

**VELESZÜLETETT ÉS SZERZETT PARAHAEMOPHILIA
MOLEKULÁRIS GENETIKAI ÉS BIOKÉMIAI
KARAKTERIZÁLÁSA**

Dr. Ajzner Éva

Témavezető: Prof. Dr. Muszbek László

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM**

KLINIKAI BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS PATOLÓGIAI INTÉZET

Debrecen, 2003

BEVEZETÉS

A véralvadás

A hemosztázis rendszer kettős feladatot lát el. Az intakt ér pályán belül a vért folyékony állapotban tartja és ezzel biztosítja a szabad véráramlást. Érfal sérülés esetén viszont ugyanennek a rendszernek a funkciója a vérzés mielőbbi megszüntetése, ezáltal a vérveszteség minimalizálása. A hemosztázis rendszer ezt a komplex feladatot humorális, celluláris és vaszkuláris működések összehangolásával biztosítja.

A humorális rendszer, a véralvadás, aktiválódását az érendothel sérülése vagy aktiválódása indítja be subendothelialis szöveti faktor (TF) véráram felé történő exponálásával vagy a TF endothel sejtekben történő expresszáásával. A TF egyaránt kötődik a zimogén (FVII) valamint a keringésben már kis mennyiségben jelenlevő aktív VII-es faktorhoz (FVIIa), TF-FVII ill. TF-FVIIa (extrinzik faktor tenáz) komplexet hozva létre. A komplex mindkét formája elegendő katalitikus aktivitással bír kis mennyiségű X-es faktor (FX) aktív enzimmé (FXa) való hasításához, de a TF:VIIa komplex katalitikus aktivitása lényegesen nagyobb és szubsztrát specifitása a FX mellett a FIX-re is kiterjed. A komplex működése a véralvadás kezdeti fázisában pikomoláris mennyiségű trombin képződéséhez vezet, ami elegendő a thrombocyták valamint az V-ös, VIII-as alvadási faktorok, prokofaktorok, részleges aktiválódásához, azaz FVa-vá és FVIIIa-vá alakulásához. A FVIIIa az intrinzik tenáz komplex kofaktora, melyben az aktív IX-es faktor (FIXa) a szerin proteáz. Az intrinzik tenáz komplex is a FX-et hasítja, de 50-100x nagyobb sebességgel, mint az extrinzik tenáz komplex. Az immár jelentős mennyiségben képződő FXa a protrombináz komplex enzimeként nagy sebességgel hasítja a protrombint trombinná, ami a véralvadás propagációs vagy előrehaladott fázisának kulcsfeltétele. A protrombináz komplex

kofaktora a FVa. A nagy sebességgel keletkező szolubilis trombin tovább gyorsítja saját képződését a XI-es faktor aktiválásával és azáltal, hogy teljessé teszi a FV, FVIII és a thrombocyták aktivációját. A trombin további működése során fibrinogén molekulákból fibrinopeptid A és B lehasításával szolubilis fibrin monomereket képez, amelyek polimerizálódva a fibrinhálót alkotják. A háló stabilizálásához pedig aktiválja a XIII-as faktort (FXIII), ami a fibrinháló kovalens keresztkötéseinek kialakítását végzi.

A véralvadás terminációs fázisában a trombin generáció megfékezését különböző antikoaguláns rendszerek végzik, enzimek gátlásával vagy a kofaktorok aktivitásának modulálásán keresztül. A TF-útvonal-inhibitor (TFPI) a FXa-t és FVIIa-TF-FXa komplexet gátolja. Az antitrombin, egy szerin proteáz inhibitor, melynek fő fiziológiás funkciója a trombin és a FXa gátlása. Az antitrombin önmagában kis hatékonyságú inhibitor, működését az endothel sejtek felszínén levő heparin-szerű molekulák (heparán szulfát) stimulálják. Az érfalon folyamatosan expresszált trombomodulin receptorhoz kikötődő trombin a protein C-t (PC) aktív szerin proteázzá hasítja és így aktiválja a PC antikoaguláns rendszert. Az aktivált PC (APC) limitált proteolízissel képes inaktiválni a foszfolipid membránhoz kötött FV/FVa-t és FVIIIa-t.

A sérülés kapcsán szabaddá váló subendotheliális rostok illetve szolubilis aktiváló anyagok hatására a nyugvó állapotban keringő thrombocyták az adhezív felülethez tapadnak, aggregálódnak és szekretálják granulumaik tartalmát, ami további aggregációt eredményez és létrejön az elsődleges trombus. Ezen aktivációs folyamat során a thrombocyták egyrészt foszfolipid kettősrétegük átrendezésével alkalmassá válnak arra, hogy a humorális kaszkád alvadási komplexeinek foszfolipid felszín biztosítsanak,

másrészt főként α -granulumaikban tárolt prokoaguláns és véralvadást szabályozó fehérjéket szekretálnak a humorális alvadáshoz.

A véralvadás V-ös faktora (FV)

A FV egyláncú, 330 kD molekulatömegű glikoprotein. Plazma koncentrációja átlagosan 20 nmol/L, 7 μ g/mL. FV a plazmában szabadon keringő forma mellett a thrombocyták α -granulumaiban is megtalálható, amely mennyiség a teljes vérben levő FV körülbelül 25%-a. A FV szintézisének elsődleges helye a máj. A thrombocyta FV "pool" eredete kapcsán még nem eldöntött, hogy a döntő mechanizmus a plazma FV endocitózissal történő felvétele vagy a thrombocyták megakaryocita prekurzoraiban történő szintézis. A FV egyláncú molekulaként szintetizálódik, és sokszoros posztranszlációs módosítás (N-glikoziláció, foszforiláció és szulfatáció) után szekretálódik.

