

A PROGRESSÍV ANTITHROMBIN ELMÉLETI ÉS GYAKORLATI VONATKOZÁSAI*

PÁLOS Á. LÁSZLÓ
az MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1974. VIII. 14

Az érpályában keringő vér a korszerű szemlélet alapján szervnek tekintendő és egyben az idegrendszer mellett a legnagyobb és legfontosabb közvetítő rendszerünk. Biztosítja, hogy a szervezet belső történései mind egymással, mind pedig a külvilággal funkcionális kapcsolatban álljanak. A keringő vér folyékony halmazállapota vitalis jelentőségű, de ugyanolyan biológiai szükség-szerűség, hogy érsérüléskor a kiömlő vér megalvadjon. A folyékony halmaz-állapot fenntartását, ill. sérülés esetén a véralvadás optimális mértékét számos regulációs rendszer biztosítja. A véralvadás mechanizmusa az egyik legjobban szabályozott biológiai rendszer.

A véralvadás mechanizmusának egymásba kapcsolódó kémiai reakciói végül az alvasztó fermentumot, a thrombint eredményezik, amely a folyékony fibrinogént gél állapotú fibrinné alakítja át.

A thrombin képződése autokatalitikus, tehát a keletkezett thrombin további thrombinképződést katalizál, ami a vér gyors alvadását jelenti. Kóros körülmények között a keringő vérben is képződhet thrombin és így az auto-katalitikus reakció értelmében azt várnánk, hogy a legkisebb intravasalis alvadék képződésekor, tehát thrombosis esetén, a keringő vér robbanásszerűen megalvadjon; ami életképtelenséget jelentene. Ez azonban nem következik be, ami csakis úgy képzelhető el, hogy olyan mechanizmusok működnek, amelyek intravasalis thrombinképződés esetén a thrombint nagy erővel közömbösítik. Ezek közül legjelentősebbek az antithrombinok. A különböző antithrombinok jelölésére a Seegers (1962) által bevezetett csoportosítás szolgált hosszú ideig alapként, ami ma már történelmi jelentőségű. Igazolódott ugyanis, hogy egy-részt olyan tényezőket tartalmaz, amelyeket az utánvizsgálatok nem igazoltak (antithrombin IV), másrészt a korábban még két tényezőnek tartott anti-thrombin-II és III azonosságát is bizonyítottaknak tekinthető.

Antithrombinnak ma tulajdonképpen azt a fehérjét nevezzük, amely irreverzibilisen és progresszíven inaktíválja a thrombint. Ez a tulajdonság

* Székfoglaló előadás. Elhangzott 1974. május 15-én.

a Seegers-féle 6 antithrombinból csupán az antithrombin-III-ra vonatkoztatható. Elsősorban Lyttleton (1954) kísérletei hívták fel a figyelmet arra, hogy az antithrombin összetett anyag. A serum thrombininaktiváló képességét vizsgálva észlelte, hogy a folyamat nem írható le egységes reakció renddel. Waugh és Fitzgerald (1956) ebből arra következtettek, hogy a serumban összetett folyamat eredményeként, több tényező hatására inaktiválódik a thrombin. Az inaktiválás reakciókinetikáját van't Hoff differenciálási módszerével vizsgáltuk (Sas és Pálos 1966) és magunk is azt találtuk, hogy a folyamat során egyre magasabb rendűvé válik a reakció-rend. Ezen adatok valószínűsítették, hogy az antithrombin nem homogén, de további felvilágosítást nem nyújtottak. Végül Abildgaardnak (1967) két frakciót sikerült izolálnia. Elektroforetikus mobilitását tekintve mindkettő α_2 -globulin. Az egyik 820 000 molekulású macroglobulin, míg a másik 64 000 molekulású glycoprotein. Ma ez utóbbit nevezzük antithrombin-III-nak. Egyébként mindkét fehérje a proteolyticus enzimek inhibitora és a progresszív thrombininaktiválás közös jellemzőjük. Különbség van közöttük azonban az inaktiválás mértékét illetően. A teljes thrombininaktiválás mintegy 70%-át az antithrombin-III végzi, és csupán 30%-áért felelős az α_2 -macroglobulin. Ha az antithrombin-III aktivitását hődefibrinált plasmában vizsgáljuk, úgy egészséges egyének 1 ml-nyi plasmájában átlagosan 700 NIH egység thrombin inaktiválódik percek alatt. Ez a thrombinmennyiség mintegy 1000 ml 300 mg%-os fibrinogént 20 sec alatt alvaszt meg, ami teljes vérré átszámítva kb. egy felnőtt ember vérmennyiségének közel a felével egyenlő.

