

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**Az V-ös faktor Leiden mutációjának trombomodulin
függő hatása a XIII-as faktor aktivációra, a fibrin- és
az alfa-2-plazmin inhibitor közti keresztkötések
kialakulására valamint a fibrinolízis folyamatára**

Dr. Koncz Zsuzsa

Témavezető:

Prof. Dr. Muszbek László
akadémikus



Debreceni Egyetem
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2012

TARTALOMJEGYZÉK

ÖSSZEFOGLALÁS.....	3
SUMMARY.....	5
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	7
BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
CÉLKITŰZÉSEK.....	19
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	20
<i>Vizsgálati alanyok.....</i>	20
<i>Plazma minták előkészítése.....</i>	20
<i>FV izolálása kevert plazmákból.....</i>	21
<i>FXIII aktivációja különböző FV_{Leiden} genotípusú plazmákban.....</i>	22
<i>SDS-PAGE és Western blotting technika.....</i>	23
<i>In vitro alvadék lízis vizsgálatok.....</i>	25
<i>Statisztikai analízis.....</i>	26
EREDMÉNYEK	
1. A FV_{Leiden} mutáció rhTM-től függő hatása a FXIII aktivációra.....	27
1.1 Az rhTM hatása a FXIII aktivációra különböző FV genotípusú plazmákban.....	27
1.2 rhTM hatása a FXIII aktivációra izolált vad típusú FV-tel illetve FV _{Leiden} -nel kiegészített FV hiányplazmában.....	32
2. A FV_{Leiden} mutáció rhTM-től függő hatása a FXIIIa által katalizált fibrin keresztkötések kialakulására.....	34
3. A FV_{Leiden} mutáció rhTM függő hatása az aktív FXIII által szabályozott α_2-PI és fibrin közti keresztkötések képződésére.....	36
3.1 Az rhTM hatása az α_2 -PI-fibrin keresztkötések képződésére különböző FV genotípusú egyénekből származó plazmákban.....	36

3.2 Az <i>rhTM</i> hatása az α_2 -PI-fibrin keresztkötésre izolált vad típusú FV-tel illetve <i>FV_{Leiden}</i> -nel kiegészített FV hiányplazmában.....	40
4. Az <i>rhTM FV_{Leiden}</i> függő hatása a <i>tPA</i> indukálta fibrinolízisre.....	43
MEGBESZÉLÉS.....	46
IRODALOMJEGYZÉK.....	51
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK.....	54
TÁRGYSZAVAK.....	55
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	56
FÜGGELÉK.....	57
NEMZETKÖZI- ÉS HAZAI KONFERENCIÁKON TARTOTT ELŐADÁSOK, BEMUTATOTT POSZTEREK.....	57

ÖSSZEFOGLALÁS

Az V-ös faktor Leiden mutációja (FV_{Leiden}) egy relatíve gyakori mutáció a kaukázusi populációban, mely heterozigóták esetén 5-8-szoros, homozigótákban 50-80-szoros vénás tromboembóliás rizikót jelent. FV_{Leiden} esetén az aktív FV (FVa) és a FV aktivált protein C (APC) indukálta proteolitikus hasítása gátolt, így a trombin generáció csökkenése elmarad és a prokoaguláns aktivitás down-regulációja, illetve a FV antikoaguláns hatása is gátolt. A FV_{Leiden} trombin generáción túlmutató közvetett hatásai kevésbé ismertek, így pl. a mutációnak a XIII-as faktor (FXIII) aktivációra, az alvadék keresztkötéseinek kialakulására gyakorolt hatását eddig nem vizsgálták.

Munkánkban tizenöt egészséges, ismert FV_{Leiden} genotípusú egyén plazmájában a vérалvadás fiziológiás, extrinszik útját rekombináns humán szöveti faktort, foszfolipidet és Ca^{2+} -ot tartalmazó oldattal aktiváltuk rekombináns humán trombomodulin (rhTM) jelenlétében és hiányában. A különböző időközökben nyert alvadékokat SDS-PAGE és Western blotting technikákkal analizáltuk, majd a FXIII aktiválódás, a fibrin keresztkötések illetve az alfa-2-plazmin inhibitor (α_2 -PI) és fibrin közti keresztkötések kialakulásának mértékét kvantitatív denzitometriával értékeltük. Kísérleteinket tisztított, vad típusú FV-tel illetve homozigóta mutáns FV_{Leiden} -nel kiegészített FV hiányos plazmákkal is elvégeztük. Az rhTM-nek a szöveti plazminogén aktivátorral (tPA) indukált alvadék lízisre kifejtett in vitro hatását turbidimetriás módszerrel vizsgáltuk FV vad típusú FV_{Leiden} homozigóta egyénektől nyert plazmákban.

A FV vad típusú egyének plazmájában az rhTM jelentősen lelassította a FXIII aktivációját, a fibrin γ -láncok dimerizációját illetve a α_2 -PI-fibrin α -lánc közti heterodimerek/oligomerek kialakulását. Az rhTM-nek ez a hatása FV_{Leiden} hordozók esetében csak elhanyagolható mértékben érvényesült. Az rhTM lelassította a tPA-indukált alvadék lízisét és ez a hatás kifejezettebb volt a FV_{Leiden} hordozó egyének plazmájában. Amennyiben a

trombin által aktiválható fibrinolízis inhibitor aktív formájának (TAFIa) hatását karboxipeptidáz gátló szer hozzáadásával felfüggesztettük, rhTM jelenlétében a lízis idő a FV vad típusú plazmákban jelentősen megrövidült, ami a lassúbb α_2 -PI-fibrin keresztkötések kialakulásával magyarázható. Ez a hatás a FV_{Leiden} hordozók esetében nem volt megfigyelhető.

A FV_{Leiden} hordozók plazmájában az rhTM-nek a FXIII aktivációra, a fibrin láncok keresztkötésére, illetve a α_2 -PI-fibrin keresztkötések kialakulására kifejtett késleltető hatása nem érvényesül, és ez az alvadék fibrinolízisének gátlásához vezet. Eredményeink a FV_{Leiden} mutáció trombózis hajlamot fokozó hatásának új biokémiai mechanizmusára világítanak rá.

SUMMARY

Factor V Leiden mutation (FV_{Leiden}) mutation is common among Caucasians and it is associated with a 5-8-fold increased risk of venous thromboembolism in heterozygotes and with a 50-80-fold risk among homozygotes. FV_{Leiden} is associated with an impaired down-regulation of the procoagulant activity exerted by activated FV and with the loss of FV anticoagulant function; hereby it compromises the down-regulation of thrombin generation. The downstream consequences of FV_{Leiden}, which might be connected to increased thrombin generation, have been revealed only partially. The effect of FV_{Leiden} on factor XIII (FXIII) activation, on the cross-linking of fibrin chains and α_2 -plasmin inhibitor (α_2 -PI) to fibrin has not been investigated.

In the plasma samples of fifteen healthy individuals with known FV_{Leiden} genotype the physiological, extrinsic pathway of coagulation was initiated by recombinant human tissue factor, phospholipids and Ca^{2+} in the presence and absence of recombinant human thrombomodulin (rhTM). Clots were recovered after various time intervals, the extent of FXIII activation, fibrin cross-linking and α_2 -PI-fibrin cross-linking were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting, then quantified by densitometry. The experiments were also carried out using FV deficient plasma supplemented with purified wild type FV or FV_{Leiden}. The effect of rhTM on tissue plasminogen activator (tPA) induced clot lysis was measured by turbid metric method.

RhTM significantly delayed the activation of FXIII, fibrin cross-linking and the formation of α_2 -PI-fibrin α -chain heterodimers/oligomers in the plasma from FV wild type individuals. This effect of rhTM was impaired in the presence of FV_{Leiden}. RhTM delayed tPA-induced clot lysis and this effect of rhTM was more pronounced in plasma containing FV_{Leiden}. When active thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFIa) was inhibited by carboxypeptidase inhibitor, rhTM accelerated clot lysis in the presence of wild type FV,

which is explained by the delayed α_2 -PI-fibrin cross-linking. This effect of rhTM did not prevail in the presence of FV_{Leiden}.

FV_{Leiden} abrogates the delaying effect of rhTM on FXIII activation, on fibrin chain cross-linking and on α_2 -PI-fibrin cross-linking, which contribute to the impaired fibrinolysis. Our results reveal a novel mechanism that contributes to the increased thrombosis risk in FV_{Leiden} carriers.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

α_2 -PI:	alfa-2-plazmin inhibitor
APC:	aktivált protein C
Asn1- α_2 -PI:	az alfa-2-plazmin inhibitor antiplazmin hasító enzim által hasított, N-terminálisan aszparagint tartalmazó izoformája
APCE:	antiplazmin hasító enzim (antiplasmin cleaving enzyme)
CPI:	karboxipeptidáz inhibitor
FV:	V-ös faktor
FVa:	aktív V-ös faktor
FV _{Leiden} :	V-ös faktor Leiden mutációval
FVIIa:	aktív VII-es faktor
FVIIIa:	aktív VIII-as faktor
FX:	X-es faktor
FXa:	aktív X-es faktor
FXIII:	XIII-as faktor
FXIIIa:	aktív XIII-as faktor
FXIII-A:	a XIII-as faktor A alegysége
FXIII-A':	trombin által hasított XIII-as faktor A alegység
FXIII-A ₂ :	XIII-as faktor A alegység homodimer
FXIII-A ₂ B ₂ :	a XIII-as faktor heterotetramer szerkezetű formája
FXIII-B:	a XIII-as faktor B alegysége
Met1- α_2 -PI:	az alfa-2-plazmin inhibitor nem hasított, N-terminálisan metionint tartalmazó izoformája
PAI-1:	1-es típusú plazminogén aktivátor inhibitor

PDP:	trombocita-mentesített plazma (platelet depleted plasma)
PPACK:	D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginin chloromethyl ketone
rhTM:	rekombináns humán trombomodulin
SDS-PAGE:	sodium dodecil szulfát poliacrilamid gél elektroforézis
T _{1/2} :	50%-os FXIII aktivációhoz és a keresztkötések 50%-ának kialakulásához szükséges idő
TAFI:	trombin által aktiválható fibrinolízis inhibitor
TAFIa:	trombin által aktiválható fibrinolízis inhibitor aktív formája
TF:	szöveti faktor (tissue factor)
TM:	trombomodulin
tPA:	szöveti plazminogén aktivátor (tissue plasminogen activator)

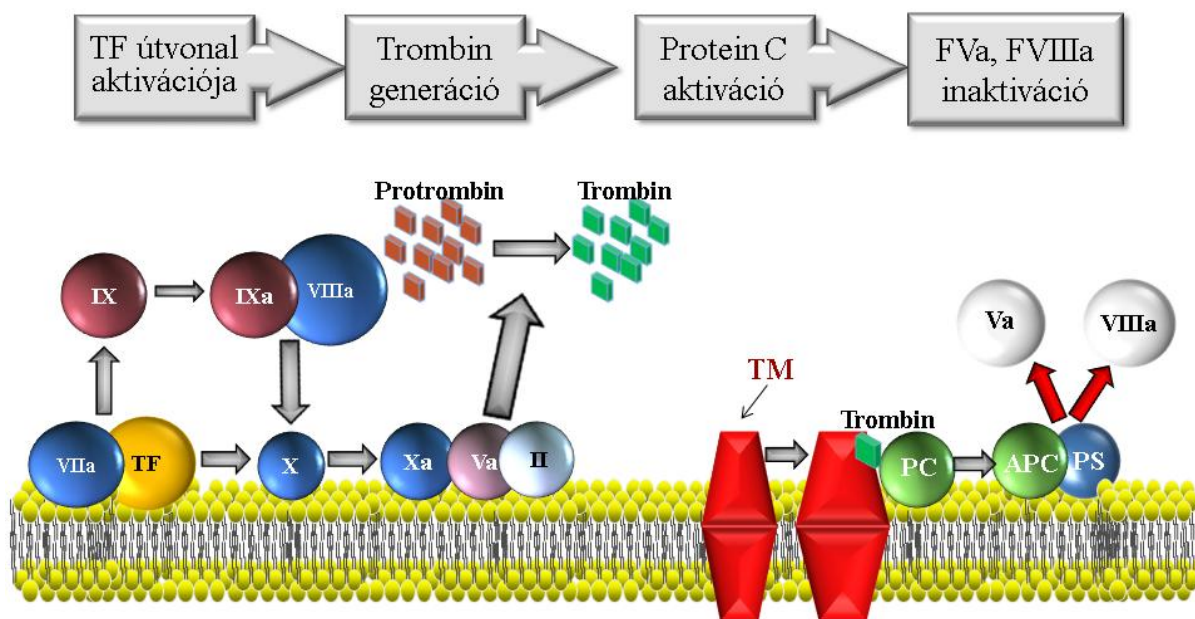
BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A hemosztázis kettős feladattal bír: egyrészt folyékony állapotban tartja a vért az érpályán belül, másrészt az érfal sérülése esetén a vérzés mielőbbi megszüntetésére törekszik, hogy a vérvesztést minimalizálja. A normál hemosztázis a természetes prokoaguláns és antikoaguláns rendszerek egyensúlyát és finom szabályozását igényli.

A prokoaguláns rendszer aktiválódásának feltétele az erek falában levő szöveti faktor (TF) véráramba való bekerülése, vagy a sejtek felületén expresszálandó TF kontaktusa az áramló vérrel. A vérárammal kontaktusba került TF komplexet képez a plazmában lévő VII-es faktorról, ill. annak aktív formájával (FVIIa) és Ca^{2+} jelenlétében kialakul egy tenáz komplex, amely az alvadás kezdeti fázisában közvetlenül hasítja a X-es faktort (FX), ezáltal azt aktív formává (FXa) alakítja. Az alvadás későbbi fázisában ezt a direkt FX aktivációt a szöveti faktor út inhibitora blokkolja és az indirekt FX aktiváció kerül előtérbe. A TF-FVIIa komplex ugyanis aktiválja a FIX-et is. A FIXa és az aktivált VIII-as faktor (FVIIIa) az aktivált trombociták foszfolipid felszínén Ca^{2+} jelenlétében komplexet képez (második tenáz komplex), amely az alvadás második, ún. propagációs fázisában végzi a FX aktivációját. A FXa kofaktorával, a FVa-val (szintén az aktivált trombociták foszfolipid felszínén, és szintén Ca^{2+} jelenlétében) protrombináz komplexet képez, ami a protrombint trombinná alakítja. A trombin a véralvadásban multifunkcionális kulcsenzime, aminek számos hatása van. A fibrinogén A α -, és B β -láncából lehasítja a fibrinopeptid A-t, ill. fibrinopeptid B-t és spontán polimerizálódó fibrin monomerek keletkeznek. Ugyanakkor aktiválja a vérlemezkéket, ami a vérlemezkék aggregációjához, a granulumokból történő szekrécióhoz és a vérlemezke membrán prokoaguláns hatásának kialakulásához vezet. Mindemellett a trombin aktiválja a FXIII-t, ami keresztkötések kialakításával stabilizálja a keletkező fibrin alvadékokat. Egy pozitív visszacsatoláson keresztül a trombin modulálja saját aktivációját azáltal, hogy aktiválja a FV-t, FVIII-t és FXI-et. Utóbbi aktív formája (FXIa) a FIX aktivátora. A FVa és FVIIIa együttesen milliószorosára növelik a trombin képződését, így a trombin generáció

egyik legjelentősebb kontrollját képezik.¹ A fentiek a véralvadás aktivációjának egy szimplifikált változatát mutatják be, a valóságban a szabályozás még bonyolultabb, több pozitív és negatív visszacsatolást involvál.

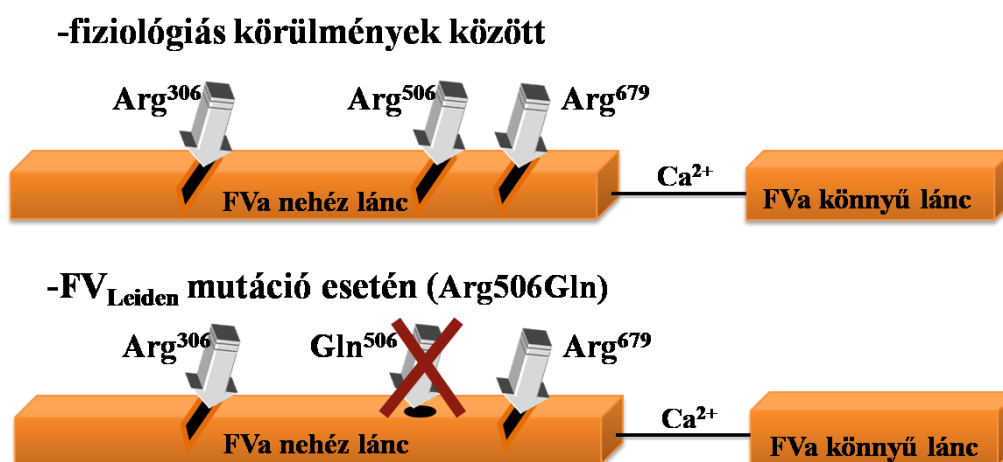
Az antikoaguláns rendszer az inaktívátor protein C/protein S rendszerből illetve a trombin, a FXa-t és egyéb aktív alvadási faktorokat is gátló inhibitorból, az antitrombin III-ból áll. Az inaktívátor rendszer a prokoaguláns rendszerrel együtt trombin hatására aktiválódik. A dolgozat témájára való tekintettel fontos megjegyezni, hogy trombomodulin (TM) hiányában a folyamat csupán a trombin generációig jut el, viszont TM jelenlétében a folyamat tovább halad, a trombin-trombomodulin komplex hatására a plazmában keringő protein C aktív enzimmé (APC) alakul. Az APC kofaktora, a protein S jelenlétében fejt ki inaktívátor hatását a FVa és FVIIIa proteolitikus inaktivációja révén. (1. ábra)



1. ábra. A szöveti faktor útvonal sémás ábrázolása. *TM hiányában a folyamat a trombin generációig jut el, míg TM jelenlétében aktiválódik az inaktívátor rendszer.*

Mind a prokoaguláns mind az antikoaguláns rendszerben bekövetkezhetnek olyan elváltozások, melyeket szerzett vagy öröklött tényezők idézhetnek elő. A vérzéses klinikai

tünetekkel járó örökletes betegségek már évszázadok óta ismertek, viszont a trombózist okozó örökletes tényezők többsége csak az elmúlt fél évszázadban került leírásra. Ezek az öröklött trombofiliák magukba foglalják az APC rezisztenciát okozó FV_{Leiden} mutációt, a protrombin G20210A allél jelenlétét, a protein C, protein S és antitrombin III deficienciákat. A dolgozat témájára való tekintettel, a továbbiakban az APC rezisztenciát okozó FV_{Leiden} mutációt részletezem, mely a kaukázusi populációban a familiáris trombofilia leggyakoribb oka. Európában országonként igen változó mértékben, 1-10%-os gyakorisággal fordul elő, hazánkban Görögországhoz, Törökországhoz, Ciprusához hasonlóan az egészséges populáció 9-10%-ban mutatható ki.² A FV_{Leiden} mutáció heterozigóta állapotban 5-8-szoros, míg homozigótaság esetén akár 50-80-szoros vénás tromboembóliás rizikótényezőt jelent. 1993-ban a svéd B. Dahlbäck és munkacsoportja számolt be először az első APC-rezisztenciában szenvedő családról,³ amelynek molekuláris genetikai hátterére egy évvel később a leideni egyetem kutatója, R. M. Bertina és munkacsoportja derített fényt, akik egy pontmutációt írtak le a FV génjén, FV_{Leiden} mutációnak nevezve el.⁴ A mutáció a FV nehéz láncának az 506-os pozíciójában bekövetkező arginin glutamin cserét (p.Arg506Gln) eredményezi, melynek következtében az APC elsődleges hasítási helye elvész (2. ábra). Az 506-os aminosav helyén történő hasítás szükséges a másik két trombin hasítási hely expozíciójához, amelyek hasítása a FVa teljes inaktiválásához vezet.