A FV molekula génje 80 kb, az 1-es kromoszómán található (1q23), 25 exonból és 24 intronból áll. A FV molekula doménszerkezete a VIII-as faktoréhoz nagyon hasonló: A1-A2-B-A3-C1-C2. A két alvadási kofaktor az A és C doménjeiben 40%-os szekvencia azonosságot mutat.

Az FV FXa-kofaktor-aktivitásának kialakulása prokoaguláns enzimek (trombin, FXa) hatására történik. Ennek során a FV B-összekötő régiója kihasad és disszociál a FVa nem kovalensen asszociált nehéz (A1-A2) és könnyű (A3-C1-C2) láncaitól. A teljes prokoaguláns aktivitással bíró FVa molekula kalciumhíddal összekapcsolt 105 kD molekulatömegű nehéz és 72/74 kD molekulatömegű könnyű láncból áll.

A FVa inaktiválása APC-mediált proteolízissal történik az Arg 306, Arg506, és Arg679 mellett. A teljes FVa inaktiválódáshoz elengedhetetlen az Arg306 hasítás, minek sebességét 20x-ra fokozza a PS jelenléte.

A FV, a véralvadás enzim kofaktora, sajátságos, kettős szerepet tölt be a normál hemosztázis egyensúlyának fenntartásában. A FVa a véralvadás protrombináz komplexében a protrombint trombinná alakító FXa kofaktora. Az egyláncú FV még inaktív prokofaktor, amelynek prokoaguláns FXa-kofaktor-aktivitása - ha egyáltalán ilyen van - kevesebb, mint a FVa kofaktor aktivitásának egy százaléka. A FVa-t esszenciális FXa kofaktornak tartják, mivel ha jelen van a protrombináz komplexben, a FXa protrombin aktivációs képessége több ezerszeresre fokozódik. A nem aktivált FV, vagy az APC által hasított FV ugyanakkor a PS-sel azonos jelentőségű kofaktorként működik az APC mellett a FVIIIa inaktiválásában. A FV teljes prokoaguláns aktivációját követően antikoaguláns kofaktor képessége elvész. Az eddigi eredmények azt valószínűsítik, hogy a FV pro- és antikoaguláns működései között egy nagyon finomam szabályozott egyensúly létezik: a FV aktivációjával az antikoaguláns kofaktor funkció eltűnik, de az APC katalizálta FV proteolízis prokoaguláns hatással nem bíró antikoaguláns kofaktor funkciójú fehérjét eredményez. A FV aktivált formája tehát esszenciális prokoaguláns funkciót tölt be, aminek hiányában vérzékenység alakulhat ki. A nem-aktivált prekursor protein faktor viszont mint az APC antikoaguláns kofaktora működik a FVIIIa aktivitás szabályozásában. Ennek a funkciónak a sérülése (FV R506Q, FV Leiden) thrombosis-hajlamhoz vezethet. A FV molekula ezen kettős funkciójának pontos megismerése lényeges információkat adhat a FV deficiens betegek klinikai tüneteinek megértéséhez és majdani kezeléséhez.

FV deficienciák

Az első FV deficiens beteg leírása és a FV felfedezése a norvég származású Paul Owren nevéhez kapcsolódik. Napjainkra a FV defektusok

vérzékenységet okozó és thrombosis hajlamot okozó formái váltak ismeretté. A vérzékenységet okozó FV defektusok közé tartoznak a parahaemophiliák, azaz a klasszikus FV deficienciák, beleértve FV deficienciák kombinált formáit is. A thrombosis hajlamot okozó FV defektusok közé tartoznak az izolált homo- és heterozigóta FV Leiden mutáció és a pszeudohomozigóta FV Leiden mutáció (FV Leiden mutáció, heterozigóta I-es típusú FV deficienciával történő társulása).

A parahaemophiliák pathomechanizmus szerinti osztályozása öröklött és szerzett formákat különít el. Mindkét csoporton belül megkülönböztethető az izolált forma valamint a kombinált típus. Az első csoportban levő betegeknél kizárólag a FV aktivitása csökkent, míg a második csoportban a parahaemophilia öröklött vagy szerzett formája más faktor(ok) deficienciájával társul (kombinált FV, FVIII deficiencia).

A FV aktivitás alapján való osztályozás a haemophilia diagnosztikában általánosan használt rendszert követi. Eszerint az enyhe parahaemophilia 5-30%, a közepes súlyos 1-5% a súlyos forma 1% alatt levő FV aktivitást feltételez.

A plazma és thrombocyta FV "pool" nem egyformán érintett a különböző parahaemophiliák esetében. Egy további klasszifikáció szerint megkülönböztetünk kombinált FV deficienciákat, melyben a plazma és a thrombocyta FV "pool" egyformán csökkent és thrombocyta típusú FV deficienciákat, ahol csak a vérlemezke "pool" FV érintett.

A proporcionális FV aktivitás és FV antigénszint csökkenéssel járó parahaemophilia az I-es típusú FV deficiencia. A betegek 17%-ban detektált csökkent funkciójú FV molekula esetében észlelt deficiencia II-es típusúnak számít, ilyenkor az antigénszint a FV aktivitáshoz viszonyítva jóval magasabb.