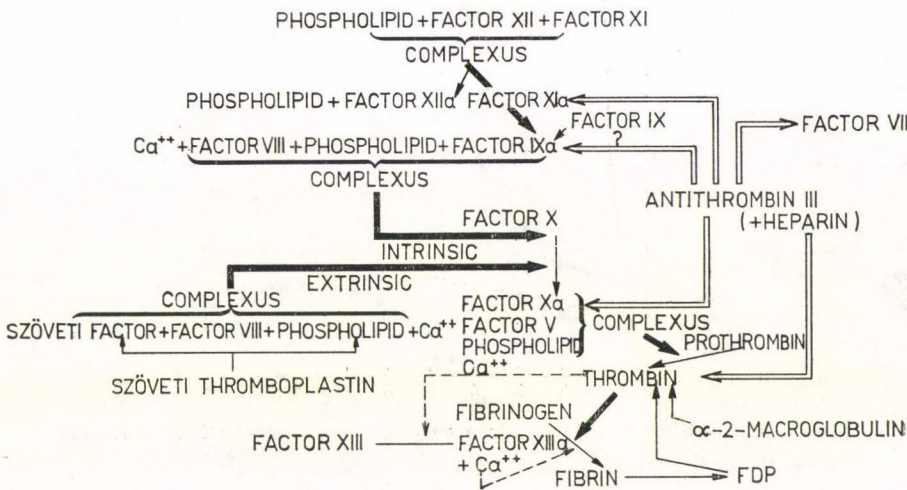
Ezen számadatok önmagukban is igazolják annak a védekező reakciónak a jelentőségét, amit az antithrombin-III a thrombininaktiválás során kifejt. Mivel a thrombininaktiválás az idő függvényében zajlik le, a legaktívabb antithrombinműködés mellett is létrejöhet kisebb-nagyobb mérvű intravasalis thrombinképződés. Általános érvényű tulajdonsága azonban az élő szervezeteknek, hogy a vitalis életfolyamatokat reguláló reakciók mindig többirányúak. Ez az antithrombin-III-ra is vonatkozik, amennyiben a véralvadás mechanizmusában több ponton fejti ki inaktiváló hatását. Már az előfázis faktorok eliminálásában is központi szerepet játszik. Semlegesíti az aktivált XIa, IXa és Xa faktorokat, sőt igazolást nyert — főleg Marciniak (1973), Yin és Wessler (1971), valamint Osamo (1971) munkásságából, hogy az antithrombin-III nagyobb intenzitással inaktiválja az aktivált X faktort, mint magát a thrombint. Az antithrombin-III ezen tulajdonságai rendkívüli védelmet biztosítanak. (1. ábra)

Az antithrombin-III által inaktivált faktoroknak közös tulajdonsága, hogy mindegyik proteolitikus enzim és aktív centrumaik hasonló szerkezetűek, mindegyik az ún. „serin protease” enzimek közé tartozik. (2. ábra)

Damus és mtsai (1973) eredményei alapján feltételezhető, hogy az alvadási cascade-enzim rendszerben mindegyik serin-protease eliminálása hasonló

mechanizmuson alapszik. A legjobban vizsgált folyamat a thrombin inaktíválása.

