

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

KATONA ÉVA



**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
KLINIKAI BIODÉJÁRI ÉS MOLEKULÁRI PATOLÓGIÁI INTÉZET
DEBRECEN, 2001.**

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.

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	3
Célkitűzés.....	7
Anyagok és módszerek.....	9
Eredmények.....	13
Megbeszélés.....	18
A tézisekben előforduló hivatkozások jegyzéke.....	22
A téziseket megalapozó közlemények jegyzéke.....	27
A tézisekben fel nem használt egyéb közlemények.....	28
Köszönetnyilvánítás.....	31
Függelék – Rövidítések jegyzéke.....	32
A tézisek alapjául szolgáló közlemények.....	33

Bevezetés

A XIII-as faktort (FXIII) először Laki és Lóránd írta le 1948-ban mint „fibrin stabilizáló faktor”-t (1). A későbbiekben Loewy és munkatársai izolálták és jellemezték a fehérje enzim tulajdonságát (2-6). 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 FXIII struktúrájáról és funkciójáról felhalmozódott ismeretek összefoglalását megtalálhatjuk Muszbek és munkatársai közleményében (7).

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 (8). A plazma és celluláris forma elsődleges szerkezete azonos. Az aktív centrumban, a 314-es pozícióban cisztein található, mely körül a transz glutaminázokra 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 transz glutaminázzá (FXIIIa) alakul. A FXIIIa, mint a transz glutaminázok 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 alvadéket 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 (9-11), a thrombocyták FXIII-A₂ tartalma normális.

A FXIII-A hiány súlyos vérzékenységet okoz (12, 13), 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 öröklésmentű. 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. gyulladásos bélbetegségek aktív szakasza, malignus haematológiai kórképek, súlyos májbetegségek, Henoch Schönlein purpura, (13-14). Ezekben az esetekben a FXIII koncentrációja széles sávban mozog, a vérzéses tünetek súlyossága nagyon változatos.

Emelkedett FXIII szintet mértek atherosclerosisban (15), angiopathiában (16) és emelkedett megakaryocita aktivitással járó krónikus leukaemiában (17).

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 (18, 19, 20). 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 (21), radioaktív izotóppal jelzett (22) vagy biotinált (23) 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 (24-28). Egy kivételével ezek mindegyike az A vagy a B alegységet határozta meg. Yorifuji (27) 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.

A felhasznált anyagok és módszerek részletes leírása az I. közleményben található.

Egér monoklonális antitestek előállítása

A monoklonális antitestek előállításához Balb/c egereket immunizáltunk a tisztított preparátumokkal az I. közlemény megfelelő fejezetében leírt protokoll szerint. Az immunizált egér lépsejtjeit Sp-2/o myeloma sejtvonal sejtjeivel fuzionáltattuk (29, 30). A hibridómák antitest termelését indirekt ELISA módszerrel vizsgáltuk. A pozitív sejtvonalakat határhígításos 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 antigénekkkel.

Az anti-FXIII-A antitestek epitóp specificitását kompetíciós direkt ELISA-val valamint indirekt ELISA-ban az additivitási indexek számolásával vizsgáltuk (IV. közlemény, 11. oldal, 2. 6. fejezet).

Monoklonális antitestek jelölése

A tisztított és megfelelő kritériumok szerint kiválasztott antitesteket vagy torna peroxidáz enzimmel (HRPO) konjugáltuk (31) vagy biotinnal jelöltük cukor oldalláncon keresztül (32).

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 (I. közlemény, 269. oldal, Assay Procedure fejezet) és a FXIII-A alegység (IV. közlemény, 10. oldal 2. 5. fejezet) 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. közlemény 269. oldalán a harmadik bekezdésben található.

Thrombocyta lizátum készítése

A thrombocyta lizátumot 41 egészséges véradó mosott thrombocyta szuszpenziójából készítettük. A részletes leírás a IV. közlemény 9. oldalának első bekezdésében található.

Más módszerek

A FXIII aktivitás meghatározása az intézetünkben kifejlesztett spektrofotometriás módszerrel történt, mely szubsztrátként egy szintetikus 12 tagú peptidet és glicin etilésztert használ (20).

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 (33).

