

**Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

**A XIII-AS VÉRALVADÁSI FAKTOR HUMÁN  
KÖNNYBEN**

Dr. Orosz Zsuzsanna Zita

Témavezető:

Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus, egyetemi tanár



**DEBRECENI EGYETEM**  
**Laki Kálmán Doktori Iskola**

Debrecen, 2011

## A XIII-AS VÉRALVADÁSI FAKTOR KÖNNYBEN

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

Írta: Dr. Orosz Zsuzsanna Zita

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája  
(Thrombosis, hemostasis és vaszkuláris betegségek programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla József, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Ludány Andrea, Ph.D.

Prof. Dr. Németh János, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2011. április 27.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla József, az MTA doktora

bírálok: Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora

Dr. Kovács Illés, Ph.D.

tagok: Prof. Dr. Ludány Andrea, Ph.D.

Prof. Dr. Németh János, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2011. április 27.

## BEVEZETÉS

A XIII-as véralvadási faktor (FXIII), korábbi nevén Laki-Lóránd faktor, a fibrin mechanikai stabilizálásáért felelős faktor, s egyben a fibrinolízis egyik fő regulátora. A plazmában heterotetramer szerkezetű (FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) zimogén formában (pFXIII) kering, mely két potenciálisan aktív katalitikus A alegységből (FXIII-A) és két hordozó/gátló B alegységből (FXIII-B) áll. A FXIII-A dimer formában egyes sejtek citoplazmájában önmagában is megtalálható, ez az úgynevezett celluláris FXIII (cFXIII). A cFXIII a vérlemezkékben igen nagy koncentrációban fordul elő, emellett a monocytákban/ macrophagokban és e sejtek csontvelői prekursoraiban is megtalálható. A FXIII-A-t jónéhány monocyta eredetű macrophagban kimutatták, mint például savós üregek macrophagjaiban, alveoláris, tumor-asszociált macrophagokban, nyirokcsomók dendritikus sejtjeiben, kötőszöveti histiocytákban, perivaszkuláris dendritikus macrophagokban, dermális dendrocytákban, stb. Friss kutatási eredmények szerint chondroblastok és osteoblastok, ill. egy bronchiális epitheliális sejt vonal is képes a termelésére. A FXIII-B egy kb. 80 kDa-os molekulatömegű glikoprotein, a hepatocyták szintetizálják és szekretálják. Ellentétben a FXIII-A-val a plazmában feleslegben található, 50%-a szabadon kering. A különböző sejtekből származó alegységek a vérben képeznek komplexet. A FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> referencia tartománya plazmában 14-28 mg/L, gyakorlatilag teljes mértékben fibrinogénnel kötött állapotban található.

A pFXIII-at a véralvadási kaszkád utolsó lépésében a thrombin és a Ca<sup>2+</sup> aktiválja, a reakció az újonnan képződő fibrinszálak felszínén megy végbe. Extracellulárisan Ca<sup>2+</sup> és thrombin jelenlétében a pFXIII-hoz hasonló módon a cFXIII is aktiválódhat, itt azonban értelemszerűen a FXIII-B leválása elmarad. A cFXIII aktivációja intracelluláris környezetben (pl. trombocytákban) nem

proteolitikus hatásra következik be, az emelkedett intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  elegendő az aktiválásához.

Az aktivált FXIII (FXIIIa) egy transzglutamináz, két peptidlánc között  $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})\text{lizil}$  keresztkötést (un. izopeptid kötés) képez. A FXIIIa elsődleges szubsztrátjai a fibrin és az  $\alpha_2$ -plazmin inhibitor ( $\alpha_2\text{-PI}$ ). A FXIIIa a keresztkötésekkel mechanikusan erősebb, nyíróhatásnak jobban ellenálló szerkezetű alvadékot képez és meggátolja az újonnan képződött fibrinnek az alvadással párhuzamosan aktiválódó fibrinolízis által történő gyors degradációját. A fibrinláncok keresztkötése és az  $\alpha_2\text{-PI}$  fibrinhez történő kovalens kapcsolódása fokozza az endogén és szöveti plazminogén aktivátor által indukált fibrinolízis elleni rezisztenciát.

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

A FXIII esszenciális szerepét a sebgyógyulásban transzgen egerekben is bizonyították. FXIII-A knock-out egerek sebgyógyulási ideje nagymértékben megnyúlt, mely inkomplett re-epithelizációval, perzisztáló nekrotizáló sebbel és abnormális hegképződéssel járt, FXIII szubsztitúció esetén azonban a gyógyulási folyamat rendben végbement. Egyes posztoperatív állapotokban is megfigyelték a FXIII koncentrátum adásának sebészi beavatkozások után a sebgyógyulására gyakorolt előnyös hatását. A sebgyógyulás fő lépései a fibrin-háló kialakulása, macrophag invázió, fibroblast migráció és proliferáció, extracelluláris mátrix (ECM) képződése és angiogenezis. A FXIII ebben a folyamatban az ECM proteinek keresztkötésével, endothel sejtekre, fibroblastokra és macrophagokra kifejtett hatásával vesz részt. Ezen hatások a thrombospondin-1 (TSP-1) down-regulációján és a c-Jun valamint Egr-1 up-regulációján keresztül mennek végbe.