A thrombin-antithrombin reakció során a thrombin aktív centrumában levő serin és az antithrombin-III arginin oldalláncai között keletkezik kapcsolat. Ezáltal egy az alvadás szempontjából inaktív komplexus jön létre. Gerendás, Pálos és Csefkó (1949) már több mint két évtizede kimutatták, hogy a heparin a thrombin inaktíválását nagymértékben fokozza a serumban. A részletes biokémiai vizsgálatok azt is igazolták, hogy a heparin nagymértékben meggyorsítja a thrombin-antithrombin-III komplexus képződését. Rosenberg és Damus (1973) szerint a heparin az antithrombin lysinjeinek ϵ -amino-csoportjaihoz kötődik, ezáltal ebben egy allostericus változást hoz létre. Egyébként a heparin hatásmechanizmusával kapcsolatban olvashatjuk a legtöbb vitát, ill. ellentmondást az irodalomban. Markwardt és Landman (1971), valamint



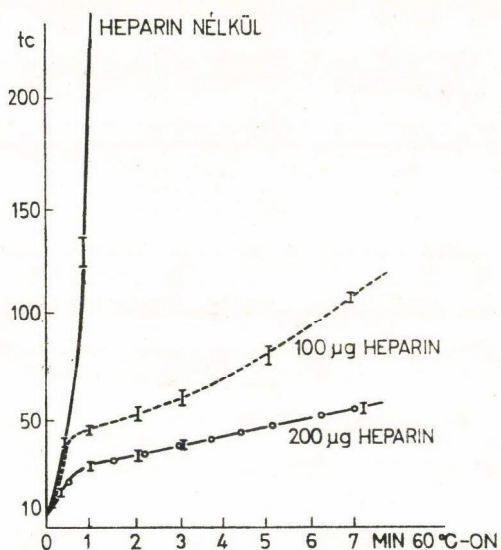
1. ábra. Az antithrombin-III támadáspontjai a véralvadás mechanizmusában

	AZ ACTIV CENTRUM AMINOSAV SORRENDJE																								
BOVIN Xa FACTOR	Asp	-	Ala	-	Cys	-	Gln	-	Glu	-	Asp	-	SER	-	Glu	-	Glu	-	Pro	-	His	-	Val	-	Thr
BOVIN TRYPSIN	Asp	-	Ser	-	Cys	-	Gln	-	Glu	-	Asp	-	SER	-	Glu	-	Glu	-	Pro	-	Val	-	Val	-	Cys
BOVIN THROMBIN	Asp	-	Ala	-	Cys	-	Gln	-	Glu	-	Asp	-	SER	-	Glu	-	Glu	-	Pro	-	Phe	-	Val	-	Met
									180																185

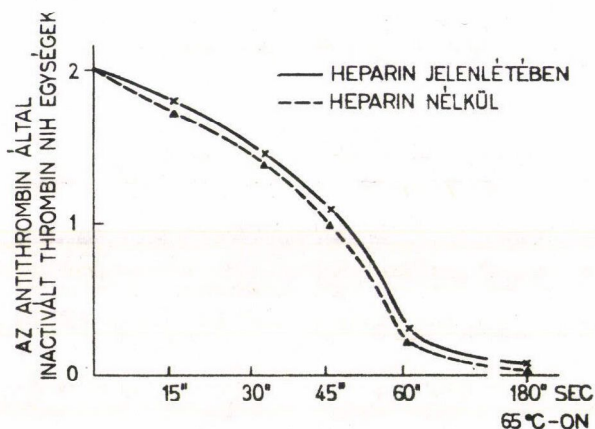
2. ábra. A serin protease típusú enzimek aktív centrumának aminosav sorrendje

saját kísérleti eredményeink is felvetették annak a lehetőségét, hogy a heparin a thrombinhoz kapcsolódva, abban konformáció változást indukál, ami a thrombin-antithrombin komplexus képződését meggyorsítja. A következő kísérleti eredmények is ezt igazolják.

Igazoltuk (Pálos 1949), hogy a heparin kivédi a thrombin hő által okozott inaktiválódását. Ez volt az első bizonyított utalás arra vonatkozóan, hogy a thrombin és heparin között kapcsolat jöhet létre. Ugyanekkor a heparin hasonló védő hatást az antithrombin-III-ra nem fejt ki (Machovich, Blaskó, Pálos 1974) (3. és 4. ábra).



