

ÉRFALKOMPONENSEKKEL MÓDOSÍTOTT FIBRINHÁLÓ MECHANIKAI ÉS LÍTIKUS STABILITÁSA

Doktori értekezés

ROTTENBERGER ZSOLT

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kolev Kraszimir egyetemi docens, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Katona Éva tudományos főmunkatárs, Ph.D.
Dr. Gadó Klára osztályvezető főorvos, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sándor Péter egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tordai Attila osztályvezető főorvos, az MTA doktora
Dr. Müllner Nándor egyetemi docens, Ph.D.

BUDAPEST

2013

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
BEVEZETÉS	6
1. IRODALMI HÁTTÉR	8
1.1. A véralvadási folyamat rövid áttekintése.....	8
1.2. A fibrinháló kialakulásának szereplői.....	8
1.2.1. A trombin.....	8
1.2.2. A fibrinogén.....	9
1.3. A fibrinháló kialakulása.....	10
1.3.1. A polimerizáció első lépései.....	10
1.3.2. Protofibrillumok, fibrinszálak kialakulása.....	11
1.3.3. Elágazások létrejötte, háló struktúra kialakulása.....	11
1.4. A fibrin(ogén) poszttranszlációs módosulásai.....	12
1.5. A fibrinháló lebontásának szereplői.....	12
1.5.1. A plazminogén.....	12
1.5.2. Plazminogén aktivátorok.....	14
1.5.2.1. Szöveti típusú plazminogén aktivátor (tPA).....	14
1.5.2.2. Urokináz típusú plazminogén aktivátor (uPA).....	15
1.6. A vérplazma egyes elemeinek hatása a vérrög kialakulására és feloldására.....	15
1.6.1. A XIII-as faktor.....	16
1.6.2. A vérlemezék (trombociták) és komponenseik.....	17
1.6.3. Vörösvértestek.....	18
1.7. A fibrinháló mechanikai stabilitásának háttere.....	19
1.8. Az erek szerkezete, felépítése, alkotóelemei.....	20
1.8.1. Tunica intima.....	20
1.8.2. Tunica media.....	21
1.8.3. Tunica adventitia.....	21
1.9. Az érfal szerkezeti változásai, atheroszklerózis.....	21
1.9.1. Az atheroszklerotikus folyamat első fázisai.....	21
1.9.2. Fibrózus plakkok kialakulása.....	23

1.9.3. Előrehaladott léziók és a trombózis.....	23
1.10. Az érfal fő makromolekuláris alkotóelemei.....	24
1.10.1. A kollagén.....	24
1.10.2. Kollagén szerepe az ateroszklerózisban.....	24
1.10.3. Proteoglikánok.....	25
1.10.4. A dekorin.....	26
1.10.5. Dekorin az ateroszklerózisban.....	27
1.11. Mátix metalloproteázok általános jellemzése.....	27
1.11.1. A mátix metalloproteázok szerepe az ateroszklerózisban.....	29
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	30
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	31
3.1. Anyagok.....	31
3.2. Módszerek.....	32
3.2.1. MMP-k előállítása.....	32
MMP-8-at expresszáló sejtvonala előállítása, kezelése.....	32
MMP-8 tisztítása transzfektált HEK-293 sejtizátumból.....	33
MMP-9-et expresszáló sejtvonala előállítása.....	33
MMP-9 tisztítása.....	34
3.2.2. Aorta dekorin tisztítása.....	34
3.2.3. Alcian kék festés.....	35
3.2.4. Kondroitináz ABC emésztés.....	36
3.2.5. Coomassie kék festés.....	36
3.2.6. Dekorin kimutatása immunblottal.....	36
3.2.7. Ezüst festés.....	37
3.2.8. Kollagén fragmentumok előállítása.....	38
3.2.9. Turbidimetriás mérések.....	38
3.2.10. Scanning elektronmikroszkópos vizsgálatok.....	38
3.2.11. Konfokális mikroszkópia.....	39
3.2.12. Plazminogén aktivációs teszt.....	39
3.2.13. Reológiai mérések.....	40
3.2.14. Statisztikai elemzések.....	42

4. EREDMÉNYEK	43
4. 1. Az MMP-k előállítása.....	43
4. 2. Aorta dekorin tisztítása.....	44
4. 3. Érfalkomponensek hatása a fibrinszerkezetre.....	47
4. 4. A módosított alvadékok lítikus rezisztenciája.....	47
4. 5. Plazminogén aktivációjának vizsgálata.....	52
4. 6. tPA penetrációja fibrinbe.....	53
4. 7. Vérplazmát tartalmazó alvadékok vizsgálata.....	56
4. 8. A fibrinháló mechanikai stabilitása.....	57
5. MEGBESZÉLÉS	60
6. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA, KÖVETKEZTETÉSEK	68
ÖSSZEFOGLALÁS	69
SUMMARY	70
IRODALOMJEGYZÉK	71
SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	86
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	87

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

APMA	4 - aminofenil – higany acetát
BSA	szarvasmarha szérum albumin
CS	kondroitin-szulfát
cDCN	dekorin (core) fehérje
DS	dermatán-szulfát
ECM	extracelluláris mátrix
FBS	borjú vérszérum
fDCN	GAG láncot hordozó (full) aorta dekorin
fpA, fpB	fibrinopeptid A, fibrinopeptid B
FRS	fibrinogén felismerő hely
GAG	glükózaminoglikán
HCII	heparin kofaktor II
HEPES	N – (2 – hidroxietil) piperazin – N – 2 – etán szulfonsav
LDL	alacsony sűrűségű lipoprotein
Lp(a)	lipoprotein (a)
LRR	leucin gazdag ismétlődés
MMP	mátrix metalloproteináz
PAI-1, PAI-2	plazminogén aktivátor inhibitor-1 (-2)
PEFABLOC	4 – (2-aminoetil) – benzoszulfonil – fluorid
PMA	phorbol 12-mirisztát 13-acetát
TAFI	trombin aktiválta fibrinolízis inhibitor
TIMP	szöveti típusú metalloproteináz inhibitor
tPA	szöveti típusú plazminogén aktivátor
uPA	urokináz típusú plazminogén aktivátor
u-PAR	urokináz típusú plazminogén aktivátor receptor
vvt	vörösvértest
$\alpha 2$ - PI	$\alpha 2$ plazmin inhibitor

BEVEZETÉS

Időszámításunk előtti 5. században élt híres görög történész, Hérodotosz szittyákról írt egyik feljegyzésében olvasható: *„Egy nagy agyagedényt borral töltenek meg, az eskütevők kissé megszúrják magukat (karjukat) késsel vagy árral, vérüket a borba csepegtetik; majd egy kardot, néhány nyílvezzőt, egy harci bárdot, és egy dárdát tesznek a keverékbe, miközben imákat mondanak; végül a két szerződő fél iszik egyet az edényből, ugyanezt teszik az őket követők vezetői is”*. A vérszerződés ma már egy rég elfeledett módja az egyezségek megpecsételésének, valószínűleg mindenkinek szokatlannak tűnne, ha a közeli jövőben az egyes nemzetek vezetői a szerződések aláírása helyett ezzel a régi szokással fogatosítanák megállapodásaikat. Régen a szittyá és hun népeknél ez a rituálé egy különösen erős, szent eskütételnek számított, melynek komolyságát a szertartásban megjelenő vér jelzi.

Német törzsi szokás volt emberáldozatok bemutatása. Úgy vélték, hogy a kifolyó vér tartalmazza az áldozat életerejét, ezért azt a falakra, isteneikről formázott szobrokra, és a szertartás résztvevőire hintették, eközben az áldozat elgyengült, életerejé elszállt. Látszólag tehát a vér hordozza az életerőt, és ez a tulajdonsága – szerencsére csak a régen élt germánok szerint – „átruházható” egy ilyen ceremónia keretében. Arról viszont nem szólnak a feljegyzések, hogy mindezek után az emberek erősebbek lettek, vagy tovább éltek volna.

Nemcsak a kulturális, szociális eseményekben volt szerepe régen a vérnek, hanem az ezzel kapcsolatos betegségekről is készültek feljegyzések. Gutaütésről Hippokratész már 2400 évvel ezelőtt említést tett. Az 1600-as évek közepén Jacob Wepfer azt találta, hogy a gutaütéses betegek agyvérzésben haltak meg. Ugyanakkor azt is felfedezte, hogy a betegség kapcsolatban lehet agyi érelzáródással (1). Hemofiliáról a legkorábbi dokumentumok második század környéki zsidó rabbiktól származnak, akik megszabták, hogy egy nő harmadik fiúgyermekét nem szabad körülmetélni, ha az előző két fia a körülmetélés során, - elvérzésben - meghalt. A 10. században az arab Albucasis különböző falvakban élt férfiakra jegyezte fel, hogy kis sebekből véreztek el. A 18. század végétől gyakrabban találkozhatunk hasonló esetleírásokkal, és szinte közzismert, hogy Viktória, Nagy-Britannia királynője is hordozója volt a betegségnek, fiú leszármazottai közt többen haltak meg vérzékenységben. Utódai révén terjedt el ez a

betegség az orosz, német és spanyol királyi családokban is (2). A betegség első kezelési formája körülbelül az 1900-as évek elejére tehető, a családtagok adtak vért a betegnek. 50 évvel később a kutatások révén már vérplazmával kezelték a vérzékenységben szenvedő betegeket. A 70-es évektől aztán véralvadási faktor koncentrátumokkal, 20 évvel ezelőtt pedig már megjelentek a terápiában a rekombináns alvadási faktor fehérjék (a vérplazma készítmények alkalmazása során gyakori volt a HIV fertőzés). A hemofília ma már egy jól kezelhető betegség. A kezelési lehetőségek kiszélesedésével az agyvérzéses páciensek megmentésére is jó az esély, amennyiben a tünetek alapján időben felismerik a betegséget.

A gazdaságilag fejlett országokban élő emberek életmódbeli változása hozta magával korunk egyik legtöbb áldozattal járó betegségét – amelyhez köthető egyébként az agyvérzés is - az ateroszklerózist. Az erek falának ezen elváltozása, mikor patológiássá válik, felfogható egyfajta érsérülésként, melyen vérrög alakulhat ki. Kicsit visszatérve még az emberiség nem is olyan régi történelmébe, valójában ez sem a legújabbkori ember betegsége, hiszen egyiptomi múmiák vizsgálata során is felfedeztek ilyen elváltozásokat (3).

A vérnek tehát már régen is fontos szerepet tulajdonítottak a különböző szertartások, rituálék során, és a vele kapcsolatos egyes betegségeket is felismerték, habár gyógyítani ugyan nem tudták még azokat. Manapság viszont hatalmas mennyiségű információ áll rendelkezésre a tudománynak és a klinikumnak ezeken a területein, a hematológián és a hemosztaziológián belül. Kiderült, hogy a példaként említett hemofília és agyvérzés a véralvadási rendszer hibás működését jelzik; előbbinél nem működik megfelelően az érsérülését kijavító, a - vérzést megállítani szándékozó - rendszer, az érelzáródásos gutaütés esetében pedig gyakran ugyanennek a rendszernek túlműködése tapasztalható.

Kutatásaink a véralvadás során kialakuló fibrinszerkezet kialakulásának és feloldódásának részletesebb feltárására irányultak. Sok információt találhatunk a szakirodalomban arról, hogy a vérben lévő makromolekulák, enzimek hogyan befolyásolják a fibrinháló képződését és szétesését. Ugyanakkor kézenfekvő vizsgálni azt is, hogy az érfal maga hogyan képes befolyásolni a fibrinszerkezetet, hiszen érsérülés esetén lokálisan ahhoz kapcsolódva alakul ki a vérzést megállító fibrindugó. Arról viszonylag kevés ismeret van birtokunkban, hogy az érfal egyes strukturális

alkotóelemei hogyan hatnak a véralvadásban és a fibrinolitikus folyamatokban. Munkánk során ezekre a kérdésre próbáltunk meg válaszolni, ezen értekezés témája az, milyen hatással vannak az erek falában lévő egyes makromolekuláris komponensek a fibrinszerkezetre, annak keletkezésére, illetve feloldódására.

