

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Kun Mária

Témavezető: Prof. Dr. Muszbek László



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2018

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Kun Mária, okleveles Klinikai Laboratóriumi Kutató

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

Témavezető: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora
tagok: Dr. Nagy Ágnes, PhD
Prof. Dr. Szűcs Gabriella, az MTA doktora

A doktori szigorlat helyszíne, időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK, Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék könyvtár, 2018. március 6. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Boda Zoltán, az MTA doktora
Dr. Nagy Előd, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Boda Zoltán, az MTA doktora
Prof. Dr. Szűcs Gabriella, az MTA doktora
Dr. Nagy Ágnes, PhD
Dr. Nagy Előd, PhD

Az értekezés védésének helyszíne, időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”épület tanterme, 2018. március 6. 13:00 óra

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. A XIII-as faktor szerkezete és funkciója

A véralvadás XIII-as faktora (FXIII) két katalitikus/potenciálisan aktív A alegységből (FXIII-A) és két gátló/stabilizáló B alegységből (FXIII-B) felépülő, 326 kDa molekulatömegű heterotetramer proenzim (FXIII-A₂B₂).

A 83 kDa-os FXIII-A-t, négy strukturális 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. Döntően csontvelő eredetű sejtek termelik. A plazmában mennyiségének 99%-a FXIII-B-vel komplexben található. Intracellulárisan FXIII-A₂ homodimerként (FXIII-A₂, cFXIII) megtalálható vérlemezkékben, monocitákban és makrofágokban.

Az FXIII-B 75 kDa molekulatömegű, hepatociták által szintetizált glikoprotein, mely 8,5% szénhidrátot is 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.

Az FXIII a véralvadás utolsó fázisában aktiválódik során trombin és Ca²⁺ jelenlétében (FXIII-A₂^{*}).

Az FXIII-A szerkezete a transzglutaminázokra jellemző, kémiaiilag egy acil-transzfer reakciót katalizál. A véralvadásban az FXIIIa fő feladata az újonnan képződött alvadék. Emellett, a plazmin fő inhibitorát, az α_2 -plazmin inhibitor (α₂-PI) az FXIIIa kovalensen a fibrin α-láncához rögzíti, megakadályozva ezzel a trombus korai degradációját.

1.2. FXIII hiány

Az FXIII hiány öröklött és szerzett formája egyaránt ismert. Előbbi öröklődési típusa autoszomális recesszív, átlagos gyakorisága az európai és észak amerikai populációban 1:2 millióhoz. 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. Az FXIII hiány egyik első és egyben leggyakoribb, az esetek 80%-ánál megjelenő tünete, csecsemőkorban a köldökcsomónál fellépő, jellegzetesen késleltetett típusú vérzés.

Elkülönítünk FXIII-A és FXIII-B hiányt. Utóbbi kevésbé súlyos, ezen betegek FXIII aktivitása rendszerint 5-10% közé tehető, ami enyhe vérzékenységet okoz. Az FXIII-A hiány I-es típusába a kvantitatív defektusok, míg a II-es típusába a kvalitatív defektusok tartoznak. Az FXIII-A hiány mutációs adatbázisa (2017 novemberi adat) összesen 69 kóroki mutációt regisztrál az FXIII-A génben.

Az FXIII hiány a leginkább aluldiagnosztizált vérzékenység, felismerése speciális diagnosztikai jártasságot igényel, mivel a véralvadási szűrőtesztek nem jelzik. 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-A₂, Novothirteen, Tretten, Cartidecacog, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dánia) történő profilaxis ajánlott.

Az FXIII ellenes antitestek között megkülönböztetünk allo- és autoantitesteket. Az alloantitestek öröklött FXIII hiányos betegekben a pótló terápia kapcsán fejlődhetnek ki. Az autoantitestek kialakulása gyakran autoimmun vagy malignus betegségekhez, ill. krónikus gyógyszeres kezelésekhez társul, de – különösen idős korban – idiopátiásan is előfordul. A legtöbb esetben IgG típusúak az antitestek, melyek az FXIII mindkét alegysége ellen termelődhetnek, jóllehet az FXIII-A ellenes antitestek sokkal gyakoribbak.

