

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**ÚJ, MONOKLONÁLIS ANTITESTEK ALKALMAZÁSÁN ALAPULÓ
MÓDSZEREK A VÉRALVADÁS XIII-AS FAKTORÁNAK
KVANTITATÍV MEGHATÁROZÁSÁRA**

KATONA ÉVA

TÉMAVEZETŐ:

PROF. DR. MUSZBEK LÁSZLÓ
AKADÉMIKUS, EGYETEMI TANÁR

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
KLINIKAI BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS PATOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2001.

Bevezetés

A XIII-as faktort (FXIII) először Laki és Lóránd írta le 1948-ban mint „fibrin stabilizáló faktor”-t. A későbbiekben Loewy és munkatársai izolálták és jellemezték a fehérje enzim tulajdonságát. Az egyre intenzívebb kutatások és klinikai megfigyelések bizonyították, hogy ez a faktor fontos szerepet tölt be a véralvadás utolsó szakaszában, ezért 1963-ban hivatalosan is elismerték véralvadási faktorként és a XIII-as faktor nevet kapta. Ezt követően, de különösen az utóbbi évtizedben felgyorsult a FXIII kutatása, melynek eredményeként ismertté vált a fehérje- és génszerkezete, az enzim aktiválódásának feltételei és az is egyre inkább nyilvánvalóvá vált, hogy funkciója nem korlátozódik a fibrin szálak keresztkötésére a véralvadás során, hanem számos más folyamatban is fontos funkciót tölt be.

A véralvadás XIII-as faktora egy protranszglutamináz, mely két formában található meg a szervezetben. A plazmában A és B alegységekből felépülő heterotetramer (FXIII-A₂B₂) formában kering. Az A alegység (FXIII-A) potenciálisan aktív, a B alegység (FXIII-B) gátló/stabilizáló szerepet tölt be. A FXIII-A főként csontvelői eredetű sejtekben szintetizálódik, míg a FXIII-B alegységet a máj termeli. A komplex kialakulása nagy valószínűséggel a plazmában történik. A plazmában a FXIII-A teljes egészében komplexben kötött (kivéve a nagyon ritka FXIII-B hiányt), míg a FXIII-B feleslegben termelődik, ezért kb. 50%-a szabadon kering. A FXIII celluláris formája a trombocytákban, monocyta/macrophag sejtekben két FXIII-A alegységből álló homodimer (FXIII-A₂) formában található meg jelentős mennyiségben.

A FXIII-A alegység molekulatömege ~83 kDa, nem glikozilált polipeptid. A plazma és celluláris forma elsődleges szerkezete azonos. Az aktív centrumban, a 314-es pozícióban cisztein található, mely körül a transzglutaminázokra jellemző (Tyr-Gly-Gln-Cys-Trp) szekvencia található. A

FXIII-A génjében több polimorfizmust kimutattak, melyek közül számosnak semmilyen hatása nem ismert az enzim funkciójára. A FXIII Val34Leu polimorfizmus jelentősége abban áll, hogy az aminosav csere mindössze három aminosavra van a trombin hasítási helyétől az aktivációs peptidben, ami befolyásolhatja az aktiváció folyamatát, mértékét. Az utóbbi évek kutatási eredményei szerint a mutáció hordozása védő hatást biztosít egyes érrendszeri megbetegedésekkel szemben.

A FXIII-B alegység ~80 kDa molekulatömegű glikoprotein, mely 8,5% szénhidrátot tartalmaz. Tipikus mozaik fehérje, mely 10 ismétlődő u.n. „sushi-domén”-t tartalmaz.

A FXIII az alvadási kaszkád utolsó szakaszában aktiválódik, trombin és Ca^{2+} hatására egy 37 aminosavból álló aktivációs peptid lehasad, ezt követően a FXIII-B alegységek leválásával a FXIII-A konformáció változáson megy át. A konformáció változás miatt az aktív centrum ciszteinje felszínre kerül, a FXIII-A aktív transzglutaminázzá (FXIIIa) alakul. A FXIIIa, mint a transzglutaminázok általában, egy acil transzfer reakciót katalizál, melyben az egyik peptidláncban található glutamin γ karboxamid csoportja az acil donor, a másik peptidlánc lizin ϵ amino csoportja az akceptor. A kialakuló izopeptid kötés a peptidláncok kovalens keresztkötését eredményezi. In vitro körülmények között a trombin és Ca^{2+} a celluláris FXIII-at ugyanilyen módon aktiválja (természetesen ekkor nincs szükség a FXIII-B leválására). In vivo a thrombocytákban lévő FXIII-A₂ a thrombocyták aktivációját követő intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedés miatt az aktivációs peptid lehasadása nélkül is aktiválódik.