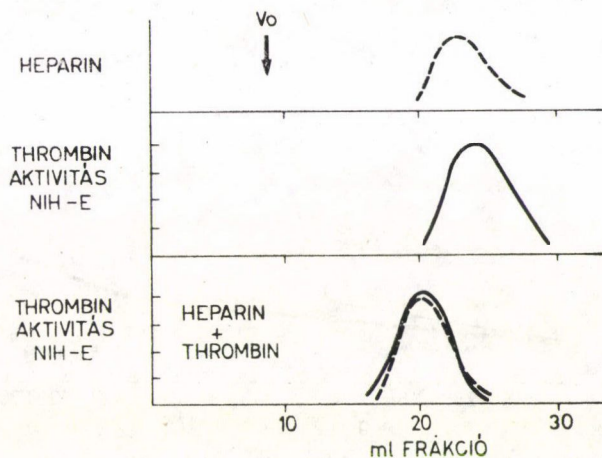
3. ábra. A thrombin hőinaktiválódása 60°-on heparin jelenlétében és anélkül



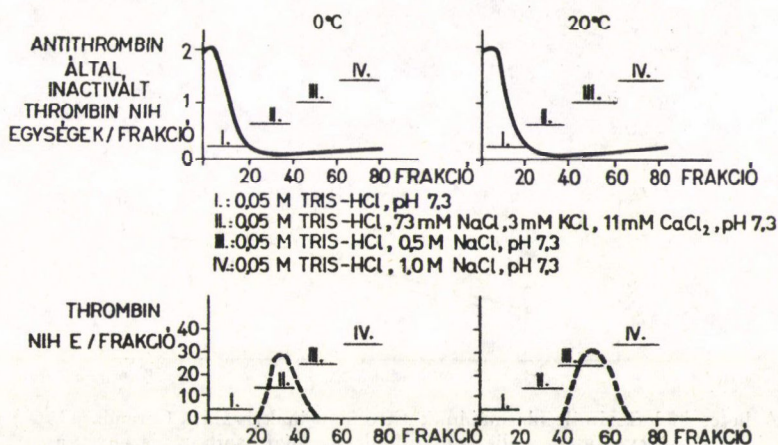
4. ábra. Az antithrombin-III hőinaktiválódása 65°-on heparin jelenlétében és anélkül

A továbbiakban gélfiltrációval igazoltuk, hogy a thrombin és a heparin komplexust képez, amely Sephadex G-200 oszlopon nagyobb molekulásúlyú tartományban eluálódik, mint a thrombin vagy a heparin külön-külön. (5. ábra)

Az egyes anyagok kötődésének vizsgálatára igen alkalmas módszer, ha a vizsgált anyagok közül az egyiket szilárd fázishoz kötve immobilizáljuk. Kidolgoztunk egy eljárást, melynek során Sephadex G-200-hoz kötöttünk heparint és ebből a gélből készített oszlopra vittük fel — 0 °C-on és 20 °C-on — a részlegesen tisztított thrombint és az antithrombin-III-t. Vizsgáltuk, hogy milyen ionerősségű oldatokkal eluálhatók ezek a fehérjék. Kísérleteink azt igazolták, hogy mindkét hőmérsékleten az antithrombin-III már a legkisebb ionerősségű oldattal eltávolítható a heparin-gélről, míg a thrombin csak nagyobb ionerősségű pufferrel eluálható; ami erősebb kötődésére utal. (6. ábra)



5. ábra. A thrombin — heparin komplexus, továbbá a thrombin, ill. heparin elutios profilja külön-külön



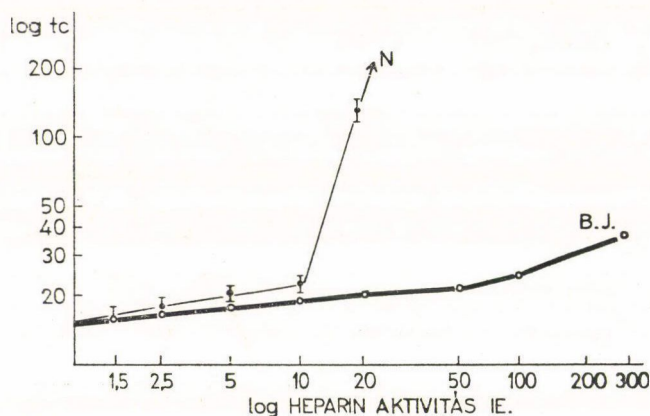
6. ábra. A thrombin és az antithrombin-III kötődése solid fázisú heparinhoz 0°-on és 20°-on

