

Ny detaljeret indsigt i blodkoagulationen

Koagulationsfaktorer er proteiner, der kan få blodet til at størkne (koagulere). Processen er nøje reguleret og er ansvarlig for både den gavnlige koagulation, som aktiveres ved vævskader, men også den skadelige, som forekommer under dannelsen af blodpropper. Her præsenteres forskningsresultater fra et studie, der har fokuseret på de sidste begivenheder af koagulationen. Studiet viser, at koagulationsfaktor XIII spiller en langt mere kompliceret rolle end hidtil troet.

Af Camilla Lund Nikolajsen og Jan J. Enghild, Interdisciplinary Nanoscience Center og Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet

En af kroppens vigtigste forsvarsmekanismer er blodets evne til at størkne og derved stoppe en blødning. Blodkoagulationen består af en række reaktioner, der normalt aktiveres som følge af vævsskader. Disse reaktioner får blodet til at størkne lokalt omkring vævsskaden og forhindrer således blodtab. Blodkoagulation kan altså ses som naturens eget plaster. Processen er nøje reguleret, og skærer vi os for eksempel i fingeren, skal reaktionerne på den ene side sikre, at en stabil masse af størknet blod dannes, så blødningen standser. På den anden side er det vigtigt, at reaktionerne begrænses til det skadede område, og at det størknede blod nedbrydes igen efter sårhelingen.

Livsvigtig balance

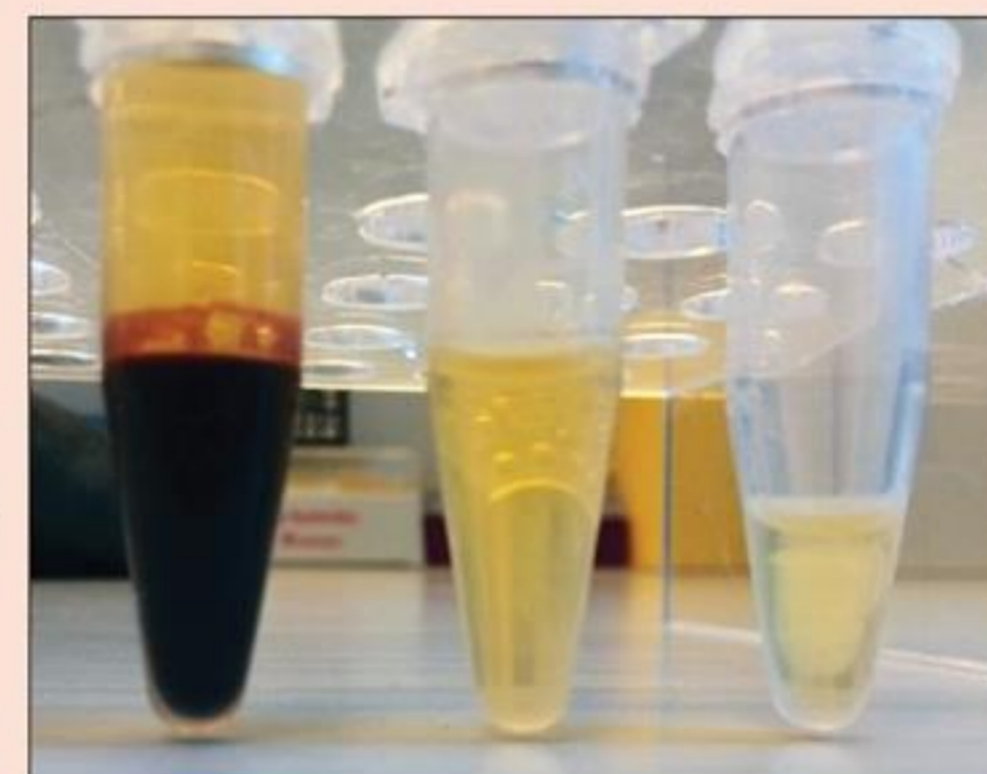
Blodkoagulationen reguleres af prokoagulanter og antikoagulanter, som kan henholdsvis fremme eller hæmme koagulationsprocessen. Under normale omstændigheder er disse i en balance, der forhindrer både omfattende blødninger og omfattende koagulation. En ubalance kan imidlertid være medvirkende til, at blodet koagulerer inde i vores blodkar og danner blodpropper. Dette er en af de hyppigste dødsårsager i verden [1].