A plazma FXIII fő funkciója, hogy az alvadási kaszkád utolsó szakaszában aktiválódás után a fibrin szálakat keresztköti, valamint az α 2-plazmin inhibitort (α 2-PI) a fibrin polimerekhez köti, ezáltal stabilizálja az alvadékat és megvédi a fibrint az azonnali, gyors fibrinolitikus degradációtól.

A FXIIIa-nak a fibrinen kívül más fontos fehérjeszubsztrátjai is vannak: a véralvadás V-ös faktora, plazminogén aktivátor inhibitor-2, adhezív proteinek (fibronektin, vitronektin, von Willebrand faktor, trombospondin), citoskeletális fehérjék (aktin, miozin). Ezen szubsztrátok keresztkötése révén a FXIII befolyásolja a sejtek adhézióját, migrációját, az érendotel átjárhatóságát, szerepe van a sebgyógyulásban, szöveti újraképződésben.

A celluláris FXIII funkciója még nem teljesen tisztázott, de valószínűleg nem korlátozódik arra a tényre, hogy a FXIII-A a megakaryocytákban, monocyta/macrophag sejtekben termelődik (a thrombocyták tároló valamint szállító funkciót töltenek be) és a károsodott sejtekből kijutva a plazmában lévő FXIII-B alegységgel kapcsolódva a plazma FXIII koncentrációját emeli.

A FXIII-B hiánya nagyon ritka, következményeként a védő alegység hiányában a FXIII-A koncentrációja is jelentősen csökken a plazmában, a thrombocyták FXIII-A₂ tartalma normális.

A FXIII-A hiány súlyos vérzékenységet okoz, valamint elhúzódó sebgyógyulással, meddőséggel, spontán vetéléssel jár, ami az esetek többségében egész életen át tartó pótló terápiát tesz szükségessé. Az öröklött FXIII-A hiány igen ritka (1:3.000.000), autoszómális recesszív öröklésmenetű. Öröklött hiány esetén a plazma FXIII koncentrációja < 1 % és a thrombocytákban sem mutatható ki FXIII-A₂. Szerzett FXIII hiány sokkal gyakrabban alakul ki fokozott felhasználás vagy csökkent szintézis miatt és különböző betegségekhez társulhat, mint pl. gyulladós bélbetegségek aktív szakasza, malignus haematológiai kórképek, súlyos májbetegségek, Henoch Schönlein purpura. Ezekben az esetekben a FXIII koncentrációja széles sávban mozog, a vérzéses tünetek súlyossága nagyon változatos.

Emelkedett FXIII szintet mértek atherosclerosisban, angiopathiában és emelkedett megakaryocyta aktivitással járó krónikus leukaemiában.

A FXIII plazmaszintjének kimutatása funkcionális vagy immunológiai módszerekkel lehetséges. A funkcionális módszerek két különböző elven működnek. Az UV spektrofotometriás módszerek a legelterjedtebbek, a transzglutamináz reakció során felszabaduló ammónia mennyiségét határozzák meg. Ezen módszerek könnyen, gyorsan kivitelezhetők, automatizálhatók, de az érzékenységük az összes paraméter optimalizálása ellenére sem teszi lehetővé a normál plazma szint 5 %-ánál alacsonyabb FXIII aktivitás pontos meghatározását. 5%-nál alacsonyabb FXIII aktivitás meghatározására az aktivált FXIIIa által fehérje szubsztrátokba beépített fluoreszcens, radioaktív izotóppal jelzett vagy biotinált aminok mennyiségének meghatározása ad lehetőséget, de ezek a módszerek nagyon munka- és időigényesek, nem standardizálhatók.