2. ábra. APC hasítási helyei a FV nehéz láncán fiziológias körülmények között illetve FV_{Leiden} mutáció esetén

FV_{Leiden} mutáció esetén a FVa prokoaguláns aktivitás down-regulációja csökkent⁴⁻⁶ illetve a FV kofaktor aktivitása az APC katalizált FVIIIa inaktivációban szintén gátolt,⁷ aminek következtében a trombin generáció APC okozta csökkenése elmarad.^{8,9}

A trombin egyik fontos szubsztrátja a véralvadás XIII-as faktora, melyet először Laki és Lóránd írt le 1948-ban mint "fibrin stabilizáló faktort". A FXIII egy protranszglutamináz, mely két formában található meg a szervezetben. A plazmában levő forma két katalitikus A alegységből (FXIII-A) és két gátló/stabilizáló B alegységből (FXIII-B) felépülő heterotetramer formában (A₂B₂) kering.¹⁰ A FXIII-A megközelítőleg 83 kDa molekulatömegű és a csontvelő eredetű sejtekben szintetizálódik; míg a ~80 kDa molekulatömegű FXIII-B-t a hepatociták termelik. A plazmában az A alegység csak komplex formában van jelen, ezzel szemben a B alegységnek mintegy 50%-a szabadon kering.

A másik forma a celluláris FXIII, mely csak két A alegységet tartalmaz homodimer formában (FXIII-A₂); megtalálható a trombociták, a monociták és a makrofágok citoplazmájában.¹¹⁻¹³ A FXIII-A négy szerkezeti doménből (egy β -szendvics domén, egy katalitikus „core” domén és két β -hordó domén) illetve egy aktivációs peptidből (AP-FXIII) épül fel. A katalitikus domén tartalmazza a katalitikus triádot (Cys314, His373 és Asp396),

mely a nem-aktivált FXIII-ban rejtve van, így a szubsztrátjai számára nem hozzáférhető. Az AP-FXIII kivételével, a FXIII-A domén szerkezete azonos más transzglutaminázokéval, bár a FXIII-A₂ dimer, míg a többi transzglutamináz monomer szerkezetű.

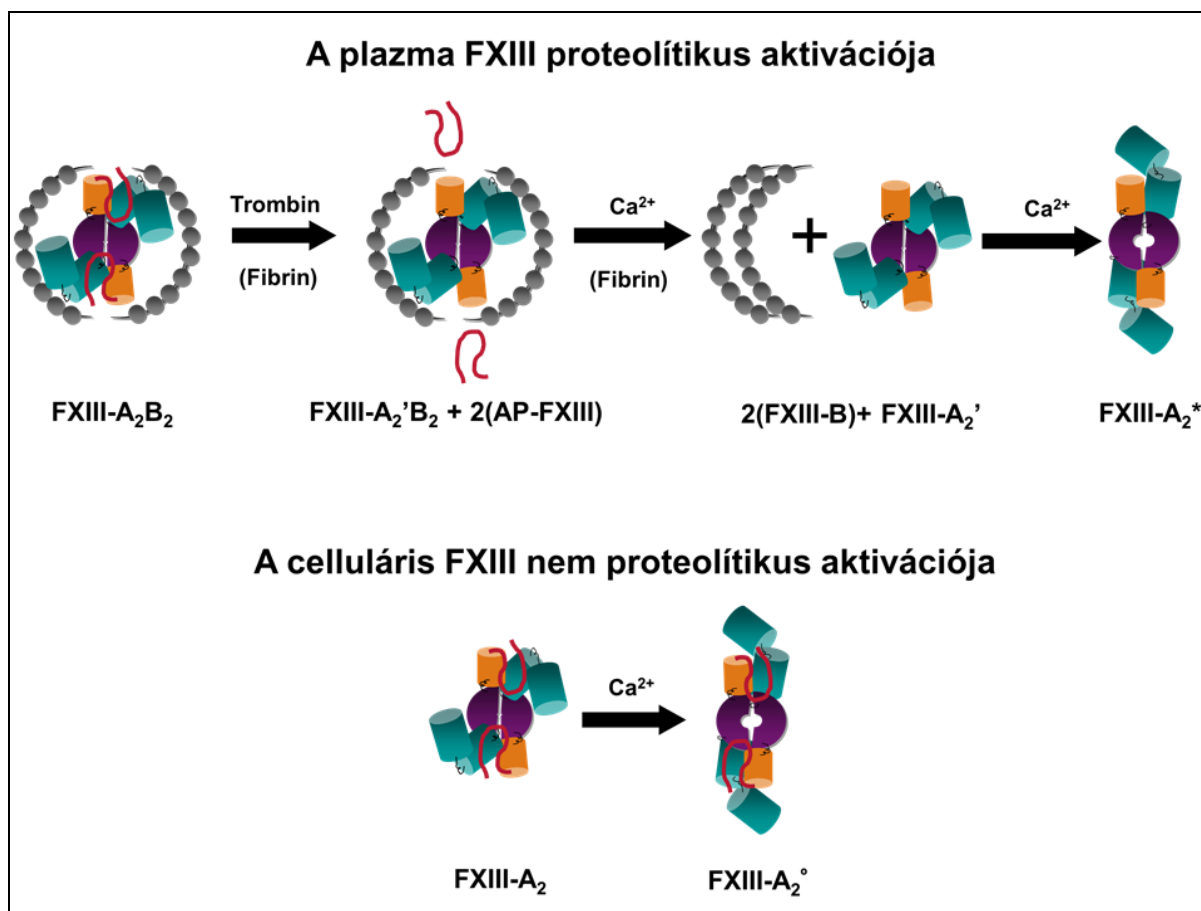
A FXIII-A génjében több polimorfizmust írtak le, amelyek közül öt aminosav cserével jár. Feltételezett trombo-protektív hatása miatt a FXIII-A Val34Leu a legkiterjedtebben tanulmányozott polimorfizmus. A polimorfizmus jelentősége abban áll, hogy csupán három aminosavra van a trombin hasítási helyétől az aktivációs peptidben, ezért a FXIII trombin által történő aktivációját befolyásolja. A Leu34 variáns esetében az aktivációs peptid 2.5X gyorsabban szabadul fel, mint a Val34 esetében. A gyorsabb aktiválódás következtében a Leu34 variáns esetében gyorsabb a fibrin α - és γ -lánc keresztkötések illetve az α_2 -PI-fibrin közti keresztkötések kialakulása. Korábban azt is kimutatták, hogy a Val34Leu polimorfizmus a képződött fibrinháló struktúráját a fibrinogén szinttől függően befolyásolja. Magas fibrinogén koncentrációnál a Leu34 variáns által keresztkötött fibrin vastagabb szálakból áll, a pórusok nagyobbak, könnyebben penetrálhatóak és fogékonyabbak a fibrinolízisre.

A FXIII-B egy glikoprotein, mely 8.5% szénhidrátot tartalmaz. Egy tipikus mozaik protein, amely 2-2 diszulfid híddal összekapcsolt, tíz ismétlődő „sushi” doménből áll. Szekrécioja során egy 20 aminosavból álló vezető szekvencia hasad le róla.^{14, 15}

A két alegység a plazmában komplexet alkot, melynek normál plazmakoncentrációja 14–28 mg/L. A plazmában a FXIII fibrinogénhez kötődve kering ($K_d \sim 10^{-8}$ mol/L). A FXIII a plazmában az alvadási kaszkád utolsó lépcsőjében aktiválódik trombin és Ca^{2+} hatására. Első lépésben, a trombin aktiválja a tetramer szerkezetű FXIII-at (FXIII-A₂B₂) azáltal, hogy a potenciálisan aktív A alegységről (FXIII-A) lehasít egy 37 aminosavból álló aktivációs peptidet. Ezt követően, Ca^{2+} jelenlétében a B alegységek disszociálnak, a hasított FXIII-A (FXIII-A') pedig konformáció változáson megy keresztül és aktív transzglutaminázzá

(FXIIIa) alakul.¹⁴ A fibrin jelenléte az aktivációs folyamatot 80-100-szorosára gyorsítja (3. ábra).

A FXIII-B hiányában, a celluláris FXIII aktivációjához nem szükséges proteolitikus hasítás, hanem az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció megemelkedése elegendő az aktív konfiguráció kialakulásához (3. ábra).^{14, 16} A FXIII aktivációja a fibrin felszínén történik, majd a keletkezett FXIIIa a fibrinalvadékhoz kötődve marad.^{17, 18}



3. ábra. A plazma és a celluláris FXIII aktivációja (Muszbek L. et al, *Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. Physiological reviews.* 2011; 91(3): 931-72).

Mint a transzglutaminázok általában, a FXIIIa is egy acil-transzfer reakciót katalizál,¹⁰ amiben egy peptidláncban levő glutamin γ -karboxamid csoportja az acil donor, és egy primer

amin az acil akceptor. Ha a szubsztrát primér amin egy másik peptidlánc ϵ -amino csoportja az így kialakult izopeptid kötés a peptidláncok kovalens keresztkötését eredményezi.^{16,19}

A FXIIIa legfontosabb szubsztrátja a fibrin és az α_2 -PI.²⁰

A FXIII fontos szerepet játszik a hemosztázisban, a sebgyógyulásban és a terhesség fenntartásában.^{10, 21} A hemosztázisban betöltött szerepe az alvadék végleges szerkezetének kialakításában és a fibrinolízis szabályozásában érvényesül. A fibrinszálak keresztkötése illetve a fibrin polimerek és az α_2 -PI közti keresztkötések kialakítása révén stabilizálja a fibrinalvadéket, növeli az ellenállását a keringő vér nyíróerejével szemben és védi azt a gyors fibrinolitikus degradációtól.²²⁻²⁵

A FXIIIa által történő fibrinszálak keresztkötése a γ -láncok közti dimerizációt és nagy molekulatömegű α -lánc polimerek kialakulását eredményezi. A γ -láncok dimerizációja egy gyors folyamat, ami az egyik γ -lánc 406-os pozíciójában levő lizin és egy másik γ -láncon 398-as vagy 399-es pozícióban levő glutamin közötti intermolekuláris kapcsolat kialakulását jelenti. Az α -láncok glutamin és lizin csoportjai között jóval lassabban alakulnak ki többszörös keresztkötések, melyek α -oligomerek és nagy molekulatömegű α -polimerek megjelenését eredményezik. Az α -polimerek kialakulása a fibrin alvadéknak stabilitást kölcsönöz, fokozza az alvadék erősségét, rigiditását és ellenállóképességét,²⁶ a γ -dimerek fokozzák a fibrinháló merevségét.²⁷

A FXIIIa elméletileg három mechanizmus révén vesz részt a fibrinolízis szabályozásában: 1/ A fibrin α -polimerek kialakítása révén direkt hatással van az alvadék fibrinolízissel szembeni ellenállására, 2/ A fibrinszálak keresztkötése révén csökkenti a plazminogén fibrinhez való kötődését, ezáltal gátolja a tPA által történő plazminogén aktivációt, 3/ Az α_2 -PI fibrinhez történő kötése révén megvédi az alvadéket a fibrinolitikus enzim, a plazmin által történő gyors proteolitikus degradációtól.

Az α_2 -PI a plazmin legfőbb fiziológiás inhibitora, mely a fibrin polimerizációt követően FXIIIa hatására gyorsan a fibrin α -láncaihoz kötődik, majd az így képződött

heterodimerek beépülnek az α -polimerekbe.²⁰ Az α_2 -PI a szerpin családba tartozó, 491 aminosavból felépülő fehérje, melyet a máj termel és szekretál. A szekretált α_2 -PI N-terminálisan metionint tartalmaz (Met1- α_2 -PI). A plazmában egy proteáz, az antiplazmin hasító enzim (APCE) az N-terminus felől lehasít róla egy 12 aminosavból álló oligopeptidet, így a Met1- α_2 -PI Asn1- α_2 -PI izoformává alakul.¹⁹ Mind a Met1- α_2 -PI, mind az Asn1- α_2 -PI izoforma megtalálható a humán plazmában, arányuk 3:7. Míg az Asn1- α_2 -PI izoforma kitűnő szubsztrátja a FXIIIa-nak, 2-es pozícióban lévő Gln csoportja révén acil donorként viselkedik a transzglutamináz reakcióban,²⁸ addig a Met1- α_2 -PI izoforma kevésbé jó szubsztrát, mivel a potenciális szubsztrát Gln fedve van, s így nem hozzáférhető a FXIIIa számára.²⁹

A fibrinalvadék kialakulása során az Asn1- α_2 -PI Gln2 csoportja a fibrin(ogén) Lys303-al képez keresztkötést, ez a Lys reziduum nem vesz részt az α -láncok polimerizációjában.³⁰ Mivel az α_2 -PI molekulában nincs acil akceptor lizil reziduum, ezért nincs lehetőség α_2 -PI homodimer képződésre.³¹ Az α_2 -PI-nak a fibrin α -láncokba való beépülése megelőzi a fibrin α -láncok keresztkötődését. A keresztkötött α_2 -PI teljes mértékben megőrzi plazmin gátló aktivitását, ezért hatékonyan megvédi a fibrinalvadékat a plazmin által történő emésztéstől.^{22,31} Így a FXIII és az α_2 -PI közösen kulcsfontosságú szerepet töltenek be a fibrinalvadék védelmében. E mechanizmusok elsődleges fontosságát a fibrinolízis elleni védelemben Fraser és munkatársai által legújabban publikált közlemény is megerősíti.³²

A FXIIIa α_2 -PI-n kívül a fibrinolitikus rendszer más komponenseit is beépíti a fibrinhálóba; ilyen összetevők a TAFI, az urokináz plazminogén aktivátor, a plazminogén, a 2-es típusú plazminogén aktivátor és a lipoprotein(a), bár nincsenek olyan kísérleti eredmények, amelyek azt bizonyítanák, hogy e fehérjék keresztkötése kulcsfontosságú lenne a fibrinolízis szabályozásában.^{16, 33} A fibrin α -láncának C terminális doménjén levő lizin reziduumok FXIIIa által történő keresztkötése csökkenti a plazminogén és a tPA számára a kötőhelyeket, ennek következtében a plazminogén aktivációt, ezáltal is védve az alvadékat a proteolízistól.³⁴

A humán tPA ~70 kDa molekulatömegű, egyláncú glikoprotein, melyet az endotélsejtek szekretálnak a vérbe, ahol 80%-a az 1-es típusú plazminogén aktivátor inhibitorhoz (PAI-1) van kötve, a fennmaradó 20% pedig szabadon kering. Enzimaktivitással rendelkezik, a plazminogén plazminná történő átalakulását katalizálja. Szerkezetében „kringle-domén” található, ami kulcsfontosságú a tPA-fibrin közti interakcióban, mivel a maximális enzim aktivitás szempontjából elengedhetetlen a tPA fibrinhez, mint kofaktorához való kötődése.³⁵ A tPA szerkezetében levő 2. kringle kötődik a fibrinben a fibrinolízis első fázisában szabaddá váló C-terminális lizinekhez, a finger struktúra pedig képes a natív fibrin kötésére is. A fibrin jelenléte erőteljesen fokozza a tPA plazminogén iránti affinitását, ezáltal a plazminogén aktivációja háromszorosára fokozódik.³⁶ A tPA, akárcsak a többi plazminogén aktivátor, a plazminogén Arg561-Val560 kötését hasítja, melynek következtében plazmin keletkezik. A plazmin szerkezeti felépítésében öt „kringle-domén” vesz részt; az aktív centrum pedig a C-terminális részén található, mely a szerin-proteázokra jellemző katalitikus triádot (Ser741, His603, Asp646) tartalmazza.³⁷ Az aktív plazmin a fibrinszálakat keresztirányba, a peptid kötésben lévő lizin karboxil-csoportok mentén hasítja. A folyamat előrehaladtával egyre több C-terminális lizin oldallánc válik szabaddá, ahová további plazminogén és tPA képes bekötődni. A tPA-plazminogén-fibrin komplex kialakulása pedig pozitív visszacsatolást jelent a plazmin generáció szempontjából, ami a fibrinolízis fokozódásához vezet.³⁶

A fibrinolízis lecsengéséért inhibitorok felelősek, melyek közül fontosabb a már korábban említett α_2 -PI, továbbá a PAI-1 és a TAFI. A fibrin felszínéhez kötődött plazmint az α_2 -PI csak lassan képes inaktiválni (a féléletideje kb. 10-100 sec), mivel a plazminnak a lizinkötő helye és az aktív centruma is foglalt; ezzel szemben a szabad plazmint gyorsan inaktiválja (féléletideje 0,1 s).³⁸ Az endotélsejtek és hepatociták által termelt PAI-1 szintén a szerpinek családjába tartozik, legnagyobb mennyiségben a trombocitákban található meg, és a

trombocita aktiváció során szekretálódik. Legfontosabb szerepe a fibrinolízis gátlása a vérlemezke dugó kialakulása során.

