

# בחינת ההשפעה של מחלות זיהומיות ואוטואימוניות על פעילות הקרישה של Fibrinogen-like protein 2 בדם היקפי

תקציר:

**הקדמה:** האנזים Fibrinogen-like protein 2 (FGL2) הוא פרוטרומבינאזה הפועל באופן בלתי תלוי במסלול הקרישה הקלאסי. FGL2 מעורב בתהליכי קרישה ודלקתיות כחלק מתגובת המערכת החיסונית בגוף. לנוכח יחסי הגומלין ההדוקים בין קרישיות וסרטן, החלבון הוצע בעבר לשמש כסמן ביולוגי לממאירויות. לפיכך, הראינו לאחרונה שפעילות FGL2 שהופק מדגימות של תאים חד גרעיניים מדם היקפי גבוהה יותר בממצע בחולי לימפומה יחסית לבריאים ויורדת בקרב מטופלים בהפוגה. אולם אין זה ברור האם או כיצד הפעילות משתנה בנוכחות מצבים אחרים מלבד ממאירות.

**מטרה:** בעבודה המוצגת כאן אנו בוחנים את השפעת נוכחות זיהומים חידקיים, נגיפיים או מחלות אוטואימוניות על רמת הפעילות של FGL2 בדם.

**שיטת המחקר:** תאי דם היקפי הופקו מ־93 מאושפזים במחלקה פנימית שאובחנו עם זיהום חידקי, נגיפי, או מחלה אוטואימונית ומ־39 נבדקים בריאים. פעילות FGL2 נבחנה בכל אחת מהדגימות על ידי מדידה של זמן יצירת קריש. ערכים קליניים ודמוגרפים נאספו עבור כל המטופלים.

**תוצאות:** לא נמצא שינוי משמעותי בממצע פעילות הקרישה של FGL2 בין בריאים וחולים במחלות זיהומיות או אוטואימוניות. כמו כן, הפעילות לא נמצאה במתאם לערכים קליניים או דמוגרפיים שנבחנו. טווח הפעילות בין אנשים שונים מעיד על קיומה של שונות גבוהה (עד פי 2.5 מהממוצע) בפעילות הבסיסית באוכלוסיה.

**מסקנות:** מחלות זיהומיות או אוטואימוניות אינן משנות מהותית את רמת פעילות הקרישה שמקורה ב־FGL2 בדם ההיקפי.

**דיון וסיכום:** בעוד שפעילות הקרישה של FGL2 בדם מושפעת מנוכחות תאים סרטניים כמו לימפומה, הנוכחות של דלקות ממקור שונה אינה משפיעה בצורה משמעותית על הפעילות. זאת למרות שביטוי FGL2 משתנה עקב תגובת מערכת החיסון. הממצא מחזק את השימוש בפעילות כסמן ביולוגי לסרטן. המשרעת הרחבה של טווחי הפעילות בנבדקים שונים עשויה למקם את FGL2 כסמן מתאים יותר למעקב וכחות לאבחון.

יצחק צ'רני<sup>1,2,4</sup>  
דניאל שפשוניץ<sup>3,4</sup>  
מאיר להב<sup>3</sup>  
אסתר רביזדה<sup>4,2,1</sup>

<sup>1</sup>מעבדה להמטואונקולוגיה, מכון פלסנשטיין למחקר רפואי, מרכז רפואי רבין, פתח תקווה  
<sup>2</sup>המעבדה להמטולוגיה, בית חולים בילינסון, מרכז רפואי רבין, פתח תקווה  
<sup>3</sup>מחלקה פנימית א', בית חולים בילינסון, מרכז רפואי רבין, פתח תקווה  
<sup>4</sup>הפקולטה לרפואה סאקלר, אוניברסיטת תל אביב, תל אביב

**מילות מפתח:** פעילות הקרישה של FGL2; פרוטרומבינאזה; סמן ביולוגי; אוטואימוניות.  
**KEY WORDS:** Fibrinogen-like protein 2; Prothrombinase; Autoimmune