A FXIII deficienciák adekvát diagnózisához, osztályozásához, a különböző FXIII formák funkciójának, eloszlásának vizsgálatához nem elegendő az enzimaktivitás mérése, hanem szükség van a komplex és az alegységek koncentrációjának meghatározására (a normál plazma koncentráció 1%-ánál alacsonyabb tartományban is) és a különböző sejtekben, szövetekben való lokalizációjának kimutatására is. Ezen célok megvalósítására a specifikus antitestek alkalmazásán alapuló immunológiai módszerek alkalmasak. Főként poliklonális anti-FXIII specifikus antitestek felhasználásával kidolgoztak néhány immunológiai módszert a FXIII meghatározására. Egy kivétellel ezek mindegyike az A vagy a B alegységet határozta meg. Yorifuji két szendvics ELISA módszer kifejlesztésével különbséget tudott tenni a szabad és a komplexben kötött FXIII-B között. Az egyik ELISA-ban elfogó és jelzett ellenanyagként is poliklonális anti-FXIII-B ellenanyagot, a másik rendszerben elfogó ellenanyagként olyan monoklonális anti-FXIII-B antitestet használt, amely a FXIII-B-t elsősorban a komplexben ismeri fel, jelzett ellenanyagként pedig poliklonális ellenanyagot.

Célkitűzés

A FXIII deficienciák adekvát diagnózisa céljából szükség van mind az izolált alegységek mind a komplex koncentrációjának pontos meghatározására is. Az alegységek koncentrációja nem feltétlenül arányos a plazmában található komplex koncentrációjával (FXIII-B hiány esetén pl. komplex nem található a plazmában csak csökkent mennyiségű FXIII-A). Megfelelő specificitással bíró, jól reprodukálható, korlátlan mennyiségben előállítható immunológiai módszer monoklonális ellenanyagok felhasználásával dolgozható ki, ezért célul tűztük ki:

1. Monoklonális antitestek előállítását egér rendszerben az izolált FXIII alegységekkel valamint tisztított plazma FXIII-al történő immunizálás után.
2. A monoklonális antitestek specificitásának tesztelését.
3. Az antitestek szelektálása után szendvics ELISA módszerek kidolgozását a komplex és az alegységek meghatározására.
4. A kidolgozott ELISA módszerek specificitásának, precizitásának, reprodukálhatóságának tesztelését.
5. Az ELISA módszereket alkalmazva a plazma és celluláris FXIII referencia tartományának megállapítását.
6. Az ELISA módszerrel kapott eredmények összevetését az intézetben kidolgozott aktivitás mérés eredményeivel.
7. A kidolgozott módszereket alkalmazva a különböző FXIII formák kimutatását plazmában és más testfolyadékokban, sejt lizátumban.

Anyagok és módszerek

FXIII(A₂B₂), FXIII-A és FXIII-B tisztítása

A FXIII(A₂B₂) tisztítását humán plazmából végeztük Lorand módszere alapján. A tisztított FXIII-B előállításához az A alegységet ismételt fagyasztás-olvasztás módszerével leválasztottuk a komplexről, majd affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A FXIII-A alegységet humán placentából preparáltuk.

Egér monoklonális antitestek előállítása

A monoklonális antitestek előállításához Balb/c egereket immunizáltunk a tisztított preparátumokkal. Az immunizált egér lépsejtjeit Sp-2/o myeloma sejtvonal sejtjeivel fuzionáltattuk. A hibridómák antitest termelését indirekt ELISA módszerrel vizsgáltuk. A pozitív sejtvonalakat határhígítási módszerrel klónoztuk. A monoklonális antitesteket nagyobb mennyiségben ascites folyadékból ammónium-szulfátos kicsapás módszerével nyertük.

Monoklonális antitestek szelektálása

Indirekt ELISA rendszerek segítségével azon antitesteket választottuk ki, melyek egyaránt nagy affinitással kötődtek a megfelelő alegységgel, valamint a komplex FXIII-al és nem mutattak aspecifikus reakciót más antigénnel. Az anti-FXIII-A antitestek epitóp specificitását kompetíciós direkt ELISA-val valamint indirekt ELISA-ban az additivitási indexek számolásával vizsgáltuk.

Monoklonális antitestek jelölése

A tisztított és megfelelő kritériumok szerint kiválasztott antitesteket vagy torma peroxidáz enzimmal (HRPO) konjugáltuk vagy biotinnal jelöltük cukor oldalláncon keresztül.

Egylépéses szendvics ELISA módszer a plazma FXIII (FXIII-A₂B₂) és a FXIII-A alegység koncentrációjának meghatározására.