A TAFI a legújabban felfedezett fibrinolízis inhibitor, mely összekötő kapocs a koaguláció és fibrinolízis között.^{39, 40} A TAFI ~60 kDa molekulatömegű egyláncú protein, melyet prokarboxipeptidáz U, prokarboxipeptidáz B vagy prokarboxipeptidáz R néven is ismerünk. A TAFI legfőbb aktivátora a trombin, a trombomodulin jelenléte 1000-szeresére fokozza trombin által történő aktivációját. A TAFI-t a tripszin és plazmin is képes aktiválni. Fiziológias körülmények között az aktív forma meglehetősen instabil (féléletideje kb. 10 perc). A TAFIa egy olyan karboxipeptidáz, ami a részlegesen degradált fibrinben C-terminálissá váló, a plazmin, plazminogén és tPA számára kötőhelyül szolgáló lizin és arginin oldalláncokat hasítja le, ezáltal gátolva a fibrinolízist.⁴¹

A FV_{Leiden} mutáció trombin generáción túlmutató közvetett hatásai kevésbé ismertek. Ismert, hogy az APC profibrinolitikus hatással is bír, ami a down-regulált trombin generáció miatt a TAFI csökkent aktivációján keresztül valósul meg. A FV_{Leiden} mutáció csökkenti az APC-re adott profibrinolitikus választ is. A mutációt hordozó egyénekben fokozódik a trombin generáció és a TAFI aktiváció, így a fibrinolízis folyamata is gátolt.⁴² A FV_{Leiden} TAFI aktivációra gyakorolt hatása TM koncentráció függő.⁴³ Ezek a mechanizmusok feltehetően részt vesznek a FV_{Leiden} mutációval járó fokozott trombóziskészség kialakításában.

.

CÉLKITŰZÉSEK

Mivel a FV_{Leiden} mutációnak a fibrinalvadék keresztkötéseinek kialakulására kifejtett hatását eddig nem vizsgálták és a fibrinolízisre gyakorolt hatása is csak részben ismert, ezért célunk volt megvizsgálni:

1. A FV_{Leiden} mutáció FXIII aktivációjára kifejtett hatását rhTM jelenlétében és hiányában.
2. A FV_{Leiden} mutáció hogyan befolyásolja a FXIIIa által katalizált fibrin keresztkötések (γ -dimerek, α -polimerek) kialakulását.
3. Az α_2 -PI és a fibrin láncok közti keresztkötések képződését hogyan befolyásolja a FV_{Leiden} jelenléte.
4. A FV_{Leiden} mutáció fibrinolízisre gyakorolt hatását, és ebben a FXIII szerepét rhTM jelenlétében és hiányában.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálati alanyok

Tizenöt egészséges, ismert FV genotípusú (5 vad, 5 FV_{Leiden} heterozigóta, 5 FV_{Leiden} homozigóta) önkéntest (3 férfit és 12 nő, életkoruk: 17-67 év) válogattunk be a kísérleteinkbe. Kizárási kritériumot jelentett a személyes anamnézisben szereplő trombózis illetve bármilyen vérzékenységgel járó kórkép. Egyik résztvevő sem volt antikoaguláns terápián és a vérvételt megelőző 2 hétben nem szedtek gyógyszert. A véralvadás szűrőtesztjei mindegyik önkéntes esetében a normál tartományban voltak és a fibrinogén-, a FXIII aktivitás és antigén szintjük is a referencia tartományon belül volt. Tekintettel arra, hogy a FXIII aktiváció sebességét az FXIII-A alegység Val34Leu polimorfizmusa is befolyásolja,^{18, 44, 45} ezért a vizsgálatokhoz valamennyi esetben FXIII-A Val34 genotípusú egyéneket választottunk. A FV_{Leiden} mutáció és a FXIII-A Val34Leu polimorfizmus genotipizálása korábban közölt, standard PCR módszerrel történt.^{46,47}

A kutatás a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával történt. A vizsgálat teljes mértékben megfelel a Helsinkai Deklaráció etikai elveinek, minden egyén írásos és szóbeli tájékoztatást követően írásos beleegyezését adta a vizsgálatban való részvételhez.

Plazma minták előkészítése

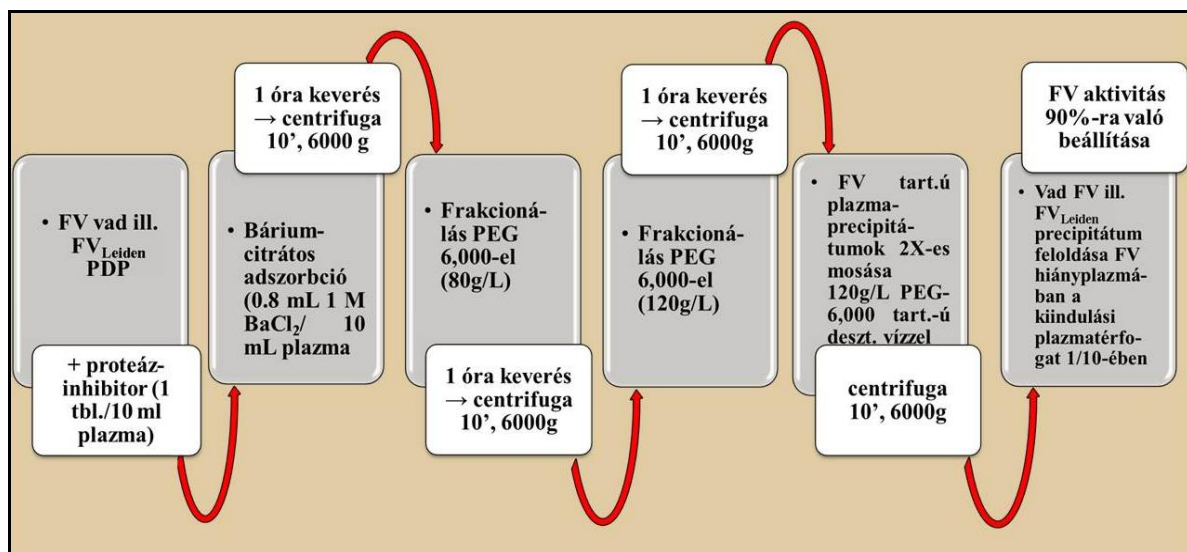
Egyénenként 18 mL vért vettünk a könyökhajlati vénából 2 mL 0.105 M-os trinátrium-citrát tartalmú csőbe. A vérvételhez 21G-s 0.8 x 38 mm átmérőjű tűt (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) használtunk. A véralvadás intrinszik útjának aktivációját 50 µg/mL kukorica tripszin inhibitorral (Gentaur, Brussels, Belgium) gátoltuk, melyet közvetlenül a vérvétel után adtuk hozzá a teljes vérmennyiséghez.⁴⁸ A citrát tartalmú vérmintákat 1,400 g-n, 20 percen át centrifugáltuk, az így nyert trombocita-szegény plazma

(PPP) felső kétharmadát egy másik centrifugacsőbe pipettáztuk, majd ezt ismét azonos módon lecentrifugáltuk. A második centrifugálás során nyert plazma felső kétharmadát, mint trombocita-depletált plazmát (PDP) használtuk fel kísérleteinkhez. Elektronikus trombocita számláló a PDP-ben nem mutatott ki trombocitát, mikroszkóp alatt elvértve láttunk 1-1 sejtet.

FV izolálása kevert plazmákból

Dahlbäck és munkatársai által leírt módszer alapján, részlegesen tisztított FV-t izoláltunk FV vad és FV_{Leiden} homozigóta egyének kevert plazmájából.²⁸ Az izolálás folyamatát sémásan a 4. ábra szemlélteti. Genotípusonként 3-3 egyéntől, egyénenként 35 mL vért vettünk savas-citrát-dextróz tartalmú Vacutainer csövekbe (ACD-B, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), majd a fent leírt centrifugálási eljárással PDP-t nyertünk. Az azonos genotípusú PDP mintákat összekevertük, majd minden 10 mL plazmához 1 tabletta proteáz-inhibitor koktélt (Complete, Mini, EDTA-free, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) adtunk. Ezt követően bárium-citráttal adszorbeáltuk a plazmát a K vitamin függő alvadási faktorok eltávolítása érdekében. A plazmához 10 mL-enként csöpögtetve 0.8 mL 1 M BaCl₂-t adtunk és az elegyet egy óráig folyamatosan kevertük. Ezután a bárium-citrátot 10 perces, 6,000 g-n történt centrifugálással eltávolítottuk. Következő lépésként PEG-6,000-el (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) történő frakcionálást végeztünk, a felülúszóhoz szilárd PEG-6,000-et adva 80 g/L-s végső koncentrációban. Egy órás kevertetést követően a csapadékot 6,000 g-n, 10 percen át tartó centrifugálással távolítottuk el. A megmaradt felülúszóhoz ismételten szilárd PEG-6,000-t adtunk 120 g/L-s végkoncentrációban és az előbbi lépést (keverés, centrifugálás) megismételtük. A FV tartalmú plazma-precipitátumot 120 g/L PEG-6,000 tartalmú desztillált vízzel kétszer átmostuk. A teljes preparációs folyamatot 4 °C-n végeztük. A vad FV és homozigóta FV_{Leiden} tartalmú precipitátumokat immundepletált FV hiányos plazmában (Technoclone, Bécs, Ausztria) oldottuk fel a kiindulási plazmatérfogat 1/10-ében. Az így kapott oldat FV aktivitását egy-lépéses alvadási teszttel határoztuk meg, majd FV

hiány plazmával történt további hígítással az aktivitást mindkét genotípus esetében 90%-ra állítottuk be.



4. ábra. FV vad illetve FV_{Leiden} homozigóta egyének plazmaiból történt FV izolálás fontosabb lépései.

FXIII aktivációja különböző FV_{Leiden} genotípusú plazmákban

Mivel plazmában a FXIII aktivációja a fibrin felszínen megy végbe és a FXIIIa a fibrinhez kötődve marad,¹⁸ ezért kísérleteinkben a FXIII aktivációját az alvasztás során nyert fibrinalvadékokban vizsgáltuk. A fibrinalvadékokat a szöveti faktor útvonal aktivációja révén nyertük. Az aktivációt elvégeztük rhTM (American Diagnostica, Stamford, CT) jelenlétében és hiányában egyaránt. Az rhTM koncentrációt Dielis és munkatársai által közölt korábbi közlemény alapján választottuk ki, az volt a célunk, hogy a trombingeneráció gátlása megközelítőleg 50%-os legyen a FV vad típusú plazmákban.⁴⁹ A kísérleteinkhez kiválasztott rhTM koncentrációt (1.5 nM-os végkoncentráció) előzetes kísérletek során teszteltük FV vad típusú plazmákon, melyekben az rhTM jelenléte átlagosan 45.4%-al (40-61%) csökkentette a trombingenerációt. A trombingenerációt Thrombin S-2238 nevű kromogén szubsztrát (Chromogenix, Lexington, MA) felhasználásával mértük.

150 μ L PDP-hez 10 μ L phys. NaCl-t és 40 μ L aktivátor koktélt adtunk, s az elegyet 37 °C-on különböző ideig inkubáltuk, majd a reakciót azonos térfogatú gátló koktéllal állítottuk le. Az aktivátor koktél Technothrombin TGA RC Low (Technoclone GmbH, Bécs, Ausztria) volt, melyet 7.5 nM rhTM-et tartalmazó, vagy nem tartalmazó 62.5 mM CaCl_2 -ban oldottunk fel. A feloldott Technothrombin TGA RC Low ~5 pM rekombináns humán TF-t, Tris-Hepes-NaCl pufferben oldott alacsony koncentrációjú foszfolipidet tartalmazott. A koaguláció során keletkezett trombin és FXIIIa aktivitásának blokkolására, ill. a fibrinolízis megakadályozására használt gátló koktél összetétele a következő volt: 20 mM benzamidin, 0.1 mM D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginin chloromethyl ketone (PPACK), 2 mM iodoacetamid, 50 mM ϵ -aminokapronsav, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA 50 mM HEPES puffer (pH 7.5).¹⁸ Az aktivátor koktél által indukált reakciót különböző időintervallumok után leállítottuk. Amennyiben az adott időintervallum alatt alvadék képződött, azt centrifugálással szeparáltuk, majd háromszor alaposan átmostuk fiziológiás sóoldattal és SDS-PAGE mintapufferben feloldottuk.

SDS-PAGE és Western blotting technika

Az alvadékokban képződött fibrin keresztkötéseket (α -polimerek, γ -dimerek) SDS-PAGE technikával 10%-os gélben vizsgáltuk; az elektroforézist követően a gélen levő fibrint Coomassie-kék (R250) festékkel tettük láthatóvá. A képződött fibrin γ -dimerek relatív mennyiségét GS-800 Kalibrált Denzitometeren (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) kvantitatív denzitometriával határoztuk meg. Az α -lánc oligomerek-polimerek képződését hasonlóképpen kvantitatív denzitometriával követtük.

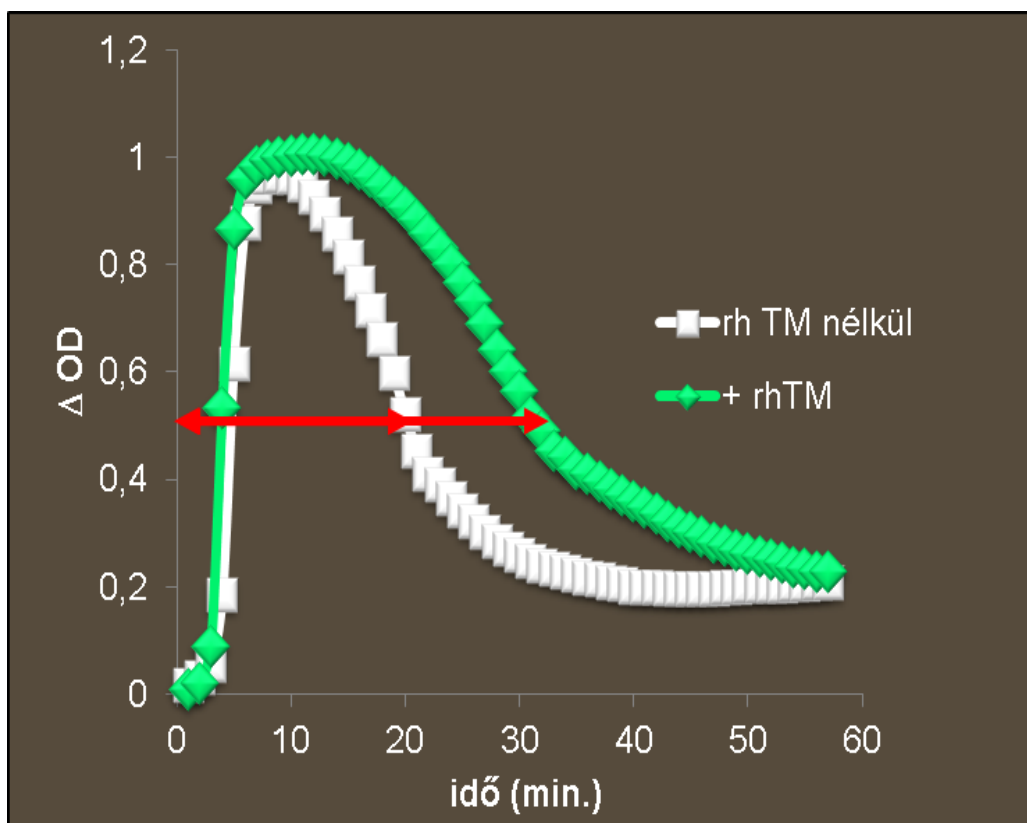
A FXIII-A aktivációját, illetve az α_2 -PI és fibrin közti keresztkötések keletkezését Western blotting technikával követtük, melyet korábban intézetünk által leírt módszer szerint viteleztünk ki.¹⁸ Az SDS-PAGE ezekben az esetekben 7.5 %-os gélben történt. A FXIII-A, ill.

a trombin által hasított, azaz proteolitikusan aktivált formájának (FXIII-A') detektálására antitestként birka anti-human FXIII-A affinitás kromatográfiával tisztított antitestet (Affinity Biologicals, Ancaster, Canada) használtunk. A detektálás nyúlban termelt biotinált birka-ellenes IgG-vel és avidinhez kötött biotinált peroxidáz komplex-szel (Vectastain ABC kit komponensek, Vector, Burlingame, CA, USA) történt; az immunreakciót megnövelt érzékenységű kemilumineszcenciás módszerrel (ECL Plus+, Amersham, Little Chalfont, UK) hívtuk elő. A FXIII-A' relatív mennyiségének a meghatározása ez esetben is kvantitatív denzitometriás analízissel történt. Az egyes mintákban levő FXIII-A' mennyiségét a fibrin alvadékban maximálisan képződő FXIII-A' mennyiségéhez viszonyítva, %-os arányban fejeztük ki. Ahhoz, hogy összehasonlítsuk az rhTM-nek a FXIII aktiváció sebességére gyakorolt hatását a különböző FV_{Leiden} genotípusú plazmákban, kiszámoltuk azt az időt, ami a FXIII 50%-os aktivációjához szükséges ($T_{1/2}$) rhTM hiányában ($T_{1/2}$ rhTM-) és annak jelenlétében ($T_{1/2}$ rhTM+).

Az α_2 -PI és fibrinszálak közt kialakuló keresztkötéseket Western blotting technikával vizsgáltuk. Elsődleges antitestként kecske anti-humán α_2 -PI affinitás kromatográfiával tisztított antitestet (Affinity Biologicals, Ancaster, Canada) használtunk. Az immunreakció detektálása és előhívása ugyanúgy történt mint FXIII-A esetében azzal a különbséggel, hogy itt másodlagos antitestként nyúlban termelt biotinált kecske-ellenes IgG-t használtunk. Az α_2 -PI-fibrin α -lánc közti heterodimerek relatív mennyiségének a meghatározása ez esetben is kvantitatív denzitometriával történt. Az egyes plazmamintákban kialakult heterodimerek relatív mennyiségét a maximálisan képződött α_2 -PI-fibrin α -lánc közti heterodimerek %-ában fejeztük ki. Az összehasonlítás érdekében ebben az esetben is $T_{1/2}$ értékeket (az 50%-os heterodimerizációhoz szükséges időintervallumokat) számoltunk.