Ezen vizsgálatok nem elvonatkoztatott adatok, hanem olyan biokémiai alaputatásokat képviselnek, melyek ma már a gyakorlatba is átvihetők. Ennek a reprezentatív példája egy a világirodalomban is egyedülálló, munkatársaimmal közölt esetünk (Sas és mtsai 1974), melyben a laboratóriumi és biokémiai kísérletek derítettek fényt a kórkép patomechanizmusára.

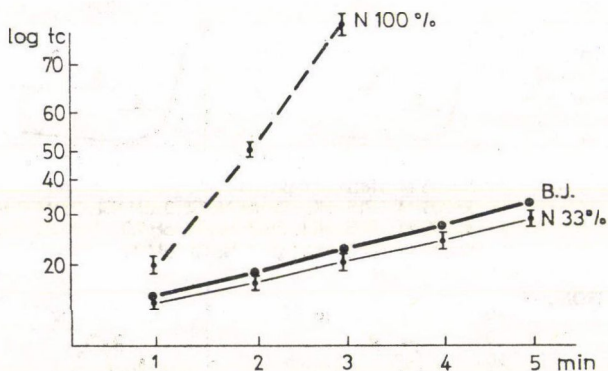
A 38 éves férfi betegünknek 18 éves kora óta 21 thrombosisa és 2 alkalommal tüdőembóliája volt. Vizsgálataink alkalmával derült ki, hogy vérének alvadási ideje az iv. adott heparin hatására nem hosszabbodott meg és „in vitro” a plasmájához adott, a therápiás adagot sokszorosán meghaladó heparin hatására sem változott meg a thrombin alvasztási idő. (7. ábra)

A beteg hődefibrinált plasmájának, ill. serumának thrombin-inaktiváló képessége 30% volt, amit a heparin fokozni nem tudott. (8. ábra)

A kofaktor egyidejű mérésekor csupán 5% körüli értéket kaptunk. (9. ábra)

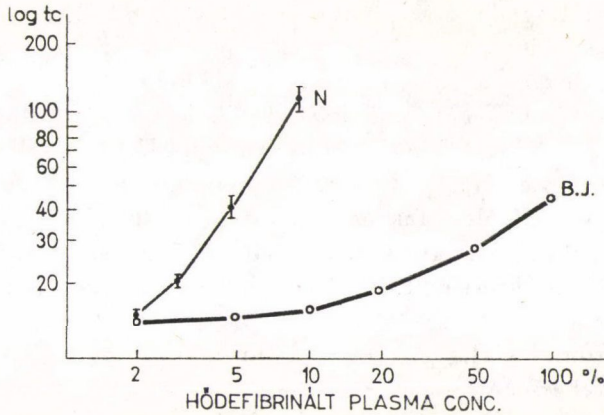


7. ábra. A beteg citrátos plasmájának thrombin alvasztási ideje, thrombin—heparin koncentráció függvényében. Az alvasztási időt 100 IE heparin sem módosította, míg a kontroll plasma már 10 IE heparin hatására alvaszthatatlanná vált