A szelekciós lépések során kiválasztottuk az 1D2D6 kódjelű anti-FXIII-B és 3A6H7 kódjelű anti-FXIII-A antitesteket és biotinnal jelöltük.

A 3B2H12 kódjelű anti-FXIII-A antitestet HRPO enzimmel konjugáltuk. A három antitest felhasználásával egylépéses szendvics ELISA módszereket dolgoztunk ki a plazma és a FXIII-A alegység meghatározására.

A plazma FXIII koncentráció referencia tartományának meghatározása a kidolgozott ELISA módszerrel

A referencia mintavételi csoport 189 egészséges egyénből (102 nő, 87 férfi) állt. A plazmaminták gyűjtésének és tárolásának módja az I. közleményben található.

Thrombocyta lizátum készítése

A thrombocyta lizátumot 41 egészséges véradó mosott thrombocyta szuszpenziójából készítettük. A részletes leírás a IV. közleményben található.

Más módszerek

A FXIII aktivitás meghatározása az intézetünkben kifejlesztett spektrofotometriás módszerrel történt, mely szubsztrátként egy szintetikus 12 tagú peptidet és glicin etilésztert használ (III. közlemény).

A FXIII Val34Leu polimorfizmus kimutatása az intézetünkben kifejlesztett detektáló módszerrel történt, mely az amplifikáció során generált restriktációs hely (ACRS – amplification created restriction site) elvén alapul (II. közlemény).

Bronchoalveoláris mosás

61 gyermeknél végeztünk bronchoalveoláris mosást, közülük 33 esetben súlyos bronchitis (25 fiú, 8 lány, életkor: 1-15 év, $x=2,7\pm 3,2$ év), 8 esetben fibrotizáló alveolitis (5 fiú, 3 lány, életkor: 2-14 év) igazolódott. 22 esetben (életkor: 2-14 év, $x=6,8\pm 5,2$ év) idegen test aspirációjának gyanúja miatt történt mosás, de az aspiráció és bronchiális gyulladás nem igazolódott, ezért ezt a csoportot kontrollnak tekintettük. A bronchoalveoláris mosást altatás alatt végeztük. A mosást steril, 37°C-os izotóniás NaCl oldattal végeztük. A visszanyert folyadékot steril nylon szöveten keresztül szűrtük, majd ezt követően 10 percig 800 x g-n centrifugáltuk. A sejt szuszpenziót 0,2% borjú szérum albumint tartalmazó RPMI tápfolyadékban szuszpendáltuk. A sejtek életképességét trypan kék festék kizárás alapján állapítottuk meg. A sejtösszetélt May-Grünwald-Giemsa festés után kenetből számoltuk. A mosófolyadék albumin koncentrációját immunnefelometriával határoztuk meg (Behring BN 100, Germany).

Statisztikai módszerek

A FXIII ELISA meghatározások kalibrációs görbéit négyparaméteres logisztikus görbe illesztésével készítettük Genesis-Lite software segítségével (Labsystems, Helsinki, Finland).

Kolmogorov-Szmirnov teszttel vizsgáltuk, hogy a FXIII koncentráció eloszlása a referencia populációban normál eloszlást követ-e.

A referencia tartomány megállapítása során a National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (Villanova, PA) követelményei szerint jártunk el. A férfi és női referencia csoportok eredményeit a z teszt alkalmazásával vetettük össze.

Két módszer korrelációját Deming-féle regresszióval vizsgáltuk a CBstat program segítségével. A tengelymetszet nullától való eltérésének

szignifikanciáját Student t-teszttel ellenőriztük. A normalizált értékeket Bland-Altman-féle grafikonon ábrázoltuk.

A kontroll és beteg csoportok bronchoalveoláris mosófolyadékában mért FXIII koncentrációk közötti eltérés szignifikanciáját Mann-Whitney U próbával teszteltük.

Eredmények

I. Egylépéses szendvics ELISA módszer kidolgozása a plazma XIII-as faktor mérésére, a módszer evaluálása

FXIII specifikus monoklonális ellenanyagok előállítása.

Az izolált FXIII-A alegységgel történő immunizálást követően 38 db pozitív hibridómát szelektáltunk. Az antigénhez való kötődés erőssége alapján közülük 23 vonalat klónoztunk. Az antitestek többsége indirekt ELISA-ban történő tesztelés alapján egyaránt kötődött a szabad és a komplexben kötött A alegységhez is, három csak a szabad A alegységet ismerte fel.