## הקדמה

החלבון Fibrinogen-like protein 2 הוא פרוטרומבינאזה המצוי בדם וברקמות ובעל חשיבות בתיווך של תהליכי קרישה ודלקתיות בהקשר של תגובות המערכת החיסונית [1]. החלבון (בגודל של כ־65 kDa) הוא סריין-פרוטאזה המתבטא על פני הממברנות של תאים, בעיקר מקרופאגים, תאים דנדרטיים, תאי אנדותל ואפיתל ותאים סרטניים [1, 2]. בדומה לפקטור FGL2, Xa מסוגל לחתוך את פרוטרומבין לתרומבין. בשונה מפקטור FGL2, Xa אינו תלוי במסלול הקרישה הרגיל, אינו זקוק לשפעול, אך זקוק לפקטור Va וסידן לפעילות אנזימית מירבית [3]. קיימת גם צורה מסיסה של החלבון המופרשת בצורה קבועה מלימפוציטים ובעלת יכולת דיכוי של פעילות

המערכת החיסונית [4]. מכל מקום, שלא כמו הצורה המסיסה של FGL2, פעילות הקרישה של FGL2 (כלומר, יצירה של פיברין) באה לידי ביטוי במידה רבה ברקמות בעיקר בתגובה למצבים פתולוגיים ודלקתיים. לדוגמה, ברקמת הכבד עקב הדבקה בצהבת נגיפית, בדלקות חדות (acute), בדחייה של שתלים, בגידולים סרטניים, ועוד [13-5]. פעילות FGL2 נקשרה לא אחת כבעלת תרומה משמעותית להתפתחות הסרטן. פרסומים שונים מתארים את העלייה בביטוי FGL2 ופעילות הקרישה שלו במגוון רחב של רקמות סרטניות [9, 14, 15]. בנוסף, מחקרים הראו שעיקוב בביטוי של FGL2 ברקמה הסרטנית מסייע משמעותית לעיכוב התפתחות גידולים במודל של חיות [16, 17]. לנוכח המעורבות של FGL2 בסרטן, בדקנו בעבר האם ניתן להשתמש בפעילותו כסמן

האדומים (דגימה עשירה בתאים לבנים חד גרעיניים ובטסיות) נלקחה ונשטפה שלוש פעמים (7,4500 x g דקות, טמפ' חדר) עם 50 מ"ל PBS (נטול סידן ומגנזיום) כדי להיפטר משאריות פלסמה. התאים הורחפו לבסוף ב-5 מ"ל PBS ונספרו במכשיר ספירת דם (Siemens) ADVIA 2120i CBC automatic analyzer כדי לקבוע מספר מדויק של אוכלוסיות התאים בדגימה. כל הדגימות למדידת הפעילות הוכנו כך שיכילו מספר קבוע של תאים. שאריות ה-PBS סולקו על ידי סרכוז נוסף והתאים נשמרו כמשקע יבש ב-80°C עד מדידת הפעילות.

**מדידת פעילות FGL2:** משקע התאים הורחף ב 200 מיק"ל פלסמה נטולת פקטור X (חברת Stago). התרחיף עבר סוניקציה כדי לשבור את התאים ליצירת תמיסה אחידה. לאחר מכן, נבדק זמן השרייה של יצירת קריש על ידי בדיקת PT (Prothrombin) בצורה אוטומטית במכשיר קואגולומטר ACL-TOP 500 (חברת IL). לצורך הבדיקה, 50 מיקרול' דגימה הוספו ל-100 מיקרול' רכיב recombiplastin (חברת IL) ונקרא השינוי בבליעה באורך גל 420 ננומ' למשך 300 שניות. זמן יצירת קריש ארך לרוב 90-200 שניות. זמן הקרישה תורגם לפעילות קרישה יחסית תוך שימוש בעקומת כיוול של פלסמה תקינה (נורמאלית).

### ניתוח סטטיסטי

כל המידע המוצג במחקר זה הוא בפעילות יחסית לבריאים (באחוזים), ממוצע, חציון וסטיית תקן. החישובים בוצעו תוך שימוש בתוכנת SAS v.9.4 או GraphPad Prism v.6. מתאם או קשר בין פרמטרים נבדק על ידי מיתאם spearman's. מובהקות סטטיסטית נבדקה באמצעות תבחין ANOVA (multiple comparison analysis, Tukey-Kramer adjustment). P-value מתחת ל-0.05 נחשב למובהק סטטיסטית.