Foto: Peter F. Gammelby.

■ Koagulation af isoleret plasma

Blodet består af to hoveddele; blodceller og blodplasma. Blodplasma er en gullig væske, der indeholder vand, salte, lipider, plasmaproteiner og lavmolekylære organiske stoffer så som glukose. Yderst til venstre på billedet ses, hvordan blodcellerne samles i bunden af et prøverør efter centrifugering af opsamlet blod. Plasmaet kan fjernes ved hjælp af en pipette. Blodprøver opsamles typisk i rør, der indeholder antikoagulanter. Antikoagulanter hæmmer koagulationen og holder det isolerede plasma flydende. Opsamles blodet i rør uden antikoagulanter eller tilsættes prokoagulanter, vil det isolerede plasma hurtigt koagulere. Når koagulationen aktiveres i plasma, dannes en hvidlig, uopløselig masse, der hovedsageligt består af proteinet fibrin. Denne masse kaldes på engelsk en "plasma clot" eller på dansk en "plasmaprop" eller "plasma-koagel" og ses yderst til højre på billedet. I det beskrevne studie er den uopløselige "plasmaprop" blevet isoleret og undersøgt ved hjælp af avanceret massespektrometri.



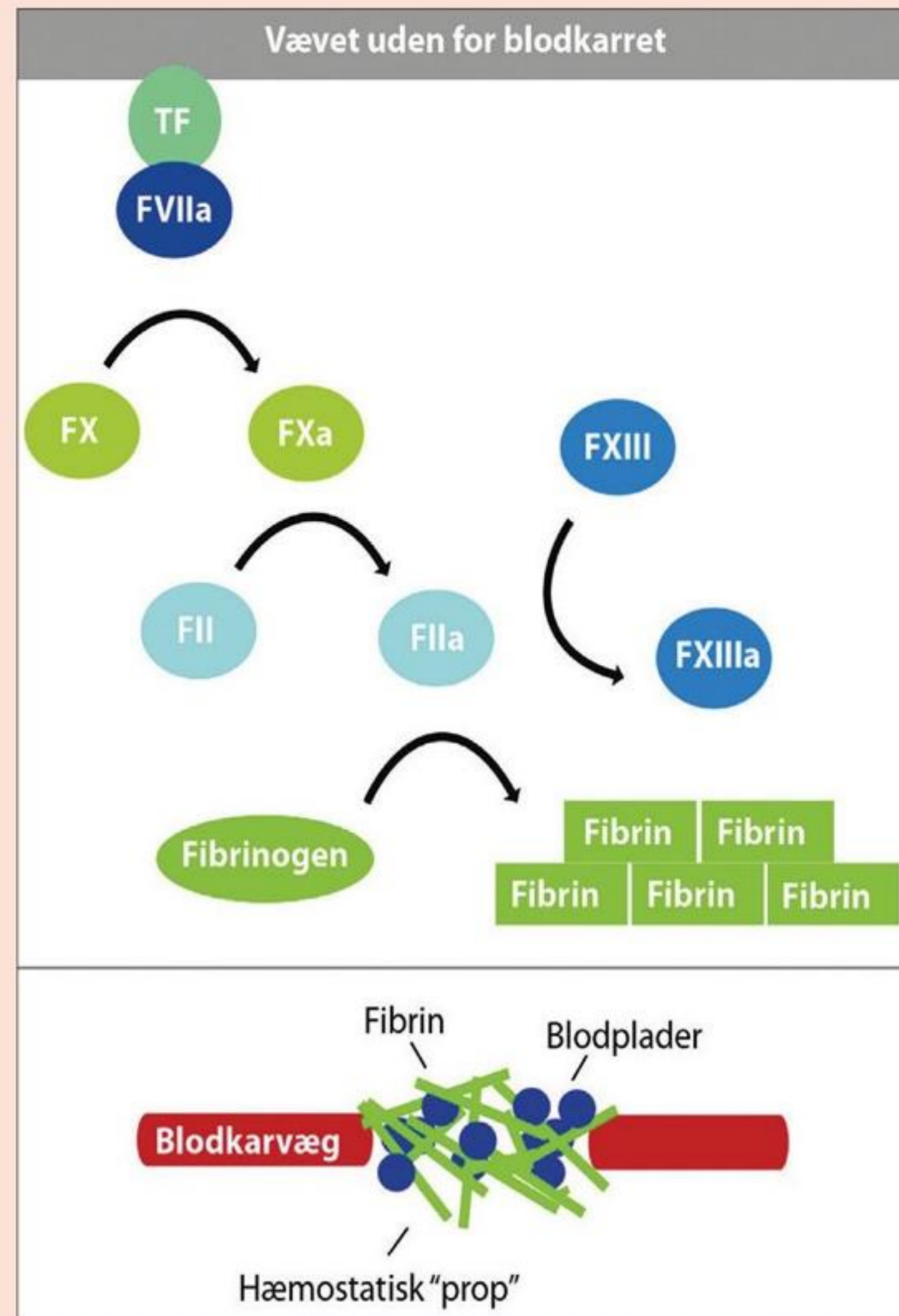
En ubalance, der opstår på grund af manglende prokoagulanter, eksempelvis en koagulationsfaktor, giver derimod ophav til blødninger. Omkring 1.000 danskere er diagnosticeret med en blødersygdom. Langt flere menes dog at have den mest almindelige blødersygdom, von Willebrands sygdom, uden at vide det (ca. 1% af befolkningen) [2].