In vitro alvadék lízis vizsgálatok

A tPA által indukált alvadék lízist turbidimetriás módszerrel vizsgáltuk.^{42, 43} A fibrinolízist a plazmához adott 10 μ L tPA-val (American Diagnostica, Stamford, CT; végkoncentráció: 5 nM) indukáltuk, melyet közvetlenül az aktivátor koktél előtt adtunk a plazmához. A lízis vizsgálatokat elvégeztük rhTM jelenlétében is hiányában is. Egyes kísérletekben a TAFIa-t 25 μ g/mL krumból izolált karboxipeptidáz inhibitorral (CPI; Sigma, St. Louis, MO) gátoltuk, Mosnier és munkatársainak ajánlása szerint.⁴³ Amennyiben a FXIIIa aktivitást kívántuk gátolni a lízis vizsgálatok során, 2 mM iodoacetamidot adtunk a rendszerünkhöz. Az alvadás és lízis folyamatát turbidimetriás módszerrel követtük „microplate reader” segítségével 37 °C-on, 405 nm-es hullámhosszon, 2 órán keresztül (5. ábra). Az eredmények kvantitatív értékeléséhez az 50%-os lízishez szükséges időt (a maximális turbiditástól az 50%-os feltisztulásig eltelt időt) számoltuk ki.⁴³



5. ábra. rhTM hiányában illetve annak jelenlétében zajló reprezentatív tPA indukálta *in vitro* lízis vizsgálat. A görbe felszálló szára a plazma

alvadása során észlelt, a leszálló szár a plazma fibrinolízise során észlelt optikai denzitás változást ábrázolja az idő függvényében. Az eredmények kvantitatív értékeléséhez az 50%-os lízishez szükséges időt mindegyik genotípusnál kiszámoltuk és oszlopdiaagramm formájában ábrázoltuk.

Statisztikai analízis

A statisztikai vizsgálatokat GraphPad Prism program (La Jolla, CA, USA) segítségével végeztük. A genotípusok között rhTM hiányában és jelenlétében kapott különbségeket Kruskal-Wallis-féle variancia-analízissel hasonlítottuk össze. Az eredmények közti különbségek szignifikanciáját Mann-Whitney U-teszttel számítottuk ki; eredményeinket $p < 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

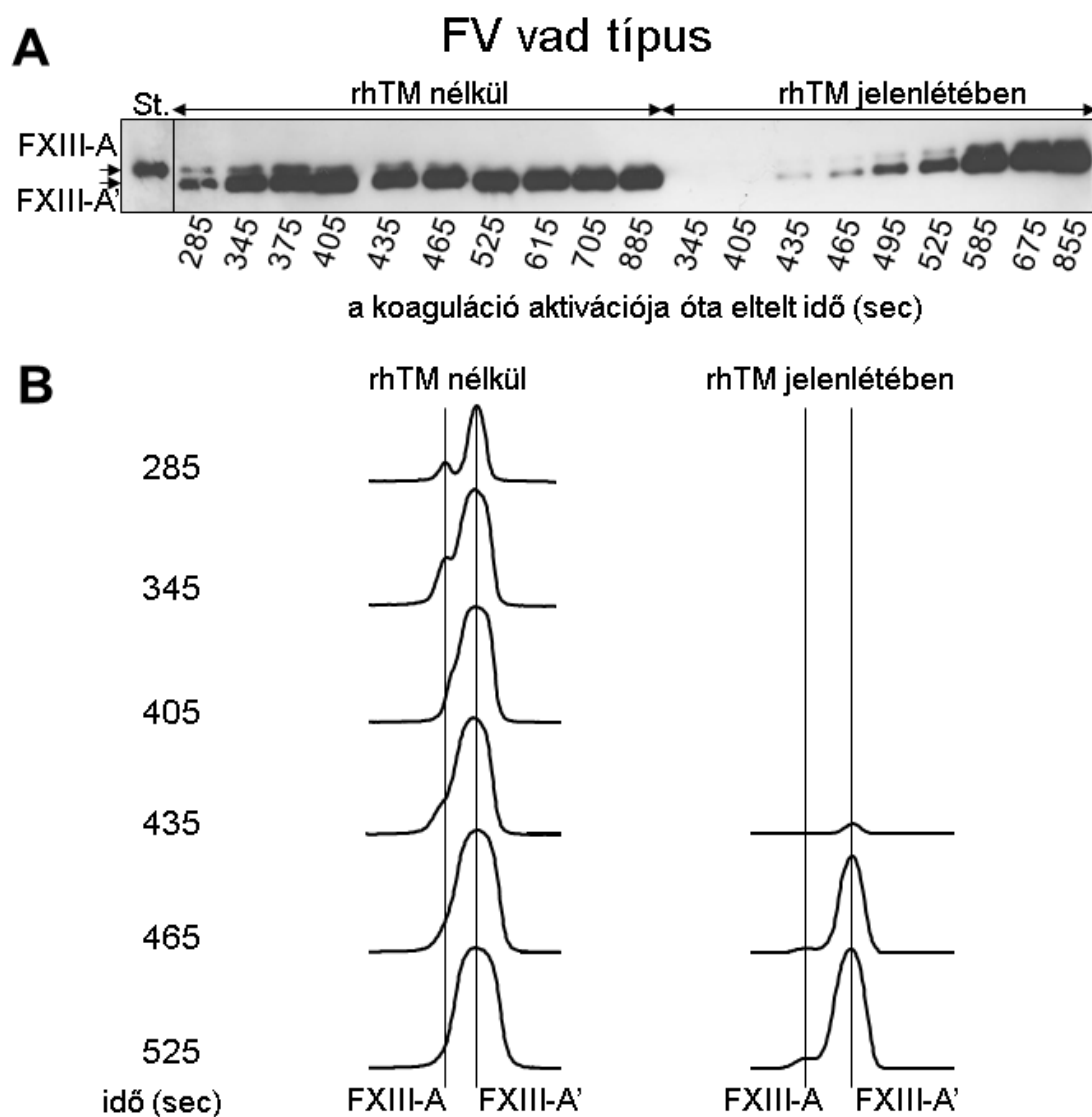
1. A FV_{Leiden} mutáció $rhTM$ -től függő hatása a $FXIII$ aktivációra

1.1. Az $rhTM$ hatása a $FXIII$ aktivációra különböző FV genotípusú plazmákban

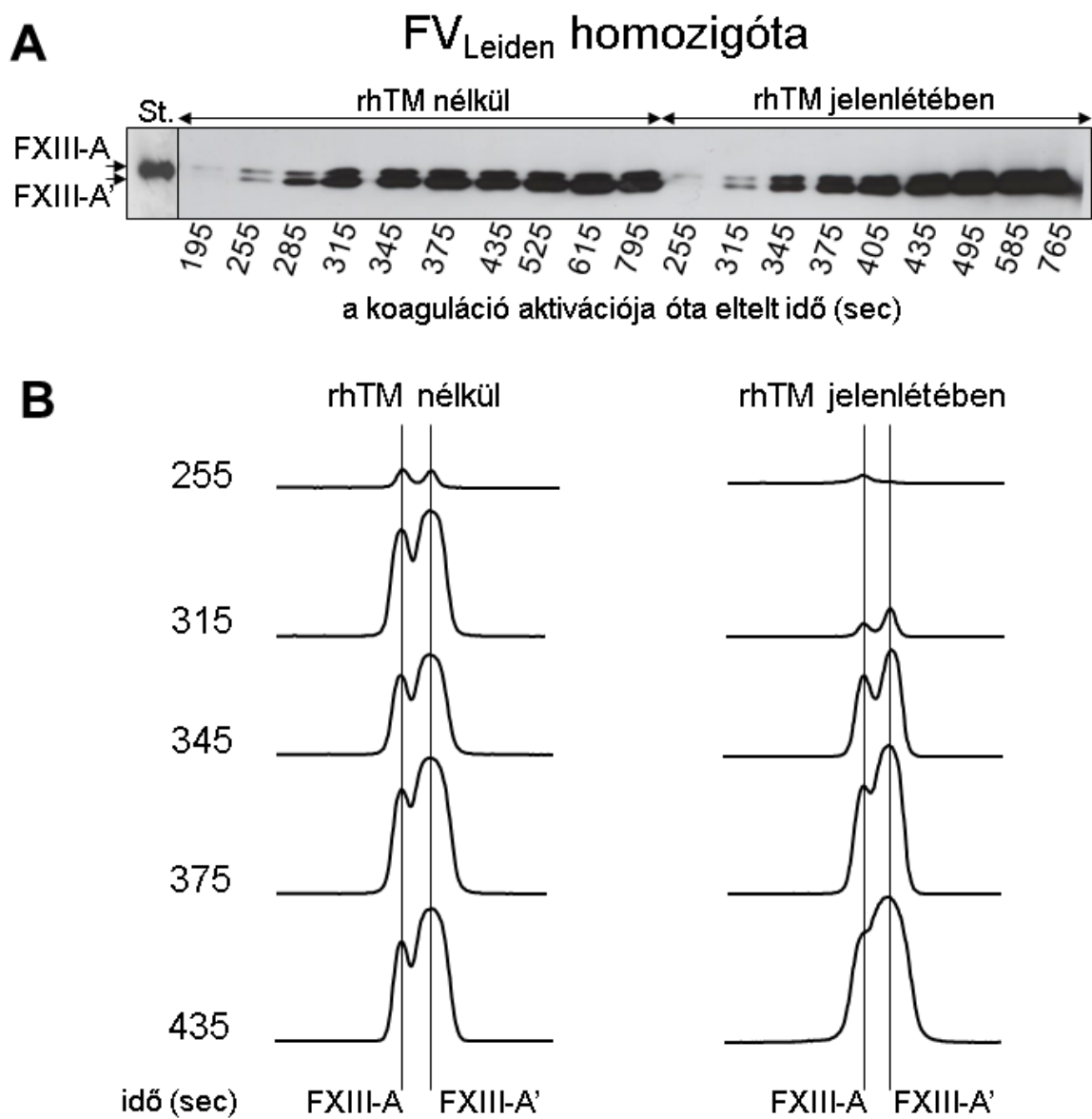
A 6-8. ábrák a $rhTM$ -nek a $FXIII$ aktivációra gyakorolt hatását szemléltetik 1-1 reprezentatív, különböző FV genotípusú plazmában, míg az 1. táblázat és a 9. ábra az individuálisan kapott eredmények átlagát összegzi. Az 6A. és 7A. ábrán egy FV vad típusú illetve egy FV_{Leiden} homozigóta egyén Western blot képét látjuk, mely a plazmában végbemenő $FXIII$ proteolitikus aktivációját szemlélteti. A $FXIII$ aktivációjának kinetikájáról a Western blot képek kvantitatív denzitometriás értékelésével kaptunk információt (6B. és 7B. ábra). Az egyes mintákban kapott $FXIII$ -A' mennyiségeket a plazmában maximálisan aktiválódott $FXIII$ -A mennyiséghez viszonyítottuk, az arányt %-ban fejeztük ki (8. ábra). Ahhoz, hogy összehasonlíthassuk a $rhTM$ -nek a $FXIII$ aktivációra gyakorolt hatását a különböző genotípusok esetén, kiszámoltuk azt az időt, ami a plazmában levő $FXIII$ 50%-ának aktivációjához szükséges TM hiányában ($T_{1/2}$ $rhTM$ -) illetve annak jelenlétében ($T_{1/2}$ $rhTM$ +) (1. táblázat); majd az ezek közti különbséget ($T_{1/2}$ $rhTM$ +)-($T_{1/2}$ $rhTM$ -) oszlopdiagram formájában ábrázoltuk (9. ábra).

Az $rhTM$ hiányában végzett kísérletek során nem észleltünk számottevő különbséget a $FXIII$ aktiváció időbeni lefolyásában az egyes genotípusok között (6-8. ábra); a $T_{1/2}$ értékek között sem volt szignifikáns különbség (1. táblázat). A FV vad típusú egyének plazmájában a $FXIII$ aktiváció időben jelentősen lelassul $rhTM$ jelenlétében (6, 8, 9 ábrák és az 1. táblázat). A TM ezen hatása a heterozigóta és homozigóta egyének esetén elhanyagolható mértékű (7-9. ábra és az 1. táblázat). A $FXIII$ aktivációja során mért $T_{1/2}$ értékek jelentősen megnyúltak $rhTM$ jelenlétében a vad típusú plazmákban, szemben a heterozigóta- és homozigóta plazmákban észlelt kismértékű változással (1 táblázat), a genotípusok közti különbségek azonban nem voltak szignifikánsak, ami az alacsony esetszámmal és a nagyfokú individuális

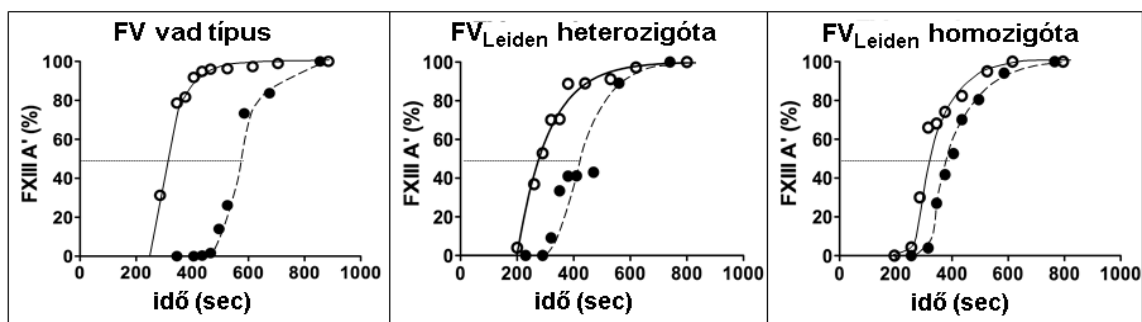
variabilitással magyarázható (1. táblázat). Ezt bizonyítja, hogy amennyiben a hetero- és homozigótákat egy csoportként kezeltük, a FV_{Leiden} hordozók és FV vad típusú egyének közti különbség szignifikánssá vált. Mivel az interindividuális variabilitás zavarhatja az rhTM genotípustól függő hatásának megítélését, ezért minden egyénnél külön kiszámoltuk az rhTM által előidézett $T_{1/2}$ megnyúlást a FXIII aktivációjában, azaz az rhTM jelenlétében ($T_{1/2}rhTM+$) és annak hiányában ($T_{1/2}rhTM-$) mért $T_{1/2}$ értékek közti különbséget (9. ábra). A $T_{1/2}rhTM+$ és $T_{1/2}rhTM-$ értékek közti különbség szignifikánsan nagyobb volt a FV vad típusú egyéneknél, mint a FV_{Leiden} heterozigóta és homozigóta csoportokban (szám szerint 175 sec, 39 sec illetve 25 sec). A hetero- és homozigóták között is észleltünk különbséget, de ez nem volt statisztikailag szignifikáns.



6. ábra. A FXIII aktivációja egy reprezentatív FV vad típusú egyén plazmájában rhTM hiányában és annak jelenlétében. (A) *Western blot kép, mely rhTM-nek a FXIII időbeni aktivációjára gyakorolt hatását szemlélteti. Az aktivált FXIII A alegység (FXIII-A') az alvadás aktivációját követően különböző időpontokban kinyert fibrin alvadékokban. St.: tisztított FXIII-A₂ standard. (B)* *Egyes minták Western blotjainak denzitometriás kiértékelése.*



7. ábra. A FXIII aktivációja egy reprezentatív FV_{Leiden} homozigóta plazmában rhTM hiányában és annak jelenlétében. (A) Western blot kép, mely rhTM-nek a FXIII időbeni aktivációra gyakorolt hatását szemlélteti. . Az aktivált FXIII A alegység (FXIII-A') az alvadás aktivációját követően különböző időpontokban kinyert fibrin alvadékokban. St.: tisztított FXIII-A₂ standard. (B) Egyes minták Western blotjainak denzitometriás kiértékelése.

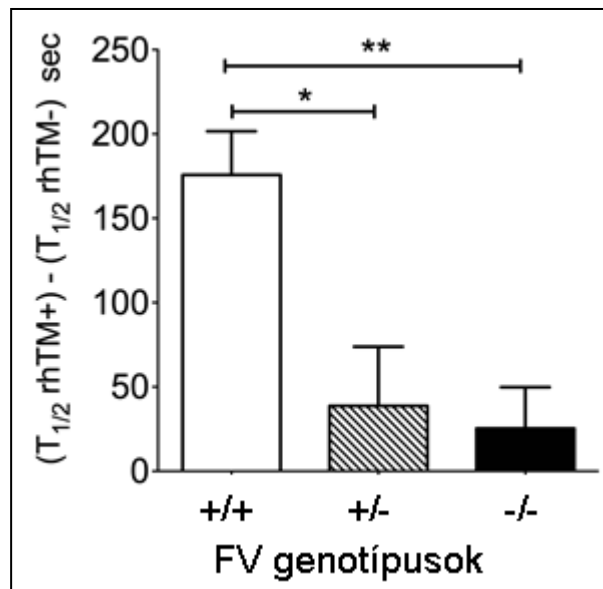


8. ábra. rhTM hatása a FXIII időbeni aktivációjára három reprezentatív, különböző FV genotípusú egyén plazmájában. Az üres karikákkal jelzett görbe az rhTM hiányában történt FXIII aktiváció kinetikáját ábrázolja, míg a telt karikák az rhTM jelenlétében zajló FXIII aktiváció kinetikáját jelölik. A vízszintes pontozott vonalak a FXIII-A 50%-ának aktivációját jelzik.

1. táblázat. rhTM hatása az 50%-os FXIII aktivációhoz szükséges időkre ($T_{1/2}$) különböző FV genotípusú plazmákban.

