson IM, Berntorp E, Zettervall O: Induction of immune tolerance in patients with hemophilia and antibodies to factor VIII by combined treatment with intravenous IgG, cyclophosphamide, and factor VIII. *N Engl J Med* 1988, 318(15):947-950.
85. Muszbek LP, K. Katona, É.: Auto-, and alloantibodies against factor XIII: laboratory diagnosis and clinical consequences. *J Thromb Haemost* 2017, submitted.
86. Ichinose A, Japanese Collaborative Research Group on AH: Autoimmune acquired factor XIII deficiency due to anti-factor XIII/13 antibodies: A summary of 93 patients. *Blood Rev* 2017, 31(1):37-45.
87. Franchini M, Frattini F, Crestani S, Bonfanti C: Acquired FXIII inhibitors: a systematic review. *J Thromb Thrombolysis* 2013, 36(1):109-114.
88. Kessel R, Hu C, Shore-Lesserson L, Rand J, Manwani D: A child with acquired factor XIII deficiency: case report and literature review. *Haemophilia* 2013, 19(6):814-826.
89. Boehlen F, Casini A, Chizzolini C, Mansouri B, Kohler HP, Schroeder V, Reber G, de Moerloose P: Acquired factor XIII deficiency: a therapeutic challenge. *Thromb Haemost* 2013, 109(3):479-487.
90. Lusher JM: Inhibitor antibodies to factor VIII and factor IX: management. *Semin Thromb Hemost* 2000, 26(2):179-188.

## **9. Tárgyszavak**

- FXIII-as faktor
- FXIII hiány
- antitest
- osztályozás
- kötési affinitás
- vérzékenység

## **10. Keywords**

- factor XIII
- FXIII deficiency
- antibody
- classification
- binding affinity
- bleeding diathesis

## 11. Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek Prof. Dr. Muszbek László akadémikusnak a kutatáshoz szükséges feltételek megteremtéséért, a munkám irányításáért, az értekezés megírásában és a felmerülő problémákban nyújtott segítségéért, hálával tartozom az irányomban mutatott kedvességéért és türelméért. Hasznos tanácsai és észrevételei jellemformálóak voltak.

Köszönöm Dr. Bereczky Zsuzsannának, a Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék igazgatójának, hogy biztosított támogatásáról.

Külön köszönöm hozzájárulását a munkához Dr. Pénzes-Daku Krisztinának, aki nem csak munkatársként, hanem barátként is végig támogatott. Nagyon szépen köszönöm többek között a laboratóriumi technikák elsajátításában nyújtott segítségét is.

Hálámat szeretném kifejezni Haramura Gizella vezető analitikusnak a Western blot vizsgálatokban nyújtott segítségéért és az FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> illetve az FXIII-B preparálásért.

Köszönöm Dr. Katona Évának és munkacsoportjának az antitestek izolálásában és az antigén mérésekben nyújtott segítségért, melyek elengedhetetlenek voltak a munkához.

Köszönet intézetünk molekuláris biológiai részleg dolgozóinak az első beteg genetikai anilíziséért.

Köszönöm Molnár Évának az FXIII aktivitás mérésben nyújtott segítségét.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Erdődi Ferencnek és Dr. Bécsi Bálintnak a Biacore 3000-es készüléken végzett kísérletekben nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Georges E. Rivard professzor úrnak és munkatársainak, valamint a Belgyógyászati és Laboratóriumi Medicina Intézetnek a rendelkezésünkre bocsátott beteg plazmákért és klinikai adatokért.

Köszönöm a Klinikai Laboratóriumi Kutatószék Tanszék minden egyes munkatársának az együtt töltött felejthetetlen percekért.

Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok családomnak és barátaimnak, hogy mindig mellettem álltak és támogattak céljaim elérésében.

## Tudományos támogatás:

A PhD értekezés elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00050 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.



## **12. Függelék**

A függelék hivatalos publikációs listát és az értekezés témájában megjelent közlemények különnyomatát tartalmazza.



Nyilvántartási szám: DEENK/400/2017.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kun Mária  
Neptun kód: YW938A  
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10057380

### **A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények**

1. **Kun, M.**, Szuber, N., Katona, É., Péntes, D. K., Bonnefoy, A., Bécsi, B., Erdődi, F., Rivard, G. E., Muszbek, L.: Severe bleeding diatheses in an elderly patient with combined type autoantibody against factor XIII A subunit: novel approach to the diagnosis and classification of anti-factor XIII antibodies.  
*Haemophilia*. 23 (4), 590-597, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/hae.13205>  
IF: 3.569 (2016)
2. Péntes, D. K., Vezina, C., Bereczky, Z., Katona, É., **Kun, M.**, Muszbek, L., Rivard, G. E.: Alloantibody developed in a factor XIII A subunit deficient patient during substitution therapy: characterization of the antibody.  
*Haemophilia*. 22 (2), 268-275, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/hae.12786>  
IF: 3.569
3. Péntes, D. K., Rázsó, K., Katona, É., Kerényi, A., **Kun, M.**, Muszbek, L.: Neutralizing autoantibody against factor XIII A subunit resulted in severe bleeding diathesis with a fatal outcome: characterization of the antibody.  
*J. Thromb. Haemost.* 14 (8), 1517-1520, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jth.13367>  
IF: 5.287

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,425**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 12,425**

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

Debrecen, 2017.11.16.