1. IRODALMI HÁTTÉR

1. 1. A véralvadási folyamat rövid áttekintése

Az ér sérülésekor azonnal lokális érreakciók indulnak el. Ezt a folyamatot nevezzük vazokonstriciónak, mely a vérzéscsillapítás legelső fázisának tekinthető. Az endotél sejtréteg sérülése révén a vér érintkezésbe lép a szubendotéliummal, amihez a sérülést követően néhány percen belül megindul a vérlemezkék (trombociták) kitapadása (második fázis), mely közvetlenül vagy von Willebrand faktoron (vWf) keresztül közvetve az érfal kollagénjéhez történik. A kitapadt sejtek aktivációja majd aggregációja során egy laza szerkezetű „sejtdugó” alakul ki (4). A szubendotéliumban nagy mennyiségben jelen levő szöveti faktor beindítja a véralvadási kaszkádot (harmadik fázis), mely folyamat végén a trombin a vérben lévő szolubilis fibrinogénból – átmenetileg - oldhatatlan fibrinhálót hoz létre a kitapadt trombociták köré, stabilizálva ezzel az általuk létrehozott aggregátumot. A kialakuló fibrinháló sokféle makromolekulát képes magába zárni, ezekről és szerepükről, illetve hatásaikról később bővebben lesz szó. A folyamat mindhárom fázisa jól szabályzott, utóbbi kettőben többszörös pozitív és negatív visszacsatolós lépések játszanak döntő szerepet abban, hogy a véralvadás gyorsan és lokálisan történjen.

1. 2. A fibrinháló kialakulásának szereplői

1. 2. 1. A trombin

A trombin alapvető szerepet játszik a véralvadásban, működése során a szolubilis fibrinogén molekulát hasítja, így alakul ki a fibrin monomer melynek polimerizációjával jön létre a fibrinháló. A vérben protrombin formában van jelen,

átlagosan 1,4 μM koncentrációban. Aktiválódása szigorúan szabályzott folyamat. Az aktív enzim keletkezéséhez fiziológiai körülmények közt a véralvadás több faktora, illetve vérlemezke membránfelszín is szükséges hozzá (5). A humán trombinnak három formáját különböztethetjük meg: α -, β -, és γ - trombin (6). Ezek közül a 37 kDa tömegű, glikozilált α -trombin játszik fő szerepet a véralvadásban. Az aktív enzim egy 36 aminosavas A láncból, és egy 259 aminosav hosszúságú B láncból áll (7), amelyeket a Cys1 és Cys122 aminosavak közti diszulfidhíd tart össze (8). Autokatalitikus hasítás következtében jön létre az enzim másik két formája, amelyeknek fiziológiásan nincs szerepe a véralvadás folyamatában, aktivitásuk az α formához képest elhanyagolható. Az enzimen több kitüntetett helyet különböztethetünk meg, ezek: az Asp102 - His57 - Ser195 aminosavak által meghatározott aktív centrum, az apoláris hely, illetve a specificitásért felelős hely, ezek egymáshoz közel lokalizálódnak. A másik fontos elem a fibrinogén felismerő hely (FRS) (8).

Az enzimnek a fibrinogén mellett más szubsztrátjai vannak, például az V-ös, VIII-as, XI-es, XIII-as faktorok. Képes a vérkemeczkék aggregációját és szekrécióját elindítani, protein-C-n keresztül pedig saját képződését leállítani. Működését az antitrombin, α_2 -makroglobulin, illetve a heparin kofaktor II gátolja heparin jelenlétében (8). Hirudin is hatékonyan képes gátolni a működését (9).

1. 2. 2. A fibrinogén

A fibrinogén egy 340 kDa trinoduláris glikoprotein, ami a vérplazmában 2-4 mg/ml koncentrációban fordul elő. Három különböző polipeptid láncból áll, ezek a 610 aminosav hosszúságú A α , 461 aminosavas B β , és a 411 aminosavból álló γ láncok (10), amelyeket diszulfid hidak kapcsolnak össze (11). Minden lánc a molekulában kétszer fordul elő (dimer). A γ lánc alternatív mRNS hasítás eredményeképpen γ' formában is megjelenik, mely a normális γ láncból két helyen tér el: az eredeti 408 - 411 aminosavak 408 - 427 aminosav inszercióra cserélődnek (9-es intron átíródása végett) (12, 13). A γ' lánc heterodimer formában fordul leginkább elő (γ / γ'), körülbelül 15 %-át adva az össz-fibrinogén molekulának. A homodimer γ' / γ' előfordulása 1 % alatti (14, 15).

A molekula nyújtott szerkezetű; központi, és két szélső, disztális globuláris régióra különíthető. A 6 fehérjelánc N-terminálisa alkotja a molekula központi E

régióját. Az innen a két ellentétes irányba kiinduló láncok helikális coiled-coil régiókat alkotnak. Mindkét coiled –coil régió egy-egy globuláris D régióban végződik. Ezek tartalmazzák a B β és γ láncok C-terminálisát, amelyeket β illetve γ csomónak neveznek. Az A α láncok C terminálisa a D régió túlnyúlik, aztán visszahajlik a coiled-coil régióhoz, majd az E régió közelében végződik, ahol a molekulán belüli másik A α lánc ugyanezen doménjével kölcsönhatásba lép (16, 17). Az A α lánc ezen darabját α C konnektor és α C domén szakaszokra osztják (18, 19).

1. 3. Fibrinháló kialakulása

1. 3. 1. A polimerizáció első lépései

A trombin a fibrinogén A α láncát az Arg16-os pozícióban, B β láncát az Arg14-es pozícióban hasítja, létrehozva ezzel a fibrinopeptid A (fpA) és fibrinopeptid B (fpB) nélküli fibrin monomert, amely ezáltal polimerizációra képessé válik. Mivel molekulánként 2 fpA és 2 fpB található, ezért összesen 4 peptid hasítása történik meg. A hasítás mindig a fpA-val kezdődik (20), és gyorsan lezajlik az fpB peptidek lehasadásához képest, amelyeknél egy kezdeti fáziskésés után gyorsul fel a folyamat. Ez a gyorsulás a fibrinháló szerkezetének kialakulásával áll összefüggésben (21). A fpA lehasítása jól jellemzett: az A α lánc 7 - 16 meglehetősen konzervatív aminosavai alakítják ki azt a motívumot (rövid α hélix, több hidrogénhid kötés), ami ezen régió trombin általi felismeréséhez szükséges (22). A Phe8, Leu9 és Val15 aminosavak egy hidrofób térrészt alakítanak ki, ami a trombin apoláris zsebébe illeszkedik, az Arg16-os oldallánc pedig a specificitásért felelős helyre kerül az enzimen (23). A 7 - 19 régióban az egyes aminosavak cseréje majdnem minden esetben nagyon korlátozott vagy teljesen gátolt trombin általi fpA hasítást eredményez (24).

Az fpB lassult vagy gátolt lehasítása a fibrinogénről gyakran nem is detektálható, hiszen az fpA lehasadása elegendő ahhoz, hogy a fibrinháló kialakuljon.

A trombin képes a már fpA és fpB mentesített fibrinhez – vagyis a kialakuló fibrinhálóhoz - is kötődni (25). utóbbi esetben az enzim aktív marad, tehát a kötődés egyik esetben sem az aktív centrumon keresztül történik meg. Az A α lánc első 51 aminosava jó trombin szubsztrát, nem úgy mint ugyanezen lánc első 23 aminosava

annak ellenére, hogy a hasítási hely megvan mindkettőben. Az $A\alpha$ lánc fpA hasítási helye a trombin FRS helyén keresztül befolyásolja annak kötődését a szubsztrátjához (26, 27). Különböző $B\beta$ lánc változatokkal történt kísérletek (28 - 30) arra engednek következtetni, hogy az $A\alpha$ lánc kezdő szakasza mellett a $B\beta$ lánc fpB hasítási hely utáni régiója is szerepet játszik az FRS kötésben. Valószínűleg ezen két, illetve a harmadik (γ) lánc által alkotott térszerkezeti motívum alakítja ki a teljes FRS kötőhelyet (31).

1. 3. 2. Protofibrillumok, fibrinszálak kialakulása

Az fpA lehasítása után egy addig nem észrevehető struktúra kerül a felszínre, amit A-gombnak, vagy GPRV motívumnak neveznek, és az α -lánc 17-20-as pozíciójű aminosavai alkotják. Ez a gomb képes a γ csomó 'a' zsebébe illeszkedni, ami a 337 és 379 aminosavak közt helyezkedik el (32). Ezen A:a nemkovalens interakció (33, 34) eredményeképpen jönnek létre a félig átfedő, kétszálú protofibrillumok, melyek elektronmikroszkópos képen 22,5 nm-es periodicitást mutatnak (35). Az ez után következő fpB hasítás után kialakuló B-gomb pedig a β csomó 'b' helyére képes kapcsolódni. Eredmények vannak arra vonatkozóan, hogy a B:b kölcsönhatás fontos a protofibrillumok laterális összekapcsolódásában, és fibrinszálakká szerveződésében, ugyanakkor inkább valószínűsíthető ezen interakció protofibrillum stabilizáló hatása (36, 37). A fibrinszálak a protofibrillumok egymás köré csavarodásából alakulnak ki (38). αC régió hiányos fibrinogén polimerizációja során a kialakuló fibrinháló sűrűbb, vékonyabb szálú, több elágazást tartalmaz, ami az $\alpha C:\alpha C$ interakciók szerepét támasztja alá a laterális aggregáció során (39). Valószínűleg a fibrillumok közt többféle (gyenge) kölcsönhatás jön létre, melyek mind szerepet játszanak a laterális aggregáció folyamatában.

1. 3. 3. Elágazások létrejötte, a háló struktúra kialakulása

Két típusú elágazás jöhet létre a fibrinszálban. A bilaterális elágazás akkor jön létre, ha dupla szálú protofibrillumok laterálisan asszociálnak, négyszálú fibrillumot létrehozva, de az asszociáció nem tökéletes. További fibrillumok laterális kapcsolódása révén valósul meg a vastagodása ezen elágazásoknak.

Ekvilaterális elágazódást három protofibrillum képes létrehozni (40). Ez a típus nagyobb gyakorisággal jön létre akkor, ha a fibrinopeptidek hasítása lassan zajlik (41). Laterális asszociációt előtérbe helyező körülmények vastag fibrin szálakat hoznak létre, kevés elágazódási ponttal, míg ha a laterális asszociáció gátolt, vékony szálak jönnek létre, sok elágazással (42).

1. 4. A fibrin(ogén) poszttranszlációs módosulásai

A fibrinogénnek in vivo akár egymillió változata is létrejöhet (43). Néhány példát említve csak, a fibrin(ogén) esetében poszttranszlációs módosítások közt tartjuk számon például az oxidációt és a nitrozilációt, amelyek atherotrombotikus betegségek markereiként is funkcionálnak. Ezen módosítások szerepe és hatása nem tisztázott, hiszen kapcsolatba hoztak már ezekkel a folyamatokkal gyorsult illetve teljesen gátolt fibrinháló képzést is. Homociszteín-láció fordulhat elő a fibrinogén szintézisekor (intracellulárisan magasabb a homociszteín koncentrációja mint a vérplazmában), a lizin oldalláncokon, ami a plazmin általi fibrinbontást lassítja. A homociszteín egy új szulfhidril csoportot visz a molekulába, ami diszulfid-híd kialakítására képes például albuminnal. Glükóz kapcsolódása a lizin oldalláncokhoz (cukorbetegknél a megemelkedett vércukorszintnek köszönhetően) ugyancsak a homociszteínhez hasonló hatású plazmin működését vizsgálva.

Egyes betegségeknel tehát jelentős szereppel bírhatnak a fibrin(ogén) utólagos módosításai (44).

1. 5. A fibrinháló lebontásának szereplői

1. 5. 1. A plazminogén

Miután a vérzéscsillapító funkcióját betöltötte, a véralvadéknak eliminálnia kell a keringési rendszerből. A képződő alvadék már a kialakulása során magába zárja az önmaga feloldódásáért felelős enzim, a plazmin inaktív előanyagát, a plazminogént.

A plazminogén egy 92 kDa tömegű glikoprotein, amely sok szövetben jelen van ugyan, legnagyobb mennyiségben azonban a vérből mutatható ki, koncentrációja 2 μ M

(45). A májban szintetizálódó 810 aminosavas fehérjeláncból a szekréció során 19 aminosav levágódik, így alakul ki a 791 aminosavas fehérje (46). A fehérje N-terminálisán glutamátot hordoz, ezért Glu-plazminogénnek nevezik. Az N terminálison található preaktivációs peptidet (Glu1 - Lys77) 5 homológ úgynevezett kringle struktúra követi (K1 - K5). Ezek 80 aminosav nagyságú domének, melyeket egyenként 3 diszulfid-híd stabilizál (47), ezek felelősek a fibrin és egyéb szubsztrátkötéséért (48). A molekula C terminálisán helyezkedik el a proteáz aktivitásért felelős régió (Val562 - Asn791) (49). A kringle-k a fehérjék C-terminális lizin oldalláncjaihoz kapcsolódnak, minek eredményeképpen a plazminogén aktivációja két nagyságrenddel gyorsul.