	$T_{1/2}$ FXIII aktiváció (sec)	
	rhTM- (átlag $\pm$ SEM)	rhTM+ (átlag $\pm$ SEM)
FV vad típus (n=5)	454 $\pm$ 86.9	629.8 $\pm$ 75.3
Heterozigóták (n=5)	418.8 $\pm$ 53.8	457.6 $\pm$ 21.8
Homozigóták (n=5)	380.0 $\pm$ 95.8	417.0 $\pm$ 88.6
FV _{Leiden} hordozók (n=10)	399.0 $\pm$ 52.2	437.3 $\pm$ 43.5*

rhTM-: rhTM hiányában, rhTM+: rhTM jelenlétében, * $p < 0.05$



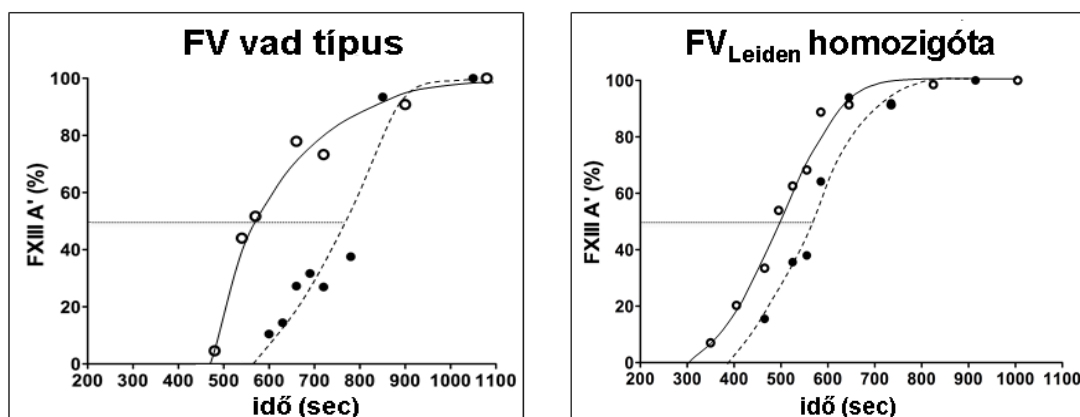
9. ábra. rhTM hatása a FXIII aktivációjára különböző FV genotípusú plazmákban. Az ábrán az 50%-os FXIII aktivációhoz rhTM jelenlétében és hiányában szükséges idők közti különbségeket $(T_{1/2} \text{ rhTM}+) - (T_{1/2} \text{ rhTM}-)$ tüntettük fel. Az eredmények genotípusonként 5-5 egyén plazmájával végzett kísérletek átlagát és a hozzájuk tartozó standard hibákat (SEM) reprezentálják. +/+ : FV vad típus, +/- : FV_{Leiden} heterozigóta, -/- : FV_{Leiden} homozigóta

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

1.2. rhTM hatása a FXIII aktivációra izolált vad típusú FV-tel illetve FV_{Leiden}-nel kiegészített FV hiányplazmában

Az alvadék kialakulását befolyásoló plazma komponensek individuális különbségeinek kiküszöbölése érdekében, valamint a kapott eredmények megerősítése céljából, FV vad és FV_{Leiden} homozigóta egyének kevert plazmaiból FV-t izoláltunk, majd ezzel kiegészítettük a kereskedelemben kapható FV hiányplazmát, melyből a FV-öt immunabszorpcióval teljes mértékben eltávolították. Az így kapott plazmákban is megvizsgáltuk, hogy a különböző genotípusú FV hogyan befolyásolja az rhTM FXIII aktivációra gyakorolt hatását (10. ábra). Ez esetben a FV kivételével valamennyi plazma komponens azonos volt. rhTM hiányában FV_{Leiden} tartalmú plazmában a FXIII aktivációja

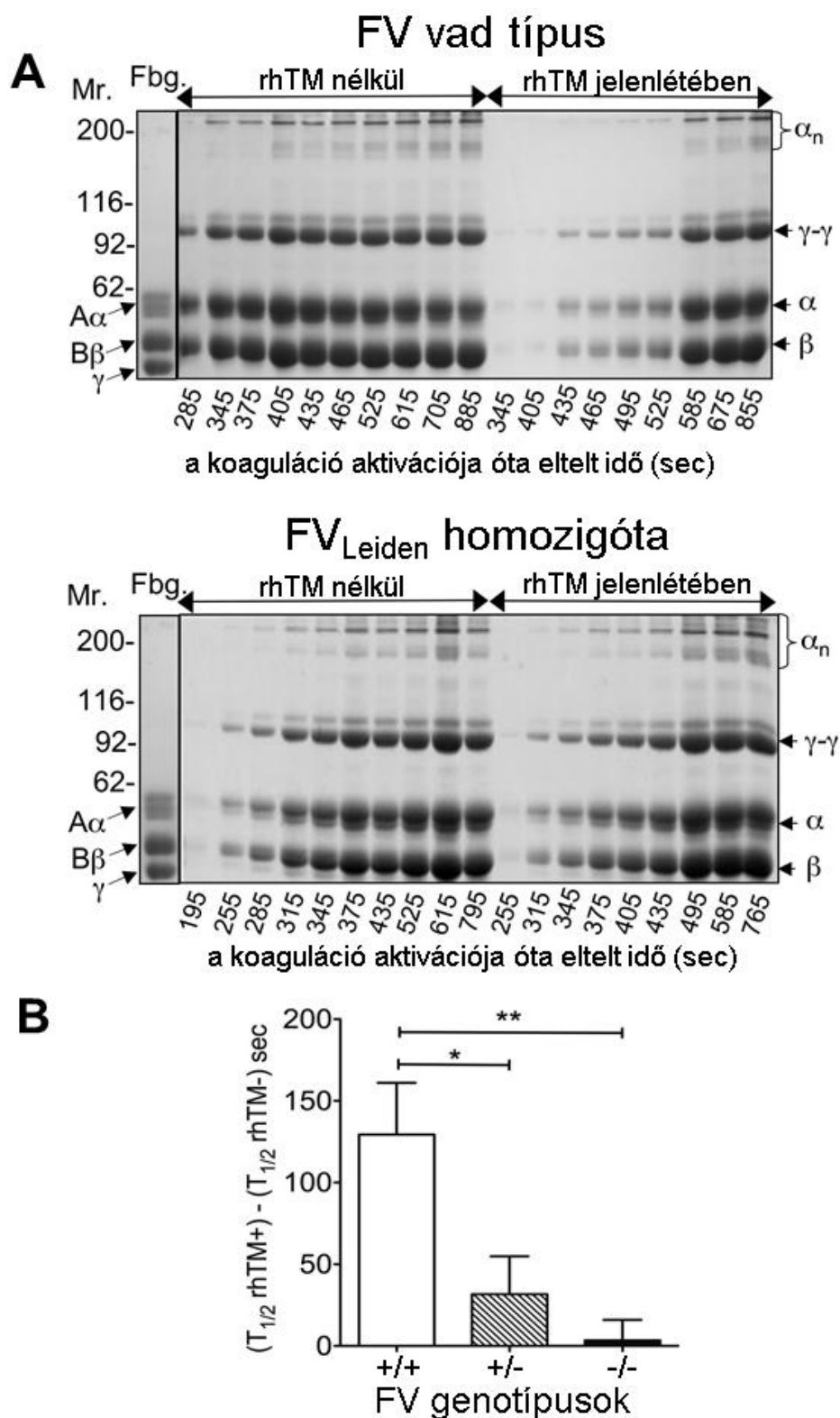
valamivel korábban következett be, mint a vad FV-öt tartalmazó plazmában, ami azzal lehet összefüggésben, hogy a részlegesen tisztított két különböző genotípusú FV preparátum összetétele némileg eltért egymástól. A vad típusú FV-tel pótolta FV hiányplazmában a rhTM jelenléte szignifikánsan lelassította a FXIII aktivációját; a $T_{1/2}$ értékek közötti különbség 185 sec volt. Amikor a hiányplazmát homozigóta FV_{Leiden}-nel egészítettük ki az rhTM FXIII aktivációt késleltető hatása sokkal szerényebben érvényesült, a $T_{1/2}$ értékek közti különbség 65 sec volt.



10. ábra. A FXIII proteolitikus aktivációjának kinetikája részlegesen tisztított vad típusú FV-tel illetve homozigóta FV_{Leiden}-nel kiegészített FV hiányplazmában. Az üres karikákkal jelzett görbe az rhTM hiányában történt FXIII aktiváció kinetikáját mutatja be, míg a telt karikák az rhTM jelenlétében zajló FXIII aktivációt demonstrálják. A vízszintes, pontozott vonal a FXIII-A 50%-ának aktivációját jelzi.

2. A FV_{Leiden} mutáció rhTM-től függő hatása a FXIIIa által katalizált fibrin keresztkötések kialakulására

Munkánk következő részében azt vizsgáltuk, hogy az rhTM jelenléte hogyan befolyásolja a különböző FV genotípusú egyének plazmáiban a fibrin keresztkötések kialakulását. FV vad típusú egyének plazma mintáiban az rhTM egyértelműen késleltette a fibrin γ -dimerek kialakulását, míg a FV_{Leiden} homozigóták plazma mintáiban ez a hatás jelentős mértékben csökkent (11A. ábra). Az rhTM-nek a fibrin α -polimerek képződésére gyakorolt hatása hasonló tendenciájú, mint a γ -dimerizáció esetében (lásd az SDS-PAGE gél felső részén levő részlegesen polimerizálódott α -láncokat). Mivel az α -láncok polimerizációja időben lassúbb folyamat, ezért a teljes polimerizáció nem fért bele a kísérleteink időkeretébe és így az α -láncok keresztkötését nem tudtuk a teljes polimerizáció százalékában kifejezni. A FXIII aktivációjának értékeléséhez hasonlóan meghatároztuk az összes γ -lánc 50%-ának γ -dimérré történő alakulásához szükséges időt ($T_{1/2}$). A FV vad típusú egyének plazmáiban jelentős különbséget észleltünk az rhTM nélkül és annak jelenlétében mért $T_{1/2}$ értékek között; míg a FV_{Leiden} hordozók esetében ez a különbség minimális volt (11B. ábra). A FV_{Leiden} homozigóta plazmákban az rhTM még kevésbé lassította le a γ -láncok dimerizációját mint a heterozigótákban, a két genotípus között azonban a különbség nem volt szignifikáns.



11. ábra. Az rhTM hatása a fibrin keresztkötések képződésére különböző FV genotípusú plazmákban. **(A)** Coomassie kékel festett SDS-PAGE gélek, mely a fibrin keresztkötéseket ábrázolják 1-1 reprezentatív FV vad és FV_{Leiden} homozigóta plazmában rhTM hiányában illetve annak jelenlétében. Az alvadás időtartamát az egyes minták esetében a gélek alatt levő

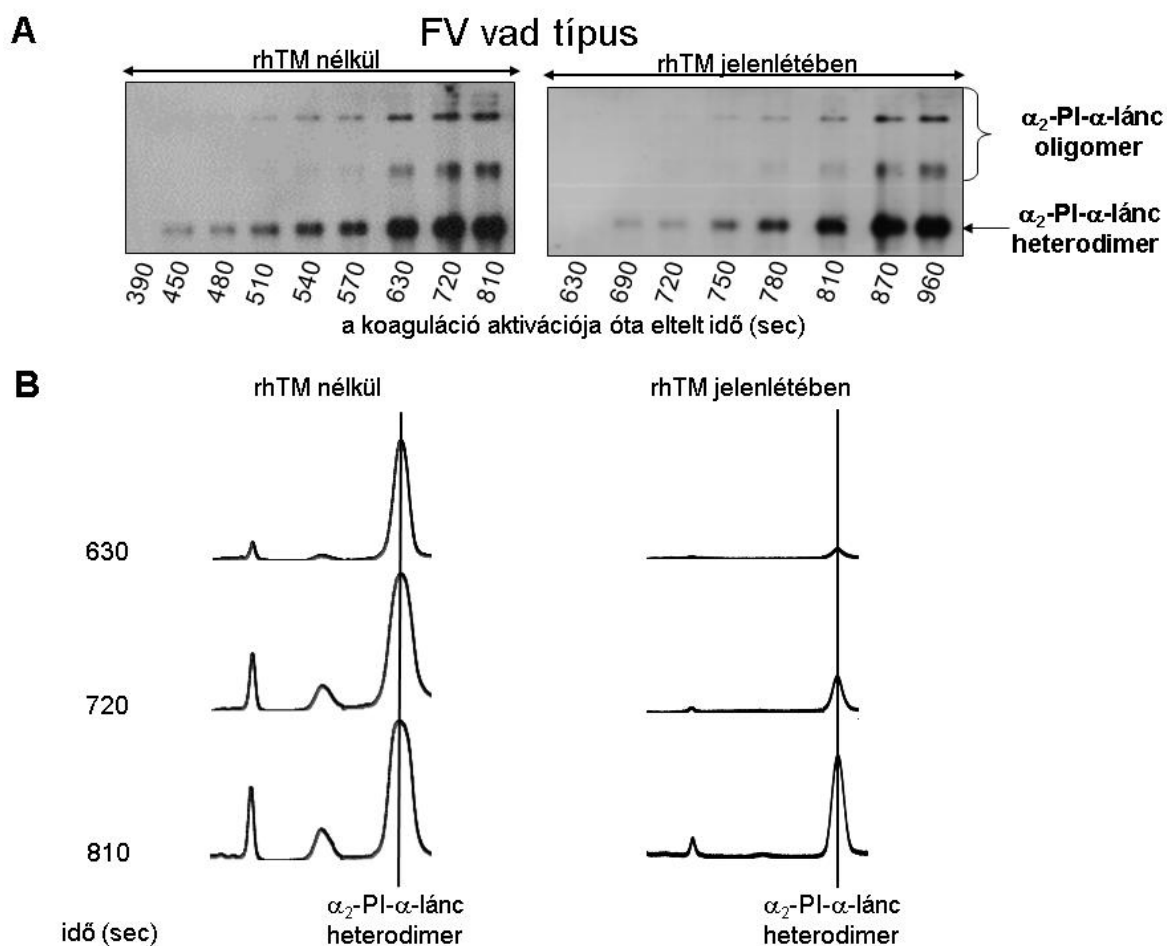
számsorban tüntettük fel, másodpercben kifejezve. Fbg.: fibrinogén standard, α_n : α -polimerek, $\gamma\gamma$: γ -dimerek, a fibrin(ogén) láncokat nyíllal tüntettük fel az ábrán. **(B)** A különböző FV genotípusok hatása az 50%-os fibrin γ -dimerizációhoz szükséges időre rhTM jelenlétében ($T_{1/2}rhTM+$) és annak hiányában ($T_{1/2}rhTM-$). Mindhárom genotípus esetében 5-5 egyén plazmáját vizsgáltuk, majd a ($T_{1/2}rhTM+$) és ($T_{1/2}rhTM-$) közötti különbségek átlagát és a hozzájuk tartozó standard hibákat (SEM) oszlopdiagram formájában ábrázoltuk. +/+ : FV vad típus, +/- : FV_{Leiden} heterozigóta, -/- : FV_{Leiden} homozigóta. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3. A FV_{Leiden} mutáció rhTM függő hatása az aktív FXIII által szabályozott α_2 -PI és fibrin közti keresztkötések képződésére

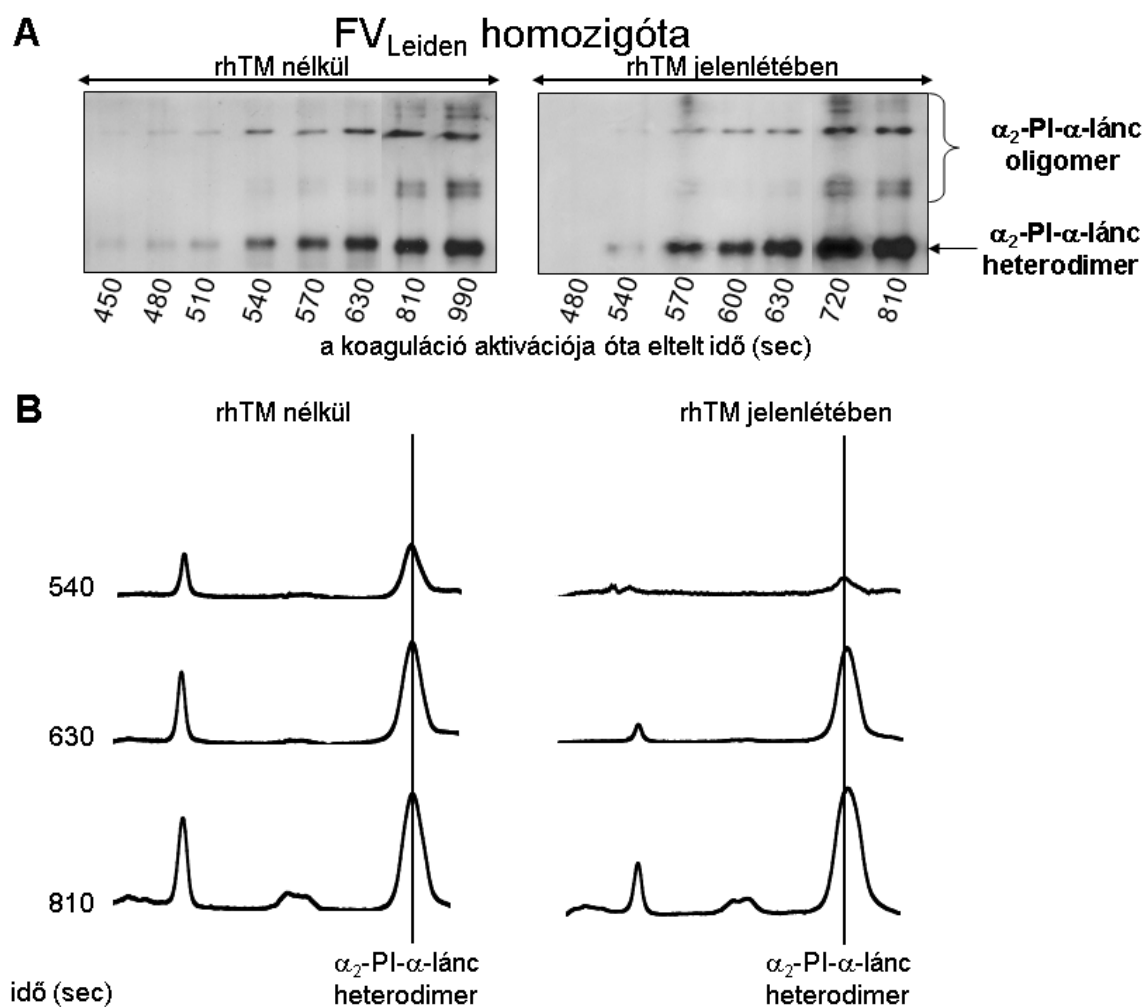
A fenti eredmények birtokában, illetve annak ismeretében, hogy az aktivált FXIII a fibrinolízis egyik legfőbb szabályozója, kutatásunk következő fázisában különböző FV genotípusú egyéneknél megvizsgáltuk az rhTM fibrinolízisre gyakorolt hatását.