A szakirodalomban még olvasható, de a laboratóriumi tesztek szenzitivitásának fokozódásával lassan elavuló klasszifikáció az ún. CRM negatív és pozitív deficiencia fogalma. A fehérje-antigén kimutatási eljárás során a teszt pozitivitása a vizsgált fehérje, esetünkben a FV jelenlétét, negativitása pedig hiányát jelentette. A később használt "CRM reduced" kifejezés a csökkent, de még kimutatható fehérje mennyiségekre utalt.

Veleszületett parahaemophilia

A hereditér parahaemophilia öröklésmenete autoszomális recesszív, prevalenciája $1:10^6$. Az irodalomban körülbelül 200 eset szerepel. Ezen esetek döntő többségénél azonban a részletes biokémiai és molekuláris genetikai háttér ismeretlen. A FV gén teljes szekvenciájának ismertetésével azonban egyre nő a részletesen kivizsgált esetek száma. 2002 augusztusáig huszonegy FV deficienciát okozó mutációt írtak le. A felderített mutációkat hordozó betegek közül tizennégy esetben volt súlyos a FV deficiencia, s e betegek közül tizenkét esetben homozigóta formában levő mutáció okozta a deficienciát, kettőnél pedig (ebből egyik a tézisekben is elemzett beteg) kombinált heterozigóta mutációt bizonyítottak. A mutációk véletlenszerűen érintik a FV gén valamennyi exonját, természetesen a legtöbb mutáció az igen nagy 13-as exonban van, de ún. mutációs forró pont nem detektálható. A mutációk között "nonsense", "frameshift", "splicing" és "missense" mutációk egyaránt előfordulnak. A felderített mutációk döntő többsége egy-egy családban fordult elő, csupán öt mutációt találtak meg legalább két nem rokon családban.

Szerzett parahaemophilia

Szerzetten izolált FV deficiencia, FV elleni gátlótest képződésének a következménye. A veleszületett parahaemophiliákhoz hasonlóan igen ritka betegségnek tartották: egy az 1955 és 1997 között megjelent FV inhibitorral kapcsolatos közléseket feldolgozó tanulmány 105 eset klinikai és laboratóriumi sajátosságait elemezte. Anti-FV antitest kialakulhat alloimmunizáció kapcsán, öröklött FV deficienciában szenvedő betegek friss fagyasztott plazmával történő kezelésekor. Auto-antitestképződéssel anti-FV antitest leggyakrabban olyan betegeknél fordult elő akik előzetesen sebészeti kezelést, vértranszfúziót vagy antibiotikum kezelést kaptak, de nem ritka az idiopathiás esetek száma sem. A bovin FV-t tartalmazó készítmények alkalmazásakor kialakuló anti-FV antitest, a készítmény bovin FV-je ellen képződő anti-bovin FV antitest, amely a human FV-el keresztreakciót ad. Jellemző, hogy a FV inhibitoros betegek döntő többsége felnőttkorban diagnosztizált, nem ritka a 70 év feletti beteg. A FV inhibitorra jellemző, hogy spontán vagy kezelés hatására gyakran 4-22 hét alatt szanálódik. A betegség prognózisa, ha az inhibitor megjelenéséhez gyakran kapcsolódó nagy akut vérzést sikerül uralni, kifejezetten jó.

A parahaemophiliák klinikai tünetei

A parahaemophiliák klinikai tünetei változó súlyosságú vérzékenységtől a tünetmentességig különbözőek lehetnek, sőt négy FV elleni gátlótest okozta, thrombosis-hajlammal járó parahaemophiliás eset is ismert. A vérzés leggyakrabban mucocutan, a leggyakoribb tünetek az epistaxis, a szájüregi vérzések, a menorrhagia. Gyakori tünetnek számít a posztoperatív vérzés és az ízületi vagy izomközti vérzés. Ritka, de gyakran fatális tünet a központi idegrendszeri vérzés. Érdekes, hogy míg a gastrointestinalis vérzés és a

haematuria ritka vérezéstípus a veleszületett parahaemophiliákban, addig a gátlótestes formáknál a vérzékenységet mutató betegek harmadánál jelentkezik.

Egyelőre még nem tudjuk mi annak a magyarázata, hogy míg a humán szervezetben látszólag teljes FV hiány sem letális, addig a FV knock-out egerek esetében az embriók kb fele már az embrionális fejlődés 9-10 napjáig elpusztul, a többiek pedig a születést követő 2 órán belül elvéreznek.

A parahaemophiliák laboratóriumi diagnosztikája

A FV deficiencia a coagulopathiák szűrőtesztjeiben leggyakrabban a protrombin idő (PI) és aktivált parciális tromboplastin idő (APTI) megnyúlását okozza. A lokálisan alkalmazott bovin trombin tartalmú készítmények hatására kialakuló FV alloantitestek esetében gyakran a fenti eltérésekhez a trombin idő (TI) megnyúlása is társul, ilyenkor ugyanis az alloantitest FV mellett trombinnal is reagál. A hasonló alvadási szűrőteszt eredményekkel járó izolált vagy kombinált coagulopathiáktól való elkülönítésre egyfázisú PI, APTI alapú faktoraktivitás meghatározások szükségesek. A FV aktivitásának 30% alá csökkenése esetén a FV deficiencia igazolható. A parahaemophilia diagnózisának felállítását követően a kezeléshez elengedhetetlen annak eldöntése, hogy inhibitor vagy faktor hiány okozza a faktoraktivitás csökkenését. A parahaemophilia okozta vérzékenység súlyossága egyes szerzők szerint a thrombocyta FV aktivitás megtartottságától függ, ezért ennek meghatározása lényeges további információ lehet a klinikum számára.