A FXIII szerepe a sebgyógyulásban részben proangiogenikus hatásának is köszönhető. Az érújdonképződés komplex lépések együttese, a sebgyógyulástól a tumor növekedésig igen sok fiziopatológias folyamatban játszik lényeges szerepet. A FXIII részt vehet az endothelsejt-vérlemezké kapcsolat kialakításában, aktív formája pedig fokozza a humán umbilikális endothelsejtek (HUVEC) migrációját, csökkenti apoptózisukat. A FXIIIa nem hat a vasculáris endotheliális növekedési faktor (VEGF) szekrécijára, sem a VEGF fehérje szintjét, sem pedig a VEGF receptor-2 (VEGFR2) messenger ribonukleinsav (mRNS) szinteket nem befolyásolja. Ezzel szemben a sejtekben a thrombospondin-1 (TSP-1) mRNS szinte teljes eltűnését indukálja, és jelentősen csökkenti a TSP-1 szintjét a tápfolyadékban. A FXIII szerepét az angiogenesisben állatmodellekben is bizonyították: FXIII knock-out egerekben az érújdonképződés mértéke elmarad a normál társaikhoz képest. Nyulakon a FXIIIa injectiója a cornea subepitheliális rétegébe 36 órán belül gazdag kapilláris hálózat létrejöttét indukálta, emellett a kezelés hatására a szaruhártya keratocytáiból és a stroma szálcsáiból eltűnt a TSP-1. A FXIII koncentrátum helyi alkalmazása az angiogenesis elősegítésével támogatja a rossz regenerációs hajlamot mutató sebek gyorsabb begyógyulását, míg a FXIIIa által indukált érújdonképződés gátlásával az antitumor terápiában nyílnak új lehetőségeink.

A FXIII megjelenéséről plazmán kívüli folyadékterekben keveset tudunk. Intézetünkben bronchoalveoláris mosófolyadékban vizsgálták a FXIII megjelenését. Kimutatták, hogy normál esetben az alveoláris felszíni folyadékrétegben csak cFXIII található, gyulladásos bronchoalveoláris megbetegedésekben azonban megjelenik a pFXIII is, a cFXIII mennyisége pedig szignifikánsan emelkedik. A FXIII megjelenését könnyben korábban nem vizsgálták, az irodalomban egyetlen ilyen témájú közleményt sem találtunk. Tekintettel arra, hogy a fibrinolízisnek komoly szerepe van a könny

homeosztázisában, feltételeztük, hogy a FXIII is megtalálható a könnyben, s szerepe lehet a könny fiziopatológias folyamataiban.

Normál körülmények között a szaruhártyának nincs vérellátása, így nincs közvetlen kapcsolatban a vérrel, bár a fibrinogén és a fibrinolitikus rendszer egyes komponensei megjelennek a könnyben, és egyensúlyi helyzetük megtartása fontosnak tűnik a könny homeosztázisának megtartásában. Az egyik ilyen fontos szereplő a plazminogén, mely a fibrinolitikus enzim, a plazmin proenzime. A plazminogén deficiencia fő klinikai tünete egy súlyos látásromlást okozó szembetegség, a conjunctivitis lignosa, mely fibringazdag álhártya képződésével jár a tarzális kötőhártya felszínén, ezzel fekélyek kialakulásához és a corneális epithelium hiperplastikus elváltozásához vezet. Azon transzgen egerekben, melyekben a plazminogén gén hiányzik, az emberi megbetegedéshez megjelenésben és szövettanilag igen hasonló conjunctivális elváltozások láthatók. Nagyon valószínű, hogy plazminogén hiánya, így következetesen az aktív formája - a fő fibrinolitikus enzim - plazmin hiánya nem megfelelő fibrin-eliminálódást, és így pseudomembrán képződést eredményez. Ismert, hogy a kötőhártya és a szaruhártya epithel sejteji plazminogén aktivátorokat termelnek, melyek szintén megjelennek a könnyben. A plazminogén aktivátor inhibitor-2 (PAI-2) is kimutatható az egészséges humán corneális epitheliumban és a normál könnyben. A szaruhártya sebgyógyulása plazminogén hiányos egerekben nem megfelelő, súlyos gyulladással, retrocorneális fibrin depositumok lerakódásával, corneális hegyszövet képződéssel és gyakran strómális neovaszularizációval jár. Kombinált fibrinogén és plazminogén hiányos egerekben azonban a szaruhártya sebgyógyulása normális. A fibrin(ogén) lerakódás és a fibrinolitikus rendszer egyensúlya fontos szerepet játszik a corneális homeosztázis megtartásában, a FXIII szabályzó hatása ebben a mechanizmusban még nem ismert.