3.1. Az rhTM hatása az α_2 -PI-fibrin keresztkötések képződésére különböző FV genotípusú egyénekből származó plazmákban

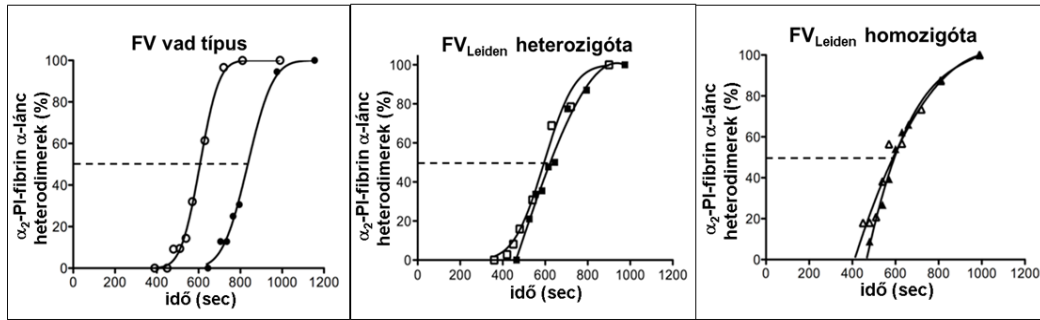
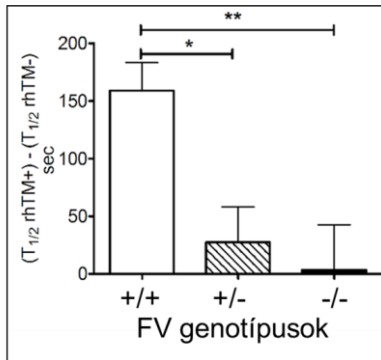
A 10. és 12. ábra az rhTM-nek az α_2 -PI és fibrin közti keresztkötések kialakulására gyakorolt hatását szemlélteti egy reprezentatív FV vad típusú egyén plazmájában. rhTM jelenlétében α_2 -PI-fibrin α -lánc közti heterodimerek kialakulása szignifikánsan később kezdődik és lassabban zajlik le, mint rhTM hiányában; ugyanakkor szignifikáns különbséget észleltünk a nagy molekulatömegű α_2 -PI tartalmú polimerek megjelenésében is. Ezzel ellentétben, a FV_{Leiden} homozigóta plazma mintákban eltűnik az rhTM nélküli és az azt tartalmazó plazmaminták közti különbség (13. és 14. ábra); sőt egyetlen mutáns allél jelenléte is szignifikánsan csökkentette az rhTM hatását (14. ábra).



12. ábra. Az α_2 -PI fibrin α -láncához történő keresztkötése egy reprezentatív FV vad típusú egyéntől származó plazmában rhTM hiányában és jelenlétében. **(A)** A Western blot kép alatt levő számsor az inkubáció időtartamát jelzi. **(B)** Egyes minták Western blotjainak denzitometriás kiértékelése.



13. ábra. Az α_2 -PI fibrin α -láncához való keresztkötődése egy reprezentatív FV_{Leiden} homozigóta egyén plazmájában rhTM hiányában és jelenlétében. (A) A Western blot kép alatt levő számsor az inkubáció időtartamát jelzi. (B) Egyes minták Western blotjainak denzitometriás kiértékelése.

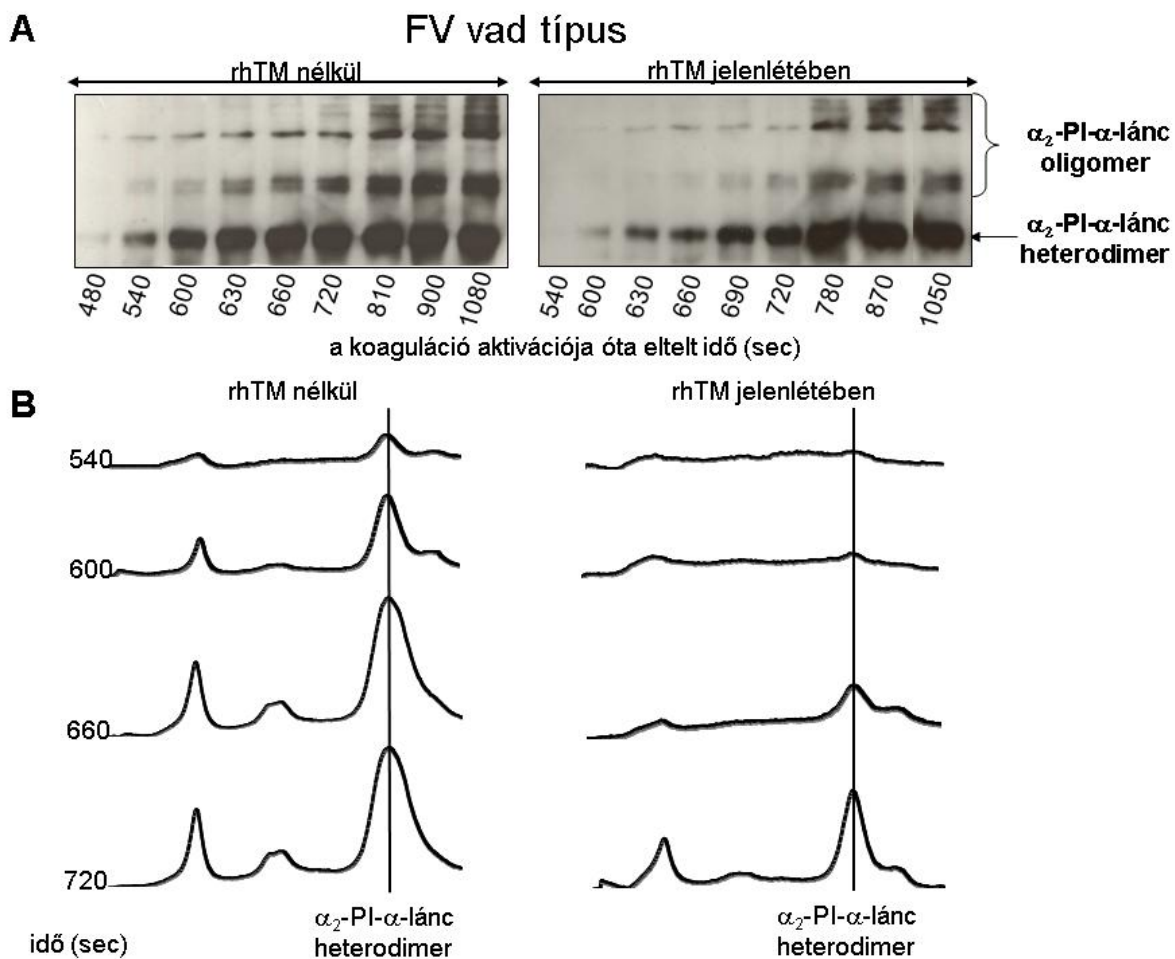
A**B**

14. ábra. Az rhTM hatása α_2 -PI-fibrin α -lánc közti keresztkötések kialakulására különböző FV genotípusú plazmákban. **(A)** Genotípusonként 1-1 plazmával nyert reprezentatív Western blot kép kvantitatív elemzésével kapott eredmények, melyek az α_2 -PI-fibrin α -lánc heterodimeriek képződésének kinetikáját szemléltetik. Az üres körök, négyzetek és háromszögek az rhTM nélkül bekövetkezett heterodimerizáció kinetikáját, míg a teltek az rhTM jelenlétében zajló heterodimer képződés kinetikáját mutatják. A vízszintes, szaggatott vonal az 50%-os heterodimerizációt jelzi. **(B)** A különböző FV genotípusok hatása az 50%-os α_2 -PI-fibrin α -lánc heterodimerizációhoz szükséges időre rhTM jelenlétében ($T_{1/2}$ rhTM+) és annak hiányában ($T_{1/2}$ rhTM-). Mindhárom genotípus esetében 5-5 egyén plazmáját vizsgáltuk, majd a ($T_{1/2}$ rhTM+) és ($T_{1/2}$ rhTM-) közötti különbségek átlagát és a hozzájuk tartozó standard hibákat (SEM) oszlopdiagram formájában ábrázoltuk. +/+ : FV vad típus, +/- : FV_{Leiden} heterozigóta, -/- : FV_{Leiden} homozigóta. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

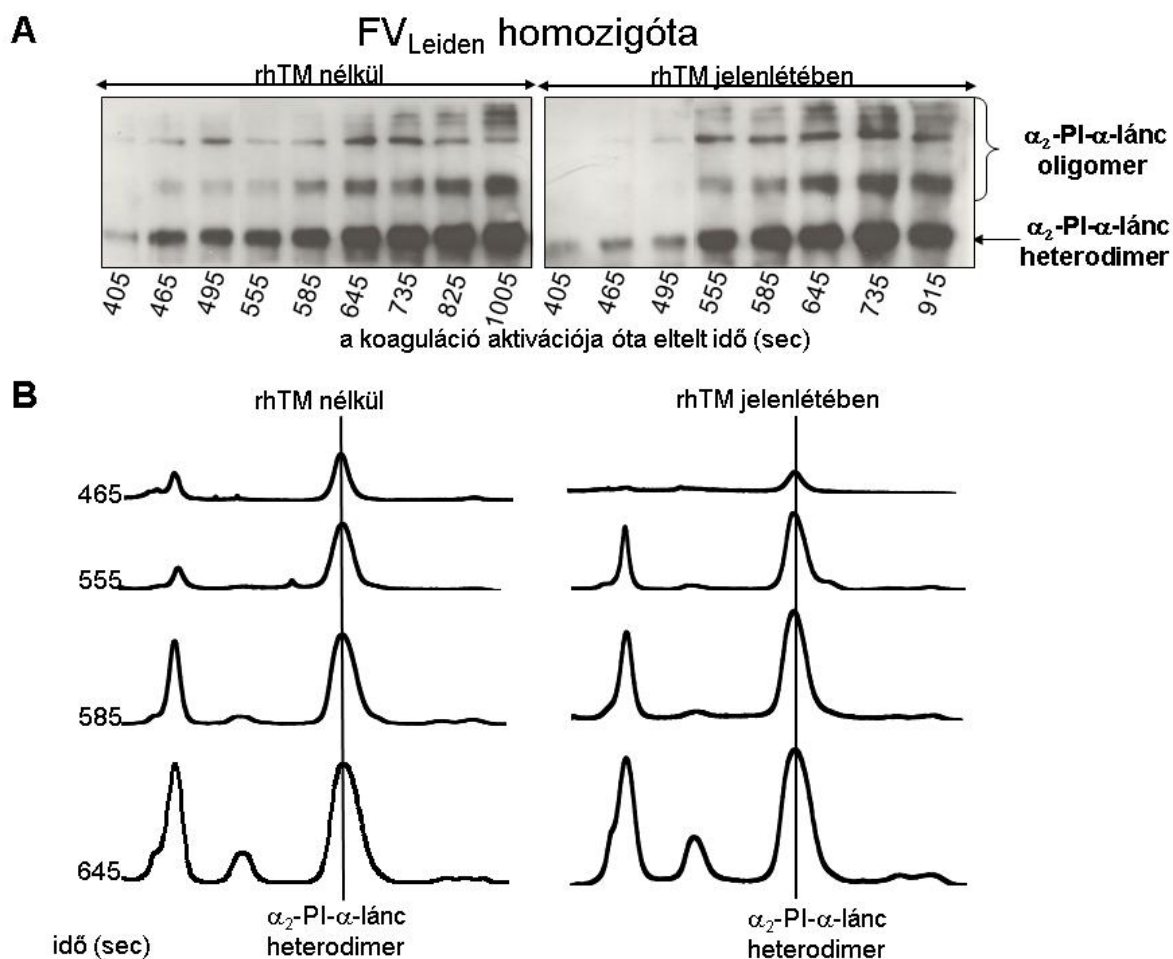
A 14A. ábra α_2 -PI-fibrin α -lánc közti heterodimerek kialakulásának kinetikáját ábrázolja 1-1 reprezentatív, különböző FV genotípusú egyén plazmájában. Az rhTM hatástalansága egyértelmű mindkét FV_{Leiden} hordozó csoport esetében. Az α_2 -PI-fibrin α -lánc közti heterodimerek 50%-ának kialakulásához szükséges rhTM jelenlétében és hiányában mért $T_{1/2}$ közti különbségeket ábrázolja a 14B. ábra. A FV vad típusú egyének és a FV_{Leiden} heterozigóták illetve homozigóták között észlelt különbségek szignifikánsak, viszont a két FV_{Leiden} hordozó csoport közti különbség ez esetben sem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. Amennyiben az rhTM-nek az α_2 -PI-fibrin α -lánc heterodimerek és oligomerek kialakulására gyakorolt hatását együtt vizsgáltuk, a FV_{Leiden} mutáció a fentiekhez hasonlóan befolyásolta az eredményeket (nem ábrázoltuk).

3.2. Az rhTM hatása az α_2 -PI-fibrin keresztkötésre izolált vad típusú FV-tel illetve FV_{Leiden}-nel kiegészített FV hiányplazmában

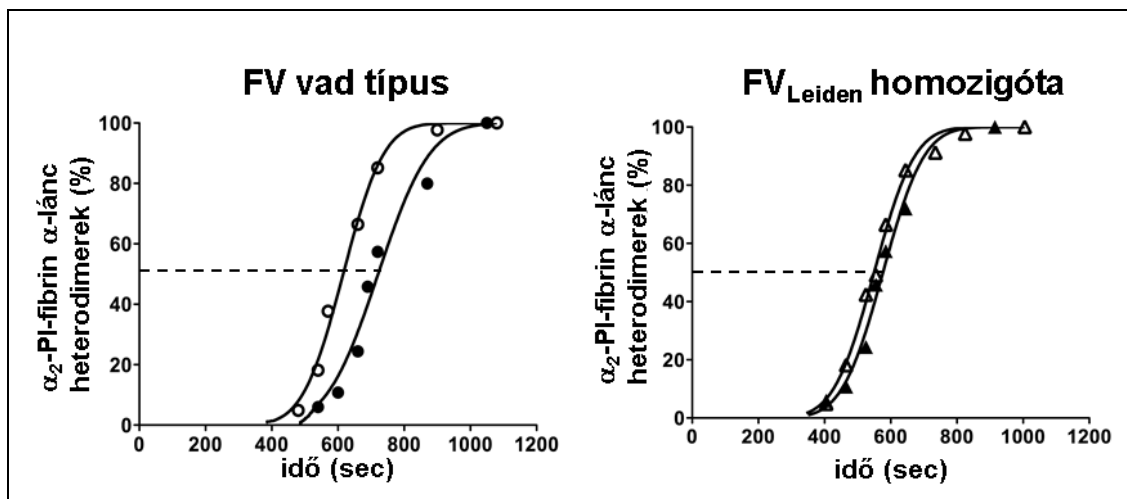
A FXIII aktivációnál leírt kísérletekhez hasonlóan az alvadék kialakulását befolyásoló plazma komponensek individuális különbségeinek kiküszöbölése érdekében, valamint a kapott eredmények megerősítése céljából, ez esetben is FV vad és FV_{Leiden} homozigóta egyének kevert plazmáiból FV-öt izoláltunk, majd ezzel kiegészítettük a FV hiányplazmát. Az így kapott plazmákban is megvizsgáltuk, hogy a különböző genotípusú FV hogyan befolyásolja az rhTM α_2 -PI-fibrin keresztkötésre gyakorolt hatását (15-17. ábrák). Abban az esetben, amikor a hiányplazmát vad típusú FV-al egészítettük ki, az rhTM szignifikánsan lelassította az α_2 -PI fibrinhez való keresztkötését (15. és 17. ábra). Amennyiben a hiányplazmához homozigóta FV_{Leiden}-t adtunk, az rhTM-nek e késleltető hatása minimális mértékben érvényesült (16-17. ábra).



15. ábra. Az α_2 -PI fibrin α -láncához való keresztkötődése részlegesen tisztított vad típusú FV-tel kiegészített FV hiányplazmában. **(A)** A különböző ideig, rhTM hiányában illetve jelenlétében inkubált alvadékokban a keresztkötött α_2 -PI-t Western blotting technikával detektáltuk. A Western blot kép alatt levő számok az inkubációs időket jelzik. **(B)** Egyes minták Western blotjainak denzitometriás kiértékelése.



16. ábra. Az α_2 -PI fibrin α -láncához való keresztkötődése részlegesen tisztított homozigóta FV_{Leiden} -nel kiegészített FV hiány plazmában. **(A)** A különböző ideig, rhTM hiányában illetve jelenlétében inkubált alvadékokban a keresztkötött α_2 -PI-t Western blotting technikával detektáltuk. A Western blot kép alatt levő számok az inkubációs időket jelzik. **(B)** Egyes minták Western blotjainak denzitometriás kiértékelése.