### תוצאות

פעילות הקרישה של FGL2 נקבעה בדגימות תאי דם של 132 נבדקים. רמות פעילות FGL2 בקבוצות השונות מוצגות בתרשים 1. פרטים דמוגרפיים ותוצאות הפעילות מסוכמות בטבלה 1. בחינת המיתאם בין התוצאות לבין הרקע הדמוגרפי והקליני של קבוצות המחקר מוצג בטבלה 2.

#### ממצאי ניתוח התוצאות:

1. ממוצע רמת הפעילות בקבוצות החולים שנבדקו יחסית לבריאים היה 78%, 88.6% ו-111.8% בחולים עם זיהום ממקור חיידקי, נגיפי ומחלות אוטואימוניות, בהתאמה.

ביולוגי למחלה. ההיגיון מאחורי רעיון זה התבסס על ההשערה שעלייה בפעילות FGL2 ברקמה הסרטנית עשויה להיות מלווה בעלייה מערכתית גם בדם, שם כאמור FGL2 מתבטא באופן טבעי. אכן, כפי שפרסמנו לאחרונה, בחולי לימפומה מסוג B ניתן למצוא עלייה מובהקת בפעילות הקרישה של FGL2 בדגימת דם היקפי עשירה בתאים חד גרעיניים יחסית לבריאים [18]. באופן דומה, הראינו עלייה בפעילות FGL2 בתאי דם של חולי לימפומה מסוג T של העור בהשוואה לחולי דרמטיטיס לא ממאיר [19].

הבנת פעילות הקרישה של FGL2 והיישום של FGL2 כסמן בדם מחייבים הבנה של המצבים בהם פעילותו משתנה. לנוכח השינוי בביטוי והמעורבות של FGL2 במחלות דלקתיות שונות, אנו בודקים בעבודה זו את ההשפעה של מחלות זיהומיות או אוטואימוניות על פעילות האנזים FGL2 בדם. לשם כך, פעילות האנזים נמדדה בדגימות דם של מאושפזים מאובחנים והשוותה לזו של קבוצת נבדקים בריאים.

### שיטות

**אוכלוסיית המחקר:** לצורך המחקר נאספו דגימות דם היקפי מ-132 נבדקים. אוכלוסיית המחקר כללה מתנדבים בריאים (39 במספר) וחולים מאושפזים במחלקה פנימית שאובחנו עם מחלות זיהומיות ממקור חיידקי (52 במספר) או נגיפי (31 במספר) או עם מחלה אוטואימונית (10 במספר). דגימת הדם נאספה בבוקר היום הראשון לאשפוז מטופלים לאחר צום. מטופלים עם מחלות ממאירות טמומות (סולידיות) ולימפופרוליפטיביות אחרות ברקע הוצאו מהמחקר. נתונים דמוגרפיים וקליניים נאספו מהתיקים הרפואיים של החולים עם דגש על לקיחת תרופות מעכבות קרישה, פעילות טסיות וסטטינים. מרבית החולים עם זיהומים חיידקים אובחנו עם דלקת ריאות, זיהום בדרכי השתן וזיהומים ברקמות רכות. מרבית החולים עם זיהומים נגיפיים אובחנו עם זיהומים בדרכי הנשימה העליונות. חולי מחלות אוטואימוניות כללו זאבת, וסקולטיטיס, דלקת כיבית של הכרכשת ("המעיי הגס"), תסמונת צ'רג שטראוס ודלקות מיפרקים אחרות ממקור אוטואימוני. המחקר אושר על ידי ועדת הלסינקי וכל הנבדקים חתמו על טופס הסכמה.