## **CÉLKITŰZÉSEK**

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

## **BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### *Vizsgált egyének*

A vizsgálatunkba 60 egészséges egyént vontunk be: 21 nőt és 39 férfit, medián életkoruk 28 év (interkvartilis tartomány: 24-47 év). Egyiküknek sem volt gyulladt vagy sérült a szeme, nem használtak semmilyen szemcseppet,

műkönyvet, nem hordtak kontaktlencsét. Az allergiás és száraz szemű egyéneket kizártuk a vizsgálatból. Ezekről az önkéntesektől stimulált és nem stimulált könnymintákat gyűjtöttünk, a könny FXIII-A, FXIII-B, FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> valamint totál protein koncentrációjának a meghatározására. A totál protein mennyiséget minden könnymintából lemértük, azonban néhány könnymintából a nyert minta kis térfogata miatt csak két FXIII paramétert tudtunk meghatározni. Így a vizsgált mintaszám FXIII-A esetében 52, FXIII-B és FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> esetében 50-50 volt. Ezen alcsoportokban a férfi:nő arány 33:19, 32:18, illetve 31:19 volt, az átlagéletkorok és az interkvartilis tartományok megegyeztek a teljes csoporttal.

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

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



### *Könnyminták gyűjtése*

A könnymintákat atraumatikus módon üvegkapilláris csövekbe gyűjtöttük. A mintavétel helyi érzéstelenítés nélkül az alsó laterális könnymeniscusból történt, reggel 7 és 8 között. A könnymintákat minden esetben 1 percig gyűjtöttük. Tapasztalataink szerint összesen 8,5  $\mu\text{L}$  egészséges, nem stimulált könnyre volt szükség a FXIII-A, FXIII-B, FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> és totál protein koncentrációk biztonságos meghatározásához. A betegektől származó minták esetében a FXIII komplex és alegységek koncentrációi magasabbak voltak, ezekben az esetekben akár 4  $\mu\text{L}$  könny is elég lehet meghatározások elvégzéséhez.

Az egészséges egyénektől mindkét szemből gyűjtöttünk mintát, szükség esetén a könnymintavételt fél óra pihenés után megismételtük. A levett mintákat alacsony fehérje kötésű – LoBind – csövekben +4 °C-on tároltuk legfeljebb 5 napig, míg a fenti méréseket elvégeztük. Előkísérleteinkben kimutattuk, hogy a könny vizsgált alkotóelemeinek a koncentrációja legalább 10 napig nem változik. A könnymintákat hígítatlanul, stabilizáló nélkül, +4 °C-on tárolva az eredetileg mért FXIII-A, FXIII-B és FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> koncentrációk 99,4%-át, 98,5%-át és 98,5%-át mértük vissza 10 nap elteltevel.

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

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

sejtes elemeket és a sejttörmelékét, és a felülúszót használtuk a meghatározásokhoz.

### *Laboratóriumi módszerek*

A könny total protein koncentrációjának mérését 1  $\mu\text{L}$ , fiziológias sóval 20x-osra hígított mintából bicinchoninsavas meghatározással (bicinchoninic acid protein assay; BCA módszer) végeztük. A kalibrációs sor elkészítéséhez bovin szérum albumint (BSA) használtunk.

A könnyben lévő FXIII alegységek és komplex meghatározásához a plazmában lévő FXIII kimutatására alkalmas, laboratóriumunkban korábban kifejlesztett ELISA módszerek antitestjeit alkalmaztuk. A FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> meghatározására biotinált monoklonális FXIII-B alegység ellenes elfogó antitestet és torma-peroxidázzal (HRPO) jelölt monoklonális FXIII-A alegység ellenes detektáló antitestet használtunk. Hasonlóképpen biotinált elfogó és HRPO-val jelzett detektáló monoklonális antitesteket alkalmaztunk a FXIII-A illetve FXIII-B mérésére szolgáló módszereknél is. A FXIII-A és FXIII-B mérésére szolgáló módszerek esetében az elfogó és detektáló antitestek az antigén molekulák különböző epitópjai ellen irányultak. Ezek az antitestek mind a szabad, mind a komplexben lévő FXIII alegységet felismerik, vagyis méréseink során a total FXIII-A és FXIII-B koncentrációkat határoztuk meg.