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 már korábban leírtak alapján (34). 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 sejtösszetételt May-Grünwald-Giemsa festés után kenetből számoltuk. A

mosófolyadék albumin koncentrációját immunefelometriával 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 (35) 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. Egy lépéses 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 (I. közlemény 1. ábra). 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 (I. közlemény, 2. ábra), fiziológiás koncentrációban jelenlévő fibrinogén és más plazma komponensek az antitestek kötődését nem zavarják (I. közlemény, 1. táblázat).

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 (I. közlemény, 2. táblázat).

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 (III. közlemény, 6. ábra).

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. közlemény, 3. ábra).

II. Egylépeses 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 (IV. közlemény 3.1. fejezet, 1. ábra). A 3A6H7 antitestet biotináltuk, a 3B2H12 antitestet HRPO enzimmel jelöltük és egy a plazma FXIII ELISA-val megegyező elven működő ELISA módszert dolgoztunk ki (IV. közlemény 2.5. fejezet).

A kidolgozott módszer mérési tartománya 0,4 - 40 $\mu\text{g/L}$, érzékenysége a normál plazma koncentráció 0,04 % -ának meghatározását is lehetővé teszi (IV. közlemény 3.2. fejezet). A módszer azonos mértékben mutatja ki a FXIII-A alegységet a plazmában és a celluláris formában (IV. közlemény 3. ábra).

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 (IV. közlemény 4. ábra). A FXIII-A ELISA-val mért eredmények az aktivitás mérés eredményeivel is jó korrelációt mutattak ($r= 0,870$) (IV. közlemény 5. ábra).

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.

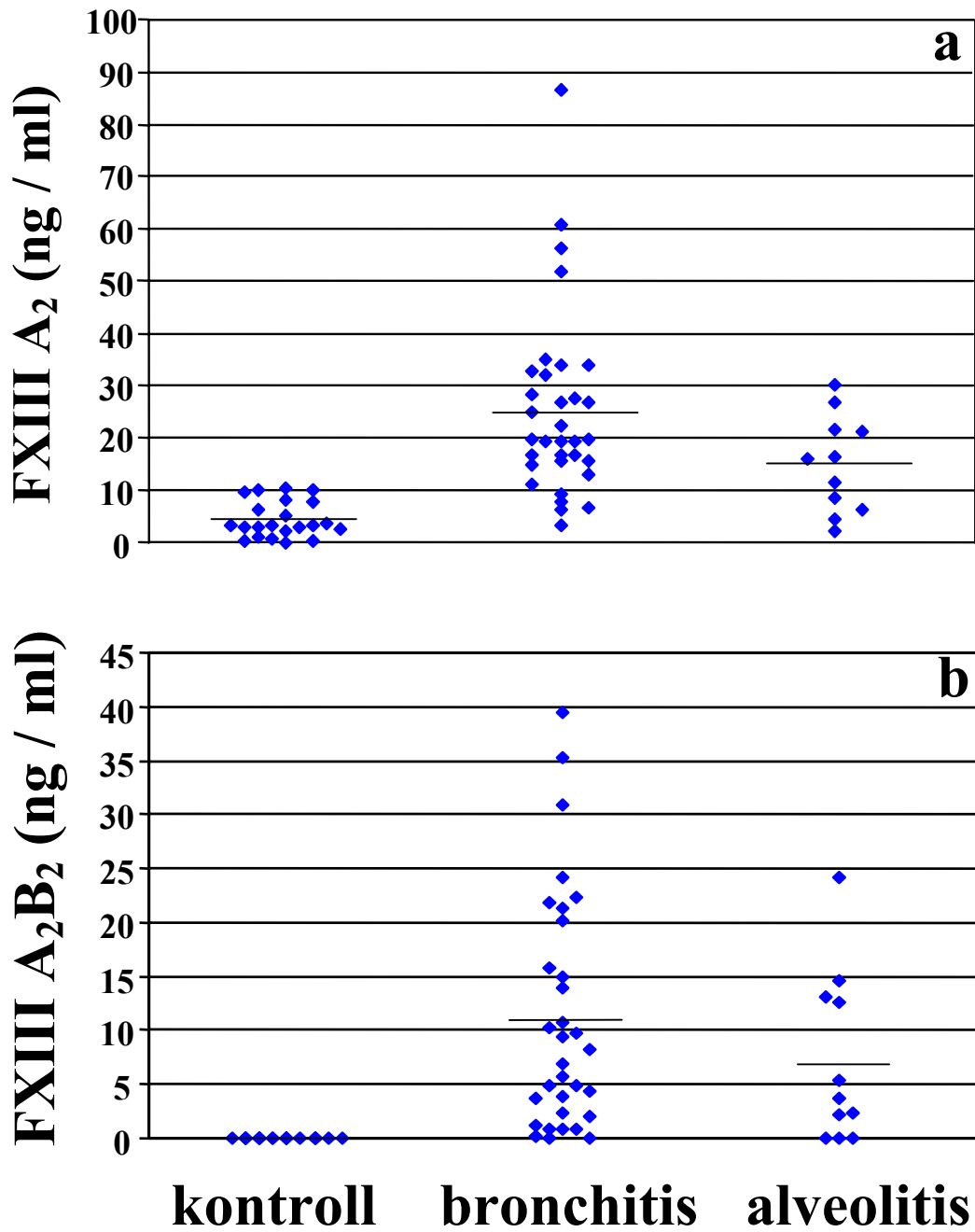
Bronchoalveoláris mosófolyadék FXIII koncentrációjának meghatározása