**הכנת הדגימות:** דגימות דם בנפח של כ-10 מ"ל נאספו במבחנות EDTA. התאים האדומים הופרדו משאר התאים בדם על ידי שימוש במרכיב (גרדיאנט) ריכוזים של פיקול' (מבחנות UNI-SEP, חברת נובמד). לאחר הסרכוז (750 x g, 30 דקות, טמפ' חדר), כל התכולה מעל ההפרדה מן התאים

### טבלה 1:

המחקר, נתונים דמוגרפיים ופעילות FGL2

מספר נבדקים	בריאים	זיהום חיידקי	זיהום נגיפי	מחלה אוטואימונית
39	52	31	10	
מגדר (גברים/ נשים)	17 / 22	32 / 20	20 / 11	4 / 6
גיל ממוצע (טווח)	40 (21-60)	64 (22-80)	66 (21-95)	52 (20-74)
פעילות (יחסית לבריאים)	100% (28.1%)	78% (36.4%)	88.6% (21%)	111.8% (71.5%)
חציון (טווח)	103.5% (41.7%-154.2%)	71.6% (25.9%-253.1%)	92.5% (37.9%-120%)	104.2% (28.6%-259.8%)
p-value (יחסית לקבוצת הבריאים)		0.058	0.799	0.918

**תרשים 1:**

פעילות קרישה של FGL2 בדגימות תאי דם בקבוצות הנבדקים. הפעילות המוצגת היא יחסית לפעילות הממוצעת בקבוצת הבריאים. ממוצע הפעילות מוצג בקו מודגש. קווי השגיאה מציינים את סטיית התקן (הערכים המדויקים מוצגים בטבלה זו)



**דיון וסיכום**

התפקיד המדויק של פעילות הקרישה של FGL2 בדם עדיין אינו ברור. ידוע שמצבים דלקתיים שונים כגון זיהומים ומחלות חיסוניות קשורים היטב לעלייה ברמת האנזים FGL2 ברקמות – לרוב דרך הסתננות של תאי מערכת החיסון לרקמה כגון מקרופאגים ותאים דנדריטים או באמצעות מיקרו-שלפוחיות (וסיקולות) [1, 2, 5, 20]. לעומת זאת, מסתמן ממחקר זה שרמת האנזים הפעיל בדם של הנבדקים במחלות שהוזכרו לעיל נותרת די דומה, למרות טווח "נורמלי" רחב יחסית. לפיכך, ייתכן ורמת האנזים הפעיל בדם עולה רק במצבים מסויימים מאוד כמו לימפומות כפי שתיארנו בעבר [18, 19]. יש לציין שלא נמצא מיתאם בין הפעילות של FGL2 בדם ורמות הביטוי שלו בלימפומות. מכאן ייחודה וכוחה של מדידת פעילות FGL2 כישום כסמן ביולוגי. אולם בשל הטווח הרחב יחסית ברמות הפעילות בין נבדקים, עשוי לא להתאים כסמן מאבחן גרידא, אלא כסמן מעקב אישי – דהיינו, עלייה חריגה בפעילות יכולה להצביע על תגובה לממאירות או מצבים פתולוגיים אחרים שטרם זוהו.

**מחברת מכתבת: אסתר רביזדה**

מעבדה להמטולוגיה, בית חולים בילינסון  
מרכז רפואי רבין, פתח תקווה  
טלפון: 03-9376634  
פקס: 03-9376648  
דוא"ל: erabi@clalit.org.il

**טבלה 2:**

מיתאם (Δ) כנגד רמת פעילות FGL2

מחלה אוטואימונית	זיהום נגיפי	זיהום חיידקי	בריאים	סה"כ
מגדר	-0.23	0.09	-0.09	-0.09
גיל	0.24	-0.09	-0.04	-0.10
פיברינוגן	-0.14	0.08		0.01
CRP	-0.38	-0.08		-0.19
קריאטינין	-0.26	-0.20		-0.20*
מטופל בסטטינים	0.15	0.13		0.09
מטופל בנוגדי טסיות	0.01	0.01		0.05
מטופל בנוגדי קרישה	0.17	-0.28*		-0.13
תפקודי קרישה PT	-0.02	-0.11		-0.18
תפקודי קרישה aPTT	0.05	-0.14		-0.13