BETEGEK ÉS CÉLKITŰZÉS

Egy fiú csecsemő születésekor subduralis haematoma, majd védőoltásai kapcsán intramuscularis haematomák miatt került kivizsgálásra. Családi anamnézisében vérzékenység, rokonházasság nem volt felderíthető.

A 78 éves nőbeteg súlyos anaemia és melena miatt került kórházi felvételre. Felvételét megelőzően három évvel a betegnél uterectomia és kétoldali ovariectomia történt. Az intraoperatív és posztoperatív vérzések kezelése során többször alkalmaztak friss fagyasztott plazma és vvt. massa készítményeket. A beteg családi anamnézisében vérzékenység nem fordult elő. A gastrointestinalis kivizsgálások során vérzést okozó anatómiai eltérést nem találtak, atrófiás antrum gastritis, cholelithiasis és reflux cholecystitis igazolódott. A beteg kezelése során friss fagyasztott plazma, thrombocyta és vvt. koncentrátumok, nagy dózisú immunglobulin adása mellett, plazmaferézis és immunszuppresszív terápia (ciklosporin A és ciklofoszfamid) alkalmazása is szerepelt. A követés 3 éve alatt a beteg néhány relapsuson esett át, négy különböző időpontban volt szükség kórházi kezelésére.

Célkitűzéseink

- 1. A betegek haemorrhagias diathesisének karakterizálása.**
- 2. Az első pontban megfogalmazott vizsgálatok mindkét betegnél súlyos FV deficienciát igazoltak. A továbbiakban a betegek parahaemophiliájának részletes molekuláris genetikai hátterét és biokémiai mechanizmusát kívántuk felderíteni.**

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Thrombocyta és plazma minták előkészítése

A vizsgált betegektől és a fiú csecsemő elérhető rokonaitól 0.105 mol/L nátrium citráttal 1:10 arányban alvadásgátolt vért vettünk. A Western blotting és az immunoprecipitációs vizsgálatok mintáihoz azonnal proteáz inhibitorok keverékét adtuk. A plazmát 22 °C-on, 2,000 g-vel, 20 percig történő centrifugálással nyertük. A thrombocyta szuszpenzió izolálása thrombocyta aktivációt gátló anyagok jelenlétében végzett differenciál centrifugálással történt.

Coagulopathiák diagnosztikájában használt alvadási tesztek

A coagulopathiák szűrésére PI, APTI és TI vizsgálatokat végeztünk. A gátlótest kereséshez a beteg és normál plazma különböző arányú keverékeit is teszteltük azonnal, vagy 1 óra 37 °C-on történő inkubációt követően. A FV elleni gátlótest kimutatására Bethesda módszert használtunk. LA jelenlétét funkcionális tesztekkel zártuk ki.

FV aktivitás meghatározás

FV aktivitás meghatározása a betegek plazmájából és thrombocyta lizátumából egyfázisú PI alapú teszttel történt. A plazma FV aktivitás meghatározás kalibrációját gyári standard humán plazma segítségével végeztük, míg a thrombocyta FV aktivitás kalibrációja normál thrombocyta lizátum felhasználásával történt.

FV antigén meghatározás ELISA módszerrel

Sandwich ELISA rendszereket állítottunk be totál FV, FV nehéz lánc (FVNL) és FV könnyű lánc (FVKL) antigén (Ag) meghatározására. Az egyes rendszerek specificitását a "coating" során alkalmazott antitest biztosította, amely a totál FV ELISA-ban egy poliklonális FV ellenes antitest volt, a FVNL ELISA esetén egy FV B domén epitóp ellenes monoklonális antitest (a FV nehéz láncát és B doménjet tartalmazó molekulát ismeri fel), míg a FVKL ELISA esetén FVKL ellenes monoklonális antitest volt. A sandwich másik oldalán FV ellenes antiszérum használatával biztosítottuk, hogy a potenciálisan jelenlevő valamennyi normál és kóros szerkezetű bekötődött FV felismerhető legyen. A plazma FV Ag tesztek kalibrációját gyári standard humán plazma segítségével végeztük, míg a thrombocyta lizátumból történő FV meghatározás esetében egészséges donorok thrombocyta lizátumának felhasználásával történt a kalibráció. A FV antigén szinteket a normál átlag százalékában fejeztük ki.

Immunoprecipitáció, SDS-poliakrilamid gél elektroforézis (SDS-PAGE) és immunoblotting

A plazma FV-t immunprecipitációval izoláltuk. Az immunprecipitátumok és a teljes plazma minták SDS-PAGE elektroforézisét követően, Western blotting analízist végeztük. Első antitestként általában az immunprecipitációhoz is használt poliklonális FV elleni antitestet használtuk. Az fiú csecsemő esetében az eredmények megerősítésére további első antitesteket (FV ellenes antiszérum, FV B-domén ellenes monoklonális antitest) is alkalmaztunk.