Mivel a könnyben a FXIII koncentrációja igen alacsony, és a rendelkezésünkre álló minta mennyisége is limitált, hiperszenzitív chemilumineszcens micro-ELISA módszereket fejlesztettünk ki. Az érzékenység növekedését egyrészt Lumigen PS-atto peroxidáz szubsztrát alkalmazásával, másrészt a reakció-térfogat 50  $\mu\text{L}$ -re történő csökkentésével (384 lyukú streptavidin-fedett mikrolemezeket használva) értük el. A reakció elve és menete mindhárom ELISA (FXIII-A, FXIII-B, FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) esetében megegyező. Elővizsgálataink tapasztalatai alapján a következő módon végeztük a meghatározásokat: 50  $\mu\text{L}$  1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -es koncentrációjúra hígított biotinált elfogó

antitestet 1 órán át szobahőn inkubáltunk streptavidinnel fedett mikrolemezen. A hígító puffer 0,5 mol/L NaCl-ot, 5 mg/mL BSA-t, 0,5 g/L Tween 20-at, 15 mmol/L-es foszfát puffert tartalmazott, pH-ja 7,2 volt. Az inkubációs idő leteltével 5x alaposan mostuk a mikrolemezt. A mosó puffer 0,5 mol/L NaCl-ot, 0,5 g/L Tween 20-at, 15 mmol/L-es foszfát puffert tartalmazott, pH-ja 7,2 volt. A lemezbe ezután 2,5  $\mu$ L, hígító pufferrel 50  $\mu$ L-re hígított könnyemintát mértünk, és 1 órán át inkubáltuk. Újabb alapos mosások (5x) után 50  $\mu$ L hígító pufferrel 0,5  $\mu$ g/mL-es koncentrációjúra hígított HRPO jelzett detektáló antitestet pipettáztunk a mikrolemezbe. Ismét 1 óra inkubálást ötszöri alapos mosás követett, majd 50  $\mu$ L a forgalmazó utasításainak megfelelően elkészített – a szobahőmérsékletű szubsztrát két komponensét egyenlő arányban összemért, fényérzékenysége miatt sötétben tartott – Lumigen PS-atto peroxidáz szubsztrátot pipettáztunk a mikrolemezbe. A kemilumineszcens jelet 5 percen belül Infinite M200 mikrolemez leolvasóval (Tecan microplate reader) mértük. A kalibrációs görbék elkészítéséhez REA-clot referencia normal plazma hígító pufferrel készített különböző hígításait használtuk. A referencia plazma megadott FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> és FXIII-A koncentrációját (20,84 mg/L és 10,63 mg/L) a WHO nemzetközi standard plazmával, míg FXIII-B tartalmát (19,04 mg/L) laboratóriumunkban preparált tisztított FXIII-B alegységgel végzett kalibrációval határoztuk meg.

#### *A módszerek jellemzése*

A kis térfogat miatt kevert gyűjtött könnyeminták mennyisége sem lett volna elegendő a módszerek pontatlanságának ellenőrzéséhez, így könnyeminta helyett a referencia plazma különböző hígításait használtuk a FXIII komplex és alegységek meghatározására alkalmas hiperszenzitív kemilumineszcens ELISA módszerek analitikai jellemzéséhez. A reprodukálhatósági vizsgálatokat a The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP5-A2 irányelveinek megfelelően végeztük: 20 napig minden nap két párhuzamos méréssel

meghatároztuk ugyanazon minták koncentrációját. A kimutathatósági és minimális mérési határok megállapítása a CLSI EP-17-A protokoll leírásának megfelelően történt. A kimutathatósági határok meghatározásához Linnet és Kondratovich részben nemparametrikus módszerét választottuk.

A visszanyerési vizsgálatokat a következőképpen végeztük: különböző koncentrációjú nagy tisztaságú FXIII-A<sub>2</sub>-t, FXIII-B-t, vagy FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-t tartalmazó oldatot adtunk a könnymintákhoz. A kiegészítő oldatok 90 µg/L vagy 400 µg/L FXIII-A<sub>2</sub>-t, 210 µg/L vagy 820 µg/L FXIII-B-t illetve 150 µg/L vagy 730 µg/L FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-t tartalmaztak hígító pufferrel hígítva. Ezeket az oldatokat 10x-esre hígítottuk kevert gyűjtött könnymintával. A kevert gyűjtött könny FXIII-A<sub>2</sub> koncentrációja 1,86 µg/L, FXIII-B koncentrációja 4,48 µg/L FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> koncentrációja 0,87 µg/L volt. A visszanyerést a számított és mért hozzáadott FXIII hányadosaként százalékban fejeztük ki.

### *Statisztikai analízis*

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

## EREDMÉNYEK

### *A kemilumineszcens FXIII ELISA módszerek analitikai jellemzése*

A kimutathatósági határ a FXIII-A meghatározás esetében 0,014 µg/L, a FXIII-B esetében 0,019 µg/L, a FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> esetében pedig 0,016 µg/L volt. Mivel ezeknél a koncentrációknál a mért értékek eltérései az EP-17-A CLSI protokollban megadott 25%-os hibahatár alatt voltak – FXIII-A meghatározás esetében 12,8%, FXIII-B esetében 15,8%, FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> esetében pedig 14,3% – a minimális mérési határokat mindhárom esetben a kimutathatósági határokkal megegyezőnek tekinthetjük.