Egységes irányelvek hiányában a kezelés legtöbbször a különböző lehetőségek empirikus alkalmazását jelenti. A terápia célja főként a vérzés kontrollálása, az antitest mihamarabb történő eradikációja. A megkísérelt terápiák közé tartoznak a szteroidokkal és ciklofoszfamiddal történő immunszuppresszió, valamint az antitest eltávolítása immunadszorpcióval. Rituximab (anti-CD20 monoklonális antitest) alkalmazása is hasznos lehet, és időnként intravénás immunglobulin (IVIG) adását is megkísérlik.

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 Ca²⁺ 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.

A nem-neutralizáló antitest jelenlétére az FXIII koncentrátum beadását követő farmakokinetikai vizsgálat (megrövidült féléletidő a plazmában) utal.

2. Célkitűzés

1/ Két FXIII-A ellenes autoantitest okozta szerzett FXIII hiány és egy alloantitesttel kombinálódott öröklött FXIII-A hiány kórtörténetének leírása.

2/ A diagnózishoz vezető laboratóriumi algoritmus bemutatása.

3/ Az 50%-os gátlást (IC_{50}) meghatározó módszer adaptálása az antitest okozta gátlás erősségének mérésére.

4/ Az antitestek biokémiai hatásának felderítése.

5/ A felületi plazmon rezonancia (surface plazmon resonance; SPR) bevezetése az antitestek FXIII alegységekhez való kötődésének, affinitásának meghatározására.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Fehérje preparálások

A tisztított FXIII-A₂B₂-t és FXIII-B-t egészséges véradóktól gyűjtött humán plazmából intézetünkben Lóránd és munkatársai, ill. Chung és munkatársai módszereivel állítottuk elő. Az élesztő sejtekben előállított rFXIII-A₂-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 átszűrte 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-tartalmazó foszfát pufferben (PBS; pH: 7,2) dializáltuk.

2.2. 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. Az FXIII aktivitás méréseket mosott trombocita szuszpenzióból is elvégeztük.

A plazma és trombocita minták FXIII aktivitását az intézetünkben kifejlesztett ammónia felszabadulást mérő teszttel határoztuk meg. Ehhez a Rea-chrom FXIII, ill. Technochrom[®] FXIII reagens készlet néven a Reanal-ker (Budapest, Magyarország) és a Technoclone (Bécs, Ausztria) cégek által forgalmazott kitéket használtuk. A kiték tartalmazzák a meghatározáshoz szükséges reagenseket (aktivátor, detektáló, NADPH, inhibitor, stabilizátor).

Az FXIII aktivitás meghatározását a Modular EVO P800 (Hitachi, Roche, Basel, Svájc) analízátorral végeztük. 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[®] FXIII tesztet (Siemens, Marburg, Németország) alkalmazták.

2.3. FXIII antigén meghatározások

Az FXIII-A₂B₂, az FXIII-A, a totál és a szabad FXIII-B antigén szintek mérése ELISA technikával történt. A plazma FXIII-A₂B₂ antigén meghatározást egy, az intézetünkben korábban kifejlesztett egy lépéses ELISA módszerrel végeztük. Ehhez sztreptavidinnel fedett mikrolemezeket, biotinált FXIII-B ellenes elfogó és torma-peroxidázzal (HRPO) jelzett FXIII-A ellenes detektáló monoklonális antitesteket használtunk. A kialakult abszorbanciát 450 nm-en iEMS Reader MF microplate

készüléken (Labsystem, Budapest, Magyarország) mértük. 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. A totál FXIII-B antigén meghatározásnál 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 mérésnél. A totál FXIII-B méréséhez kalibrátorként 40 egészséges egyéntől gyűjtött plazma keverékét, szabad FXIII-B meghatározáshoz pedig ismert koncentrációjú tisztított FXIII-B alegységet használtunk.

2.4. FXIII aktiválódást/aktivitást gátló hatás erősségének meghatározása

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 pufferezt (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 egy 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.

2/ Az inhibitor erősségének mérése IC₅₀ meghatározással.