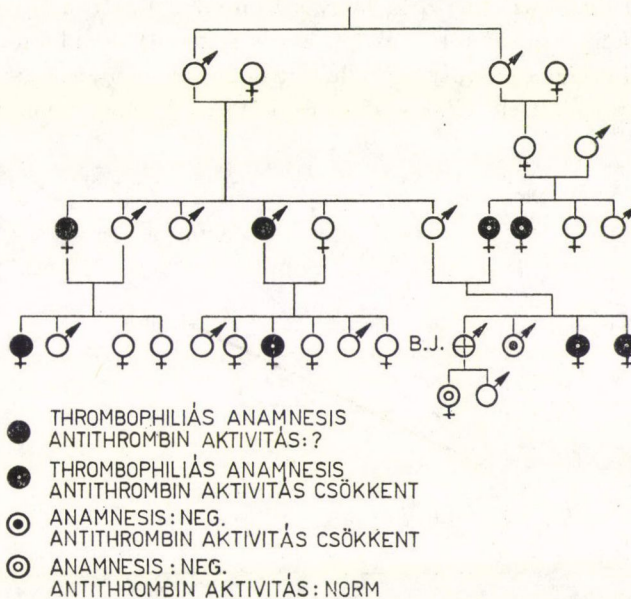


8. ábra. A beteg hődefibrinált plasmájának thrombin inaktiválása Gerendás (1960) módszerével mérve, a normális kontroll plasma hígításaihoz viszonyítva

Adatainkból arra következtettünk, hogy a beteg véreből a thrombin-inaktiválásért felelős antithrombin-III, ill. heparin kofaktor hiányzik. A mintegy 30%-os thrombininaktiválás, az α_2 -macroglobulin hatásának köszönhető, ami a számszerű aránynak is megfelel. Ezt teljes mértékben igazolta, hogy amikor monospecifikus anti- α_2 -macroglobulin serummal közömbösítettük a beteg α_2 -macroglobulinját, a beteg seruma thrombint egyáltalán nem inaktivált.



9. ábra. Egeberg (1965) módszerével mért heparin cofactor aktivitása a beteg plasmájában



10. ábra. B. J. betegünk családfája

Tekintettel arra, hogy a beteg családjában is halmozottan fordultak elő thromboemboliás megbetegedések, a kórképet öröklődőnek tartottuk. Ezt támasztották alá a család többi tagjainál talált hasonló eredmények és az igazolt consanguinitás. Chromosomaeltérést nem találtunk. (10. ábra)

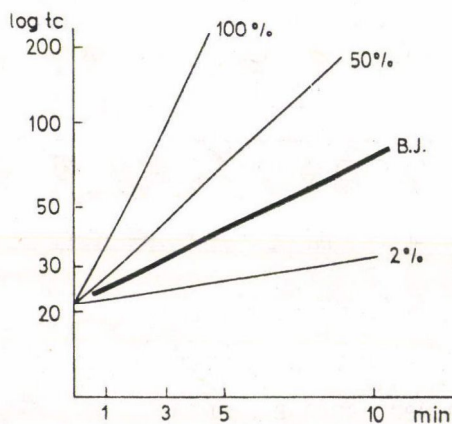
Tekintettel arra, hogy betegünkben alvadásfiziológiai módszerekkel antithrombin-III, ill. heparin kofaktor-aktivitást mérni nem tudtunk, immunológiai módszerrel is megvizsgáltuk serumának antithrombin-III tartalmát; monospecificus human antithrombin-III ellenes immunsavóval. Azt találtuk, hogy betegünk és családtagjainak serumában az antithrombin-III mint antigén, gyakorlatilag normális mennyiségben van jelen. Ez azt bizonyította, hogy vérükben, mint antigen olyan antithrombin-III fehérje kering, ami funkcióképességét elvesztette. Tehát betegünk esetében egy ún. „dummy protein condition” áll fenn. A kóros fehérjét antithrombin-III_{Budapest}-nek neveztük el.

Az antithrombin-III_{Budapest} egyéb funkcióiban is kórosnak bizonyult. A beteg serumja az aktivált X faktort a normális kontrollhoz viszonyítva csak 25%-os aktivitással tudta inaktíválni, ami feltehetőleg Marciniak és Tsukamura (1972) által leírt Xa-faktort inaktíváló macroglobulin hatásának volt tulajdonítható. (11. ábra)

Az antithrombin-III_{Budapest} tehát a thrombin és a Xa faktor inaktíválására képtelen fehérje.

Az antithrombin-III mennyiségének, ill. aktivitásának változása a thrombophilia szempontjából — ahogy esetünk is igazolja — egyik döntő tényező lehet, de több kórképben is észlelték aktivitásának változását.