A módszerek összegzett pontatlansága – laboratóriumon belüli pontatlanság – az alacsony koncentrációk mérésénél egyik FXIII antigén assay esetében sem haladta meg a 12%-ot, a magas koncentráció-tartományokban pedig minden esetben 5,5 % alatti volt. A módszerek mérési tartománya igen széles, mindhárom esetben a minimális mérési határtól indul, FXIII-A<sub>2</sub> assay esetén 0,014-2,0 µg/L, a FXIII-B meghatározásnál 0,019-10,0 µg/L, a FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> ELISA-nál pedig 0,016-4,0 µg/L. Az alacsonyabb mérési tartomány az egészséges könnyminták alacsony FXIII komplex és alegységek koncentrációinak meghatározásánál fontos, míg a teljes széles mérési tartomány lehetővé teszi a magas FXIII koncentrációjú betegminták mérését egyetlen hígítás elkészítésével. A megadott mérési tartományokban a másodfokú polinomiális görbék kiváló illeszkedést mutattak, az eredmények kiszámításához ezek egyenleteit használtuk.

A visszanyerési vizsgálatok eredménye megközelítőleg 100% volt mindhárom FXIII antigént kimutató módszer esetében. Az anti-FXIII-A és anti-FXIII-B monoklonális antitest kombinációról, melyet a FXIII komplex kimutatására használunk, korábbi vizsgálatok bizonyították, hogy specifikus, vagyis csak a FXIII komplex mennyiségét méri. Hasonlóképpen a FXIII-A meghatározást nem zavarja a FXIII-B alegység jelenléte, és a FXIII-B

kimutatást nem befolyásolja a FXIII-A<sub>2</sub> jelenléte. A módszerek specificitását az is jól bizonyítja, hogy FXIII-A és FXIII-B immundepletált plazmamintákból nem tudunk FXIII-A-t, FXIII-B-t, ill. FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> komplexet sem kimutatni.

*FXIII alegységek és komplex egészséges egyének stimulált és nem stimulált könnymintáiban*

Az egészséges egyének stimulált és nem stimulált könnyében mért FXIII-A, FXIII-B, FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> és totál protein koncentrációkat, valamint az egy perc alatt gyűjthető könny térfogatát összehasonlítottuk. A FXIII-ra vonatkozó eredményeket a totál protein koncentrációra normalizálva is megadtuk. Kolmogorov-Smirnov és Shapiro-Wilk próbával is bizonyítottuk, hogy mindhárom FXIII paraméter értékei nem-Gaussi, vagyis nem normál eloszlásúak. Sem nem stimulált, sem stimulált könnyben nem találtunk korfüggést, ill. szignifikáns nemek közti különbséget a FXIII alegységek és komplex vonatkozásában. A nem stimulált könnyminták alacsony térfogata arra utal, hogy a könnymintavétel nem okozta a könnysekreáció jelentős stimulációját. A mintákban az általunk mért totál protein koncentrációk mind stimulált, mind nem stimulált könny esetében jól korrelálnak az irodalomban közöltekkel.

Nem stimulált könnyben következetesen alacsony mennyiségű FXIII-A és FXIII-B alegység mérhető, 2,13 µg/L azaz  $2,66 \times 10^{-11}$  mol/L FXIII-A illetve 7,22 µg/L azaz  $8,70 \times 10^{-11}$  mol/L FXIII-B. A FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> értékek mediánja igen alacsony, az esetek 16%-ában a FXIII komplex koncentrációja a minimális mérési határ alatt volt. A könnyben a FXIII alegységek csak viszonylag kis mennyisége képez komplexet az adott körülmények között, a FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> medián értéke 0,67 µg/L vagyis  $0,21 \times 10^{-11}$  mol/L, ami azt jelenti, hogy a mért totál FXIII-A alegységnek csak a 16% van komplex formában. A FXIII-A, FXIII-B alegységek és FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> komplex koncentrációk eloszlása az alacsony koncentrációk irányába tolódott el.

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

#### *FXIII szintek perforáló keratoplasztikán átesett betegek könnymintáiban*

A műtét előtti szintekhez képest 24 órával a transzplantációt követően a könny FXIII-A koncentrációja 10,4-szeresére, FXIII-B koncentrációja 9,4-szeresére a FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> koncentráció pedig 20,5-szeresére emelkedett. A könnysekreáció jelentősen fokozódott, a totál protein tartalom pedig csökkent, ami hígabb könny fokozott termelődésének köszönhető. Következésképpen a FXIII szintek totál protein koncentrációra vonatkoztatott eredményei még nagyobb emelkedést mutattak: FXIII-A esetében az emelkedés 16,9-szeres, FXIII-B esetében 17,7-szeres, míg FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> esetében 25,7-szeres volt. Az első 24 óra után az emelkedett FXIII szintek fokozatosan csökkentek, de még hét nappal a műtét után is szignifikánsan magasabb értékeket mértünk, mint operáció előtt. A műtét utáni első naphoz képest a csökkenés mértéke FXIII-A, FXIII-B és FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> esetében különböző időben érte el a szignifikáns szintet, a 7. napon azonban a koncentrációk mindhárom paraméter esetében szignifikánsan alacsonyabbak voltak mint a műtét után 24 órával.