Az IC₅₀ 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-A₂B₂-t (1. és 2. beteg esetében: 4,2 µg/mL, 3. beteg esetében: 8,3 µg/mL) inkubáltuk a betegekből preparált, ill. normál IgG különböző koncentrációival 60 percig, 37 °C-on, ezt követően trombinnal (20 U/mL) és CaCl₂-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 (ΔA/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 IC₅₀ értékét a www.ic50.tk szoftver segítségével számítottuk ki.

2.5. 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. Ezután trombin (1. beteg: 20 U/mL, 2. beteg: 2,5 U/mL, 3. beteg: 5 U/mL) és CaCl₂ (10 mM) hozzáadása után a 2,5., 5., 10., 15. és 20. percen 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-merkaptoetanollal (MEA) redukáltuk. A különböző időkből kivett mintákból 40 ng-nyi FXIII-A₂B₂-t SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS PAGE) 7,5%-os gélben futtattuk, majd a gélből a fehérjéket polivinilidén fluorid (PVDF) membránra elektroblottoltuk. 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.

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.

50 mM HEPES-t és 100 mM NaCl-ot tartalmazó pufferben 4,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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_2 -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 10 mM $CaCl_2$ -t is tartalmazó detektáló oldat hozzáadása után mértük a transzglutamináz aktivitást (a $CaCl_2$ végkoncentrációja 10 mM volt).

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

Végül az FXIII (4,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) komplexet trombinnal (20 U/mL) és $CaCl_2$ -vel (10 mM) 10 percig 37 °C-on előaktiváltuk, majd ezt követően az előbbiek szerint a beteg IgG-jével, ill. normál IgG-vel egy órán át inkubáltuk és lemértük az FXIIIa aktivitást.

2.6. Kötődési vizsgálatok

A harmadik beteg kapcsán tájékozódó 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. Kísérleteinkhez Biacore X (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Svédország) és Biacore 3000 (GE Healthcare, Little Chalfon, UK) felületi plazmon rezonanciát mérő készülékeket használtunk.

Méréseinkhez karboximetilált dextrán mátrixt hordozó chipeket (CM5: GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Svédország vagy CMD: XantTec, Düsseldorf, Németország, a két chip között nincs különbség) használtunk. A ligandok immobilizálása a dextrán mátrixhoz aminocsoportokon keresztül kovalensen ment végbe. Eredményeink kiértékelése a Biacore Evaluation szoftverrel (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Svédország) történt. 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. 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. Vizsgáltuk az antitestek kötődését az FXIII-A₂B₂-hez, a rFXIII-A₂-hez és a plazmából tisztított FXIII-B-hez is.

2.7. Molekuláris genetikai analízis

Az első beteg esetében a kapott DNS mintákból elvégeztük a F13A1 teljes génjének fluoreszcens direkt szekvenciózását, majd ezt követően a beteg szüleitől származó DNS mintákból célzott génszekvenciózás történt. A kódoló régiók és az exon-intron határok felszorzosítása 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.

A PCR termékek ellenőrzése GelRed-et (Izinta Kereskedelmi Kft, Budapest, Magyarország) tartalmazó, 3%-os agaróz gélelektroforézissel történt. A PCR termékek tisztításához és a direkt szekvenciózáshoz 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 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 történt.

3. Eredmények

3.1. Első beteg

3.1.1. Esetleírás

Az első beteg egy súlyos, öröklött FXIII hiányban szenvedő fiatal nő volt. Betegségét 1994 márciusában diagnosztizálták Kanadában, ekkor mindössze három éves volt. A kórlefolyással kapcsolatos adatokat kollaborációs partnerünk Prof. Dr. Georges E. Rivard (Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Kanada) szolgáltatta. Anamnézisben zúzódások, kis sebekből származó elhúzódó vérzések szerepeltek. A diagnózis felállításakor a plazmában lévő FXIII aktivitás rendkívül alacsony, 0,01 IU/mL (1%) alatt volt. A plazma FXIII-A₂ 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[®], 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 transzfúzió elegendő volt a hosszabb vérzésmentes időszakok eléréséhez. A 15 mL/kg szülői plazma transzfúzió 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[®] (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, inentől kezdve a terápiát dexamethasone és Fibrogammin® (90 IU/kg) alkotta. Ezt követően a faktor VIII inhibitor eliminálására kidolgozott Malmö-protokoll alapján 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 prednizolonnal 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 dexamethasonnal 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 antiteszének 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.