A plazma FXIII-al történő immunizálást követően 54 pozitív hibridómát szelektáltunk. Az antitestek zöme a FXIII-B alegység ellen irányult és mind a szabad, mind a komplexben kötött alegységet felismerte. FXIII-A alegységre 6 antitest volt specifikus. A szelektált pozitív hibridek közül a 20 legerősebb kötődést mutató hibridómát klónoztuk.

Egylépéses szendvics ELISA módszer a plazma FXIII koncentrációjának meghatározására.

A különböző, HRPO enzimmel jelölt anti-FXIII-A és jelöletlen anti-FXIII-B monoklonális antitesteket páronként kombinálva szendvics ELISA-ban, kiválasztottuk az anti-FXIII-B 1D2D6 és az anti-FXIII-A 3B2H12 antitesteket az ELISA kidolgozására. Az anti-FXIII-B antitestet biotináltuk, ami lehetővé tette, hogy streptavidinnel fedett ELISA lemezt alkalmazva a plazma FXIII-t tartalmazó mintát vagy standardot és a két antitestet egy lépésben mérjük a lyukakba. Ezáltal az ELISA kivitelezésének az ideje jelentősen lerövidült (kb. 2 óra).

A kidolgozott ELISA módszer specifikus a plazma FXIII-A₂B₂-ra, az izolált alegységekkel nem ad reakciót, fiziológiás koncentrációban jelenlévő fibrinogén és más plazma komponensek az antitestek kötődését nem zavarják.

A módszer 0,95 - 40 µg/L koncentráció tartományban lineáris, jól reprodukálható (Az optimális hiba normál ill. alacsony tartományban 2,0% ill. 3,3%, a rutin hiba 5,5% ill. 8,7%). Extrém magas érzékenysége a normál plazma koncentráció 0,05 %-ának kimutatását is lehetővé teszi.

A plazma FXIII referencia tartományának megállapítása

189 egészséges véradó plazma FXIII koncentrációját meghatározva a kidolgozott ELISA módszerrel, 14-28 mg/L plazma FXIII referencia tartományt határoztunk meg. Nem találtunk különbséget férfiak és nők között.

Az ELISA-val meghatározott plazma FXIII koncentrációk összehasonlítása a spektrofotometriás aktivitás mérés eredményeivel.

141 egészséges és 200 beteg plazmájának a két módszerrel mért FXIII koncentrációját összehasonlítva lineáris összefüggést tapasztaltunk $r = 0,893$ korrelációs értékkel.

Val34Leu FXIII polimorfizmus hatása a plazma FXIII szintjére

189 egészséges egyén plazma FXIII koncentrációját meghatározva a kapott koncentrációk eloszlása a normál eloszlást követte. Nem találtunk szignifikáns különbséget a vad típusú allélt ill. a mutációt homo- vagy heterozigóta formában hordozó egyének plazma FXIII koncentrációja között.

II. Egy lépéses szendvics ELISA a FXIII-A meghatározására plazmából és sejt lizátumból, a módszer alkalmazása

A módszer kidolgozása és evaluálása

Az anti-FXIII-A monoklonális antitestek közül kiválasztottuk a 3B2H12 és 3A6H7 ellenanyagpárt és igazoltuk, hogy az A alegység különböző epitópjait ismerik fel. A 3A6H7 antitestet biotináltuk, a 3B2H12 antitestet HRPO enzimmel jelöltük és egy a plazma FXIII ELISA-val megegyező elven működő ELISA módszert dolgoztunk ki.

A kidolgozott módszer mérési tartománya 0,4 - 40 µg/L, érzékenysége a normál plazma koncentráció 0,04 % -ának meghatározását is lehetővé teszi. A módszer azonos mértékben mutatja ki a FXIII-A alegységet a plazmában és a celluláris formában.

A FXIII-A ELISA-val mért eredmények összehasonlítása a FXIII A₂B₂ ELISA és a FXIII aktivitás mérés eredményeivel

214 plazma minta FXIII koncentrációját meghatározva a két ELISA módszerrel, erős korrelációt ($r= 0,965$), lineáris összefüggést találtunk. A regressziós egyenes meredeksége 0,52, ami jól egyezik az alegységek molekulatömege alapján számított 0,51 elméleti értékkel. Ez az eredmény is azt igazolja, hogy a FXIII-A ELISA módszer azonos mértékben ismeri fel a szabad és komplexben kötött FXIII-A-t. A FXIII-A ELISA-val mért eredmények az aktivitás mérés eredményeivel is jó korrelációt mutattak ($r= 0,870$).