A 23 követett esetből 10 donor szaruhártyán volt ereződés megfigyelhető 3-12 hónappal a perforáló keratoplasztikát követően. A betegeket a transzplantátum állapota – ereződött és nem ereződött – szerint két csoportra osztottuk és a két csoportban az első héten mért FXIII szinteket összehasonlítottuk. Azon betegek esetében, akiknél a donor szaruhártya a későbbiekben a követési idő alatt beereződött, már a műtét előtt mért FXIII szintek is magasabbak voltak. A kis esetszám következtében a műtét előtt mért

különbség csak a FXIII komplex esetében volt szignifikáns. A műtét után a FXIII-A, FXIII-B alegység és FXIII komplex koncentrációk emelkedése az ereződött csoportban szignifikánsan nagyobb volt, mint a nem ereződött csoportban.

## MEGBESZÉLÉS

Mivel a könnyminták térfogata limitált, és a benne lévő FXIII alegységek és komplex koncentrációja alacsony, a laboratóriumunkban korábban kifejlesztett gyors, egylépéses szendvics-ELISA módszerek, melyeket eredetileg a plazmában lévő FXIII komplex, és FXIII-A meghatározására dolgoztak ki, nem voltak elég érzékenyek az ebben a testfolyadékban történő mérésekhez. Emellett nem létezett jól bevizsgált módszer a FXIII-B mérésére. A következő változtatásokkal igen érzékeny, jól reprodukálható stabil módszereket fejlesztettünk ki a FXIII-A, FXIII-B és FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> koncentrációk meghatározására könnyben:

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



között alaposan mostuk a lemezt. Ezek a változtatások egyrészt jelentősen csökkentették a háttérrel, másrészt lehetővé vált a teljesebb komplexképződés az antigén és az antitestek között, így a módszer érzékenysége tovább nőtt.

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

A plazmában való kimutatásra szolgáló módszerekhez képest ezekkel a változtatásokkal a kimutathatósági, esetünkben egyben a minimális mérési határokat a FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> assay esetében 1/59-ed részére, a FXIII-A meghatározásnál 1/25-öd részére csökkentettük. Az érzékenység hasonló növekedését értük el a FXIII-B alegységet kimutató módszer esetén is.

A módszerek igen nagy érzékenysége lehetővé tette, hogy az egy egyéntől származó kis térfogatú nem stimulált könnymintákból is biztonsággal meghatározzuk a FXIII koncentrációkat. A FXIII-A és FXIII-B koncentrációja könnyben sokkal kisebb, mint a plazmában. Számításaink szerint a könny FXIII-A tartalma 1/5200-ad része a plazmáénak (11 mg/L). A plazma FXIII-B koncentrációja 21 mg/L, vagyis a FXIII-B könny: plazma arány 1:2900. A FXIII-B:FXIII-A moláris arány könnyben 3.5, ami majdnem duplája a plazmában található FXIII-B:FXIII-A aránynak (2:1). Könnyben a FXIII-A-nak csak 16%-a képzett komplexet a FXIII-B-vel. Ez ellentétben áll a plazmában megfigyelttel, ahol a FXIII alegységek több mint ezerszer magasabb koncentrációban találhatók, mint a könnyben, és a FXIII-A<sub>2</sub> szinte kizárólag komplex formában fordul elő. A FXIII-A és FXIII-B koncentrációinak mediánja nem stimulált könnyben  $1.33 \times 10^{-11}$  mol/L FXIII-A<sub>2</sub>-nek és  $4.35 \times 10^{-11}$  mol/L FXIII-B<sub>2</sub>-nek felel meg. Ezeket az adatokat, és a laboratóriumunkban megállapított  $0,16 \times 10^{-9}$  mol/L-es egyensúlyi állandó ( $K_d$ ) értéket használva a FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> számított elméleti értéke  $0,27 \times 10^{-11}$  mol/L, miszerint elméletileg a FXIII-A alegység 20%-a van komplexben. A FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> mért koncentrációja a könnyben 0,67 µg/L, azaz  $0,21 \times 10^{-11}$  mol/L volt. A mért értékekből történő

számításaink szerint normál könnyben a FXIII-A alegység 16%-a található komplex formában, azaz a mért és számított értékek jól egyeznek egymással. Ha a plazmában mért FXIII alegység koncentrációkkal végezzük el a számításokat, a FXIII-A alegység a mérésekkel megegyezően a kalkulációk szerint is a gyakorlatilag 100%-ban komplexként fordul elő a keringésben. Ezek a felismerések azt sugallják, hogy a plazma és a könny között a komplex képződés különbsége egyszerűen a könnyben lévő FXIII alegységek alacsony koncentrációinak köszönhető, ami miatt az adott egyensúlyi állandónak megfelelő komplexképződés kismértékű, és nem merül fel egy, a komplexképződést gátló komponens jelenléte.