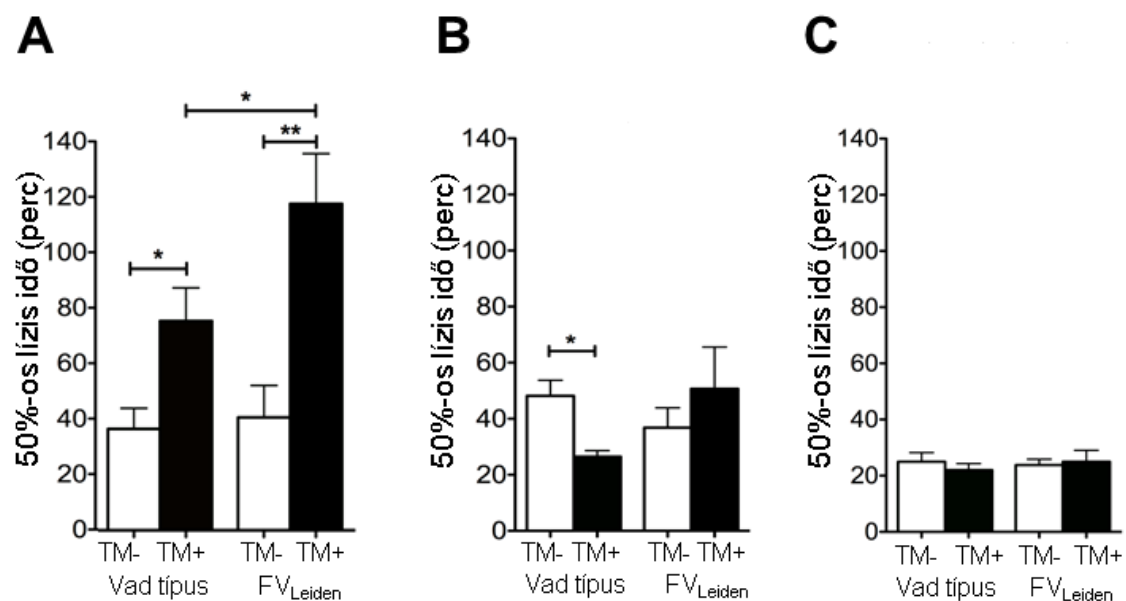
17. ábra. Az α_2 -PI fibrinhez való kötődésének kinetikája részlegesen tisztított vad típusú FV-tel illetve homozigóta FV_{Leiden} -nel kiegészített FV hiányplazmában. Az ábrák a fibrin α -lánc α_2 -PI heterodimerizáció kinetikáját mutatják $rhTM$ hiányában (üres karikák, ill. háromszögek) ill. jelenlétében (telt karikák, ill. háromszögek). A vízszintes, szaggatott vonal az α_2 -PI 50%-ának heterodimerizációját jelzi.

4. Az $rhTM$ FV_{Leiden} függő hatása a tPA indukálta fibrinolízisre

Mivel az α_2 -PI fibrinhez való keresztkötődése jelentősen befolyásolja az alvadék lízisét, ezért a következőkben az $rhTM$ -nek a tPA indukált lízis folyamatára kifejtett hatását vizsgáltuk FV vad és FV_{Leiden} homozigóta egyének plazmaiban (18. ábra). $rhTM$ hiányában nem tapasztaltunk különbséget a két genotípus között. Az $rhTM$ jelenléte mindkét genotípus esetén szignifikánsan megnyújtotta az alvadék lízis idejét, azaz a fibrinolízis mértékét csökkentette, bár az $rhTM$ FV_{Leiden} homozigóták esetén szignifikánsan hatékonyabb volt, mint a FV vad típusú egyéneknél (16A. ábra). $rhTM$ hatására a FV_{Leiden} homozigóta egyének plazmájában az 50%-os lízis szignifikánsan, mintegy 40 perccel később következett be, mint a FV vad típusú egyének plazmájában.

Ismert, hogy a TM TAFI aktivációra kifejtett hatásán keresztül befolyásolja a fibrinolízist. Annak bizonyítására, hogy a TM α_2 -PI-fibrin keresztkötésre kifejtett hatásának

szintén fontos szerepe van a fibrinolízis szabályozásában, in vitro lízis vizsgálatokat végeztünk TAFIa inhibitor jelenlétében, illetve olyan feltételek mellett is, amikor a TAFIa-t és FXIIIa-t egyszerre gátoltuk. A TAFIa gátlása mellett, az rhTM hatására felgyorsult a fibrinolízis a FV vad típusú egyénektől származó plazmákban, míg a FV_{Leiden} mutáció esetén ez a gyorsulás elmaradt (18B. ábra). Ennek hátterében az állhat, hogy rhTM jelenlétében a vad típusú FV-öt tartalmazó plazmákban a FXIII aktiváció lelassulása miatt a FXIIIa által katalizált α_2 -PI-fibrin keresztkötés is lelassul, míg ezek a hatások FV_{Leiden} esetén nem érvényesülnek. A lassúbb FXIII aktiváció szerepét az rhTM jelenlétében - TAFIa gátlása mellett - felgyorsult fibrinolízisben úgy bizonyítottuk, hogy a lízis vizsgálatokat TAFIa és FXIIIa együttes gátlása mellett is elvégeztük (18C. ábra). Ez esetben - az rhTM jelenlététől függetlenül - a FXIIIa gátlása miatt a lízis mindegyik plazma mintában jelentősen felgyorsult, és az egyes genotípusok közötti különbség is eltűnt.



18. ábra. Az rhTM hatása az alvadék tPA indukálta in vitro lízisére FV vad illetve FV_{Leiden} homozigóta egyének plazmáiban, inhibitorok nélkül (A), TAFIa inhibitor jelenlétében (B), ill. TAFIa és FXIIIa inhibitorok együttes alkalmazása esetében (C). Genotípusonként 5-5 egyén plazmájában meghatároztuk az 50%-os lízis időt rhTM hiányában (TM-) és jelenlétében (TM+). Az oszlopdiagramon a kapott értékek átlagát és a hozzájuk tartozó standard hibákat (SEM) tüntettük fel. Az oszlopok felett levő, csillaggal jelzett szakaszok a megfelelő csoportok között levő szignifikáns különbséget jelölik. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

MEGBESZÉLÉS

A TM a FXIII aktivációt direkt és indirekt mechanizmus révén képes befolyásolni. Fibrinogén hiányában magas koncentrációjú trombin szükséges a tisztított rendszerben történő FXIII aktiválásához; a trombin FXIII aktiváló képességét a trombin-trombomodulin komplex csökkenti.⁵⁰ Amennyiben a fibrinogén jelen van, a FXIII aktivációja különféleképpen módosul. A polimerizálódó fibrin 100-szorosára fokozza a FXIII aktivációját a plazmában.⁵¹⁻⁵⁵ Intézetünkben korábban kimutatták ugyanakkor, hogy a FXIII aktiváció a polimerizált fibrinfelületen megy végbe.¹⁸ Egyértelmű korreláció van a fibrinképződés és a FXIII aktiváció között, a fibrinképződés beindulását gyorsan követi a FXIII aktivációja.¹⁸ A fibrinhez való kötődés felgyorsítja a FXIII-A-ban az Arg37-Gly38 peptidkötés trombin által indukált hasítását.^{53, 56} Ennek köszönhető, hogy plazmában jóval alacsonyabb trombin koncentráció is elégséges a FXIII aktivációjához, mint tisztított, fibrinogén-mentes rendszerben.

Plazma körülmények között a TM direkt és indirekt mechanizmusok révén fejti ki hatását a FXIII aktivációra.⁵⁷ A direkt mechanizmus során a TM verseng a fibrinnel a trombin exosite-1 kötőhelyéért. A trombin exosite-1 fibrinhez való kötődése esszenciális a trombin katalizálta FXIII-A hasításának felgyorsulásában. A TM gátolva a trombin fibrinhez való kötődését, gátolja a fibrin felületen történő gyors FXIII aktivációt.⁵⁷ A TM FXIII aktivációt befolyásoló hatása egy indirekt mechanizmus révén is érvényesülhet. A TM felerősíti a protein C trombin indukálta aktivációját. Az APC proteolitikusan hasítja a FVa-t és FVIIIa-t, és ezáltal leregulálja a trombin generációt; a csökkent trombin generáció pedig késleltetett FXIII aktivációhoz vezet.

Eredményeink szerint FV vad típusú egyének plazmájában az rhTM szignifikánsan lassította a FXIII aktivációt, és ennek következtében a fibrin láncok keresztkötését, valamint az α_2 -PI fibrinhez való kovalens kötését. A TM-nak ez a fibrin stabilizációt lassító hatása FV_{Leiden}

mutációt hordozó egyének plazmaiban nem érvényesült. Ha a TM direkt hatása, azaz a FXIII trombin indukálta aktivációjának direkt gátlása érvényesülne, a FXIII aktiváció lassítása a FV genotípustól függetlenül bekövetkezne. Mivel ez csak a FV vad típus esetén észlelhető, eredményeink arra engednek következtetni, hogy plazmában nem a TM direkt hatása érvényesül, hanem az APC útvonalon keresztül kifejtett trombin generáció csökkenésnek és a fibrinképződés gátlásnak van elsődleges szerepe a lassúbb FXIII aktivációban és keresztkötés képződésben. FV_{Leiden} mutáció esetében a trombin generáció és a fibrin képződés APC útvonalon keresztül érvényesülő down-regulációja elvész, ill. sokkal kevésbé hatékony, így az rhTM FXIII aktivációt és a fibrin valamint az α_2 -PI keresztkötődést lassító hatása csak kismértékben érvényesül.

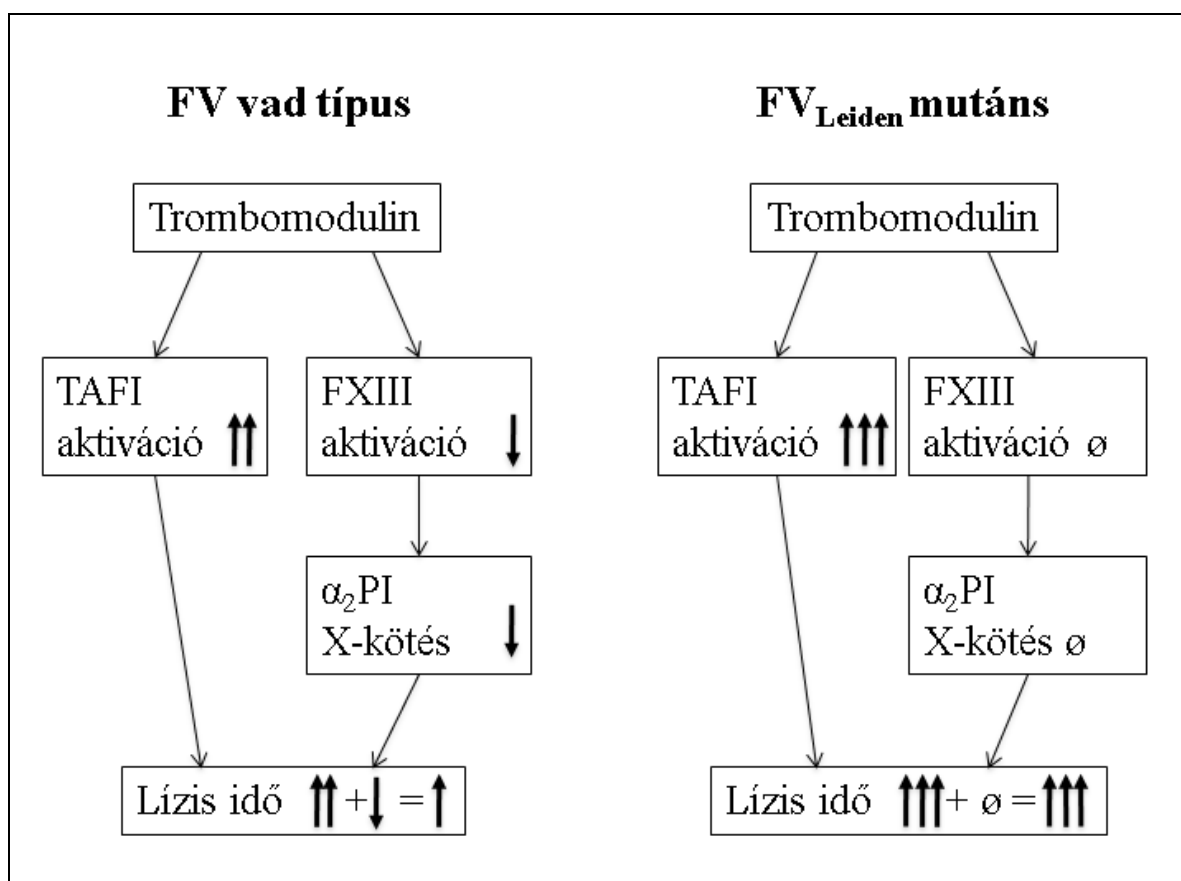
Az általunk végzett kísérletek során találtunk ugyan különbséget a FV_{Leiden} hetero- és homozigóták között, de ez statisztikailag nem bizonyult szignifikáns eltérésnek. Ez részben a vizsgálati alanyok kis számával magyarázható. A FV_{Leiden} homozigóták számát az adott feltételek mellett (trombózis mentes anamnézis, illetve FXIII-A Val34Leu polimorfizmusra nézve vad genotípus) nem tudtuk növelni. A vizsgálatban résztvevő öt homozigóta egyént közel 3000 egyén vizsgálatának eredményeként sikerült beválogatni. Másrészt a kísérleti körülmények beállításánál a FV_{Leiden} mutáció hatásának kimutatása volt az elsődleges szempont és nem a heterozigóta ill. homozigóta állapot közti különbség vizsgálata. A kísérleti feltételek változtatásával lehetett volna találni olyan koncentráció viszonyokat, melyeknél a heterozigóták és homozigóták közti különbség markánsabb, ez esetben azonban a kis vizsgálati szám miatt a vad típus és a heterozigóták közti különbség statisztikai szignifikanciáját elveszíthettük volna.

In vitro körülmények között,⁴² és transzgén egerekben in vivo⁵⁸ is igazolták, hogy a FV_{Leiden} mutáció protrombotikus hatása részben a fibrinolízis gátlása révén valósul meg. A TAFI és a FXIII a fibrinolízis két kulcsfontosságú down-regulátora, utóbbi antifibrinolitikus hatása az α_2 -PI-nak a fibrinhez való keresztkötése révén érvényesül (19. ábra). A TAFI-t a

trombin aktiválja, TM jelenléte pedig 1000-szeresére gyorsítja fel az aktiváció folyamatát. A TAFIa a részlegesen emésztett fibrinről lehasítja a C-terminálisan szabaddá váló lizin oldalláncokat, melyek a hatékony plazminogén aktivációhoz szükségesek.⁴¹ A TM bonyolult mechanizmus révén szabályozza a TAFI-t.^{36, 59, 60} Egyrészt fokozza a trombin által történő TAFI aktiváció sebességét, másrészt a PC aktiválásán keresztül csökkenti a trombin generációt, ami a kevesebb rendelkezésre álló trombin miatt csökkent TAFI aktivációhoz vezet. A TM-nak e hatásai koncentráció-függőek, vagyis alacsony TM koncentráció mellett a TAFI aktiváció fokozódása dominál, míg a magas TM koncentráció, az APC FV-re gyakorolt hatásán keresztül a trombin generáció csökkenésének kedvez, ami csökkent TAFI aktivációval jár. Ennek megfelelően, míg az alacsony TM koncentráció antifibrinolitikus/protrombotikus, addig a magas TM koncentráció profibrinolitikus/antitrombotikus hatással bír. FV_{Leiden} mutáció esetében az antitrombotikus hatás csökkent, vagyis a TAFI aktiváció magasabb TM koncentrációknál észlelt gátlása elvész.⁴³ A TM FXIII aktivációra és a fibrin illetve α_2 -PI keresztkötésre kifejtett hatását is befolyásolja a FV_{Leiden} mutáció. FV_{Leiden} hordozók esetében elmarad a TM FXIII aktivációt és fibrin illetve α_2 -PI keresztkötődést lassító hatása. Ez magyarázza, hogy FV_{Leiden}-t tartalmazó plazmában a lízis idő rhTM jelenlétében bekövetkező megnyúlása, azaz a fibrinolízis csökkenése, kifejezettebb volt, mint vad típusú FV-öt tartalmazó plazmákban (18A ábra és 19. ábra). A fenti mechanizmus a FV_{Leiden} mutáció okozta fokozott tromboembóliás rizikónak egy új biokémiai mechanizmusát jelenti.

Annak bizonyítására, hogy a FXIII aktiváció és a fibrin valamint α_2 -PI keresztkötések kialakulása valóban szerepet játszik a TM fibrinolízisre kifejtett hatásában, a lízis vizsgálatokat TAFIa inhibitor jelenlétében, azaz a TAFI aktiváción keresztül ható mechanizmusok kiiktatásával, is elvégeztük. A TAFIa gátlása esetén a FV vad típusú egyének plazma mintáiban rhTM jelenlétében a fibrinolízis folyamata felgyorsult (a lízis idő rövidült), amit a FXIII aktiválódás lelassulása és ennek következtében az α_2 -PI fibrinhez való kovalens

kapcsolódásának a késleltetése magyaráz (18B. ábra). FV_{Leiden} mutáció esetén a TM-nak az α_2 -PI fibrin keresztkötés kialakulását lassító hatása elmaradt, és az rhTM jelenlétében és hiányában mért lízis idők közel azonosak voltak. Amennyiben a TAFIa gátlás mellett FXIIIa inhibitorral gátoltuk az α_2 -PI keresztkötődését, azaz mindkét fibrinolízist gátló mechanizmust kiiktattuk, a fibrinolízis rhTM jelenlététől függetlenül jelentősen felgyorsult és eltűnt a FV genotípusok közti különbség is (18C. ábra). Ezek az eredmények megerősítik a FXIII aktiváción és az α_2 -PI-fibrin keresztkötések kialakulásán keresztül ható mechanizmus fontosságát a FV_{Leiden} mutáció antifibrinolitikus hatásában.



19. ábra. A TM tPA által indukált fibrinolízisre kifejtett hatásának feltételezett mechanizmusa FV vad típusú és FV_{Leiden} mutáns egyének plazmájában. Vad típusú FV esetében a TM a trombinnal komplexet képezve fokozza a TAFI aktivációját, ami a lízis idő megnyúlását, azaz a fibrinolízis csökkenését eredményezi. Ezzel ellentétesen ható

mechanizmus a FXIII aktivációjának, ill. ennek következtében az α_2 -PI fibrinhez történő keresztkötésének a késleltetése, ami a lízis idő megrövidüléséhez, a fibrinolízis fokozódásához kellene vezessen. A két ellentétes hatás közül a TAFI-n keresztül operáló mechanizmus a hatékonyabb, ezért a lízis idő TM hatására megnyúlik, de nem annyira, mintha a FXIII-on keresztül ható mechanizmus nem lenne jelen. FV_{Leiden} mutáció esetén a trombin generáció fokozódása miatt a TAFI aktiváció is fokozódik, s ugyanakkor a FXIII aktiváció késleltetése elmarad. Ennek következtében a lízis idő rhTM hatására FV_{Leiden} jelenlétében még inkább megnyúlik, mint vad típusú FV esetén.