En kaskade af reaktioner

Koagulationsfaktorerne udgøres af elleve plasmaproteiner,

■ Koagulationskaskaden

Den øverste illustration viser, hvordan koagulationsfaktorer aktiveres i en kaskadereaktion som følge af en vævsskade. Skader på blodkarvæggen resulterer i, at plasmaproteiner, heriblandt koagulationsfaktorerne, kommer i kontakt med proteiner i det omkringliggende væv. Et af disse vævsproteiner kaldes tissue factor (TF) på engelsk eller vævsfaktor på dansk. Når TF binder til faktor VII (FVII), aktiveres koagulationskaskaden. Aktiveret FVII (FVIIa) i kompleks med TF kan således aktivere faktor X (FX). Aktiveret FX (FXa) aktiverer efterfølgende faktor II (FII), og herefter kan aktiveret FII (FIIa) aktivere både faktor XIII (FXIII) og fibrinogen. Fibrinogen giver således ophav til uopløselige fibrinpolymerer, der stabiliseres af aktiveret FXIII (FXIIIa). Lignende reaktioner aktiverer de resterende koagulationsfaktorer. Den nederste illustration skitserer, hvordan polymeriseret fibrin og blodplader danner en såkaldt hæmostatisk "prop", der kan standse blødninger fra et skadet blodkar.



substrat er modificeret med biotin, hvilket gør det muligt at oprense og identificere substratpeptider fra plasmaproteinerne. Til formålet har vi benyttet topmoderne udstyr inden for proteinseparation og massespektrometri. Vi har endvidere undersøgt, hvilke plasmaproteiner, der bliver krydsbundet til fibrinfibre under koagulationen *ex vivo*. Kort forklaret har vi isoleret frisk blodplasma og ladet dette koagulere. Herefter har vi oprenset de krydsbundne plasmaproteiner og igen benyttet massespektrometri til at identificere de oprensede proteiner.

Tidligere har forskere identificeret 20 substrater i blodplasma. Vores studie afslørede yderligere 132 substrater. Dermed kendes nu i alt 152 substrater, hvoraf mindst 48 inkorporeres i fibrinfibre under koagulationsprocessen.

der traditionelt kaldes faktor I-XIII (faktor IV er Ca^{2+} -ioner og ikke et protein, og faktor VI er en aktiveret form af faktor V). Faktorerne cirkulerer i blodet som inaktive proenzym, der under normale omstændigheder aktiveres, når et blodkar beskadiges. Aktiveringen er en såkaldt kaskadereaktion, hvor proenzymene aktiveres trinvis, og reaktionen forstærkes ved hvert trin. Koagulationskaskaden kulminerer med aktiveringen af faktor II, der efterfølgende aktiverer fibrinogen (faktor I) og faktor XIII. Fibrinogen omdannes til uopløselige fibrinfibre, der fungerer som et net omkring blodceller ved det skadede område. Aktiveret faktor XIII er et enzym, der danner kovalente krydsbindinger imellem specifikke proteiner. Disse krydsbindinger dannes blandt andet imellem fibrinfibre, der således stabiliseres [3].