Thrombocyták FXIII-A tartalmának meghatározása

41 egészséges egyén mosott thrombocytáinak lizátumában meghatározott FXIII-A koncentrációk alapján egy thrombocyta FXIII tartalmát 60 ± 10 fg mennyiségűnek becsüljük, ami kb. a sejt összfehérje 3%-ának felel meg.

Bronchoalveoláris mosófolyadék FXIII koncentrációjának meghatározása

66 bronchoalveoláris mosófolyadék FXIII koncentrációját határoztuk meg a kidolgozott két ELISA módszerrel. A kontrolloknál a mosófolyadékokban FXIII-A₂B₂-t nem tudtunk kimutatni, csak FXIII-A₂-t nagyon alacsony koncentrációban. Súlyos bronchitis és alveolitis esetén a mosófolyadékok FXIII-A₂ koncentrációja jelentősen megemelkedett, és megjelent a FXIII-A₂B₂, ami a plazmából történő átszűrődést jelez igazolható vérzés nélkül.

Megbeszélés

A FXIII koncentrációjának meghatározása a következő esetekben szükséges:

- Öröklött FXIII deficienciák diagnózisa és osztályozása,
- Szerzett FXIII deficienciák diagnózisa és monitorozása,
- FXIII pótló terápia követése,
- FXIII koncentráció, mint rizikó tényező, meghatározása artériás érbetegségekben és vénás trombózis során.

Mint azt a bevezetésben említettük, a FXIII meghatározása alapvetően két módon lehetséges: a FXIII aktivitás mérésével és immunológiai módszerekkel. Az UV spektrofotometriás FXIII aktivitás meghatározás az egyszerűsége, gyorsasága, automatizálhatósága miatt egyre inkább elterjed a rutin laboratóriumokban és valóban jól alkalmazható szűrőtesztként. Azonban a módszer érzékenysége nem teszi lehetővé 5 % -nál alacsonyabb FXIII aktivitás kimutatását. Súlyos FXIII hiány esetén mindenképpen érzékenyebb módszerek alkalmazására van szükség. Az amin inkorporációs módszerek alkalmasak erre a célra, de azok munka- és időigényesek, nem standardizálhatók. A FXIII tömeg koncentrációjának meghatározására kidolgozott módszerek ezeket a hibákat elkerülhetik. Számos immunológiai módszert kidolgoztak és közöltek a FXIII koncentrációjának meghatározására. Egy kivétellel ezek mindegyike a FXIII valamelyik alegységét mérte poliklonális antitestek segítségével. Az alegységek koncentrációjának meghatározásából nem lehet egyértelműen megadni a komplex mennyiségét, mert a B alegység feleslegben kering a plazmában, az A alegység pedig - bár normál körülmények között teljes egészében komplexben kötött - B alegység hiányban (esetleg a máj által termelt B alegység koncentrációjának jelentős csökkenése esetén is) szabadon is előfordul. A helyzetet bonyolítja, hogy a FXIII kimutatására más testfolyadékokból, sejtekből is szükség lehet, ahol a körülmények a plazmától teljesen eltérőek. A fent

említett módszerek másik problémája, hogy e módszereket nem kalibrálták tisztított FXIII preparátum segítségével, így a koncentráció csak a normál kontroll % -ában volt megadható. Nem vizsgálták továbbá, hogy az alegységek összekapcsolódása, a fibrinogénhez való kötődése milyen módon befolyásolja az antitesteknek FXIII alegységekkel történő reakcióját. Yorifuji és mtsai két szendvics ELISA módszert állítottak össze a plazma FXIII mérésére. Az első módszerben poliklonális anti-FXIII-B volt az elfogó antitest és HRPO-val jelölt poliklonális anti-FXIII-A-t használtak detektáló antitestként. Ezen módszernél alacsonyabb plazma hígítások esetén a fibrinogén interferált az anti-FXIII-A antigénjéhez történő kötődésével. A másik ELISA-ban monoklonális anti-FXIII-B volt az elfogó, a poliklonális anti-FXIII-B a detektáló antitest. A komplexben kötött FXIII-B alegységre specifikus monoklonális antitest azonban bizonyos mértékű keresztreakciót a szabad B alegységgel is mutatott, ami a komplex FXIII fölmérését eredményezte.