P < 0.05\*

2. השינוי הגדול ביותר שנמצא מול קבוצת החולים, ירידה של כ-20% ברמת פעילות הקרישה של FGL2 יחסית לבריאים שזוהה במאושפזים בשל זיהומים ממקור חיידקי, אך במובהקות סטטיסטית נמוכה (p-value = 0.058) (טבלה 1).  
3. לא נמצא כל מיתאם משמעותי או מובהק בין רמת פעילות FGL2 ונתונים דמוגרפיים (גיל, מגדר). כמו כן, לא נמצא מיתאם משמעותי חזק בין פעילות FGL2 ומדדים קליניים שונים הרגישים לדלקתיות (פיברינוגן, CRP, קריאטינין), תפקודי קרישה, או תרופות לטיפול בקרישיות יתר (טבלה 2). מיתאם שלילי מובהק (p = 0.007) אך חלש (Δ = -0.2) נמצא מול רמות נוגדי קרישה בחולים עם זיהום ממקור חיידקי.  
4. מתוך המדידות ניתן להבחין במשרעת רחבה יחסית של רמת פעילות FGL2 בנבדקים, הן בבריאים או חולים (coefficient of variance נע בין 23% ל-67%).

**מסקנות**

רמת פעילות הקרישה של FGL2 בדם הנבדקים לא הושפעה באופן מובהק או משמעותי מנוכחות של מחלות אוטואימוניות או מחלות זיהומיות. ייתכן שקיימת השפעה, אם כי נמוכה, על פעילות FGL2 במחלות זיהומיות ממקור חיידקי, על רמות קריאטינין גבוהות או על נטילת נוגדי קרישה. אולם יהיה צורך לבחון השפעות אלו בקבוצות גדולות יותר. עלייה בפעילות קרישת הדם עשויה להיות ייחודית יותר למחלות ממאירות שונות כדוגמת לימפומה.

**ביבליוגרפיה**

1. Yang G & Hooper WC, Physiological functions and clinical implications of fibrinogen-like 2: A review. World J Clin Infect Dis 2013;3:37-46.  
2. Hu J, Yan J, Rao G & al, The duality of fgl2-secreted immune checkpoint regulator versus membrane-associated procoagulant: Therapeutic potential and implications. Int Rev Immunol 2014;35:325-39.  
3. Chan CW, Chan MW, Liu M & al, Kinetic