3.1.2. 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-A₂B₂ 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).

3.1.3. Az alloantitest kötődése a XIII-as faktorhoz és alegységeihez

Az első beteg plazmájából preparált IgG-vel elvégzett SPR méréseknél elsőként rFXIII-A₂-t, majd FXIII-A₂B₂-t, végül FXIII-B₂-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_a érték rekombináns FXIII-A₂ esetén $8,24 \times 10^7$ M⁻¹-nek, a K_d $1,44 \times 10^{-8}$ M-nak adódott, ami erős kötődést jelent. Az asszociációs és disszociációs sebességi állandók értékei: $k_a=4,82 \times 10^4$ M⁻¹s⁻¹ és $k_d=5,68 \times 10^{-4}$ s⁻¹. Nagyságrendileg szinte teljesen azonos eredmények születtek komplex FXIII ligandként történő alkalmazásával is; $K_a=1,05 \times 10^8$ M⁻¹, $K_d=1,31 \times 10^{-8}$ M, $k_a=8,17 \times 10^3$ M⁻¹s⁻¹, $k_d=9,07 \times 10^{-5}$ s⁻¹.

Mivel az IgG preparálás során totál IgG-t nyertünk és ezen kísérletekben az antitestet, mint analitot használtuk, aminél nem tudtuk, hogy mennyi benne a specifikus FXIII-A ellenes IgG. Így a kapott K_a érték valamivel alacsonyabb lehet a

valós értéknél. A későbbiekben izolált IgG-t alkalmaztuk ligandként és FXIII-at analitként.

3.1.4. Az alloantitest FXIII-at gátló kapacitásának meghatározása

Az inhibitor titer Bethesda-Nijmegen módszerrel történő meghatározása a kanadai laboratóriumban történt. A gátló kapacitás egzakt mérésére mi a farmkológiában 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 mg/mL -es IgG koncentráció felett már csaknem teljes gátlás volt tapasztalható. Egészséges egyénektől származó gyűjtött plazmából preparált IgG nem volt hatással az FXIII aktivitásra.

3.1.5. Az alloantitest klasszifikációja

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. Normál IgG jelenlétében az FXIII trombin által történő hasítása már 2,5 perc alatt teljesen végbement. Ezzel szemben a beteg IgG jelenlétében az AP-FXIII lehasítása nem ment végbe maradéktalanul. 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.

A következőkben az alloantitestnek az FXIII 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-A₂B₂) inkubáltuk a beteg IgG-jével, valamint normál IgG-vel és Ca^{2+} hozzáadása után mértük az enzim transzglutamináz aktivitását. Ily módon lehetőségünk nyílt együtt vizsgálni, hogy az alloantitest gátolja-e az FXIII aktiváció Ca^{2+} indukálta lépéseit (a B alegységek disszociációja és az

FXIII-A' dimer enzimatisusan aktív konformációvá történő átalakulása), valamint az aktív FXIII aktivitását. Az egészséges önkéntesektől származó, normál IgG-nek még a legmagasabb koncentrációban sem volt hatása, 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.

Az utolsó kísérletsorozatban kíváncsiak voltunk az antitestek aktivált FXIII aktivitására kifejtett hatására. Az alloantitest jelenléte a trombinnal és Ca^{2+} -mal teljesen aktivált FXIII transzglutamináz aktivitását 57%-kal csökkentette.

3.2. Második beteg

3.2.1. 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, valamint a PFA-100 záródási idők és α_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-A₂B₂ és FXIII-A₂ 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.

A beteg plazmájában az FXIII-B antigén szintje 30% volt. A trombociták lizátumában meghatározott FXIII aktivitás (117%), és az FXIII-A antigén szintje (128%) normál volt. A neutralizáló autoantitest jelenléte keveréses vizsgálattal 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 elbocsátották, 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.

3.2.2. SPR mérések, kötődési állandók meghatározása

Az SPR technikával történő kötődési vizsgálatokban analitként rFXIII-A₂-t, FXIII-A₂B₂-t és FXIII-B₂-t használtunk a 16. ábrán látható koncentrációkban. Ligandként a beteg plazmájából preparált IgG szolgált. rFXIII-A₂ 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-A₂B₂ 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.