PCR amplifikáció és DNS szekvenálás

A FV gén teljes kódoló szakaszát, a "splicing" régiókkal és a promoterrel együtt PCR amplifikációt követően szekvenáltuk. Az ultrafiltrációval tisztított PCR termékeket ABI 310 Genetic Analyzer segítségével szekvenáltuk.

Immunglobulin G tisztítása plazmából

A FV inhibitor gyanús beteg plazmájából és a kontroll plazmákból a teljes IgG frakciót Protein G Sepharose oszlopon izoláltuk, mikrokoncentrátoron töményítettük.

Az IgG FV ill. FVa-hoz való kötődésének vizsgálata ELISA technikával

Saját fejlesztésű szolid-fázisú ELISA teszttel detektáltuk az anti-FV antitestek tisztított humán FV-höz és a FV trombin aktivált formájához való kötődését. Tisztított FV-t vagy FVa-t rögzítettünk ELISA lemezre, majd plazma vagy tisztított IgG különböző hígításaival inkubáltuk. A FV ill. FVa-hoz bekötődött IgG típusú anti FV antitest jelenlétét peroxidáz jelzett anti humán IgG és TMB szubsztrát felhasználásával detektáltuk.

Az anti-FV autoantitest epitópjának karakterizálása

Az anti-FV autoantitest epitópjának karakterizálására blokkoló ELISA rendszert állítottunk be. A FV molekulán ismert epitóppal rendelkező monoklonális antitestekkel blokkoltuk az ELISA-lemezhez rögzített FV molekula kötőhelyeit. Mosást követően a beteg IgG preparátumának különböző hígításait adtuk és peroxidázzal jelzett anti-humán IgG-vel mértük a bekötődött beteg IgG mennyiségét.

A beteg plazmából származó IgG FVa prokoaguláns aktivitásra kifejtett hatásának vizsgálata funkcionális tesztekkel

A beteg IgG növekvő koncentrációit normál plazma "pool"-hoz adtuk és mértük a keverék PI, APTI és TI idejét. Kontroll kísérletekben a beteg IgG helyett egészséges donor IgG-jét használtuk a keverékekben. Az eredményeket végül beteg és normál plazma különböző arányú keverékeiben mért PI, APTI, TI időkhöz hasonlítottuk. A beteg IgG hatását a FVa prokoaguláns aktivitására minimálisan módosított kromogén protrombináz tesztben is vizsgáltuk. Rekombináns, trombin aktivált FVa-t inkubáltunk együtt a beteg IgG növekvő koncentrációival. A FVa maradék prokoaguláns aktivitását a kromogén trombin szubsztrát segítségével kinetikus tesztben mértük.

ELISA teszt a FV-anti-faktor V immunkomplex kimutatására

ELISA rendszert dolgoztunk ki FV-specifikus immunkomplexek detektálására. A tesztben "capture" antitestként poliklonális anti-human FV antitestet, detektálásra pedig peroxidáz jelölt anti-humán IgG-t használtunk. A beteg és kontroll plazmákat valamint thrombocytá lizátumokat különböző hígításokban teszteltük.

EREDMÉNYEK

Öröklött súlyos FV deficiencia; egy fiú csecsemő coagulopathiájának karakterizálása

Coagulopathia szűrőtesztek

A klinikailag vérzékeny csecsemő coagulopathiájának vizsgálatánál súlyosan megnyúlt PI-t (58.1 sec; kontroll: 8.7-11.5 sec) és APTI-t (198.8 sec; kontroll: 29.5-42.7 sec) észleltünk, míg a TI a normál tartományban volt.

FV aktivitás

Az alvadási faktorok aktivitásának meghatározásakor a beteg plazmájában és thrombocyta lizátumában a FV aktivitást mérhetetlenül alacsonynak találtuk (mindkét esetben $<0.4\%$). A családtagok közül a beteg édesanyjánál, édesapjánál és apai nagymamájánál 50% körüli FV aktivitást mértünk, míg a többi vizsgált családtag normál FV fenotípust mutatott.

FV gén szekvencia analízis

A DNS szekvencia analízis során a probandnál két kauzatív mutációt találtunk, mindkettőt heterozigóta formában: a 13-as exonban a 2952-es nukleotid pozícióban egy bázis (timin) delécióját, a 16-os exonban az 5493-as nukleotid pozícióban egy bázis (guanin) inzercióját. A proband édesanyjánál a 5493insG mutáció heterozigóta formája, édesapjánál a 2952delT mutáció heterozigóta formája volt igazolható. A proband DNS szekvenciájában két további, nem kauzatív mutációt találtunk: A327→G szubsztitúciót a 2-es exonban (csendes mutáció) és egy ismert polimorfizmust a 22-es exonban (heterozigóta A6250→T).

Mutáns FV fehérjék kimutatása

A proband genetikai eltéréseinek fehérjeszintû következményeként, elméletileg két különbözô molekulasúlyú trunkált FV molekula képzôdhetne. A különbözô FV epitópokra specifikus ELISA tesztek alkalmazásával FVKL:Ag egyáltalán nem volt a beteg plazmájában kimutatható (<0.5%). Ugyanakkor a másik két ELISA tesztben bár súlyosan csökkent mennyiségben, de mérhetô volt a beteg plazmájában FVAg (FVNLL:Ag 1.7%, total FVAg: 1.03%). A szülôknél és az érintett nagymamánál valamennyi ELISA tesztel 50% körüli FVAg szint volt detektálható.