Fiziológiásan K1 - K4-nek van a legnagyobb affinitása a lizin oldalláncokhoz, bizonyítottan ezek kötődnek a fibrinhez is (50, 51, 52). Natív fibrinben a K5 mutat legnagyobb affinitást a még intakt fehérjében lévő lizinek iránt (53). A plazminogénnek két fő izoformája van (I-es és II-es típusú plazminogén), amelyeknek glikoziláltsága különböző (54). A szerkezetbeli eltérés megnyilvánul a funkcióbeli különbségekben is: a II-es forma erősebben kötődik α 2-antiplazminhoz, és plazminogén aktivátorokkal kevésbé aktiválható (55, 56).

A plazminogén önmagában nem működőképes enzim, K5 melletti Arg561 - Val562 hasítás eredményeképpen jön létre a szerin proteázok közé sorolt plazmin, mely mint molekuláris olló képes hasítani a fibrinszálakat. A plazmin egy nehéz A láncból (561 aminosav) és egy könnyű B láncból (230 aminosav) áll (57), amit két diszulfid-híd tart össze Cys549 - Cys666 és Cys558 - Cys566 pozíciókban. Az aktív centrum a B lánc His603, Asp646 és Ser741 aminosavaiból áll. Plazmin általi hasítás eredményeképpen jön létre az úgynevezett Lys-plazminogén. A hasítás több helyen történhet, Lys62, Arg68 és Lys77 pozíciókban is (58). Glu-plazminogén sokkal tömörebb szerkezetű, melyben kölcsönhatás alakul ki az N terminális 1 - 77 aminosav és a K5 domén között, illetve K3 és K4 között (59). Az N terminális peptid proteolitikus hasítása, tehát a Glu-plazminogén - Lys-plazminogén átalakulás eredményeképpen a tömör formából egy nyújtott, nyitott konformáció jön létre, amely plazminogén aktivátorokkal könnyebben aktiválhatóvá válik (60, 61).

1. 5. 2. Plazminogén aktivátorok

A plazminogén aktivátorai szintén szerin proteázok, melyek többfélék lehetnek: szöveti típusú PA (tPA) urokináz típusú (uPA), illetve proteáz aktivitással nem rendelkező bakteriális fehérjék (streptokináz, staphylokináz). Emberben értelemszerűen csak az első kettő fordul elő.

1. 5. 2. 1. Szöveti típusú plazminogén aktivátor (tPA)

Főként az erek belső falát adó endothel sejtrétegben képződik és szekretálódik a vérbe, 70 kDa-os 527 aminosavas egyláncú glikoproteinként, ahol körülbelül 70 pM-os koncentrációt ér el (62). Plazmában kb. 20 % van szabad formában, a többi Plazminogén Aktivátor Inhibitor-1- hez (PAI-1) kötött formában van jelen. Szerkezetében 5 különálló modult találunk: N terminálisa az úgynevezett finger domén (F) (Ser1 - Lys49), ami homológ a fibronektin fibrin kötő finger doménjével. Ezt egy epidermális növekedési faktor (EGF) szerű domén követi (Ser50 - Asp87). A két kringle domént (K1: Thr88 - Gly176, és K2: Asn 177 - Cys261) a tripszinszerű katalitikus domén követi a molekula C terminálisán (Ser262 - Pro527). A tPA fibrin szelektív aktivátor, vagyis a plazminogént csak akkor képes aktiválni, mikor az fibrinhez kötött állapotban van. Az egyláncú tPA-t a plazmin hasítja Arg275 - Ile276 pozícióban, ami ezáltal kétszálúvá alakul, melyet egy diszulfid-híd tart össze. Érdekes módon, az egyszálú „proenzim” forma is rendelkezik kb 10 %-nyi enzimaktivitással (a kétszálú formához képest). Ennek oka a Lys156 és az Asp194 oldalláncok között létrejövő kapcsolat. A tPA mindkét formája képes létrehozni plazminogénnel és fibrinnel egy hármas komplexet. A folyamat végeredményeképpen a plazminogén az Arg561 -Val562 pozícióban hasítódik és plazminná alakul. A fibrinhez való kötődés során a plazminogén és a tPA is konformációváltozáson megy át, amelynek hatására a plazminogén aktivációja mintegy százszorosára gyorsul. A kötődés a tPA F és K2 doménjén keresztül történik (63). A fibrinben nagy affinitású ($K_d = 16 - 33$ nM) és alacsony affinitású ($K_d = 1$ μ M) Lys dependens kötőhelyek vannak a tPA számára, az αC régió A α 392 - 610 tartományában és a γ 312 - 324 régióban (64, 65). Ezek a kötőhelyek a fibrinogénben nem kerülnek a felszínre, a fibrinben viszont igen. A

plazminogén aktivációjának fontos aspektusa, hogy mind az aktiválandó enzim és az aktivátor is hasonló kötőhelyeket ismernek fel a fibrinszálon, így egymáshoz elég közel lokalizálódhatnak ahhoz, hogy a plazminogén aktivációs folyamat nagy hatásfokkal végbemenjen. A tPA megfelelő működéséhez kofaktorokat igényel, legfontosabb ilyen maga a fibrin. További kofaktorok lehetnek: aktin, miozin, denaturált fehérjék, jellemzően aggregátumok, mely β -redő struktúrákat tartalmaznak (66, 67).

1. 5. 2. 2. Urokináz típusú plazminogén aktivátor (uPA)

Az uPA-t sokféle sejttípus szintetizálja és szekretálja: endothel és epithel sejtek, ér simaizom sejteji, monociták, makrofágok, fibroblasztok. Molekulatömege 53 kDa, 411 aminosavnyi egyszálú fehérjelánc, melynek koncentrációja a vérben 2 - 4 ng/ml (68, 69). A tPA-val ellentétben a pro-uPA igazi zimogén, melynek aktivitása elhanyagolható a kétláncú aktív formához képest, melyet a plazmin alakít ki úgy, hogy elhasítja a Lys158 - Ile159 peptidkötést. A keletkező két láncot egy diszulfid-híd tartja össze. Ugyancsak a tPA-tól eltérő módon nem csak a fibrin felszínén képes aktiválni a plazmint, hanem a vérben is (nem fibrin szelektív aktivátor). Sejtfelszíni u-PAR receptorhoz kapcsolódva a plazmin képződése felgyorsul, amely köszönhető részben a plazminogén gyorsabb aktivációjának és a plazmin általi kétszálú uPA forma kialakulásának (61, 70). Plazminogén aktivációja viszont a tPA-hoz hasonlóan az Arg561 - Val562 kötés hasítása révén valósul meg.

1. 6. A vérplazma egyes elemeinek hatása a vérrög kialakulására és feloldására

In vivo a trombus kialakulása során nem csak a fibrinogén játszik szerepet a vérrög szerkezeti felépítésében, hanem a plazma más fehérjéi, sejtes elemei is beépülnek, amik befolyásolják a rög képződését és lízisét. A hatásuk lehet közvetlen (konkrétan a fibrin szerkezetét befolyásolják) vagy közvetett (a fibrinhálót kialakító trombin vagy lebontó plazmin enzimekre, illetve ezek aktivátoraira vagy inhibitoraira hatnak). A fontosabb sejtes és molekuláris elemek szerepét foglalom össze röviden a következő néhány bekezdésben.

1. 6. 1. A XIII-as faktor

Tetramer szerkezetű (A_2B_2) pro-transzglutamináz, ahol a katalitikus funkciót az aktivált A alegységek látják el, a B alegységek hordozó/védelmi szerepet töltenek be. Az A alegység 83 kDa tömegű, csontvelő eredetű, míg a B alegység 80 kDa-os, és a máj termeli. A plazmában soha nincs szabad A alegység, ezt a feleslegben termelődő B alegységek mindig komplexálják (intracellulárisan aktív homodimer A alegységek vannak). Aktiválódása során a trombin az A alegység Arg37 - Gly38 kötést hasítja, és megfelelő mennyiségű Ca^{2+} jelenlétében a B alegység disszociál, mely események konformációváltozást okoznak az A alegységen, és szabaddá válik az aktív hely. Az aktiválás ugyanakkor felgyorsul a fibrin felszínén, és azt is kimutatták, hogy trombin által aktivált FXIII nem mutatható ki szérumban, tehát kötve marad az aktív enzim a fibrinen (71).

A plazmában minden FXIII fehérje fibrinogénhez kötött, legnagyobb affinitással a γ' láncon lévő kötőhelyhez (72), ahova a trombin is képes kapcsolódni. Aktivációja után két fő szubsztrátja a fibrin és az α_2 -PI (továbbiak például az V-ös faktor, PAI-2, Lp(a), fibrinogén, fibronectin, vimentin, miozin, aktin, vinkulin).

Az enzim fő funkciója a fibrinháló stabilitásának fokozása, benne keresztkötések létrehozása. A fibrinben intermolekuláris γ dimereket hoz létre, az egyik γ lánc Lys406-ot kapcsolja össze a másik γ lánc Glu398/399-val. Az α láncok keresztkötése is megvalósulhat FXIII által, de sokkal lassabban mint a γ láncoknál. A kapcsolódás több helyen is végbemehet lizin és glutamin oldalláncok között, α oligomereket létrehozva. Ritkán előfordulhat még α és γ láncok közti keresztkötés, illetve γ trimerek és tetramerek is kialakulhatnak. A fibrinháló stabilitását és fibrinolitikus rezisztenciáját leginkább az α oligomerek fokozzák (73), de a γ dimerek is hozzájárulnak a stabilabb szerkezet kialakulásához (74). A keresztkötések révén az egyes fibrinszálak közti terek kevésbé átjárhatóvá válnak a lizist végző vagy elősegítő fehérjék számára.

A FXIII képes az α_2 -PI-t keresztkötni a fibrinnel (75), további akadályokat gördítve ezáltal a plazmin működése elé (76).

In vivo a trombin által aktivált fibrinolízis inhibitor (TAFI) is keresztkötődhet a fibrinhez a FXIII által. A TAFI feladata ebben a rendszerben, hogy a fibrin C-terminális lizin oldalláncait levágja, csökkentve ezzel a tPA és plazmin(ogén) kitapadási helyeinek

számát. A fibrinhálóba beépülő monociták PAI-2-t tartalmaznak, ami az uPA inhibitora. A sejtekből felszabaduló PAI-2-t képes a FXIII a fibrinhez kötni, gátolva ezáltal az uPA általi plazminogén aktivációt.

1. 6. 2. A vérlemezék (trombociták) és komponenseik

A vérlemezék 2-3 μm nagyságú, sejtmag nélküli, a csontvelői megakariociták citoplazmájából lefűződő citoplazma fragmentumok. Számuk a vérben 250000-300000 db/ mm^3 . Granulomer régióban különböző anyagokat tároló granulumok vannak. Leggyakoribbak a 400 nm átmérőjű α -granulumok, melyek véralvadási faktorokat, fibrinogént, plazminogént, fibronektint, IV-es típusú vérlemezkefaktort vWF-t és trombospondint tárolnak.

Artériás trombusokban számítások szerint a vérlemezék körülbelül 25-szörös mennyiségben koncentrálnak (77). A hálóba került vérlemezék kb. 6 óra után elhalnak, sejtalkotóik a trombus részévé válnak, többek között nagy mennyiségű foszfolipiddel dúsítva azt (78, 79). A vérlemezke-membrán fontos szerepet játszik a véralvadás beindításában, ugyanakkor az is bebizonyosodott, hogy ezen membránok nagy részét kitevő foszfatidil-kolin és foszfatidil-serin molekulák a fibrinolízist gátolják, egyrészt diffúziós gátat képeznek a tPA, plazminogén és plazmin előtt, másrészt képesek ezek megkötésére is (78).

Vérlemezke eredetű miozin is μM -os koncentrációban fordul elő a trombusban. Plazmin általi in vitro fibrinolízis során a folyamat lelassul miozin jelenlétében, ez a lassulás uPA általi fibrinolízis indításkor lineárisan függ a miozin koncentrációjától. A tPA-nak a miozin kofaktora (80), de a fibrinnel asszociált miozin nem, csak a szabad formája váltja ki a plazminogén aktivációra kifejtett pozitív hatást. Áramlási körülmények közt miozin jelenlétében a fibrinháló szétesése hamarabb megkezdődik (a fibrin degradációs termékek közti kapcsolatot gyengíti) ugyanakkor mivel a plazminnak szubsztrátja (80) így kompetál a fibrinnel a plazmin általi hasítás során, összeségében a lízist lassítja (81).

Aktivált vérlemezék trombin általi stimulációra polifoszfátot szekretálnak (82), melyek beindítják az XII faktoron keresztül az aktív trombin nagy mennyiségben történő keletkezését, ami a többek között a TAFI fokozott működéséhez vezet és

végeredményben fibrinolízis inhibitor hatással bírhat (83). A polifoszfátok interakcióba léphetnek a fibrinogénnel és a fibrinnel, és képesek a kialakulóban lévő fibrinháló szerkezetét módosítani a fibrinogén – fibrin átalakulás során, melynek hatására a fibrinháló permeabilitása csökken, pórusai szűkebbek, szálai vékonyabbak lesznek (84). Ezeknek a hatásoknak az ellenkezőjét is kimutatták (85), ugyanakkor mindkét esetben a polifoszfátok gátolták a fibrinolízist, melynek oka a Pn és tPA csökkent affinitása a fibrinfelszínhez.