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 ($4,43 \pm 3,43$ µg/L). Súlyos bronchitis és alveolitis esetén a mosófolyadékok FXIII-A₂ koncentrációja szignifikánsan megemelkedett ($25,23 \pm 16,9$ ill. $15,1 \pm 9,2$ µg/L) és megjelent a FXIII-A₂B₂ ($11,0 \pm 10,9$ ill. $7,1 \pm 7,9$ µg/L) ami a plazmából történő átszűrődést jelez igazolható vérzés nélkül (1. ábra). A mért FXIII koncentrációkat a mosófolyadékok albumin koncentrációjára vonatkoztatva a két betegcsoportban szintén szignifikáns emelkedést tapasztaltunk (1. táblázat).

1. táblázat

A BAL mosófolyadék minták albuminhoz viszonyított relatív FXIII A₂ és FXIII A₂B₂ koncentrációja

	Bronchitis (n=33) átlag ± SD	Alveolitis (n=11) átlag ± SD	Kontroll (n=22) átlag ± SD
FXIII A ₂ /albumin µg/mg	$0,23 \pm 0,13$	$0,16 \pm 0,15$	$0,10 \pm 0,06$
FXIII A ₂ B ₂ /albumin µg/mg	$0,10 \pm 0,12$	$0,04 \pm 0,04$	0
Albumin mg/L	$117 \pm 69,7$	$148,5 \pm 129,9$	$43,9 \pm 28,4$



1. Ábra

Bronchoalveoláris mosófolyadék minták **a**: FXIII-A és **b**: plazma FXIII A₂B₂ koncentrációja különböző betegcsoportokban: krónikus bronchitis (n=33), alveolitis (n=11), kontroll (n=22).

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 (24-28). 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 (27). 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 enzimmel, a másik anti-FXIII-A és az anti-FXIII-B antitesteket biotinnal jelöltük. A HRPO enzimmel 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 gyulladással járó 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) (27). A koncentrációk eloszlása a

normál eloszlást követte, a nemek között nem találtunk eltérést. A Val34Leu mutáció nem befolyásolta a FXIII plazma szintjét.

A tézisekben előforduló hivatkozások jegyzéke

1. Laki K, Lóránd L. On the solubility of fibrin clots. *Science* 1948;108:280.
2. Loewy AG, Veneziale C, Forman M. Purification of the factor involved in the formation of urea-insoluble fibrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1957;26:670-1.
3. Loewy AG, Dunathan K, Kriel K, Wolfinger J. Fibrinase I. Purification of substrate and enzyme. *J. Biol. Chem.* 1961;236:2625-33.
4. Loewy AG, Dunathan K, Kriel K, Wolfinger J. Fibrinase II. Some physical properties. *J. Biol. Chem.* 1961;236: 2634-43.
5. Loewy AG, Dunathan K, Kriel K, Wolfinger J. Fibrinase III. Some enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* 1961;236: 2644-7.
6. Loewy AG, Dunathan K, Kriel K, Wolfinger J. Fibrinase IV. Effect on fibrin solubility. *J. Biol. Chem.* 1961;236:2648-55.
7. Muszbek L, Yee VC, Hevessy Zs. Blood coagulation factor XIII: Structure and function. *Thromb. Res.* 1999;94:271-305.
8. Takahashi N, Takahashi Y, Putnam FW. Primary structure of blood coagulation factor XIIIa (fibrinoligase, transglutaminase) from human placenta. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1986;83:8019-23.