Fibrinolyse

Umiddelbart efter aktivering af koagulationskaskaden aktiveres en modsatrettede proces, der kaldes fibrinolyse. Under denne proces nedbrydes fibrinfibre af enzymet plasmin. Faktor XIII krydsbinder plasmaproteiner, der hæmmer fibrinolysen, til fibrin. Dette stabiliserer fibrinfibre yderligere. At krydsbindingsreaktionen er essentiel for blodkoagulationen ses hos personer med en sjælden blødersygdom, der skyldes mangel på faktor XIII. Disse personers blod koagulerer som normalt, men deres fibrinfibre er ikke stabile, og efter kort tid begynder de at bløde igen.

En udvidet forståelse af faktor XIII's rolle

Vi har i vores studie udført en omfattende undersøgelse af den proces i koagulationen, der involverer faktor XIII [4]. Vi har først og fremmest undersøgt, hvilke plasmaproteiner, der kan fungere som substrater for faktor XIII i krydsbindingsreaktionen. Vores metode er baseret på *in vitro* krydsbinding imellem et kunstigt faktor XIII substrat og de plasmaproteiner, der kan fungere som faktor XIII substrater. Det kunstige

Fra ny viden til nye hypoteser

Vi ved fra tidligere studier, at de identificerede substrater har funktioner i henholdsvis koagulationssystemet, immunsystemet, i det inflammatoriske system og i dannelsen af bindevæv. Vi ved endvidere, at krydsbindingsreaktionen kan påvirke funktionen af de krydsbundne proteiner. Eksempelvis kan faktor XIII stabilisere fibrinfibre ved at krydsbinde fibrin og fibrinolysehæmmere. Det forventes, at krydsbindingsreaktionen kan påvirke funktionen af de nyligt identificerede substrater og/eller ændre fibrinfibrenes egenskaber på en lignende måde. Vores resultater indikerer derfor, at faktor XIII ikke bare stabiliserer fibrinfibre, men spiller en langt mere kompleks rolle i koagulationen. Specielt vekselvirkningen mellem faktor XIII og immunforsvaret er interessant, da begge parter er involverede i sårheling, blodpropdannelsen og blodforgiftningen [4].

Vores resultater rejser en række nye spørgsmål og forventes at stimulere fremtidig forskning inden for koagulationsfeltet, således at en øget forståelse af faktor XIII's rolle opnås. Et interessant spørgsmål er eksempelvis, om faktor XIII kan regulere aktiveringen af immunsystemet under koagulationen? En bedre forståelse af faktor XIII's funktioner kan på længere sigt føre til en bedre behandling af faktor XIII-mangel og forhåbentlig også til en bedre medicinsk behandling af blodpropper.

E-mail:

Camilla Lund Nikolajsen: camillan@inano.au.dk

Jan J. Enghild: jje@mbg.au.dk

Referencer

1. Lippi, G., Franchini, M. and Targher, G. (2011) Arterial thrombus formation in cardiovascular disease, *Nat Rev Cardiol* 8, 502-512.
2. www.bloderforeningen.dk.
3. Versteeg, H.H., Heemskerk, J.W., Levi, M. and Reitsma, P.H. (2013) New fundamentals in hemostasis, *Physiol Rev* 93, 327-358.
4. Nikolajsen, C.L., Dyrland, T.F., Poulsen, E.T., Enghild, J.J. and Scavenius, C. (2014) Coagulation Factor XIIIa Substrates in Human Plasma: Identification and incorporation into the clot, *J Biol Chem* 289, 6526-6534.