Vérlemezek szekretorikus granulumaiban foszfolipáz A2 tárolódik és ürül aktivációs stimulusra. Az enzim képes a foszfolipidek sn-2 pozíciójú észter kötéseinek hasítására, szabad zsírsavakat téve ezáltal szabaddá. Sebészi úton eltávolított trombusból mM nagyságrendben mutatható ki szabad zsírsav (86), mely a vérlemezke összetételét vizsgálva főleg olajsavnak és palmitinsavnak adódik (87). Az olajsav képes gátolni a plazmin fibrinolitikus aktivitását, tPA működését teljesen gátolja fibrinmentes környezetben, ugyanakkor fibrin jelenlétében hatása ezzel ellentétes, ami a plazminogén-fibrin-tPA komplex favorizált képződésének köszönhető (86).

1. 6. 3. Vörösvértetek

A vérben a fibrinogén körülbelül 2 %-a vörösvértetekkel kötötten kering, a vörösvértest membránjának egy integrin receptora révén (88, 89). Artériás trombusok kialakulásakor a vörösvértetek (vvt) beépülnek a hálóba, módosítva annak szerkezetét és mechanikai tulajdonságait. A fibrinszálak közti tér megnövekedése tapasztalható, amikor 20 %-nyi vvt inkorporálódott a kialakuló hálóba (90). A vérrög permeabilitása a benne lévő aggregált vvt-k hatására lecsökken (91), a fibrinszálak átmérője megnövekszik, a vvt-k koncentrációjától függően sűrűbb vagy lazább hálóstruktúra jön létre. A viszkoelasztikus modulusok 10 %-nyi vvt koncentrációnál érik el maximumaikat, nagyobb mennyiségnél csökken mind az elasztikus, mind a viszkózus modulus esetében, ugyanakkor a viszkózus / elasztikus hányados megnő (92). Ez a tanulmány kiemeli azt is, hogy a vvt-k nem homogéne helyezkednek el a fibrinhálóban (in vitro sem), illetve nagyfokú, lokális heterogenitást okozhatnak a fibrinszálak számában.

Az in vitro kísérleti rendszerek összeállítása (habár hasonló irányú kutatásról van szó) meglehetősen eltérő lehet. Mi sem bizonyítja ezt jobban, minthogy az előzőekhez hasonlóan csak fibrinből és vvt-ből keletkező szerkezet lehet a vvt nélkülihez képest vékonyabb szálú, és szűkebb pórusú, ráadásul sűrűbb hálózattal (93). A tPA általi plazminogén aktiváció gyorsul vvt-t is tartalmazó fibrin felszínén, ugyanakkor a plazmin általi fibrinolízis sebessége lelassul. A vvt-k jelenléte vékonyabb szálakat eredményez, ami jobb hatásfokkal üzemel a plazminogén aktiváció során. A nagyobb vvt mennyiség viszont azt eredményezi, hogy csökken a plazmin(ogén) által elérhető fibrinfelszín, ami csökkent lízis lehetőségét rejti magában.

1. 7. A fibrinháló mechanikai stabilitásának háttere

A véralvadék stabilitását kétféleképpen szemlélhetjük. Egyrészt a plazmin enzimatis lebontás elleni rezisztenciáját értjük alatta, másrészt a véráramlás általi nyíróerőknek is ellen kell tudni állnia, hogy stabilan a kialakulása helyén maradjon, a vérkeringés ne tudja elsodorni a képződési helyéről, illetve annak hatására ne következzen be szerkezetében olyan változás, ami integritását veszélyezteti.

Az érkeresztmetszetet megváltoztatja a kialakuló trombus, aminek hatására módosul a vér reológiája is. A vér (elképzelt) folyadékrétegei az erekben laminárisan áramlanak. Az egyes rétegek különböző sebességgel haladnak, az érfaltól az ér tengelye felé haladva sebességük egyre nő. Az egész érkeresztmetszetet figyelembe véve egy parabola alakú áramlási profil rajzolódik ki. A legnagyobb nyíróerő ellenben (lévén a sebességgradiens ott a legnagyobb) az érfal mentén generálódik. Trombus vagy ateroszklerotikus plakk azonban megváltozott érgeometriát, ezáltal módosuló áramlási viszonyokat is eredményez (94). Mindkét esetben a szűkületet okozó képlet csúcsán hat a legnagyobb nyíróerő. (Ez okozza a plakksapka erózióját előrehaladott ateroszklerotikus területeken).

A trombus tehát változó dinamikájú körülmények közt alakul ki, hiszen méretének növekedésével az ér keresztmetszete csökken, ami a rá ható nyíróerők változását hozza magával.

A trombust, illetve a benne lévő fibrinhálót viszkoelasztikus polimernek tekintjük (95), melynek különböző elemei határozzák meg azt, hogy mennyire

deformálódik az áramló vér hatására. A deformáció lehet reverzibilis, illetve akár irreverzibilis, súlyos esetben leszakad, és embóliát okozhat. Utóbbi leginkább a nagyon merev szerkezetű trombusra jellemző, míg a plasztikusabb szerkezetűek esetében formáját megváltoztatva, új alakot felvéve állhat ellen a véráramlásnak.

A viszkoelasztikus anyagok viszkózus és elasztikus paraméterekkel jellemezhetőek. Elasztikus anyagok a rájuk ható erő hatására gyorsan megváltoztatják alakjukat, és ez az alakváltozás mindaddig fennáll, míg az erőhatás tart, majd eredeti alakjukba térnek vissza. Az inelasztikus anyagok rájuk irányuló erő hatására nem deformálódnak azonnal, alakjuk folyamatosan változik, és az erőhatás elmúltával nem veszik fel újra eredeti formájukat. Fibrin esetében lassan növelve a feszültséget, a rög deformációja csak elasztikus tulajdonságokat mutat, inelasztikust csak elhanyagolható mértékben. Gyors erőváltozás esetében viszont utóbbi komponens jelenléte arányaiban nagymértékben megnő. Az elasztikus tulajdonságok a helikális coiled-coilhoz, a globuláris γ -nodulusokhoz, de leginkább a kevésbé strukturált α C doménhez köthetőek (96).

1. 8. Az erek szerkezete, felépítése, alkotóelemei

Az érfalat belülről kifelé haladva három rétegre különíthetjük el. A belső tunica intima, a középső tunica media és a külső tunica adventitia. Ez a rétegződés az egész érpályában végigkövethető (a legkisebb átmérőjű erekben a t. media hiányzik), ugyanakkor a rétegek egymáshoz viszonyított aránya más és más az egyes szakaszokon.

1. 8. 1. Tunica intima

Az érfalat alkotó legbelső réteg aránylag vékony, legfontosabb eleme a laphámyszerű sejtekből felépülő, folyamatos endothel réteg. Ezen sejtréteg alatt található a lamina basalis, amit nagyobb erek esetében egy laza rostos kötőszöveti rétegbe ágyazott, helyenként simaizomsejteket is tartalmazó subendothel réteg követ. Ebben körkörösén futó rugalmas rostok és kollagén fibrillumok vannak jelen, az elasztikus típusú nagy artériák esetében. Az izmos típusú artériákban, melyek az artériás rendszer

legnagyobb részét adják, a t. intima és a t. media határán az úgynevezett membrana elastica interna is megtalálható.

1. 8. 2. Tunica media

Artériákban erősen fejlett réteg. Jellemzői a cirkulárisan futó simaizomsejtek, és a nagy arányban előforduló rugalmas rostok, elasztin. Ezek a rugalmas elemek koncentrikus lamellákat hoznak létre az érpálya ezen területén, akár 70 réteg is kialakulhat. Köztük szabálytalan nyílások találhatók, melyben extracelluláris mátrixot termelő simaizomsejtek foglalhatnak helyet. Ezek mind nagy mennyiségű proteoglikánba ágyazódnak be.

1. 8. 3. Tunica adventitia

Leginkább hosszanti kollagénrost-kötegekből, laza rugalmas rosthálózatból, fibrocitákból áll. A vastag érfalak táplálása szempontjából érdemes kiemelni a vasa vasorumokat, amelyek itt futnak.

1. 9. Az érfal szerkezeti változásai, az ateroszklerózis

Az öregedési folyamattal párhuzamosan majdnem minden artériában megfigyelhető az intimában fibrózis. Az elasztikus szövetek fragmentációja és sokszorozódása is gyakori jelenség, ez koncentrikus intimális vastagodáshoz vezet. Kalcifikációs folyamatok létrejöhetnek normál artériákban is. Az ateroszklerotikus elváltozások előjelei is megfigyelhetők már egészen fiatal korban, igaz ekkor még általában nem beszélhetünk patológiás elváltozásokról.

1. 9. 1. Az ateroszklerotikus folyamat első fázisai

Az ateroszklerózis a közepes és nagy méretű artériák belső falának aszimmetrikus, fokális megvastagodása. A folyamat során szubendotheliálisan sejtek, lipid és fibrotikus képletek halmozódnak fel.

Az érendotélium egy szelektíven működő gátat képez a vér és a szövetek közt, sejtjei tight junctionokkal kapcsolódnak egymáshoz. Az erek elágazásánál, - ahol az ateroszklerotikus folyamatok a leghamarabb elindulnak – megváltozott nyírófeszültség hatására történő adaptációjuk során az endotélsejtek orientációja és alakja (ellipszoidról poligonálisra) is megváltozik. Ezeken a területeken megnő az érendotél permeabilitása, többek közt az alacsony sűrűségű lipoproteinre (LDL) is (97). Az LDL akkumulációja az érfalban az ateroszklerotikus folyamat első állomása. Nagy eséllyel fordul elő, ha az LDL szintje a vérben magas, illetve ha ezen anyag transzportja és retenciója az érfalban megnövekedett. A retenciója során az apolipoprotein B az érfalban lévő proteoglikánokkal lép kapcsolatba (98). A becsapódott LDL modifikáción esik keresztül, leginkább oxidálódik, mely lépésben főleg a lipoxigenázoknak tulajdonítják a főszerepet (99), de az LDL molekulák lipolízise, aggregációja is szerepet játszhat abban, hogy gyulladáshoz vezet, majd endotél aktivációt képes elindítani (100, 101). Az aktivált endotél sejtréteg leukocita adhéziós molekulái segítségével (VCAM-1) monocitákat és limfocitákat emel ki a vérből, és ragaszt a gyulladt területhez. Az intima sejtréteg kemokin termelése révén a vérből kiemelt sejtek a szubendotheliális rétegbe vándorolnak (102, 103). Az intima által termelt makrofág kolónia stimuláló faktor (M-CSF) expresszió monocita – makrofág átalakulást indukál, ennek hiányában a lézió jóval kisebb (104). A makrofágok scavenger és toll receptoraikon keresztül jelentős mennyiségű módosított LDL-t képesek felvenni. Amennyiben több koleszterint vesz fel a sejt, mint amennyit le tud adni, a citoplazmában koleszteril észter cseppek formájában válik ki, végeredményképpen pedig habsejtté alakul a makrofág.

Alternatív mechanizmus szerint (Mainz hipotézis) nem az oxidáció a leglényegesebb módosítás az LDL-ben, hanem a proteázok és koleszterin észter hidrolázok játszanak fő szerepet az úgynevezett enzimatikusan módosított LDL (eLDL) kialakulásában. Az eLDL már korai szakaszban megjelenik az ateroszklerotikus folyamat során, a makrofágok több receptora ismeri fel mint az oxLDL-t, és hatására a makrofág – habsejt átalakulás is jóval jelentősebb (105).

A magas denzitású lipoprotein (HDL) erősen az ateroszklerotikus folyamat ellen dolgozik: perifériásan csökkenti a koleszterinszintet, illetve egy benne megtalálható észteráz hatása révén képes oxidált foszfolipideket bontani.

1. 9. 2. Fibrózus plakkok kialakulása

A fibrózus plakkokat nagy mennyiségű extracelluláris lipid (főleg koleszterin illetve ennek észtere), simaizomsejtek, és simaizomsejt eredetű extracelluláris mátrix felhalmozódásaként definiálhatjuk. A makrofágok által kibocsájtott citokinek és növekedési faktorok fontosak a simaizomsejtek migrációja, proliferációja és extracelluláris mátrix (ECM) produkciója szempontjából. A CD40 ligand, melyet makrofágok, simaizomsejtek és az endotél sejtjei is képesek termelni, kapcsolódása receptorához (CD154) fontos szerepet játszik az előrehaladott léziók kialakulásában. Ennek hatására gyulladásért felelős citokinek, extracelluláris mátrixot bontó proteázok, és adhéziós molekulák termelődnek (106).