9. Saito M, Asakura H, Yoshida T, Ito K, Okafuji K, Matsuda T. A familial factor XIII subunit B deficiency. *Br J Haematol* 1990;74:290-4.
10. Toretto A, Castaman G, Rodeghiero F. Abnormal plasma factor XIII subunit A with fully functional platelet FXIII in a family with congenital deficiency of FXIII subunit B. *Thromb Haemost* 1993;69:1295a.
11. Izumi T, Hashiguchi T, Castaman G, Toretto A, Rodeghiero F, Girolami A, Ichinose A. Type I factor XIII deficiency is caused by a genetic defect of its B subunit: Insertion of triplet AAC in exon III leads to premature termination in the second Sushi domain. *Blood* 1996;87:2769-74.
12. Lorand L, Losowsky MS, Miloszewski KJA. Human factor XIII: fibrin stabilising factor. *Prog Haemost Thromb* 1980;5:245-90.
13. Board PG, Losowsky MS, Miloszewski KJA. Factor XIII: inherited and acquired deficiency. *Blood Rev* 1993;7:229-42.
14. Anwar R, Miloszewski KJA. Factor XIII deficiency. *Brit J Haematol* 1999;107:468.
15. Kloczko J, Wojtukiewicz M, Bielawiec M, Zuch A. Alterations of haemostasis parameters with special reference to fibrin stabilization factor XIII and fibronectin in patients with obliterative atherosclerosis. *Thromb Res* 1988;51:575-81.

16. Kloczko J, Wojtukiewicz M, Bielawiec M, Zarzycka B, Kinalska I. Plasma factor XIII and some other haemostasis parameters in patients with diabetic angiopathy. *Acta Haematol* 1986;76:81-5.
17. Muszbek L, Polgár J, Kiss A, Ádány R, Páloczy K, Telek B, Berkessy S, Szegedi G. Factor XIII of blood coagulation in malignant haematological diseases. In: Muszbek L, ed. *Haemostasis and cancer*. Boca Raton CRC Pres, 1987:125-34.
18. Muszbek L, Polgár J, Fésüs L. Kinetic determination of blood coagulation factor XIII in plasma. *Clin Chem* 1985;31:35-40.
19. Fickenscher K, Aab A, Stuber W. A photometric assay for blood coagulation factor XIII. *Thromb Haemost* 1991;65:535-40.
20. Kárpáti L, Penke B, Katona É, Balogh I, Vámosi Gy, Muszbek L. A modified, optimized kinetic photometric assay for the blood coagulation factor XIII activity in plasma. *Clin Chem* 2000;46:1946-55.
21. Lorand L, Urayama T, deKiewiet JWC, Nossel HL. Diagnostic and genetic studies on fibrin-stabilising factor with a new assay based on amine incorporation. *J Clin Invest* 1969;48:1054-64.
22. Lorand L, Campbell-Wilkes LK, Cooperstein L. A filter paper assay for transamidating enzymes using radioactive amine substrates. *Anal Biochem* 1972;50:623-31.

23. Song YC, Sheng D, Taubenfeld SM, Matsueda GR. A microtiter assay for factor XIII using fibrinogen and biotylcadaverine as substrates. *Anal Biochem* 1994;223:88-92.
24. Barbui T, Rodeghiero F, Dini E, Mariani G, Papa ML, de Biasi R, Cordero Murillo R, Montero Umana C. Subunit A and S inheritance in four families with congenital factor XIII deficiency. *Brit J Haematol* 1978;38:267-71.
25. Skrzynia C, Reisner HM, McDonagh J. Characterisation of the catalytic subunit of factor XIII by radioimmunoassay. *Blood* 1982;60:1089-95.
26. Ikematsu S, McDonagh RP, Reisner HM, Skrzynia C, McDonagh J. Immunochemical studies of human factor XIII. Radioimmunoassay for the carrier subunit of the zymogen. *J Lab Clin Med* 1981;97:662-71.
27. Yorifuji H, Andersson K, Lynch GV, Van de Water L, McDonagh J. B protein of factor XIII: Differentiation between free B and complexed B. *Blood* 1988;72:1645-50.
28. Anwar R, Gallivan L, Edmonds SD, Markham AF. Genotype/phenotype correlations for coagulation factor XIII: specific normal polymorphisms are associated with high or low factor XIII specific activity. *Blood* 1999;93:897-905.
29. Stahli C, Staehelin T, Miggiano V, Schmidt J, Haring P. High frequencies of antigen specific hybridomas: Dependence on