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

Azt, hogy pontosan hogyan kerül a könnybe a XIII-as véralvadási faktor, jelen munkánk során nem vizsgáltuk, a lehetséges utakat azonban megpróbáljuk felvázolni. A könnyfilm három rétegből áll, az epithel sejtek rétegével érintkező kocsonyás nyálkaréteg (mucinózus fázis), a proteinek és más vízdoldékony molekulák vizes oldatát tartalmazó vizes fázis és a felszíni olajos fázis. A vizes fázis adja a könnyfilm vastagságának nagy részét, az olajos fázis védi a könnyfilmet a párolgástól. A mucinózus és vizes fázist egyes szerzők nem különítik el. A könnyben található víz, sók és fehérjék nagy részét a fő és a járulékos könnymirigyek szekretálják, bár a kötőhártya epithel sejtjei is termelhetnek proteineket, illetve a conjunctivális erek is átereszthetnek minor komponenseket. A lipidek nagy része a Meibom mirigyből származik. A FXIII-A alegység kimutatható monocytákban és különböző macrophagokban, mint a histiocytákban és dendritikus sejtekben, így a kötőhártya szöveti

macrophagjainak lehet szerepe a könnyben lévő FXIII-A produkciójában. Mivel egy bronchiális epithel sejtvonal is képes a sejt kultúra felülszójában megjelenő FXIII-A alegységet szintetizálni, a corneális epithel sejteket is érdemes lehet megvizsgálni, hogy termelnek-e FXIII-A-t. A FXIII-A alegység a FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> komplex részeként a plazmából is átszűrődhet, és a komplex disszociálhat a könnyben lévő körülmények között. A FXIII-B alegység szintézise a máj hepatocytáira lokalizálható, melyek a keringésbe szekretálják a fehérjét. A szabad FXIII-B transzudációja, és kisebb mennyiségben a conjunctivális erekből származó FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> lehet a legvalószínűbb forrása a könnyben talált FXIII-B alegységnek.

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

Szaruhártya átültetés után a FXIII-A, FXIII-B és FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> szintek óriási emelkedését tapasztaltuk, mely 24 órával a műtéti beavatkozás után tetőzött, majd fokozatosan csökkent, de a FXIII szintek még egy hét múlva is szignifikánsan emelkedettek voltak. Hangsúlyozni kell, hogy a műtétet követő első héten a FXIII szintek emelkedése ellenére a totál protein koncentrációk szignifikánsan csökkentek. A perforáló keratoplasztika után mért első napi csúcs FXIII-A és FXIII-B koncentrációk a plazmaszintek 0,5%-ának illetve 1,5%-ának

felelnek meg. Keratoplasztika utáni állapotokban a termelődő könny mennyisége jelentős mértékben megnő, esetünkben a műtét utáni első napon 12-szeresre, a hetedik napon pedig még mindig 6x több könny termelődött, mint operáció előtt. Úgy tűnik tehát, hogy a corneális sebet folyamatosan tekintélyes mennyiségű FXIII-at tartalmazó könny mossa.

Ismert, hogy a kalcium már millimoláris koncentrációban proteolízis nélkül is képes aktiválni a FXIII-A<sub>2</sub>-t, míg FXIII komplex esetében ilyen körülmények között nem következik be aktiváció. A könnyben megtalálható a Ca, koncentrációja 0,36-0,79 mmol/L, így valószínű, hogy a könnyben lévő FXIII-A<sub>2</sub>-nek legalábbis egy része nem-proteolitikusan aktiválódik. Gyulladásos körülmények között, amikor a vérárvadási rendszer egyéb komponensei is átszivároghatnak a tágult vérerekből, lehetséges, hogy thrombin képződik, és proteolitikusan is aktiválja a FXIII-at. A gyulladás során megjelenő granulocyták által termelt elasztáz szintén indukálhatja a FXIII proteolitikus aktivációját. Mivel az aktivált FXIII könnyen kötődik sejtek felszínéhez, a megkötött, így helyben maradó FXIIIa aktuális koncentrációja akár lényegesen magasabb is lehet, mint amit a könnyben mértünk.