1. 9. 3. Előrehaladott léziók és a trombózis

A trombus kialakulása az előrehaladottan ateroszklerotikus érfelszínen leginkább a plakk összetételén és ezáltal „sebezhetőségén” múlik, mintsem azon, hogy mekkora szűkületet okoz az érlumenben. Sebezhető plakkoknak vékony fibrózus felszíni sapkájuk van, mely alatt nagyszámú immunsejt helyezkedik el. A folyamat kulcsfontosságú része a fibrózus sapka integritásának fenntartása, melyben nagy szerepe van az extracelluláris mátrix képződésének (és lebomlásának), hiszen a sapkában lévő fibrilláris kollagén degradációja csökkentheti a fibrózus sapka ellenállását a mechanikus hatásokkal szemben. Az immunsejtek által kibocsájtott interferon- γ gátolja a simaizomsejtek ECM komponenseinek termelését, és indukálja többféle proteáz termelését, melyek képesek az ECM bontására, például intersticiális kollagenázt, zselatinázokat, stromelizint (107, 108). A lézió stabilitását befolyásolják kalcifikációs folyamatok is, amelyek ugyancsak jellemzőek előrehaladott állapotban. Kalcifikáció során pericita szerű sejtek mátrix állványt képeznek, mely a csontfejlődéshez hasonlóan kalcifikálódik.

Amennyiben a fibrotikus sapka erózió vagy ruptúra során megsérült, az érlumen felé nyitottá válik a lézió trombogén felszínként viselkedő magja. Ennek trombogenicitását főleg a szöveti faktor (TF), foszfolipidek, vérlemezke adhéziós molekulák adják. A sérült felszínen trombus alakul ki.

1. 10. Az érfal fő makromolekuláris alkotóelemei

1. 10. 1. A kollagén

A kollagén alapvető eleme az extracelluláris mátrixnak, minden szövetben megtalálható struktúrfehérje. Idáig 28 féle különböző kollagén fehérjét ismerünk, melyek közös jellemzője, hogy három balmenetes, α -helikális lánc egymás köré tekeredéséből alakulnak ki. A láncban tripeptid ismétlődés figyelhető meg, minden harmadik aminosav glicin, ehhez képest második pozícióban gyakori a prolin, harmadik pozícióban pedig a hidroxiprolin előfordulása (30 %). Az α láncról függően lehetséges homo- és heterotrimer kialakulás is attól függően, hogy mindhárom lánc egyforma-e vagy sem. A triplahélix részeket nemhelikális domének választják el egymástól, amik más mátrix molekulák felismerési / kapcsolódási helyei.

Az érfalban lévő fehérjék 40 %-át a kollagének adják (109). Az érfal fő kollagénei I-es és III-as típusúak, fibrilláris szerkezetűek (vastag kötegeket alkotnak), ellentétben például a bazális lamina IV-es típusú kollagénjével, ami háromdimenziós térbeli hálószerű szerkezet kialakítására is képes (110). Az I-es heterotrimer szerkezetű, két $\alpha 1$ és egy $\alpha 2$ lánc, míg a III-as típusú homotrimert három $\alpha 1$ lánc építi fel (111).

A kollagének jelentős szerepe van az erek alakjának, mechanikai stabilitásának kialakításában. Nyugalmi állapotban a t. adventitiában lévő kollagénrostok lefutása hullámos, aminek eredménye, hogy az adventitia kevésbé feszes, mint a media. Feszülés hatására azonban a hullámos elrendezés megszűnik, a rostok kinyúlnak, megakadályozva ezzel az ér túlnyúlását illetve egyéb sérülését (112).

1. 10. 2. Kollagén szerepe az ateroszklerózisban

Az érfal ateroszklerotikus területein is a kollagének dominanciája figyelhető meg. Az I-es és III-as típusú formái mellett a IV-es és V-ös kollagén típusok mennyisége is jelentősen megemelkedik, előbbi a fibrózus sapka területén jellemző (113, 114, 115). Ha a plakk területén túl sok kollagén halmozódik fel, az stenosishoz vezethet, míg ha mennyisége túl kevés, sérülékeny plakk alakul ki (116). Mennyiségét a szintézis és a degradáció egyaránt befolyásolja, mindkét folyamat végbemegy egy adott

plakkban, ugyanazon időben (117). A szintézis főleg az érintett területre vándorló simaizomsejtekhez, kisebb részt az endotélsejtekhez köthető. A kollagének lebontása leginkább a területre sereglő aktivált makrofágok, T-limfociták által termelt mátrix metalloproteázok (MMP-k) működésének az eredménye, amelyek az érfal extracelluláris mátrixának szinte minden jelenlevő komponensét képesek bontani (118).

1. 10. 3. Proteoglikánok

A kollagén rostok az érfalban proteoglikán mátrixba ágyazottak. A proteoglikánok alapvetően két részből épülnek fel: tartalmaznak egy fehérjerészt (core) és legalább egy, nagyméretű, szulfatált cukoroldalláncot (GAG) amely három típusú lehet: heparán, keratin, és kondroitin/dermatán. Ezek diszacharid ismétlődésekből épülnek fel, az egyik alkotója a diszacharidnak hexózamin, ami a 4-es vagy a 6-os pozícióban szulfatált.

A heparán szulfátok (HS) a glükózamin mellett (amely lehet 2-deoxi-2-szulfoglükóz vagy 2-deoxi-2-acetamidoglükóz) D-glukuronsavat vagy L-iduronsavat tartalmaznak, 1 - 4 glikozidos kötésben. A szulfát csoportok száma diszacharid egységenként 0,5 – 2,5 között változik, heparinok esetében ennél nagyobb is lehet (119, 120).

A keratin-szulfát proteoglikánok N-acetil-glükózamin és D-galaktóz diszacharid ismétlődésekből épülnek fel, melyek 1 - 3 és 1 - 4 kötésekkel kapcsolódnak. Előfordulnak mannóz, fukóz és szialinsav csoportok is. A szulfatáltsága a diszacharidoknak 0,8 - 1,5 közötti.

Kondroitin/dermatán-szulfát láncok N-acetil-glükózamin és D-glukuronsav és/vagy L-iduronsav diszacharid ismétlődésekből állnak, és 1 - 3 vagy 1 - 4 kötésekkel kapcsolódnak. L-iduronsav csak a dermatán láncban fordul elő. Szulfatáltsága általában 1/diszacharid.

L-iduronsav tartalmuk révén a dermatán-szulfát (DS) és a heparán-szulfát meglehetősen nagy konformációs flexibilitással rendelkezik (121), mellyel részben magyarázható a kétféle GAG lánc funkcióbeli azonossága. Jól ismert, hogy a heparin a trombinnak jó gátlószere, amennyiben antitrombin és heparin kofaktor II (HCII) is jelen van. Ugyan a heparin és a DS szulfatáltsága az előbbi javára lényegesen eltér,

szerkezetük viszont hasonló, a dermatán-szulfát képes (HCII) jelenlétében a trombint inaktiválni (122), míg a (L-iduronsavat nem tartalmazó) kondroitin-szulfát nem.

A DS megtalálható a vérben is (123, 124), vérrög kialakulása során inkorporálódhat a fibrinhálóba, hatására vékonyabb, törékenyebb fibrinszálak alakulnak ki, melyek kevésbé ellenállóak a plazmin általi degradációval szemben (125).

Hialuronsav a kondroitin-szulfátokhoz hasonló felépítésű, de nem szulfatált és nem kapcsolódik fehérjéhez (126).

A proteoglikánok fehérjerészei eléggé különbözőek lehetnek. A kisméretűek alakja globuláris, egy vagy két cukor oldallánccal. A nagyméretűeknek van legalább egy globuláris és egy lineáris része, ehhez 5 - 10 oldallánc kapcsolódhat. A nagyon nagy méretű fehérjék akár 3 globuláris régiót is tartalmazhatnak, hosszú lineáris régiójukhoz akár 100 oldallánc is kötődhet (119).

Fiziológias körülmények közt a GAG-ok képesek elektrosztatikusan I-es típusú kollagénnel kötődni. Ebben szerepe van a töltéssűrűségnek és a GAG alakjának is. Az erősen kötődő GAG-ok képesek a kollagén fibrillogenezis megváltoztatására is. CS és DS a GAG láncon keresztül és fehérje-fehérje interakciók révén is képes az I-es kollagénnel kötődni, és a fibrillogenezist gátolni.

1. 10. 4. A dekorin

A kicsi, leucin ismétlődésekben gazdag proteoglikánok csoportjába tartozik (127). Közös jellemzőjük a kb. 40 kDa nagyságú, esetenként nagyfokú homológiát mutató fehérjerész, ezen belül 6 - 10 leucinban gazdag ismétlődés (LRR), melyet két oldalról cisztein gazdag domének határolnak. Hordozhatnak dermatán/kondroitin-szulfát (biglikán), illetve keratán-szulfát oldalláncot (fibromodulin) is. Szerepük jelentős az extracelluláris tér struktúrájának szervezésében, integrin receptok ligandumaként befolyásolják a sejtadhéziót is.

A dekorin GAG láncainak nagysága akár 120 – 180 kDa is lehet (128), amely a cisztein gazdag régióban kapcsolódik a fehérjéhez. A GAG lánc leginkább dermatán-szulfát, de kisebb részt kondroitin-szulfát is lehet attól függően, milyen szövetben

expresszálódik. Átlagosan 1 szulfátcsoportot hordoz diszacharid egységenként, de ettől lényegesen eltérő mintázat is előfordulhat (129).

Core fehérjéje, melyben 10 LRR található, 57 %-os homológiát mutat a biglikánéval, ezért egy alcsaládba is szokták sorolni ezeket. Alapvető extracelluláris mátrix szervező funkciója a kollagén fibrillumok kötegekbe rendezése, ezek méretének szabályozása (130), illetve képes kapcsolatot teremteni az fibrilláris I-es és hálózatos szerkezetet kialakító VI-os kollagének közt, stabilizálva ezzel a köztük lévő kapcsolatot.

Erek falában nagy mennyiségben fordul elő torakális és radiális artériák intimájában és az adventitiában (131).

Kimutatták, hogy a dekorin kapcsolódhat a fibrinogén D régiójához, beépül a képződő fibrinhálóba, és a fibrinszátmérők csökkenését és gyorsabb lízisét okozza (132, 133).

1. 10. 5. Dekorin az ateroszklerózisban

Ateroszklerotikus léziókban a habsejtek területén (134), illetve a fibrózus sapkához asszociáltan jelentős mennyiségben mutatható ki a fehérje (135). Az erodált vagy rupturált plakkok területén viszont főleg verzikán illetve hialuronsav detektálható, dekorin csak nagyon kis mértékben (136). Ezen eredmények szerint a dekorin a fibrózus sapka területén az ott lévő kollagénnel asszociálódva a plakksapka stabilizációjában játszik szerepet, alacsony expressziója az ateroszklerotikus léziót sérülékennyé teszi. Azonban ha a sérülés megtörtént, az érfalban lévő, az érlumen felé expresszálódó dekorin szerepet játszhat a vérlemezkék aktivációjában (137).

1. 11. Mátrix metalloproteázok általános jellemzése

Az MMP-k az általánosan előforduló, multidomén Zn^{2+} dependens endopeptidázok, a metzicinek szupercsaládjának egyik csoportját alkotják. Ebbe a fehérje szupercsaládba tartoznak még többek között az ADAM-ok (metalloproteáz rész mellett még disintegrin is tartalmaznak) és az ADAMTS-ek is, melyek az előzőek mellett még trombospondin részt is hordoznak. Közös szerkezeti jellemzőjük, hogy az aktív centrumukban általában három hisztidin tartja koordinációs kötésben a szubsztrát

fehérjék hasításában alapvető szerepet játszó cink iont, illetve minden esetben ezen ion körül egy hidrofób zseb alakul ki.

Az MMP-k fő funkciója a mátrix alkotóelemeinek lebontása, és ezáltal az extracelluláris tér újrászervezése, regulációja. Ugyanakkor képesek sejten kívüli, de az ECM felépítésében közvetlenül szerepet nem játszó komponensek, mint például citokinek, receptorok hasítására is, ezáltal a szignalizációs folyamatok befolyásolására is (138).

Az MMP-k vagy matrixinek családja tehát egy alcsalád a nagy metalloproteáz enzimes családon belül. A matrixin családnak emberben eddig 23 tagját fedezték fel (139). Preproenzim formában szintetizálódnak, és zimogén (proenzim) formában szekretálódnak a sejtekből. Mindegyik tartalmaz egy katalitikus domént, amit egy úgynevezett prodomén (propeptid) fed le. Ez a propeptid körülbelül 80 aminosav hosszúságú (konszenzus szekvenciája PRCXXPD), és tartja inaktív állapotban az enzimet. A propeptidben lévő cisztein aminosav tiol csoportja „tartja fogva” a katalitikus helyen lévő Zn^{2+} iont (az enzimek szerkezetének helyes kialakulásához és felépítéséhez szükségesek még Zn^{2+} illetve Ca^{2+} ionok). Néhány kivétellel tartalmaznak egy C-terminális hemopexin-szerű domént, ami a szubsztrát felismerésben játszik szerepet (140), illetve egy prolingazdag, flexibilis „csukló” régiót.