Az általunk kidolgozott ELISA módszerekben a FXIII-A₂B₂ és FXIII-A₂ meghatározására egy anti-FXIII-B ill. két (különböző epitópot felismerő) anti-FXIII-A monoklonális antitestet alkalmaztunk, melyek közül az egyik anti-FXIII-A antitestet HRPO enzimmal, a másik anti-FXIII-A és az anti-FXIII-B antitesteket biotinnal jelöltük. A HRPO enzimmal jelölt antitest azonos volt a két rendszerben. Streptavidinnel fedett lemezben a meghatározás lényegesen gyorsabb az előző módszereknél, 2 órán belül kivitelezhető. Mivel a plazmában a FXIII fibrinogénhez kapcsolódva kering, fontos volt igazolni, hogy a tisztított FXIII fibrinogénhez való kötődése egyik antitest kötődését sem befolyásolja. Tisztított FXIII-hoz adott fibrinogén nem befolyásolta a mérési eredményeket. Ezt igazolja az az eredmény is, hogy normál vagy FXIII hiányos plazmához adott tisztított FXIII visszamérése a két ELISA-ban közel 100 % volt. A plazma FXIII ELISA-val mért eredményeket a többszörös moláris feleslegben jelenlévő szabad alegységek sem befolyásolták.

A plazma minták több hónapos $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő tárolása nem befolyásolta a mérési eredményeket. Az általunk kidolgozott ELISA-k eredményeit nem befolyásolta a FXIII fibrinogénhez való asszociációja, ill. FXIII-A ELISA esetén a B alegységek A alegységekhez való kötődése sem. Plazma FXIII ELISA esetén a jelenlévő szabad alegységek nem interferáltak a meghatározással. Ezért a meghatározások során lehetővé vált egy kereskedelmi forgalomban kapható referencia plazma másodlagos kalibrálóként való használata, melynek FXIII koncentrációját nagy tisztaságú, friss FXIII preparátumot kalibrálóként használva állapítottunk meg.

A módszerek nagy érzékenysége és jó reprodukálhatósága egészen alacsony ($\sim 0,05\%$) FXIII koncentráció kimutatását is lehetővé teszi. Ennek nemcsak a súlyos FXIII deficienciák diagnózisában és a pótló terápia monitorozásában van jelentősége, hanem tudományos jelentőséggel is bír, lehetővé teszi az igen alacsony FXIII koncentráció (ng/mL) kimutatását más testfolyadékokból, sejtekből is. A kidolgozott módszereket alkalmazva kimutattuk, hogy gyulladós tüdőbetegségekben az alveoláris felszínen megjelenik a plazma FXIII, és a celluláris FXIII mennyisége is szignifikánsan emelkedik a kontroll csoporthoz képest.

Az NCCLS előírásait követve megállapítottuk a plazma FXIII referencia tartományát (14-28 mg/L). Az általunk kapott átlagérték (21 mg/L) jó egyezést mutatott az egyetlen közölt kis egyedszámú referencia csoporton mért átlagértékkel (21,6 mg/L). A koncentrációk eloszlása a normál eloszlást követte, a nemek között nem találtunk eltérést. A Val34Leu mutáció nem befolyásolta a FXIII plazma szintjét.

A téziseket megalapozó közlemények

- I. **Katona É**, Haramura G, Kárpáti L, Fachet J, Muszbek L. A simple, quick one-step ELISA assay for the determination of complex plasma factor XIII (A₂B₂). (2000) *Thrombosis and Haemostasis* 83, 268-73. Impact factor: 4.983
- II. Balogh I, Szôke G, Kárpáti L, Wartiovaara U, **Katona É**, Komáromi I, Haramura G, Pfliegler G, Mikkola H, Muszbek L. Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. (2000) *Blood* 96, 2479-86. Impact factor: 8.782
- III. Kárpáti L, Penke B, **Katona É**, Balogh I, Vámosi G, Muszbek L. A modified, optimised kinetic photometric assay for the determination of blood coagulation factor XIII activity in plasma. (2000) *Clin. Chem.* 46, 1946-55. Impact factor: 3.769
- IV. **Katona É**, Ajzner É, Tóth K, Kárpáti L, Muszbek L. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. (2001) *J. Immunol. Meth.* 258, 127-35. Impact factor: 1.950