- analysis of a unique direct prothrombinase, fgl2, and identification of a serine residue critical for the prothrombinase activity. *J Immunol* 2002;168:5170-7.
4. Liu XG, Liu Y & Chen F, Soluble fibrinogen like protein 2 (sfgl2), the novel effector molecule for immunoregulation. *Oncotarget* 2017; 8:3711-23.
  5. Zhu Y, Zhou J, Feng Y & al, Control of intestinal inflammation, colitis-associated tumorigenesis, and macrophage polarization by fibrinogen-like protein 2. *Front Immunol* 2018;9:87.
  6. Zhu CL, Yan WM, Zhu F & al, Fibrinogen-like protein 2 fibroleukin expression and its correlation with disease progression in murine hepatitis virus type 3-induced fulminant hepatitis and in patients with severe viral hepatitis b. *World J Gastroenterol* 2005;11:6936-40.
  7. Melnyk MC, Shalev I, Zhang J & al, The prothrombinase activity of fgl2 contributes to the pathogenesis of experimental arthritis. *Scand J Rheumatol* 2011;40:269-78.
  8. Ning Q, Sun Y, Han M & al, Role of fibrinogen-like protein 2 prothrombinase/fibroleukin in experimental and human allograft rejection. *J Immunol* 2005;174:7403-11.
  9. Su K, Chen F, Yan WM & al, Fibrinogen-like protein 2/fibroleukin prothrombinase contributes to tumor hypercoagulability via il-2 and ifn-gamma. *World J Gastroenterol* 2008;14:5980-9.
  10. Ye X, Huai J, Chen R & al, Correlation of fibrinogen-like protein 2 with disease progression in patients with severe acute pancreatitis. *Exp Ther Med* 2014;7:85-9.
  11. Jin SJ, Liu Y, Deng SH & al, Neuroprotective effects of activated protein c on intrauterine inflammation-induced neonatal white matter injury are associated with the downregulation of fibrinogen-like protein 2/fibroleukin prothrombinase and the inhibition of pro-inflammatory cytokine expression. *Int J Mol Med* 2015;35:1199-212.
  12. Liu Y, Xu S, Xiao F & al, The fgl2/fibroleukin prothrombinase is involved in alveolar macrophage activation in copd through the mapk pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396:555-61.
  13. Tang M, Cao X, Li P & al, Increased expression of fibrinogen-like protein 2 is associated with poor prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Sci Rep* 2017;7:12676.
  14. Zhu Y, Zhang L, Zha H & al, Stroma-derived fibrinogen-like protein 2 activates cancer-associated fibroblasts to promote tumor growth in lung cancer. *Int J Biol Sci* 2017;13:804-14.
  15. Qin WZ, Li QL, Chen WF & al, Overexpression of fibrinogen-like protein 2 induces epithelial-to-mesenchymal transition and promotes tumor progression in colorectal carcinoma. *Med Oncol* 2014;31:181.
  16. Wang M, Liu J, Xi D & al, Adenovirus-mediated artificial microrna against human fibrinogen like protein 2 inhibits hepatocellular carcinoma growth. *J Gene Med* 2016;18:102-11.
  17. Rabizadeh E, Cherny I, Lederfein D & al, The cell-membrane prothrombinase, fibrinogen-like protein 2, promotes angiogenesis and tumor development. *Thromb Res* 2015;136:118-24.
  18. Rabizadeh E, Cherny I, Wolach O & al, Increased activity of cell membrane-associated prothrombinase, fibrinogen-like protein 2, in peripheral blood mononuclear cells of b-cell lymphoma patients. *PLoS One* 2014;9:e109648.
  19. Sherman S, Rabizadeh E, Moyal L & al, Fibrinogen-like protein 2 activity as a potential biomarker for diagnosis of early mycosis fungoides. *Acta Derm Venereol* 2017;97:370-2.
  20. Aharon A & Brenner B, Microvesicles in thrombosis and inflammation. *Isr Med Assoc J* 2016;18:530-3.

## כרוניקה

### הערכת יעילות התרכיב נגד שפעת לעונה 2018-2019 בארה"ב



ומקרי מוות עקב הדבקות בנגיפים הרווחים עתה או כאלה שיתפרצו במשך הזמן. החוקרים העריכו כי בעונה שעברה מנעה המערכה לחיסונים כ-7.1 מיליון חולים, 3.7 מיליון ביקורי רופא, 109,000 אשפוזים ו-8000 מקרי מוות. כמו כן, החיסון עשוי למתן את תסמיני המחלה אם לא מנע אותה.

המחברים ממליצים לחסן את כלל האוכלוסייה מעל גיל שישה חודשים, מאחר שבשלב זה עדיין לא מאוחר מכדי להתחסן <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/wr/mm6806a2>.

(<https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/wr/mm6806a2>).

איתן ישראלי

לאחר כל עונת שפעת, המרכז לבקרת מחלות ומניעתן באטלנטה מעריך את יעילות התרכיב שניתן באותה עונה במניעת מחלות קשות בדרכי הנשימה. בעונה הנוכחית 2018-2019, נאספו נתונים מ-3,254 ילדים ומבוגרים, החל מנובמבר 2018 ועד פברואר 2019. הערך הכולל ליעילות התרכיב לכל הגילים היה 47%. לילדים בקבוצות הגיל שישה חודשים עד 17 שנים, התקבל ערך הגנה גבוה יותר של 61%. שיעור של 75% מההדבקות בשפעת מזן A נגרמו על ידי הזן psm09 H1N1 ולגבי זן זה שיעור ההגנה של התרכיב הוערך ב-46%. ה-CDC ממליץ להמשיך לחסן את האוכלוסיות שבסיכון עדיין בשיא עונת השפעת, באשר התרכיב עשוי למנוע מחלה, אשפוזים