Működésükhöz, illetve szabályzásukhoz elengedhetetlen feltétel az aktív helyen lévő cink ion szabaddá tétele, mely az aktivációs folyamat során (melyet a szakirodalom „cysteine switch” néven említ) többféleképpen is történhet. A propeptid lehasítása nem feltétlenül szükséges az allosztérikus aktiváció során, de ezen folyamat végén általában ebben az esetben is megtörténik. A fedél az esetek nagy többségében proteolízissel távolítódik el az aktív helyről. Ezt a hasítást végezheti szerin proteáz mely gyakran a plazmin, vagy egy másik MMP is. Érdekesség, hogy az MMP-k egy jelentékeny részét a Golgi membránján lévő szerin proteáz, a furin képes aktiválni, ezáltal már működőképes formában szekretálódhatnak. Leukociták mieloperoxidáza által termelt hipoklórsav, peroxinitrit képes a fedél ciszteinjének tiol csoportjával elreagálni, mely ezáltal képtelenné válik a cink ion kötésére, ezután a propeptid autolízissel leválhat (141).

1. 11. 1. A mátrix metalloproteázok szerepe az ateroszklerózisban

Normál szerkezetű artériákban MMP-k közül csak az MMP-2 mutatható ki, ugyanakkor regulátorai, a TIMP-1 és TIMP-2 is jelen vannak, tehát alapesetben az erek falában lévő mátrixkomponensek újjászerveződése nagyon alacsony mértékű (142). Ateroszklerotikus plakkokban viszont nagy mennyiségben termelődnek és egyúttal bomlanak is le a mátrixkomponensek, nagyfokú és folyamatos struktúraát szerveződés figyelhető meg, melyben viszont jelentős szerephez jutnak az MMP-k. Ezen enzimek forrása a plakkot alkotó összes sejtfeleség lehet, leginkább a makrofágok, T-limfociták, neutrofilek, illetve a simaizomsejtek termelik, de néhány enzim forrása lehet az endotélsejt réteg. Az MMP-2-n kívül az MMP-1, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14 és 16-ot mutatták eddig ki (118). Megjelenésükben szerepe van a plakkban lévő gyulladás folyamatnak, mely során interleukin-1, tumor nekrosis faktor- α , és interferon- γ szabadul fel, illetve az oxLDL is hozzájárul termelődésük indukciójához (143, 144, 145). Ugyanakkor ezen enzimeket szabályzó rendszer(ek) csökkent működése is kimutatható a plakkon belül, a TIMP-1 bizonyítottan alacsonyabb mennyiségben van jelen, mint a nem érintett területeken (146). Az enzimgátlás szabályzásának fontosságát mutatja, hogy kísérletes körülmények közt, a plakk TIMP-1 mennyiségének növelésével a ruptúra megelőzhető (147). A plakk ruptúrája leginkább az úgynevezett váll régióban történik, ahol nagy mennyiségű makrofág található (apoptotikus sejteket fagocitálnak), ezek enzimtermelésük révén teszik sérülékennyé ezt a területet. Az immunsejtek nem csak megtermelik ezeket az enzimeket, hanem reaktív oxigén szabadgyök termelésük révén az aktiválásukhoz is nagymértékben hozzájárulnak (148).

2. CÉLKITŰZÉSEK

In vivo a vérrög nem csak fibrinhálóból áll, hanem magába zár vérből származó sejteket, makromolekulákat is. Kialakulása helyén azonban, proteázok működése révén az érfalból is kerülhetnek bele fehérjék, proteoglikánok.

Célunk az volt, hogy *in vitro* rendszerben vizsgálva meghatározzuk az erek falában megtalálható néhány jellegzetes extracelluláris mátrix molekula hatását:

- a fibrinháló szerkezetére
- a fibrinháló lítikus és mechanikai stabilitására
- a fibrinfelületen végbemenő plazminogén aktivációra vonatkozóan.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3. 1. Anyagok

Plazminogén mentes humán fibrinogént a Calbiochemtől (LaJolla, CA, USA) szereztünk be. Ez a készítmény kis mennyiségű XIII-as faktort tartalmaz, amely az általunk alkalmazott kísérleti körülmények közt, redukáló SDS poliakrilamid gélen vizsgálva, az alvadás utáni 1 órán belül γ -monomerek jelenlétét már nem lehet kimutatni. A reológias méréseknél CaCl_2 mentes rendszert használtunk, ez esetben fél órán belül nem detektálhatók a γ -dimerek.

Az enzimaktivitás mérésekhez használt kromogén szubsztrátok (plazminhoz a Spectrozyme-PL, H-D norleucil-hexahidrotirozil-lizin-*p*-nitroanilid; trombinhoz a Spectrozyme-TH, H-D hexahidrotirozil-L-alanil-L-arginin-*p*-nitroanilid) az American Diagnostica (Pfungstadt, Németország) termékei. A tPA a Boehringer Ingelheim-től (Németország) származott. Vizsgálatainkhoz a szarvasmarha eredetű trombint a Serva-tól (Heidelberg, Németország) szereztük be, majd tovább tisztítottuk ioncserélő kromatográfiával, szulfoprpoil-Sephadex gyantán 2100 IU/mg specifikus aktivitásig. A dermatán-szulfát és a kondroitin-szulfát a Sigma-Aldrich Kft-től (Budapest) érkezett. A Collagen G-t a Biochrom AG-től (Berlin, Németország) vásároltuk. A rekombináns humán dekorin fehérjét a R&D Systems-től (Abingdon, Anglia) szereztük be. A vérplazma egészséges önkéntesektől származott, amit 10 mM végkoncentrációjú nátrium-citráttal elegyítettünk, aminek 10 perces, 2000 g $-s$ centrifugálás után a felső $\frac{3}{4}$ -ét használtuk fel méréseinkhez, 4 órán belül. A kecske anti-nyúl torna-peroxidáz konjugált antitest a Sigma-Aldrich Kft. (Budapest) terméke. A dekorin elleni antitest a Santa Cruz Biotechnology INC.-től származott (Santa Cruz, CA, USA). A PROTRAN nitrocellulóz membrán (Whatman, Schleicher&Schuell), a filter jelének rögzítéséhez szükséges AMERSHAM HYPERFILM ECL (High Performance Chemiluminescence Film), és a kemilumineszcenciás torna-peroxidáz működését kimutató ECL reagens a GE Healthcare-től (Uppsala, Sweden) származott. A film előhívásához kellő, előhívó (X-ray developer) és fixáló (Roentgen superfix) oldatok készítéséhez szükséges anyagok TETENAL termékek. A FuGENE HD transzfekciós reagens a Roche (Budapest), a sejtenyésztéshez szükséges RPMI-1640, DMEM:F12, borjú vérszérum

(FBS) és antibiotikum a Sigma Aldrich Kft. (Budapest), a műanyag áruk az Orange Scientific (Belgium) termékei voltak. A sejtek líziséhez szükséges CytoBuster reagens a Merck Kft-től (Budapest) érkezett.

3. 2. Módszerek

3. 2. 1. MMP-k előállítása

MMP-8 at expresszáló sejt vonal előállítása, kezelése

A rekombináns MMP-8 cDNS a pT7CMV expressziós vektor multiklónozó hely NcoI és EcoRI helyére volt ligálva. A ligálás eredményeképpen az MMP-8 első 65 aminosava hiányzott, viszont N-terminálisán 6 darab hisztidint (HIS-tag) tartalmazó szekvenciával fuzionáltattuk. A plazmid kanamicin és G418 antibiotikum rezisztencia géneket hordozott.

A rekombináns fehérjék előállításához általánosan használt HEK-293 sejt vonalat a gyártó utasításai szerint transzfektáltuk (80 - 90 % sejtbenövés, szérumentes sejtmedium, 2 µg MMP - 8 plazmid DNS, 3 – 8 µl transzfekciós reagens). 1 nap után a tápfolyadékot DMEM-F12, + 1 % antibiotikum (10,000 egység/ml penicillin G, 10 mg/ml streptomycin - szulfát és 25 µg/ml amphotericin B) lecseréltük 10 % vérsavót (FBS) és 1 mg/ml koncentrációjú G 418 szelektív antibiotikumot tartalmazóra. A sejteket 3 hétig szelektáltuk az antibiotikummal, közben szükség szerint hetente két – három alkalommal tripszineztek őket. A tripszinezés előtt a sejteket kétszer mostuk PBS-el, majd 0,05 % tripszin, 0,02 % EDTA oldattal a sejtek felúszásáig kezeltük azokat. A sejtszámolás után az élő sejtek ötödét növesztettük tovább. Az antibiotikum rezisztens (plazmidot hordozó) sejteket 10 % FBS-t is tartalmazó tápoldatban növesztettük a megfelelő sejtmennyiség eléréséig, ami általában 10 - 15 darab, 10 cm-es Petri-csésze kb. 80 %-os benövését jelentette. Ekkor a sejteket mostuk PBS-el, majd 2 – 3 napig savómentes tápoldatban növesztettük őket.

MMP-8 tisztítás transzfektált HEK-293 sejt-lizátumból

A savómentes tápoldat és kétszeri PBS-es mosás után a sejteket a 10 darab 10 cm átmérőjű Petri csészéről sejt-kaparó segítségével összegyűjtöttük, majd Petri-csészénként 1,5 ml CytoBuster sejt-lizáló pufferrel lizáltuk 4 °C-on, melyet 1 mM benzamidin, 20 µg/ml aprotinin, 1 mM Pefabloc, 20 µg/ml leupeptin proteáz gátlókkal egészítettünk ki. A lizátumot 10 percig fugáltuk 4 °C-on, 14.000 g sebességgel, Beckman centrifuga JA-20-as rotorban. A tisztításhoz 500 µl HIS – Select gyantát (Sigma Aldrich Kft, Budapest) 5 x 500 µl desztillált vízzel mostunk, majd 2,5 ml mosó pufferben (50 mM Na - foszfát, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7,5) szuszpendáltuk, amit 5 perces 5000 g-s centrifugálás követett. A mosott, ekvibrált gyantát összekevertük a 15 ml sejt-lizátummal, majd szobahőn kevertettük 30 percig. Centrifugálás után a 3 x 1 ml mosó pufferes mosás (mindegyik lépés után centrifugálás az előzőek szerint) után 3 x 500 µl elúciós pufferrel (50 mM Na - foszfát, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,5) mostuk le a kikötődött fehérjét. Mindegyik elúciós lépést 10 perces inkubáció majd centrifugálás követte. Mindegyik lépés után 20 µl mintát vettünk, amit 5 µl 5x töménységű mintapufferrel keverve vizsgáltunk 12,5 %-os SDS poliakrikamid gélen futtatva, majd immunblottal.

MMP-9-et expresszáló sejtvonalak előállítás

A rekombináns MMP-9 cDNS-t a pcDNA3.1/Zeo expressziós vektor multiklónozó hely EcoRI és XhoI helyére ligáltuk. A plazmid ampicillin és zeocin antibiotikum rezisztencia géneket hordozott. A HEK-293 sejtek transzfekciója, szelektálása, növesztése, fehérjetermelése az MMP-8-nál leírtakhoz hasonlóan történt azzal a kivétellel, hogy az MMP-9-el transzfektált sejtek esetében 20 µg/ml bleocinnal végeztük az antibiotikum szelekciót. Különbség volt még, hogy a megtermelt fehérjét a sejtek a tápoldatba expresszálták.

U - 937 monocita sejtvonal stimuláció hatására képes megtermelni az MMP-9-et, a transzfektált HEK - 293 sejtek mellett ezzel a sejtvonallal is dolgoztunk. A szuszpenziós sejt-kultúrát RPMI-1640, 10 % FBS, 1% antibiotikumot tartalmazó tápoldatban növesztettük a 2×10^6 sejt/ml sejtszám eléréséig, 6 – 8 darab, 175 cm²-es

flaskában, összesen 500 ml végtérfogatban. Indukció előtt a sejteket fugáltuk szobahőmérsékleten, 1200 g-vel 10 percig, majd mostuk PBS-el. A stimulálást 2 -3 napig vérsavómentes RPMI-1640 tápoldatban végeztük, mely 0.2 % laktalbumin hidrolizátumot és 50 ng/ml PMA-t (phorbol 12-mirisztát 13-acetát) tartalmazott. Indukció után a sejtek tápadatait összegyűjtöttük.