A beteg plazmájából végzett Western blotting vizsgálattal nem volt FV-specifikus sáv detektálható. Ha a beteg plazmájából immunprecipitációval izoláltuk a FV-öt és lényegesen nagyobb mennyiséget vittünk fel az SDS PAGE-ra, a megnövelt szenzitivitású Western blotting során három különbözô elsô antitesttel (poliklonális FV elleni, FV antiszérum és FV B-domén elleni monoklonális) sikerült egy nagyon halvány, 236 kD mobilitású, FV-specifikus sáv jelenlétét kimutatni. Intakt, egyláncú FV nem volt kimutatható.

Szerzett FV deficiencia; egy idős nôbeteg coagulopathiájának karakterizálása

Szerzett coagulopathia kimutatása

A beteg 3 éves követése során mindvégig megnyúlt PI (elsô felvételnél 81.3 sec; kontroll: 8.7-11.5 sec) és APTI (147.2 sec; kontroll: 29.5-42.7 sec) mellett normál TI-t detektáltunk. A beteg és normál plazma 1:1 arányú keverékeibôl végzett PI, APTI idôk nem mutattak teljes korrekciót. Az 1 órási 37°C-on történô inkubációt követôen elvégzett tesztek eredményei hasonlóan alakultak. A beteg plazmájában izolált FV aktivitás (0.48%) csökkenés volt mérhetô. A beteg thrombocyta lizátumában is súlyosan csökkent FV aktivitást (1.12%) detektáltunk.

A 3 éves követés alatt mért Bethesda titer eredmények végig alacsonyak voltak (1.25-2.0 BU). Tisztított FV beteg plazmához való adagolásakor a PI és APTI idôk 7.5-10 µg/mL szuplementált FV koncentrációnál normalizálódtak. A LA kimutatására elvégzett vizsgálatok eredménye negatív volt.

A beteg plazmájában és thrombocyta lizátumában normál totál FV:Ag (106 és 80%) szint mellett erôsen csökkent FVKL:Ag (7.9, és 4.8%) volt detektálható. A FVKL: Ag szint csökkenése nem trunkált fehérje következménye volt, mivel a beteg plazmájából immunprecipitációval izolált FV Western blottinggal történô analízise során egyetlen, ~330kD molekulásúlyú, intakt FV molekulának megfelelô FV specifikus sáv volt detektálható.

A beteg FV génjének szekvenálásakor nem találtunk betegség okozó mutációt, csupán néhány ismert polimorfizmust és egy eddig nem közölt mutáció heterozigóta formáját a 13-as exonban. E mellett a beteg a Leiden mutációt heterozigóta formájában hordozta.

FV specifikus autoantitest kimutatása a beteg IgG-frakciójában

A FV ill. FVa -hoz való kötődést kimutató ELISA tesztekkel a beteg plazmájában és IgG frakciójában szignifikáns mennyiségben detektáltunk FV-ill. FVa- specifikus antitestet. A FV tartalmú immunkomplexek kimutatására szolgáló ELISA tesztekben a beteg plazmájában és thrombocyta lizátumában egyaránt FV-anti FV immunkomplexek voltak kimutathatók.

A blokkoló ELISA tesztben, négy FV specifikus monoklonális antitest hatását teszteltük. Mindegyik antitest kötődött a FV molekulához, de csak a FVKL C2 doménre specifikus HV1 antitest gátolta a beteg IgG FV molekulához való bekötődését.

A beteg IgG frakciójának hatása a FVa prokoaguláns aktivitására

A beteg IgG-je a normál plazma PI-jét és APTI-jét hasonló mértékben nyújtotta meg, mint az azonos IgG koncentrációt tartalmazó beteg plazma normál plazmához történő adása. A kontroll IgG-nek nem volt ilyen hatása. Az inhibitor nem befolyásolta a normál plazma TI idejét. A beteg IgG inhibitor hatása relatíve gyengének bizonyult, az effektív gátláshoz legalább 8 mg/mL beteg IgG koncentrációra volt szükség.

A beteg IgG növekvő koncentrációival történő inkubáció a rekombináns FVa prokoaguláns kofaktor aktivitását jelentősen gátolta a protrombináz tesztben, míg a kontroll IgG-nek nem volt ilyen hatása. 1 mg/mL beteg IgG esetén a gátlás mértéke meghaladta a 70%-ot és fiziológiás IgG koncentráció esetén (~10 mg/mL) csupán 2.5% maradék FV aktivitás volt detektálható.

MEGBESZÉLÉS

Mindkét beteg szűrőtesztjei és faktor aktivitás eredményei egyértelműen a FV deficiencia súlyos formája mellett szóltak. A betegek kora, anamnézise típusos volt, a gyermeknél FV deficiencia veleszületett, az idős nőnél szerzett formáira utaltak. Az idős nőbetegnél a FV inhibitor szűrésére végzett keveréses vizsgálatok és a Bethesda titrálás eredményei alapján kóros FV molekula és a plazma pótlások hatására kialakuló allo-antitest képződés kombinált lehetősége is felmerült.