Mivel az extracelluláris térben jelen lévő aktív FXIII segíti a sebgyógyulást, a FXIII és alegységeinek megjelenése egy plazmán kívüli folyadékterben, mint a könny, komoly szerepet tölthet be a helyi szöveti regeneráció folyamatában. A FXIII könnyben egy helyi „hormonszerű” hatással rendelkezhet, és a sejtekre gyakorolt direkt hatásán keresztül segítheti a szaruhártya kisebb sérüléseinek és sebeinek gyógyulását. Normál körülmények között a saját érhálózatral nem rendelkező cornea sebei éreződés nélkül gyógyulnak, bár egyes patológiás esetekben a sérült szaruhártya beereződése a sebészi beavatkozások utáni gyógyulási folyamat egyik fő látásromlást okozó komplikációja. Figyelembe véve a FXIII proangiogenikus hatását feltételezzük, hogy igen magas koncentrációjú FXIII jelenléte káros is lehet a szaruhártyasebek gyógyulásának folyamatában. Mint arra már utaltam, ha

nyulak kötőhártyájába nagy mennyiségű aktív FXIII-at iniciáltak, a nyulak szaruhártyája beereződött. Saját vizsgálatainkban, azon a betegek esetében, akiknél a donor szaruhártya beereződését tapasztaltuk a 18 hónapos követési idő alatt, lényegesen magasabbak voltak az átültetés előtt és után mért FXIII koncentrációk, mint akiknél a donor cornea tiszta, ereződésmentes maradt. A jelentős időbeli eltérés a FXIII szintek mérése és a beültetett szaruhártya ereződésének kezdete között, melyet a műtét után 3-12 hónappal észleltünk, úgy tűnik, kizárja a direkt kapcsolatot. Azonban az átültetés előtt mért magasabb FXIII koncentrációk és a műtétre, mint stimulusra adott fokozottabb válaszkészség, mely a FXIII szintek nagyobb mérvű emelkedését jelenti, arra utal, hogy a könny magasabb FXIII szintje és a stimulusokra adott fokozott FXIII szint emelkedés a perforáló keratoplasztikát követően a szaruhártya ereződés rizikófaktora lehet.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Megállapítottuk, hogy extravasalis folyadéktérben, a könnyben kimutathatók a FXIII szabad alegységek és FXIII komplex. Az igen érzékeny általunk kifejlesztett kemilumineszcens ELISA módszerek alkalmasak néhány mikroliter alacsony FXIII koncentrációjú mintában a FXIII alegységek és komplex mérésére, így ezek a módszerek alkalmasak a könny és valószínűleg egyéb testfolyadékok FXIII tartalmának a meghatározására. Ezek a módszerek ígéretes eszközök lehetnek a könnyben lévő FXIII monitorozására patológiás körülmények között is. 60 egészséges önkéntes könnymintájából meghatároztuk a normál könny FXIII alegységeinek a koncentrációját. A FXIII-A és FXIII-B koncentrációk medián értékei 2.13  $\mu\text{g/L}$  és 7.22  $\mu\text{g/L}$  voltak. A komplex képződés az alegységek között ilyen kis koncentrációnál a disszociációs állandónak megfelelően a plazmához viszonyítva kismértékű, a FXIII-A-nak mindössze 16%-a volt komplexben. A fehérje tartalomra normalizált FXIII szintek nem változnak a könnyben stimuláció hatására, így lehetőségünk nyílik az összehasonlításra az egyes patológiás állapotokban termelődő könnyel, ahol természetesen stimulált a könnytermelés. Keratoplasztikát követően a könny FXIII koncentrációi igen nagymértékben emelkednek. Az emelkedés még kifejezettebb azokban az esetekben, amikor a betegek követése során a donor szaruhártya későbbi ereződését figyeltük meg. Felvetődik, hogy a normál könnyben jelen lévő FXIII szerepet játszhat a szaruhártya mikrosérüléseinek gyógyulásában, a cornea transzplantáció után mért emelkedett mennyiségű FXIII pedig segítheti a corneális seb gyógyulási folyamatát. Egy bizonyos koncentráció felett azonban a FXIII angiogenezist segítő, így a beültetett szaruhártya transzparenciáját rontó érújdonképződést indukáló hatása is előtérbe kerülhet.

Iktatószám: DEENKÉTK /40/2011.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Orosz Zsuzsanna Zita

Neptun kód: XSIIKF

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Orosz, Z.Z.**, Katona, É., Facskó, A., Módos jr., L., Muszbek, L., Berta, A.: Factor XIII subunits in human tears: Their highly elevated levels following penetrating keratoplasty. *Clin. Chim. Acta.* 412 (3-4), 271-276, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2010.10.017>  
IF:2.535 (2009)
2. **Orosz, Z.Z.**, Katona, É., Facskó, A., Berta, A., Muszbek, L.: A highly sensitive chemiluminescence immunoassay for the measurement of coagulation factor XIII subunits and their complex in tears. *J. Immunol. Methods.* 353 (1-2), 87-92, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2010.01.001>  
IF:2.347 (2009)

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

Debrecen, 2011.03.17