MMP-9 tisztítása

Az összegyűjtött sejtfeülúszókat (általában 500 ml) dializáló hüvelybe csomagoltuk, majd szilárd polietilén-glikollal töményítettük 20-30 ml-es térfogatra. Ezt dializáltuk egész éjszakán keresztül TNC pufferrel szemben (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0,02 % NaN₃, 0,05 % Brij-35, pH 7,5). 50 ml zselatin – Sepharose gyantát ekvibráltunk 500 ml TNC pufferrel, majd oszlopban összekombináltuk a dializált sejtfeülúszóval. A nem specifikusan kötődő fehérjéket 5 x 50 ml TNC pufferrel mostuk le, majd TNC pufferben oldott 5 %-os DMSO (dimetil-szulfoxid) 5 ml-es térfogataival eluáltuk az oszlopról a specifikusan kikötődött fehérjéket. Az 5 ml-es frakciókból vett 20 µl-es mintákat zselatin-zimográfiával vizsgáltuk (a poliakrilamid gélbe annak polimerizációja során 0,12 tömeg/térfogat % zselatint inkorporáltunk). A gélelektroforézis után a gélt 3 x 15 percig mostuk 2,5 %-os Triton-X-100-al, majd 2 x 5 percig 50 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 20 mM NaCl pH 7,5-ös pufferrel. Ezt két napos, 37 °C-os inkubáció követte ugyanebben a pufferben, amit a gél Coomassie kék festése követett.

3. 2. 2. Aorta dekorin tisztítása

Frissen vágott borjú aorta darabokat -80 °C-on fagyasztottuk és felhasználásig ezen a hőmérsékleten tároltuk 2-metilbutánban. Felolvasztás után az anyagokat körülbelül 1 mm³-es darabokra vágtuk, majd homogenizáltuk 4 °C-on, 4 M guanidin-hidroklorid, 50 mM nátrium-acetát 5,6-os pH-jú pufferben, ami 5 mM benzamidin, 100 mM ε-aminokapronsavat, 10 mM etiléndiamin-tetraecetsavat (EDTA) és 1 mM fenilmetilszulfonil-fluorid (PMSF) proteáz gátlókat is tartalmazott. Ebből az extrakciós pufferből 10 ml-t használtunk 1 gramm szövetre (nedves súlyra számítva).

Homogenizálás és egész éjszakán keresztüli extrakció után a homogenizátumot centrifugáltuk 4 °C-on 10000 g-vel, 1 órán keresztül. A felülúszót egész éjszakán át dializáltuk 4 °C-on, 6,0 pH-jú, 50 mM nátrium-acetát, 8 M urea, 200 mM NaCl, 0,1 % Triton-X-100 pufferrel szemben (D puffer). A dializált felülúszót D pufferrel kiegyensúlyozott Q-Sepharose gyantán adszorbeáltattuk 2 órán keresztül. Ezt a gyantát oszlopba töltöttük, mostuk 5 térfogat D pufferrel, majd lépcsőzetes elúciót hajtottunk végre 0,5-1,2 M NaCl koncentráció közt (0,1 M lépésgradiens, a puffer többi komponense a D pufferrel megegyező volt). A frakciókban lévő proteoglikánokat poliakrilamid gélelektroforézis után alcian kék festéssel tettük láthatóvá. A proteoglikán tartalmú frakciókat összegyűjtöttük, és egész éjszakán keresztül dializáltuk 4 °C-on, pH 6,0-s nátrium-acetát pufferben, amely 7 M ureát, 100 mM NaCl-t tartalmazott (D2 puffer). Dietilaminoetil-Sepharose gyantát ekilibráltunk 10 oszloptérfogatnyi D2 pufferrel, és kombináltunk össze a D2 pufferrel dializált frakciókkal. Öt oszloptérfogatnyi D2 pufferes mosás után lépcsőzetes elúciót hajtottunk végre 0,3 – 1,2 M NaCl koncentráció közt (az elúciós puffer többi komponense a D2 pufferrel megegyező volt, az egyes lépcsők közt 0,1 M volt a sókoncentrációbeli eltérés). A frakciókat SDS-poliakrilamid gélelektroforézis után alcian kékkel festettük meg, majd a proteoglikánokat tartalmazókat összegyűjtöttük és dializáltuk 6,0-s pH-jú 50 mM nátrium-acetát, 1,5 M ammónium-szulfát pufferrel szemben (D3 puffer), egész éjszakán keresztül, 4 °C-on. Octyl-Sepharose gyantát tartalmazó oszlopot mostunk 10 oszloptérfogatnyi D3 pufferrel, majd felvittük a dializált mintát. Öt oszloptérfogatnyi D3 pufferrel történő mosás után eluáltuk az oszlopot 1,5 – 0 M csökkenő ammónium-szulfát grádienssel. A frakciókat SDS-PAGE után alcian kékkel és dekorin elleni antitesttel vizsgáltuk. A dekorin tartalmú frakciókat 7,4-es pH-ú 10 mM HEPES, 150 mM NaCl pufferrel szemben dializáltuk és felhasználásig –20 °C-on tároltuk. A dekorint tömegspektrometriával is azonosítottuk, LCQ-Fleet Ion Trap tömegspektrométerrel (Thermo Scientific, Karlsruhe, Németország).

3. 2. 3. Alcian kék festés

Az alcian kék festés speciálisan a savas karakterű poliszacharidok (mukopoliszacharidok, szulfatált glükózaminoglikánok), így többek között a dermatán

vagy kondroitin-szulfát láncot hordozó dekorin kimutatására alkalmas. A poliakrilamid gélt futtatás után 1 órán keresztül fixáltuk 2 x 50 ml 30 %-os metanol, 10 %-os ecetsav keverékében. A metanol kimosására 2 x 30 percig 7 %-os ecetsavoldatot használtunk. A festés 30 percig történt 0,5 % alcian kékkel, melyet 7 %-os ecetsavban oldottunk fel. A gél differenciálása 7 %-os ecetsavban történt.

3. 2. 4. Kondroitináz ABC emésztés

A vizsgálandó minta 10 µl-éhez 40 µl 96 %-os etil-alkoholt adtunk, majd vortexelés után 30 percre -80 °C-ra tettük. Felolvasztás után 12.000 g-vel 4 °C-on, 15 percig centrifugáltuk. A csapadékot a kondroitináz ABC enzim reakciópufferében oldottuk vissza: 50 µL 50 mM Tris-HCl, 60 mM nátrium-acetát, pH 8,0, mely elegy 0,01 egység enzimet tartalmazott. A glikozaminoglikán láncok emésztése egész éjszakán keresztül történt, 37 °C-on. Az emésztést 12 %-os SDS-poliakrilamid gélen ellenőriztük, alcian kék és Coomassie kék festéssel.

3. 2. 5. Coomassie kék festés

Speciálisan a fehérjék kimutatására kifejlesztett módszer. A gélt futtatás után 1 órán keresztül 2 x 50 ml 50 %-os metanol és 10 %-os ecetsav keverékében fixáltuk. A festő oldat 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R-250-et tartalmazott 50 % metanolban és 10 % ecetsavban feloldva, ezzel inkubáltuk a fixált gélt 1 órán keresztül. A differenciáló oldatban (40 %-os metanol, 10 %-os ecetsav) addig áztattuk a gélt, míg a fehérjecsíkok láthatóvá nem váltak.

3. 2. 6. Dekorin kimutatása immunblottal

A vizsgált minta 40 µl-éhez kondroitináz ABC emésztés után hozzáadtunk 500 µl 96 %-os etil-alkoholt, majd fél órára – 80 °C-ra helyeztük. Felolvasztás után 12.000-g-vel 4 °C-on, 15 percig centrifugáltuk. A csapadékot 40 µl 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1mM CaCl₂ 7,5-ös pH-jú pufferben oldottuk vissza, melyhez 1 µl 100 µg/ml koncentrációjú mátrix-metalloproteáz 3-at adtunk. az emésztés 37 °C-on, egész éjszakán

keresztül történt. Az emésztett mintát mintakezelő pufferrel (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 % SDS, pH 8,2) kevertük össze 4:1 arányban, majd 5 percig 95 °C-on inkubáltuk. A mintát 12 %-os sűrűségű SDS-poliakrilamid gélen futtattuk, 125 mM Tris, 1 M glicin, 0,5 % SDS-t tartalmazó futtató pufferben. A gélt ezután nitrocellulóz filterre blottoltuk át (25 mM Tris, 192 mM Glicin, 20 % metanol pufferben). A filtert egész éjszakán keresztül inkubáltuk a nem specifikus kötőhelyek blokkolása miatt 3 %-os borjú szérum albumint (BSA) tartalmazó foszfát pufferben (PBS, 100 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7,4). A filtert mostuk 3 x 10 percig PBS-el a fölösleges BSA kimosása végett, majd 10 ml 3 % BSA-PBS 0,05 % Tween-20-ban oldott 1 µg/ml koncentrációjú nyúl anti-dekorin antitesttel inkubáltuk 4 °C-on, 1 órán keresztül. A filtert mostuk 2 x 1 percig 10 ml PBS-el, majd 4 x 10 percig 10 - 10 ml PBS-el. A filtert ezután 10 ml 3 % BSA-PBS 0,05 % Tween-20-ban 1:10.000 hígított kecske anti-nyúl torna-peroxidáz konjugált antitesttel inkubáltuk 1 órát 4 °C-on, majd a fentiek szerint mostuk. 6 ml erősítő kemilumineszcencia oldattal (A és B komponens, hidrogén-proxid tartalmú) 1 percig inkubáltuk a filtert, majd a filmen a peroxidáz okozta jelet sötétszobában fixáló és hívó oldatok segítségével tettük láthatóvá.

3. 2. 7. Ezüst festés

A mátrix-metalloproteáz-8-al emésztett kollagén fragmentumokat GE Amersham Biosciences-től származó vásárolt 12,5 %-os SDS-poliakrilamid géleken futtattuk, majd ezüst festéssel tettük láthatóvá. A gélt 10 ml 40 % metanol és 13,5 % metanol elegyében fixáltuk, 25 percig. 3 x 5 perces desztillált vizes mosás után 0,02 % Na₂S₂O₃ redukáló oldatban áztattuk 5 percig, majd 2 x 20 másodpercig mostuk desztillált vízben. 20 percig inkubáltuk 0,1 %-os AgNO₃ oldatban, majd desztillált vízzel mostuk 20 másodpercig. A 20 ml színekfejlesztő oldattal (0,0008 % redukáló oldat, 0,0005 % formaldehid, 0,03 % Na₂CO₃) addig mostuk, míg a fehérjecsíkok megjelentek. A gélt 10 % etanol, 5 % glicerin oldatban szárítottuk.

3. 2. 8. Kollagén fragmentumok előállítása

1 mg/ml koncentrációjú rekombináns humán MMP-8-at 50 mM-os, 7,5-ös pH-jú HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ pufferben aktiváltunk 1 mM végkoncentrációjú APMA-val (aminofenil-higany-acetát) 37 °C-on, 1 órán keresztül. Az aktivált enzimmel 1 mg kollagén G-t (90:10%-os keveréke az I-es és III-as kollagéneknek) emésztettünk 8 órán keresztül, 37 °C-on, 1 ml térfogatban, a fenti pufferben. A folyamatot 8-as pH-jú, 30 µl 50 mM HEPES, 45 mM EGTA oldatával állítottuk le. Az emésztést SDS – gélelektroforézissel ellenőriztük. Az ezüst-festett gélen legnagyobb tömegben 20-60 kDa méretű fehérjérszek voltak láthatók.

3. 2. 9. Turbidimetriás mérések

96 zsebes mikrotiter lemezek mérőhelyeiben 80 µl 6 µM fibrinogént 7,4-es pH-jú, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂-t tartalmazó pufferben, 50 µg/ml kollagén fragmentum / 50 nM dekorin fehérje / 50 nM aorta dekorin / 50 µg/ml dermatán-szulfát / 50 µg/ml kondroitin szulfát – al keverve inkubáltunk 10 µl 200 nM trombin és 10 µl 60 nM plazmin jelenlétében. Az alvadék képződését és szétesését a fényabszorpció 340 nm-en, 37 °C-on történő folyamatos mérésével követtük, Zenyth 200rt spektrofotométerben. Az aladási illetve a lízisidőt ($t_{1/2}$) a maximális turbiditás értékek felének elérésének pontjaiként definiáltuk (külön-külön a görbék felszálló illetve leszálló ágán). Néhány esetben az 50 ng/ml tPA tartalmú vérplazmát 15 nM végkoncentrációjú trombinnal, illetve 12,5 mM CaCl₂ jelenlétében alvasztottuk.