A FV antigén különböző specificitású ELISA tesztekkel történő vizsgálata során a gyermeknél csak a teszt érzékenyítésével volt 1% körüli totál ill FVNL:Ag mérhető, FVKL:Ag szintje viszont detektálhatatlan volt, ami I-es típusú FV deficiencia fenotípusának felelt meg. A FV gén teljes kódoló, splicing és promoter régióinak szekvenálásával két kauzatív mutációt mutattunk ki. Mindkét mutáció olvasási keret eltolódásán keresztül korai stop kodont eredményezett a 930 ill. 1776 aminosav pozíciókban. Eredményük trunkált FV molekula szintézise lehet: a mutáns 13-as exont tartalmazó allélról elméletileg a B domén egy részét és a teljes könnyű láncot nélkülöző FV protein képződhet, a mutáns 16-os exont tartalmazó allélról íródó fehérjéről pedig hiányozna a könnyű lánc jelentős része. Ez utóbbi 1775 aminosav hosszú polipeptid számított molekulásúlya ~200 kD. Figyelembe véve, hogy ez a mutáns tartalmazza az erősen glikozilált B domént, nagyon valószínű, hogy az a kis mennyiségben jelenlevő 236 kD fehérje, amit az immunoprecipitációt követő Western blotting során detektáltunk, ezen nagyobb trunkált fehérjének felel meg. A fehérjét FV_{Debrece}-nek neveztük el. A kisebb trunkált fehérje hiánya és a FV_{Debrece} erősen csökkent mennyisége, a mutáns mRNS csökkent szintézisével, vagy a mutáns protein csökkent

stabilitásával, intracelluláris degradációjával és gyorsult plazma clearance-vel magyarázható.

A veleszületett FV hiányos gyermek mindkét FV kompartmentjében a FV aktivitása a detektálási határ alatti volt ($<0.4\%$), és a FV deficiencia súlyos vérzékenységet idézett elő. Ismert, hogy a FV "knock out" egerek intrauterin vagy postnatalis első két nap során elvéreznek, de túlélésükhöz már minimális $<0.1\%$ FV expreszió is elég. Betegünkönél nem tudtunk intakt FV-t kimutatni. Azt azonban, hogy a teszt szenitivitásától kisebb mennyiségű minimális FV "riboszomalis slippage" vagy szomatikus reverzió miatt jelen legyen, nem kizárható. Elképzelhető továbbá, hogy az általunk kimutatott trunkált FV fehérjének (FV_{Debrecen}) is van némi prokoaguláns aktivitása.

Az idős nő plazmájában és thrombocytaiban, trunkált vagy kóros szerkezetű FV molekulára jellemző FV:Ag fenotípust mutattunk ki: total FV és FVNL specifikus ELISA rendszerekben normál, míg FVKL-specifikus ELISA-ban 10% alatti súlyosan csökkent antigénszint volt detektálható. Az immunoprecipitációt követő Western blotting analízis azonban normál mobilitású FV specifikus sáv jelenlétét igazolta, és a DNS szekvenálás során sem találtunk kóros FV molekula szintézisét magyarázó genetikai eltérést. A FVKL:Ag szint csökkenésének legvalószínűbb magyarázata, hogy az ELISA teszt "capture" antitestjének FV molekulán lévő target epitópja az autoantitest által részben lefedett. Ezen hipotézis megerősítésére blokkoló ELISA tesztekben a FV molekulán ismert epitóppal rendelkező monoklonális antitestekkel próbáltuk a beteg autoantitestjének bekötődését meggátolni. Az alkalmazott antitestek közül kettő epitópja a FVKL-n, harmadiké a NL-n a negyediké pedig a B doménen található. Csak a HV1 antitest, melynek epitópja a FVKL C2 doménjén, a 2060-2069 aminosav régióban van, interferált a beteg auto-antitestjének FV molekulához való kötődésével. Ezek

alapján valószínűsíthető, hogy a HV1 antitest és a beteg autoantitestjének FV molekulán levő epitópjai azonosak vagy legalább részben átfednek. A C2 domén N-terminális vége a FVa foszfolipidfelszínhez való kötődésében játszik szerepet. Ennek gátlása jól magyarázza az alvadási tesztek és a protrombináz teszt eredményeit.

Az idős nőbeteg szerzett parahaemophiliájának hátterében álló anti-FV antitest kimutatható volt a beteg plazmájából és IgG frakciójából és reagált mind a FV mind a FVa-val. Funkcionális tesztekben a beteg IgG-je gátolta a FVa prokoaguláns aktivitását. FV-anti FV IgG immunkomplex a beteg plazmájában detektálható volt. Az antitest relatíve alacsony titerű volt, de a funkcionális tesztek bizonyították, hogy ez a titer elegendő volt a FVa funkciójának plazmában történő gátlásához, s a vérzékenységi tünetek az "in vivo" hatékonyság mellett szóltak.

Tudomásunk szerint FV inhibitor thrombocytában való jelenlétét még nem vizsgálták. A betegünk mosott thrombocyta szuszpenziójában talált eredmények - erősen csökkent FV aktivitás, normál total FV:Ag és csökkent FVLC:Ag szint, FV-anti-FV immunkomplexek jelenléte - az inhibitor thrombocytában való jelenlétére utalnak. Az IgG típusu FV inhibitorok a thrombocyták normál "in vivo" IgG transzport mechanizmusával bejuthatnak a thrombocyta alfa granulumokba. Egy másik elképzelhető alternatív mechanizmus a FV-anti-FV immunkomplexek thrombocyták vagy megakaryocyták általi felvétele és α -granulumba történő transzportja.