- immunisation parameters and prediction by spleen cell analysis. *J Immunol Meth* 1980;32:297-309.
- 30.Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody predefined specificity. *Nature* 1975;256:495-506.
- 31.Wilson MB, Nakane PK. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: *Immunofluorescence Related Staining Techniques*. Knapp W, Holubar K, Wick G, eds. Amsterdam: Elsevier 1978;215-20.
- 32.O'Shannessy DJ. Antibodies biotinylated via sugar moieties. *Methods Enzymol* 1990;184:162-6.
- 33.Balogh I, Szőke G, Kárpáti L, Wartiovaara U, Katona É, Komáromi I, Haramura G, Pfiégler Gy, Mikkola H, Muszbek L. *Blood* 2000;96:2479-86.
- 34.Nagy B, Katona É, Erdei J, Székely E, Márialigeti T, Karmazsin L, Fachet J. Fibronectin in bronchoalveolar lavage fluid and plasma from children with chronic inflammation of lungs. *Acta Paediatr Scand* 1988;77:727-733.
- 35.Linnet K. Evaluation of regression procedures for methods comparison studies. *Clin Chem* 1993;39:424.

A téziseket megalapozó közlemények

- I. **Katona É**, Haramura G, Kárpáti L, Fachel 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. *J. Immunol. Meth.* (közlésre elfogadva) Impact factor:1.950

A tézisekben fel nem használt egyéb közlemények:

1. Ladányi É, Debreczeni M, **Katona É**, Pogány Zs, Erdei J, Fachet 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, Fachet 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, Fachet J. (1988-89). Fibronectin on the bronchoalveolar surface in children with recurrent obstructive bronchitis. *Acta Paediatr. Hung.* 29 (3-4), 261-269.
5. Fachet 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, Fachet 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, Pósan 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**, Fachel J. (1995). Az egészséges újszülöttek és koraszülöttek plazmafibronectin-szintjének alakulása az elsô életnapokban. Gyermekgyógyászat 6, 567-570.
10. Nógrády N, Pócsi I, **Katona É**, Jeney V, Boross P, Tözsér J, Fachel 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, Fachel 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**, Fachel J, Fülöp TJr, 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. Brit J Haematol (közlésre benyújtva)

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Muszbek László akadémikusnak, hogy biztosította számomra a kutatáshoz szükséges feltételeket; külön köszönettel tartozom az erkölcsi és szakmai támogatásáért.

Köszönettel tartozom Dr. Facht József professzor úrnak, hogy a témaválasztáshoz hozzájárult, valamint biztosította a munkához szükséges feltételeket az Immunológiai Intézetben.

Köszönöm Dr. Nagy Bélának, hogy a FXIII meghatározásokhoz a bronchus mosófolyadék mintákat rendelkezésemre bocsátotta és az eredmények értékelésében segítségemre volt.

Köszönöm Dr. Balogh István munkáját, aki a Val34Leu polimorfizmust vizsgálta és Dr. Kárpáti Leventének, hogy a FXIII enzimaktivitás méréseket elvégezte.

Köszönöm Élesné Tóth Katalin és Haramura Gizella asszisztenseknek lelkes, segítőkész munkáját.

Az Immunológiai Intézet és a Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézet valamennyi dolgozójának és családomnak köszönöm, hogy jó légkörben, nagy kedvvel dolgozhattam.

FÜGGELÉK

Rövidítések jegyzéke

FXIII: XIII-as véralvadási factor

FXIII(A2B2): plazma FXIII

FXIII(A2): celluláris FXIII

FXIIIa: aktivált FXIII

FXIII-A: FXIII A alegység

FXIII-B: FXIII B alegység

α 2-PI: α 2-plazmin inhibitor

HRPO: torma peroxidáz enzim

ACRS: amplification created restriction site

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

BAL: bronchoalveolar lavage