Régi adataink közé tartozik, hogy a hypoxia, ill. hypoxaemia csökkenti a thrombin inaktíválás mértékét és így a vér fokozott alvadékonyságát eredményezi. A bő oxigén-ellátottság ellentétesen hat, ami annyira fokozható, hogy vérzékenység áll elő (Pálos 1948 és 1949a). Ezeket a megállapításokat



11. ábra. Betegünk serumának Xa factor inaktíválása

magassági kamrában végzett kísérleteink igazolták, ami külön aktualitást nyert napjainkban, amikor az ember elhagyni képes az évmilliók által megszokott bioszféráját, a földet és mesterséges légtérben kényszerül hosszabb vagy rövidebb ideig tartózkodni, ami jelenleg magasabb partialis nyomású oxigént jelent. Számos alvadási tényező redoxtulajdonságának változása mellett a progresszív antithrombin aktivitásának változása is jelentős tényező. A cardiovascularis megbetegedések és az ehhez társuló thrombosisra a hypoxia következtében csökkent antithrombin működésre, ill. csökkent thrombinaktiválásra vezethető vissza, ami ugyancsak régi megfigyeléseink közé tartozik (Pálos 1948, 1948a) és újabban is igazolást nyert.

Figyelmet érdemel és széleskörű vizsgálatot igényel több szerzőnek az a közlése, hogy a fogamzásgátlók szedése immunológiailag kimutatható módon az antithrombin-III csökkent aktivitását eredményezi (Zuck és mtsai 1973).

Számtalan irodalmi adat igazolja, hogy az antithrombin-III aktivitása különböző kórképekben megváltozik. Ezek közös jellemzője, hogy a haemostasis változása pontos laboratóriumi mérésekkel ellenőrizhető, ami diagnosticus, ill. therápiás szempontból bír jelentőséggel. Székfoglalóm részletei is erre engednek következtetni.

IRODALOM

- Abildgaard, U.*: Scand. J. Clin. Lab. Invest. **20**, 207 (1967).
Damus, P. S., Hicks, M., Rosenberg, R. D.: Nature **246**, 355 (1973).
Egeberg, O.: Thrombos. Diathes. haemorrh. **13**, 516 (1965).
Gerendás, M.: Thrombos. Diathes. haemorrh. **4**, 56 (1960).
Gerendás, M., Pálos, L., Á., Csefkó, I.: Ann. Inst. Biol. Pervest. Hung. **19**, 191 (1949).
Lytleton, J. W.: Biochem. J. **53**, 8 (1954).
Machovich, R., Blaskó, Gy., Pálos, L. Á.: Biochim. Biophys. Acta in press (1974).
Marciniak, E.: Brit. J. Haematol. **24**, 381 (1973).
Marciniak, E., Tsukamura, S.: Brit. J. Haematol. **22**, 341 (1972).
Markwardt, F., Landman, H.: Blutgerinnungshemmende Proteine In: Handbuch der experimentellen Pharmakologia. Band XXVII. (Ed.: Markwardt, F.) Springer Verlag Berlin (1971).
Osamo, N. O.: Blut **23**, 280 (1971).
Pálos, L. Á.: Schweiz. Med. Wchschr. **78**, 112 (1948).
Pálos, L. Á.: Schweiz. Med. Wchschr. **78**, 1230 (1948a).
Pálos, L. Á.: Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med. **71**, 471 (1949).
Pálos, L. Á.: Acta Med. Scand. **134**, 221 (1949a).
Rosenberg, R. D., Damus, P. S.: J. Biol. Chem. **248**, 6490 (1973).
Sas, G., Pálos, L. Á.: Kísérletes Orvostudomány **18**, 573 (1966).
Sas, G., Blaskó, Gy., Bánhegyi, D., Jákó, J., Pálos, L. Á.: Orv. Hetil. **115**, 483 (1974).
Seegers, W. H.: Blood Clotting Enzymology (Academic Press) New York, London (1967).
Waugh, D. H., Fitzgerald, M. A.: Amer. J. Physiol. **184**, 624 (1956).
Yin, E. T., Wessler, S., Stoll, P. J.: J. Biol. Chem. **246**, 3712 (1971).
Zuck, T. F., Bergin, J. J., Perkins, R. P.: IV. Int. Congr. on Thrombosis and Haemostasis Wien. (1973).