A FV inhibitor okozta parahaemophiliás nőbeteg gastrointestinális vérzése jól kezelhetőnek bizonyult, de a megnyúlt alvadási tesztek és az alacsony FV aktivitás a követés 3 éve alatt végig megmaradt. A tünetek szempontjából a thrombocyta FV aktivitását tartják meghatározónak. Az idős nőbeteg thrombocytáiban is kimutatható FV inhibitor, ami feltehetőleg

hatékonyan képes gátolni a thrombocyta FV prokoaguláns aktivitását. A klinikai képet befolyásoló tényezők komplexitásához a beteg heterozigóta Leiden mutációja is hozzájárulhat. Ebben az esetben ugyanis a csekély mennyiségű autoantitest által nem gátolt plazma FV 50%-a a hosszabb ideig tartó prokoaguláns hatással bíró FV Leiden molekula, ami csökkentheti a vérzékenység súlyosságát.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

I. É Ajzner, I Balogh, T Szabó, A Marosi, L Muszbek. Severe coagulation factor V deficiency caused by two novel frameshift mutations: 2952delT in exon 13 and 5493insG in exon 16 of factor 5 gene.

Blood. 2002;99:702-705

IF: 8.977

II. É Ajzner, I Balogh, G Haramura, Z Boda, K Kalmár, Gy Pfliegler, B Dahlbäck, L Muszbek. Anti-Factor V Auto-antibody in the Plasma and Platelets of a Patient with Repeated Gastrointestinal Bleeding

Accepted in J Thromb Haemost, December 2002

IF*: 4.372

* Thromb Haemost impakt faktora

A szerző egyéb nemzetközi folyóiratban megjelent közleményei:

1. Szondy Z, Reichert U, Bernardon JM, Michel S, Toth R, Ancian P, Ajzner E, Fesus L. Induction of apoptosis by retinoids and retinoic acid receptor gamma-selective compounds in mouse thymocytes through a novel apoptosis pathway. Mol Pharmacol. 1997;51:972-82.

IF: 5.678

2. Kappelmayer J, Ajzner E, Muszbek L. Incompatibility of a recombinant thromboplastin and an APTT reagent on a fully automated coagulation analyzer. Blood Coagul Fibrinolysis. 1997;8:251-2.

IF: 1.938

3. R. Póka, É. Ajzner, I. Balogh. Public health approach to activated protein C resistance assay. Am J Obstet Gynecol 1997; 177: 1271-2.

IF: 2.519

4. Kerenyi A, Schlammadinger A, Ajzner E, Szegedi I, Kiss C, Pap Z, Boda Z, Muszbek L. Comparison of PFA-100 closure time and template bleeding time of patients with inherited disorders causing defective platelet function. Thromb Res. 1999;96:487-92. IF: 1.323
5. N. Regéczy, G. Lakos, I. Balogh, É. Ajzner, E. Kiss, G. Szegedi. The Leiden mutation of coagulation Factor V in hungarian SLE patients. Clin Appl Thromb Hemost 2000; 6: 41-5. IF: 0.567
6. S.N. Baré, R. Póka, I. Balogh, É. Ajzner. Factor V Leiden as a risk factor for miscarriage and reduced fertility. Aust NZ J Obstet and Gynaecol 2000;40:186-90. IF: 0.523
7. Katona E, Ajzner E, Toth K, Karpati L, Muszbek L. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. J Immunol Methods. 2001 Dec 1;258(1-2):127-35 IF: 1.995
8. Olah L, Misz M, Kappelmayer J, Ajzner E, Csepany T, Fekete I, Bereczki D, Blasko G, Csiba L. Natural coagulation inhibitor proteins in young patients with cerebral ischemia. Cerebrovasc Dis. 2001;12(4):291-7 IF: 2.950

(A közlemények impakt faktora a 2000-es SCI Journal Rankings alapján)

A szerző hazai közleményei:

1. Z Pap, É Ajzner, C Kiss, J Emôdy, I Závodszky, A Horváth, L Muszbek. Thrombocytafunkció-zavar albínó gyermekekben. Orvosi Hetilap 1997;138:467-71
2. G Szûcs, I Mikó, É Ajzner, L Póti, K Szepesi, I Furka. Efficiency of prevention of thromboembolic complications with LMW-heparin in experiment. (in Hungarian, English abstract) Acta Chirurgica Hungarica 1997;36:356-8.
3. Póka R, Balogh I, Ajzner É, Nagy I.G. Orális fogamzásgátlás thromboemboliás szövôdményeinek megelôzése: Módszertani javaslat. Orvosi Hetilap 1998; 139: 815-8.
4. Póka R, Ajzner É, Balogh I. A családi anamnézis és a Leiden-mutáció vizsgálatának összehasonlítása fogamzásgátlót szedni kívánók körében. Magyar Nôorvosok Lapja 1999; 162: 11-5
5. M Misz, L Oláh, J Kappelmayer, G Blaskó, M Udvardy, J Fekete, T Csépany, É Ajzner, L Csiba. Haemostatic abnormalities in ischemic stroke. (in Hungarian, English abstract) Medical Weekly 1998;139:2503-7.
6. N Regéczy, I Balogh, G Lakos, M Zeher, E Bodolay, G Szucs, E Kiss, É Ajzner, G Szegedi. Hypercoagulability in various autoimmune diseases: no association with factor V Leiden mutation. Haematologia (Budap) 2000;1: 41-5.