3.2.3. Az autoantitest FXIII-at gátló kapacitásának meghatározása

A korábban elvégzett Western blotting kísérlet eredménye már azt sugallta, hogy az autoantitest az FXIII kiürülését a keringésből szignifikánsan nem gyorsítja,

így inkább neutralizáló típusba sorolható. Az FXIII aktiváció és az FXIIIa aktivitás kombinált gátlásának IgG koncentráció függése jól kimutatható volt. Az IC₅₀ értéke 50 µg/mL volt és körülbelül 100 µg/mL-es IgG koncentrációnál már teljes gátlás volt tapasztalható, ami lényegesen alacsonyabb a normál IgG szintnél (6,9-14,0 g/L).

3.2.4. Az autoantitest klasszifikációja

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 beteg IgG-jének jelenlétében valamivel ugyan lassabban alakultak ki a hasított formák, mint a normál IgG jelenlétében, de az eltérés minimális.

A következő kísérletben az aktivációs peptidet Ca²⁺ mentes közegben trombinnal lehasítottuk, majd beteg, ill. normál IgG-vel együtt inkubáltuk és Ca²⁺ hozzáadása után mértük a transzglutamináz aktivitást. A trombinnal proteolitikusan aktivált FXIII-nak (FXIII-A₂B₂) a vizsgált antitesttel történő inkubálása jelentősen, 14%-ra csökkentette (86%-os gátlás) az FXIII aktivitást.

Vizsgáltuk a beteg IgG-nek az FXIIIa-ra kifejtett hatását is. A neutralizáló autoantitestek igen jelentősen gátolták az FXIIIa transzglutamináz aktivitását. A beteg IgG-je által kifejtett gátlás mértéke 85%-os volt.

3.3. Harmadik beteg

3.3.1. 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, ami végül a bal szemén teljes látásvesztést eredményezett. Nem sokkal később nagy kiterjedésű bevérzést figyeltek meg a jobb karján. 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

szűrőtesztek eredményeit - nem találtak eltérést. Az alvadék koncentrált urea oldatban feloldódott, ami felvetette a csökkent FXIII aktivitás és az esetleges autoantitest képződés lehetőségét. Még Montréalban 16 BU feletti FXIII-at gátló antitest titer mérték. Az antitest eliminálását célzó terápia prednizolon és ciklofoszfamid kezeléssel indult, melyet később plazmaferezissel, ill. rituximabbal egészítettek ki. Egy rövid ideig a beteg nagy dózisu plazma FXIII koncentrátumot is kapott átmeneti sikerrel. 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, a beteg állapota erősen romlott és feltehetően szepszikus shockban halálozott el. A beteg különböző időpontokban levett mintáit a kanadai kollaborációs partnertől a beteg halála után kaptuk meg elemzésre.

Kanadában a kezelés során folyamatosan mérték az FXIII aktivitást és ELISA módszerrel az inhibitor titer. A kezdetben magas autoantitest titer (1:128) prednizolon és ciklofoszfamid (1-14. napig, majd csak prednizolon 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 mérékű 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 élésen 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.

Az FXIII antigének mérése az első naptól a 39. napi mintáig történt meg. Általánosságban elmondható, hogy a harmadik betegnél az FXIII-A₂B₂ antigén szint értéke tendenciájában követte az FXIII aktivitását, de rendszerint magasabb volt. 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.

Az első napokban a szabad és total FXIII-B antigén szintek gyakorlatilag azonosak voltak, köszönhetően a keringésben alacsony FXIII-A₂B₂ szintnek. A szubsztitúciós terápiát követően viszont ez megváltozott, s a két érték eltért, a total FXIII-B szint jóval megemelkedett a szabadhoz képest. Mivel a későbbi szakaszban is jelentős mennyiségű FXIII-A₂B₂ volt jelen a plazmában a total FXIII-B antigén szint valamivel magasabb maradt, mint a szabad FXIII-B.

3.3.2. Kötődési paraméterek meghatározása

A harmadik beteg IgG-jével kapott SPR szenzorgrammokat azt mutatták, hogy az autoantitest és a rFXIII-A₂ 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-A₂B₂ 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-A₂-hez, mind az FXIII-A₂B₂-hez, a kötődés az A alegységen keresztül jön létre és a B alegység jelenléte nem befolyásolja azt.