A tézisekben fel nem használt egyéb közlemények:

1. Ladányi É, Debreczeni M, **Katona É**, Pogány Zs, Erdei J, Fachel J. (1987). Fibronektin szint meghatározás ELISA technikával monoklonális ellenanyag felhasználásával progresszív szisztémás szklerózisban és morpheaban. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle* 63: 193-196.
2. Juhász I, Debreczeni M, **Katona É**, Nagy E. (1987). Plasma fibronectin concentrations in burned patients. *International Congress on Burn Treatment, Congress proceedings, Kosice, Czechoslovakia, 27-29.*
3. Nagy B, **Katona É**, Erdei J, Székely E, Márialigeti T, Karmazsin L, Fachel J.(1988). Fibronectin in Bronchoalveolar Lavage Fluid and Plasma from Children with Chronic Inflammation of Lungs. *Acta Paediatr. Scand.* 77: 727-733. Impact factor: 1,058
4. Nagy B, **Katona É**, Erdei J, Maródi L, Székely E, Márialigeti T, Karmazsin L, Fachel J. (1988-89). Fibronectin on the bronchoalveolar surface in children with recurrent obstructive bronchitis. *Acta Paediatr. Hung.* 29 (3-4), 261-269.
5. Fachel J, Ábel G, Jusupova S, Imre S, **Katona É**, Erdei J, Szöllösi J, Chihara G. (1989). Potentiation of non-specific host defence by polysaccharides like lentinan: possible mechanisms. *Int. J. Immunotherapy* V (4): 167-176. Impact factor: 3.059
6. Nagy B, **Katona É**, Erdei J, Karmazsin L, Fachel J. (1991). Fibronectin in Bronchoalveolar Lavage Fluid and Plasma of Dogs with Acute Inflammation

of Lungs. Acta Path. Micr. Immun. Scand. (APMIS) 99, 387-390. Impact factor: 0,855

7. Remenyik É, **Katona É**, Debreczeni M, Bégány Á. (1992). Fibronectin in hypersensitive vasculitis. Experimental Dermatol Abs. 1:109.
8. Udvardy M, Hársfalvi J, Pócsán E, Káplár M, **Katona É**, Rák K. (1994). A primer haemostasis adhezív tényezői és a máj fibrogenézis kapcsolata alkoholos májcirrhosisban. Orvosi Hetilap 135, 523-526.
9. Tóth Gy, Kerekes A, **Katona É**, Facht J. (1995). Az egészséges újszülöttek és koraszülöttek plasmafibronectin-szintjének alakulása az első életnapokban. Gyermekgyógyászat 6, 567-570.
10. Nógrády N, Pócsi I, **Katona É**, Jeney V, Boross P, Tôzsér J, Facht J. and Szentirmai A. (1996). Soluble cell-bound and extracellular cyclodextrin glycosyltransferases of *Bacillus macerans* show identical enzymological characteristics and antigenicity. J. Basic Microbiol. 36 (5), 335-340. Impact factor: 0,753
11. Nógrádi N, Pócsi I, Paffard SM, **Katona É**, Miles RJ, Balázs A, Facht J, Price RG and Szentirmai A. (1998). Development of ELISA and enzyme-linked immunofiltration assay (ELIFA) methods for monitoring cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) production and bacterial growth in *Bacillus macerans* batch cultures. J Biotechnol. 60, 15-22. Impact factor: 1,458

12. Wei SM, **Katona É**, Fachet J, Fülöp T Jr, Robert L and Jacob MP (1998). Epitope specificity of monoclonal and polyclonal elastin antibodies. Int. Arch. Allergy Immunol. 115. 33-41. Impact factor: 1,911
13. Nagy B, **Katona É**, Varga A, Baktai Gy, Kovács L, Márialigeti T. Fibronectin a légzőrendszer "remodelling"-jében krónikus tüdőbeteg gyermekekben . (2000) Gyermekgyógyászat 2, 145-152.
14. Kappelmayer J, Simon Á, **Katona É**, Kiss A, Kiss Cs, Muszbek L. Flow cytometric analysis of coagulation factor XIII in normal and malignant haematopoiesis by novel monoclonal antibodies. Leukemia (közlésre benyújtva)