Összegzésként elmondható, hogy FV vad típusú egyénekben a TM lassítja a trombin által indukált FXIII aktivációt, a fibrin láncok keresztkötését és az α_2 -PI fibrinhez történő keresztkötését. E hatás a trombin generáció APC útvonalon keresztül történő down-regulációja révén érvényesül. A FV_{Leiden} mutáció a TM eme hatásait megszünteti, ami (a TAFI aktivációra kifejtett hatás mellett) szerepet játszhat a mutáció antifibrinolitikus/protrombotikus hatásában.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Colman RW. Role of the light chain of high molecular weight kininogen in adhesion, cell-associated proteolysis and angiogenesis. *Biol Chem.* 2001; **382**: 65-70.
2. Balogh I, Poka R, Losonczy G, Muszbek L. High frequency of factor V Leiden mutation and prothrombin 20210A variant in Romanies of Eastern Hungary. *Thromb Haemos.* 1999; **82**: 1555-6.
3. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *P Natl Acad Sci USA.* 1993; **90**: 1004-8.
4. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994; **369**: 64-7.
5. Segers K, Dahlback B, Nicolaes GA. Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms. *Thromb Haemost.* 2007; **98**: 530-42.
6. Dahlback B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood.* 2008; **112**: 19-27.
7. Thorelli E, Kaufman RJ, Dahlback B. Cleavage of factor V at Arg 506 by activated protein C and the expression of anticoagulant activity of factor V. *Blood.* 1999; **93**: 2552-8.
8. Castoldi E, Brugge JM, Nicolaes GA, Girelli D, Tans G, Rosing J. Impaired APC cofactor activity of factor V plays a major role in the APC resistance associated with the factor V Leiden (R506Q) and R2 (H1299R) mutations. *Blood.* 2004; **103**: 4173-9.
9. van 't Veer C, Kalafatis M, Bertina RM, Simioni P, Mann KG. Increased tissue factor-initiated prothrombin activation as a result of the Arg506 --> Gln mutation in factor VLEIDEN. *J Biol Chem.* 1997; **272**: 20721-9.
10. Muszbek L, Yee VC, Hevessy Z. Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res.* 1999; **94**: 271-305.
11. Luscher EF. Fibrin-stabilizing factor from thrombocytes. *Schweiz Med Wschr.* 1957; **87**: 1220-1.
12. Kiesselbach TH, Wagner RH. Demonstration of factor XIII in human megakaryocytes by a fluorescent antibody technique. *Ann NY Acad Sci.* 1972; **202**: 318-28.
13. Muszbek L, Adany R, Szegedi G, Polgar J, Kawai M. Factor XIII of blood coagulation in human monocytes. *Thromb Res.* 1985; **37**: 401-10.
14. Komaromi I, Bagoly Z, Muszbek L. Factor XIII: novel structural and functional aspects. *J Thromb Haemost.* 2011; **9**: 9-20.
15. Bagoly Z, Koncz Z, Harsfalvi J, Muszbek L. Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thromb Res.* 2012; **129**: 382-7.
16. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komaromi I, Katona E. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev.* 2011; **91**: 931-72.
17. Achyuthan KE, Rowland TC, Birckbichler PJ, Lee KN, Bishop PD, Achyuthan AM. Hierarchies in the binding of human factor XIII, factor XIIIa, and endothelial cell transglutaminase to human plasma fibrinogen, fibrin, and fibronectin. *Mol Cell Biochem.* 1996; **162**: 43-9.
18. Shemirani AH, Haramura G, Bagoly Z, Muszbek L. The combined effect of fibrin formation and factor XIII A subunit Val34Leu polymorphism on the activation of factor XIII in whole plasma. *Biochim Biophys Acta.* 2006; **1764**: 1420-3.
19. Iismaa SE, Mearns BM, Lorand L, Graham RM. Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol Rev.* 2009; **89**: 991-1023.
20. Sakata Y, Aoki N. Cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *J Clin Invest.* 1980; **65**: 290-7.

21. Dardik R, Loscalzo J, Inbal A. Factor XIII (FXIII) and angiogenesis. *J Thromb Haemost.* 2006; **4**: 19-25.
22. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Chung KH, McKee PA. A novel plasma proteinase potentiates alpha2-antiplasmin inhibition of fibrin digestion. *Blood.* 2004; **103**: 3783-8.
23. Bangert K, Johnsen AH, Christensen U, Thorsen S. Different N-terminal forms of alpha 2-plasmin inhibitor in human plasma. *Biochem J.* 1993; **291**: 623-5.
24. Sumi Y, Ichikawa Y, Nakamura Y, Miura O, Aoki N. Expression and characterization of pro alpha 2-plasmin inhibitor. *J Biochem.* 1989; **106**: 703-7.
25. Sakata Y, Aoki N. Significance of cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin in inhibition of fibrinolysis and in hemostasis. *J Clin Invest.* 1982; **69**: 536-42.
26. Lord ST. Molecular mechanisms affecting fibrin structure and stability. *Arterioscl Throm Vasc Biol.* 2011; **31**: 494-9.
27. Standeven KF, Carter AM, Grant PJ, Weisel JW, Chernysh I, Masova L, et al. Functional analysis of fibrin {gamma}-chain cross-linking by activated factor XIII: determination of a cross-linking pattern that maximizes clot stiffness. *Blood.* 2007; **110**: 902-7.
28. Dahlback B. Human coagulation factor V purification and thrombin-catalyzed activation. *J Clin Invest.* 1980; **66**: 583-91.
29. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Lee CS, Chun JG, McKee PA. Why alpha-antiplasmin must be converted to a derivative form for optimal function. *J Thromb Haemost.* 2007; **5**: 2095-104.
30. Holmes WE, Lijnen HR, Collen D. Characterization of recombinant human alpha 2-antiplasmin and of mutants obtained by site-directed mutagenesis of the reactive site. *Biochemistry.* 1987; **26**: 5133-40.
31. Kimura S, Aoki N. Cross-linking site in fibrinogen for alpha 2-plasmin inhibitor. *J Biol Chem.* 1986; **261**: 15591-5.
32. Fraser SR, Booth NA, Mutch NJ. The antifibrinolytic function of factor XIII is exclusively expressed through alpha(2)-antiplasmin cross-linking. *Blood.* 2011; **117**: 6371-4.
33. Muszbek L, Bagoly Z, Bereczky Z, Katona E. The involvement of blood coagulation factor XIII in fibrinolysis and thrombosis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2008; **6**: 190-205.
34. Sakata Y, Mimuro J, Aoki N. Differential binding of plasminogen to crosslinked and noncrosslinked fibrins: its significance in hemostatic defect in factor XIII deficiency. *Blood.* 1984; **63**: 1393-401.
35. Lijnen HR, Zamarron C, Blaber M, Winkler ME, Collen D. Activation of plasminogen by pro-urokinase. I. Mechanism. *J Biol Chem.* 1986; **261**: 1253-8.
36. Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem.* 1982; **257**: 2912-9.
37. Petersen TE, Martzen MR, Ichinose A, Davie EW. Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system. *J Biol Chem.* 1990; **265**: 6104-11.
38. Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Thromb Haemost.* 1980; **43**: 77-89.
39. Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem.* 1995; **270**: 14477-84.
40. Nesheim M, Bajzar L. The discovery of TAFI. *J Thromb Haemost.* 2005; **3**: 2139-46.
41. Mosnier LO, Bouma BN. Regulation of fibrinolysis by thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, an unstable carboxypeptidase B that unites the pathways of coagulation and fibrinolysis. *Arterioscl Throm Vasc Biol.* 2006; **26**: 2445-53.

42. Bajzar L, Kalafatis M, Simioni P, Tracy PB. An antifibrinolytic mechanism describing the prothrombotic effect associated with factor VLeiden. *J Biol Chem*. 1996; **271**: 22949-52.
43. Mosnier LO, Meijers JC, Bouma BN. Regulation of fibrinolysis in plasma by TAFI and protein C is dependent on the concentration of thrombomodulin. *Thromb Haemost*. 2001; **85**: 5-11.
44. Balogh I, Szoke G, Karpati L, Wartiovaara U, Katona E, Komaromi I, et al. Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood*. 2000; **96**: 2479-86.
45. Ariens RA, Philippou H, Nagaswami C, Weisel JW, Lane DA, Grant PJ. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood*. 2000; **96**: 988-95.
46. Koeleman BP, Reitsma PH, Allaart CF, Bertina RM. Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C-deficient families. *Blood*. 1994; **84**: 1031-5.
47. Shemirani AH, Muszbek L. Rapid detection of the factor XIII Val34Leu (163 G-->T) polymorphism by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer detection and melting curve analysis. *Clin Chem Lab Med*. 2004; **42**: 877-9.
48. Brummel KE, Butenas S, Mann KG. An integrated study of fibrinogen during blood coagulation. *J Biol Chem*. 1999; **274**: 22862-70.
49. Dielis AW, Balliel WM, van Oerle R, Hermens WT, Spronk HM, Ten Cate H, et al. Thrombomodulin-modified thrombin generation after in vivo recombinant factor VIII treatment in severe hemophilia A. *Haematologica*. 2008; **93**: 1351-7.
50. Polgar J, Lerant I, Muszbek L, Machovich R. Thrombomodulin inhibits the activation of factor XIII by thrombin. *Thromb Res*. 1986; **43**: 685-90.
51. Greenberg CS, Miraglia CC. The effect of fibrin polymers on thrombin-catalyzed plasma factor XIIIa formation. *Blood*. 1985; **66**: 466-9.
52. Lewis SD, Janus TJ, Lorand L, Shafer JA. Regulation of formation of factor XIIIa by its fibrin substrates. *Biochemistry*. 1985; **24**: 6772-7.
53. Greenberg CS, Achyuthan KE, Rajagopalan S, Pizzo SV. Characterization of the fibrin polymer structure that accelerates thrombin cleavage of plasma factor XIII. *Arch Biochem Biophys*. 1988; **262**: 142-8.
54. Naski MC, Lorand L, Shafer JA. Characterization of the kinetic pathway for fibrin promotion of alpha-thrombin-catalyzed activation of plasma factor XIII. *Biochemistry*. 1991; **30**: 934-41.
55. Janus TJ, Lewis SD, Lorand L, Shafer JA. Promotion of thrombin-catalyzed activation of factor XIII by fibrinogen. *Biochemistry*. 1983; **22**: 6269-72.
56. Hornyak TJ, Shafer JA. Interactions of factor XIII with fibrin as substrate and cofactor. *Biochemistry*. 1992; **31**: 423-9.
57. Philippou H, Rance J, Myles T, Hall SW, Ariens RA, Grant PJ, et al. Roles of low specificity and cofactor interaction sites on thrombin during factor XIII activation. Competition for cofactor sites on thrombin determines its fate. *J Biol Chem*. 2003; **278**: 32020-6.
58. Parker AC, Mundada LV, Schmaier AH, Fay WP. Factor VLeiden inhibits fibrinolysis in vivo. *Circulation*. 2004; **110**: 3594-8.
59. Mosnier LO, Meijers JC, Bouma BN. The role of protein S in the activation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and regulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost*. 2001; **86**: 1040-6.
60. Mosnier LO, Elisen MG, Bouma BN, Meijers JC. Protein C inhibitor regulates the thrombin-thrombomodulin complex in the up- and down regulation of TAFI activation. *Thromb Haemost*. 2001; **86**: 1057-64.

Iktatószám: DEENKÉTK/261/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Koncz Zsuzsa

Neptun kód: OMGAM6

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Bagoly, Z., **Koncz, Z.**, Hársfalvi, J., Muszbek, L.: Factor XIII, clot structure, thrombosis.
Thromb. Res. 129 (3), 382-387, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2011.11.040>
IF:2.44 (2011)
2. **Koncz, Z.**, Bagoly, Z., Haramura, G., Mezei, Z.A., Muszbek, L.: Thrombomodulin-dependent effect of factor V Leiden mutation on the cross-linking of alfa2-plasmin inhibitor to fibrin and its consequences on fibrinolysis.
Thromb. Res. 130 (3), 528-534, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2012.05.019>
IF:2.44 (2011)
3. **Koncz, Z.**, Bagoly, Z., Haramura, G., Mezei, Z.A., Muszbek, L.: Thrombomodulin-dependent effect of factor V Leiden mutation on factor XIII activation.
Thromb. Res. 129 (4), 508-513, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2011.06.030>
IF:2.44 (2011)

Összesített impakt faktor: 7.32

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 7.32

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, 2012.08.27

TÁRGYSZAVAK

V-ös faktor Leiden mutációja

XIII-as faktor

α_2 -plazmin inhibitor

fibrin

fibrinolízis

trombin aktiválta fibrinolízis inhibitor

trombomodulin

KEYWORDS

factor V Leiden mutation

factor XIII

α_2 -plasmin inhibitor

fibrin

fibrinolysis

trombin activatable fibrinolysis inhibitor

thrombomodulin

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani mindazoknak, akik lehetőségeikhez mérten segítségemre voltak és hozzájárultak e munka megvalósulásához.

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Muszbek László akadémikusnak, hogy megteremtette a kutatásaimhoz szükséges feltételeket, munkámat mindvégig figyelemmel kísérte, értékes szakmai tanácsokkal látott el, ugyanakkor felkeltette bennem az új ismeretek megszerzése iránti kiolthatatlan vágyat.

Köszönöm Bagoly Zsuzsának, hogy nemcsak munkacsoport vezetőként, hanem barátként is végig segítségemre volt a munkában, hasznos szakmai tanácsokkal, észrevételekkel látott el, pozitív hozzáállásával pedig mindvégig biztatott és támogatott.

Hálás vagyok Haramura Gizellának, a laboratóriumi technikák elsajátításában nyújtott segítségéért.

Köszönöm Mezei Zoltánnak, hogy szívélyes volt a PCR vizsgálatok elvégzésében.

A Klinikai Kutató Központ valamennyi dolgozójának köszönöm, hogy jó légkört teremtettek a munkához, az irodavezetőknek pedig az adminisztratív munkában való segítségnyújtásért jár elismerés.

Nem maradhatnak ki a köszönetnyilvánításból a Laboratóriumi Medicina Intézet vérvételi-, hemosztázis- és molekuláris genetikai labor dolgozói sem, akik szükség esetén mindig szívélyesen és készségesen segítettek.

A II. Belklinika orvosszakmai igazgatójának, Prof. Boda Zoltánnak valamint dr. Oláh Zsolt és dr. Ilonczai Péter, egyetemi tanársegédeknek köszönöm a FV_{Leiden} homozigóta egyének felkutatásában nyújtott segítséget.

Végezetül, külön köszönettel tartozom a családomnak, hogy munkám során mindvégig mellettem álltak és olyan háttérrel biztosítottak, ami nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg. Andikám, köszönöm a türelmedet és a megértést a tőled elrabolt és a munkába fektetett időért!

FÜGGELÉK

NEMZETKÖZI- ÉS HAZAI KONFERENCIÁKON TARTOTT ELŐADÁSOK, BEMUTATOTT POSZTEREK

Koncz Z, Bagoly Z, Haramura G, Mezei ZA, Muszbek L. The effect of factor V Leiden mutation on the activation of factor XIII in plasma.

3rd Winter Course on Clinical Research, Palfau, Austria, 2009.01.22-24.

Koncz Z, Bagoly Z, Haramura G, Mezei ZA, Muszbek L. Új biokémiai mechanizmus az V-ös faktor (FV) Leiden mutációval összefüggő trombózis rizikó hátterében: a FV Leiden hatása a XIII-as faktor aktivációjára.

A Magyar Thrombosis és Haemostasis Társaság Laki Kálmán Emlékülése, Abádszalók, 2009.09.26.

Bagoly Z, **Koncz Z**, Haramura G, Mezei ZA, Muszbek L. Activation of Factor XIII in individuals with Factor V Leiden mutation; a novel down-stream mechanism that might contribute to the increased risk of thrombosis.

54. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Haemostaseforschung (GTH), 1. Joint Meeting GTH and NVTH, Nürnberg, Germany, 2010.02.23-25.

Koncz Z, Bagoly Z, Haramura G, Mezei ZA, Muszbek L. Factor XIII activation and fibrin cross-linking in individuals with factor V_{Leiden} mutation: a novel down-stream mechanism that might contribute to the increased risk of thrombosis.

21st International Congress of Thrombosis, Milan, Italy, 2010.07.06-09.

Koncz Z, Bagoly Z, Haramura G, Mezei ZA, Muszbek L. Az V-ös faktor Leiden mutáció fibrinolízist gátló hatásának biokémiai háttere.

A Magyar Thrombosis és Haemostasis Társaság X. Kongresszusa, Alsópáhok, 2010.09.30-10.02.

Koncz Z, Bagoly Z, Haramura G, Mezei ZA, Muszbek L. A XIII-as faktor aktiváció és a fibrin keresztkötés kialakulása faktor V Leiden mutációt hordozó egyéneknél; a fokozott thrombosis kockázathoz vezető lehetséges új mechanizmus.

„Öt év a klinikai kutatásban” című tudományos ülés, Debrecen, 2010.11.29.

Koncz Z, Bagoly Z, Haramura G, Mezei ZA, Muszbek L. Factor V Leiden mutation, factor XIII, fibrinolysis.

5th Winter Course on Clinical Research, Bad Kleinkirchheim, Austria, 2011.01.10-12.

Koncz Z, Bagoly Z, Haramura G, Mezei ZA, Muszbek L. The involvement of factor XIII in the impaired fibrinolysis of patients with factor V Leiden mutation.

55. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose und Hämostaseforschung, Wiesbaden, Germany, 2011.02.16-19.

Koncz Z, Bagoly Z, Haramura G, Mezei ZA, Muszbek L. A TAFI és a XIII-as faktor együttes szerepe az V-ös faktor Leiden mutáció okozta csökkent fibrinolízisben.

A Magyar Hematológiai és Transzfúziológiai Társaság XXIII. Kongresszusa, Pécs, 2011.05.26-28.

Bagoly Z, **Koncz Z**, Haramura G, Mezei ZA, Muszbek L. The involvement of factor XIII in the impaired fibrinolysis of patients with factor V Leiden mutation.

57th Annual SSC Meeting, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, Japan, 2011.07.23-28.

Koncz Z, Bagoly Z, Haramura G, Mezei ZA, Muszbek L. The involvement of factor XIII in the impaired fibrinolysis of patients with factor V Leiden mutation.

XI. European Thrombosis Research Organization (ETRO) Advanced Teaching Course, Campobasso, Italy, 2011.09.18-23.