3.3.3. 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 és 500 µg/mL-es koncentrációnál már teljesen legátolta az FXIII aktivitását. Az alacsony IC₅₀ érték ez esetben is azt mutatja, hogy a plazmában lévő autoantitest koncentrációja jóval meghaladja az FXIII teljes gátlásához szükséges mennyiséget.

3.3.4. 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.

Az autoantitest az FXIII A₂B₂ Ca²⁺ indukálta aktivációjára és az aktív FXIII aktivitására kifejtett kombinált hatását vizsgálva azt kaptuk, hogy 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.

4. Megbeszélés

Intézetünk munkatársai összegezték az FXIII ellenes antitesteket és következményeit leíró originális közleményeket. 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. A japán eseteket összegző közleményen 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 általunk analizált két autoimmun FXIII hiányban szenvedő beteg az idős korosztályból került ki (75 éves férfi és 82 éves nő) és utóbbi esetben az autoantitest malignus megbetegedéshez társult. A férfi betegnél az e 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 intracraniális vérzés volt az első, de igen súlyos, vérzékes tünet.

A lány gyermek esetében genetikailag is diagnosztizált öröklött súlyos FXIII-A hiány talaján, pótló terápia hatására képződött alloantitest okozta a korábban hatásos 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, szerencsére rendkívül ritka. Az általunk leírt esettel együtt összesen 4 ilyen betegről számolt be az irodalom.

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 dignisztikai 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 biokémiaailag 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-A₂B₂ Ca²⁺ indukálta aktiválódására milyen hatással van az antitest. Az utóbbi eljárás a Ca²⁺ 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 Ca²⁺ hatás esetleges gátlása mennyire köszönhető az FXIIIa gátlásának, ill. mennyire a Ca²⁺ 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 Ca^{2+} indukálta aktivációt és az FXIIIa aktivitását. Mivel ugyanakkor felgyorsította a beadott FXIII koncentrárum 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-A₂-höz és az FXIII-A₂B₂-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 koncentrárum csak kevés esetben és csak átmenetileg hatásos. Abban általános az egyetértés, hogy az elsődleges cél az antitest eradikációja kell legyen. Ez megkísérélhető az antitest eliminálásával, vagy az antitestet termelő sejtek kiirtásával. Az előbbi eljárások (plazmaferézis, immunabszorpció, plazmacsere) kevésbé hatékonynak tűnnek. Az antitest eltűnése után viszonylag gyorsan újratermelődik. Az immunszuppresszív szerek prednizolon, ciklofoszfamid, ciklosporin, rituximab az esetek egy részében hatásosak. Kiegészítő terápiaként IVIG és tranexámsav alkalmazása is történt. Az alloantitest esetében kanadai kollégáink megkísérelték az immuntolerancia kialakítását a Malmö féle protokollt (ciklofoszfamid, IVIG, nagy dózisú FXIII koncentrárum) követve. A három időpontban is megkísérelt immuntolerancia átmeneti egy, ill fél éves javulást hozott, végül naponta csak 30 IU/kg FXIII koncentrárum (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 kilátása 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 széptikus 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 építőspecifikus gátlása, is felvetnek.



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

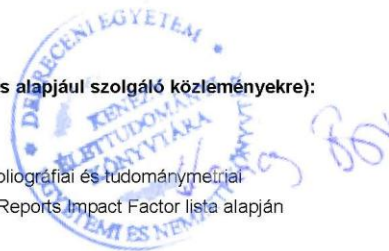
1. **Kun, M.**, Szuber, N., Katona, É., Péntzes, D. K., Bonnefoy, A., Bécsi, B., Erdódi, F., Rivard, G. E., Muszbek, L.: Severe bleeding diatheses in an elderly patient with combined type autoantibody against factor XIII A subunit: novel approach to the diagnosis and classification of anti-factor XIII antibodies.
Haemophilia. 23 (4), 590-597, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/hae.13205>
IF: 3.569 (2016)
2. Péntzes, 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. Péntzes, 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.



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.