3. 2. 10. Scanning elektronmikroszkópos vizsgálatok

Fibrin alvadékokat 50 µl térfogatban hoztunk létre (vizsgált anyagoként 2 darabot), melyekben 4,8 µM fibrinogén volt 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ 7,4-es pH-jú pufferben. Az aladást 20 nM trombinnal indítottuk és 37 °C-on, 1 órán keresztül végeztük. Az alvasztás előtt a fibrinogénhez a turbidimetriás részben leírt érfalkomponens koncentrációkat kevertük. Az Eppendorf csöveket az alvadékok kitapadásának megakadályozására 20 %-os Triton-X-100-al kezeltük elő, majd

desztillált vízzel mostuk. Az alvadék kialakulása után háromszor mostuk azokat 0,5 % Triton-X-100 oldattal, majd 100 mM 7,2-es pH-jú nátrium-kakodilát pufferbe helyeztük 1 órára. Ezután 1 órás, 1%-os glutáraldehidben történő fixálás után az alvadékokat 5 - 5 percre 20 % - 50 % - 70 % - 85 % - 96 %-os alkohol oldatokba, 1:1 arányú etanol : acetona, majd végül acetona helyeztük. A szárítási folyamatot E3000 Critical Point Drying készülékben fejeztük be (Quorum Technologies, Newhaven, UK). A mintákat tapadó szénkorongokra rögzítve, aranybevonattal fedtük be (SC7620 Sputter Coater, Quorum Technologies). A felvételek EVO 40 pásztázó elektronmikroszkóp segítségével készültek (Carl Zeiss, Oberkochen, Németország). A felvételeken lévő fibrinszálátmérők méretének meghatározásához a Matlab 7.14.0.739 (R2012a) program 8-as verziójú Image Processing Toolbox-át használtuk (The Mathworks, Natick, MA, USA).

3. 2. 11. Konfokális mikroszkópia

10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ 7,4-es pH-jú pufferben kevertünk össze 6 µM fibrinogént (melynek 2%-a Alexa Fluor⁵⁴⁶ konjugált volt), 1,5 µM plazminogént és a vizsgált anyagokat. Az alvadást 16 nM trombinnal indítottuk és 30 percig végeztük szobahőmérsékleten steril IBIDI VI 0,4 µ-os lemezeken. Ezt követően 4 µg/ml koncentrációjú tPA-YFP-t rétegeztünk az alvadék tetejére, és a két fluoreszcensen jelölt fehérje fluoreszcenciáját detektáltuk LSM710 konfokális lézer scanning mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Németország). A tPA-YFP excitációs hullámhossza 488 nm, emissziós hullámhossza 525 nm, az Alexa jelölt fibrinogén excitációs hullámhossza 543 nm, emissziós hullámhossza 575 nm volt. Plan-NexofluarX10/0.5-ös objektívvel, azonos lézer intenzitású és expozíciós körülmények közt a vizsgáló kamra felszínétől számítva 50 µM-es távolságból készítettünk egymás utáni felvételeket a fibrin felszínéről.

3. 2. 12. Plazminogén aktivációs teszt

96 zsebes mikrotiter lemez mérőhelyeiben 80µl térfogatban 3,3 µM fibrinogént, 75 nM plazminogént és a vizsgált anyagokat tartalmazó keveréket alvasztottuk 25 nM

trombinnal 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1,5 mM CaCl₂ pH 7,4-es pufferben, 37 °C-on. 45 perc után 60 µl 14 nM tPA-t és 0,6 mM Spectrozyme-PL-t tartalmazó elegy került az alvadék felszínére 10 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 7,4 pufferben. A képződő plazmin p-nitroanilint hasít ki a szintetikus szubsztrátból, melynek a növekvő abszorbanciája (a képződő p-nitroanilin mennyiségének növekedése) 405 nm hullámhosszon spektrofotométerben (Zenyth 200rt, Anthos Labtec Instruments GmbH, Salzburg, Ausztria) követhető. A mért értékeket az idő négyzetének függvényében ábrázolva egy lineáris összefüggést kapunk a $\Delta A_{405} = 0.5\epsilon k_1 k_{cat} [tPA] t^2$ egyenletnek megfelelően, ahol ϵ a p-nitroanilin extinkciós koefficiense (12,6 /mM x cm), k_1 pedig a plazmin Spectrozyme-PL-re vonatkoztatott átviteli száma (350/min), k_{cat} a plazminogén aktiváció katalitikus állandója, [tPA] pedig a tPA koncentrációját jelenti a fibrin felszíni rétegében (149, 150, 151). A $V_{app} = k_{cat} [tPA]$ összefüggés a plazminogén látszólagos maximális aktivációs sebességét írja le a fibrin felszíni rétegében, amit lineáris regresszióval határoztunk meg ezen egyenlet segítségével, a Matlab 2012a Curve Fitting Toolbox 3.2.1-el.

3. 2. 13. Reológiai mérések

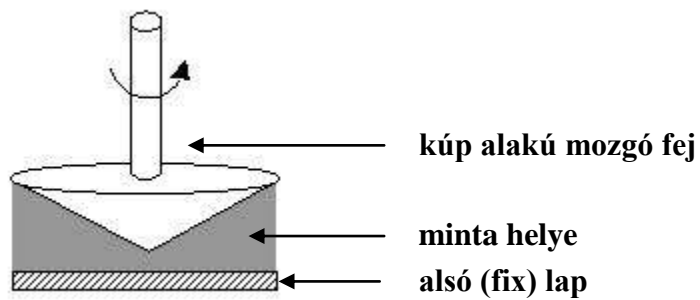
A reológia az anyag folyási és deformációs tulajdonságait vizsgálja. Méréseink és az eredmények háttérének könnyebb megértéséhez itt definiálnék néhány fogalmat.

Feszültség: külső erő hatására az anyagban fellépő ellenerő, melyet mindig felületegységre vonatkozik. Mértékegysége a Pascal (Pa, N/m²). Amennyiben az anyagra ható erő iránya a felszínnel párhuzamos, *nyíró feszültségről* (τ) beszélünk. A *nyírási (deformáció) gradiens* (γ) a test alakváltozását írja le a nyíróerő hatására ($\gamma = dx/dy$, ahol dx és dy az anyag két, térbeli dimenziójának változása, lényegében az alakváltozás leírására alkalmas paraméter). Leírására gyakran használják a tangens $\gamma - t$ is, hiszen $\tan \gamma \approx \gamma$. *Ideálisan rugalmas (elasztikus) az anyag*, ha a rá ható erő megszűnése után eredeti alakjába tér vissza (egyszerű rugóként képzelhető el). *Viszkózitás:* belső ellenállás a külső feszültséggel szemben. Többféle mértékegysége létezik, kísérleteink kapcsán a *dinamikai viszkózitás* (η) mértékegysége a [Pa*s]. A *viszkózus anyag* állandó feszültség mellett a feszültséggel arányos sebességgel megfolyik (irreverzibilis alakváltozást szenved).

A fibrinháló egy viszkoelasztikus polimer, mely – nevéből adódóan – viszkózus és elasztikus tulajdonságokkal is rendelkezik. Az ilyen természetű anyagok a rájuk ható deformációs feszültségre nem azonnal reagálnak, hanem fáziskéséssel, amely fáziseltolódási szöggént (δ) megadható. A *fáziseltolódási szög* a deformáció elasztikus – viszkózus tulajdonságairól ad információt. Az ideális elasztikus testek fáziseltolódása 0° , az ideális viszkózus anyagokra a fáziseltolódás 90° . A viszkoelasztikus rendszerek esetében a fáziseltolódás $0 - 90^\circ$ közötti. *Modulus (G)*: szilárd anyagok deformáció elleni ellenállásának kifejezője (feszültség / deformáció). G^* (komplex modulus): az anyagnak a deformáló erővel szembeni összes ellenállása: $|G^*| = \sqrt{G'^2 + G''^2}$. G' (*tárolási modulus*): a deformációt létrehozó feszültség azon része, melyet a deformált anyag tárol és a feszültség megszűnésével a deformáció megszüntetéséhez felhasznál. G'' (*veszteségi modulus*): a deformációs feszültség azon része, mely az anyag számára a deformáció során hő formájában elvész (94, 152, 153).

Oszcillációs reométer segítségével vizsgáltuk a különböző érfalkomponensekkel módosított szerkezetű fibrinhálókat. Az általunk használt reométer mérőcelláját az 1. ábra mutatja.

10 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 7,4-es pufferbe kevert $7,4 \mu\text{M}$ koncentrációjú fibrinogént és a vizsgált mátrixkomponenseket tartalmazó elegyhez 10 nM trombint adtunk. Ebből a keverékből $410 \mu\text{l}$ -t helyeztünk az oszcillációs reométer (HAAKE RheoStress I oszcillációs reométer, Thermo Scientific) 37°C -ra előmelegített alsó lapjára (mérőrés). A kúp alakú mozgó fejet (2° -os szögű, 35 mm átmérőjű) a vizsgált minta felszínére állítva, a trombin hozzáadása utáni második perctől kezdve $0,015$ -ös nyírási gradienst (γ) alkalmazva végeztük a tárolási modulusz (G') és a veszteségi modulusz (G'') meghatározását 15 percig, 1 Hz-es (1 mérés/másodperc) frekvencián. A mérési értékeket HAAKE RheoWin 3.50.0012 szoftver segítségével rögzítettük. A fibringél folyáshatárának meghatározásához a nyírófeszültséget (τ) 150 másodpercen belül $0,01 \text{ Pa}$ -ról 500 Pa -ra növeltük, és a relatív deformáció mérésének felhasználásával határoztuk meg a viszkozitást. A kritikus nyírófeszültség τ_0 értékét a viszkozitás nullára történő extrapolációjával kaptuk meg, ez az érték jellemzi a gél – folyadék fázisátmenet (fibrinszálak elszakadásának) határát.



1. ábra

Reométer kúp – lap geometriájú mérőcellájának sémája. A felső forgó kúp a vizsgált mintát nyírófeszültség alá helyezi. A mintában így generált deformáció illetve feszültség a mozgó fejen keresztül mérhető.

3. 2. 14. Statisztikai elemzések

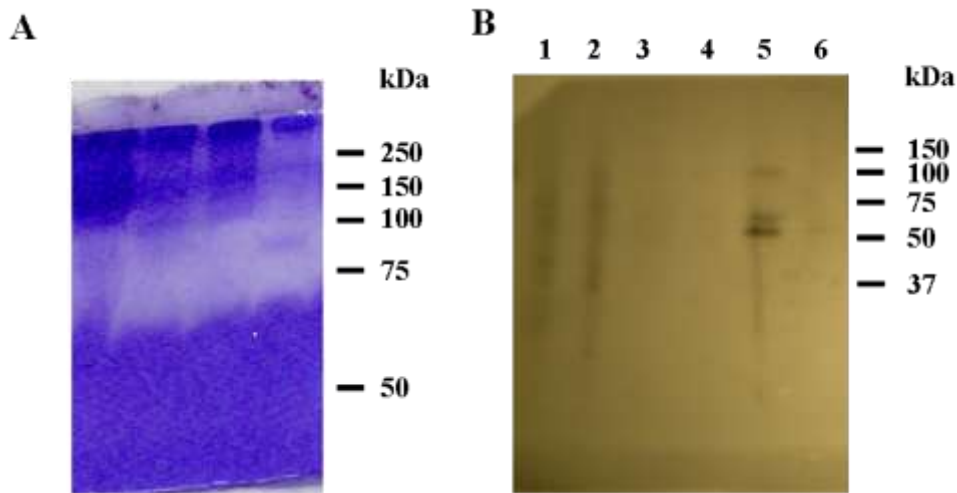
Elektronmikroszkópos felvételeken a fibrinszálak átmérőinek meghatározásához a Matlab Image Processing Toolbox-át használtuk. Egy képen 300 fibrinszál átmérőjét mértük le. Az elméleti eloszlást a mért adatok alapján Kuiper teszttel és Monte Carlo szimulációval adtuk meg. A többi kísérlet eredményét Kolmogorov-Smirnov teszttel elemeztük (Matlab R2012a Statistic Toolbox 8.0).

4. EREDMÉNYEK

4. 1. Az MMP-k előállítása

Az MMP-9 fehérje előállításával MMP-9-et hordozó plazmiddal transzfektált HEK-293-as, illetve PMA stimulációra MMP-9-et szekretáló U-937 monocita sejtvonalban is megpróbálkoztunk. Az MMP-9 zselatinkötő doménnel rendelkezik, így a zselatin-Sepharose gyanta specifikusan képes kikötni azt. Az elúciós frakciókat zselatin-zimográfiával vizsgáltuk, ami meglehetősen érzékeny módszer a zselatinázok kimutatására. A módszer lényege, hogy a poliakrilamid gélbe zselatint inkorporálunk, majd a mintát megfuttatva az SDS-t a gélből kimossuk Triton-X-100-al, mely lépés az enzim renaturációjára szolgál. A gél után 37 °C-on inkubáljuk, mely során az aktív enzim a zselatint elbontja. A gél Coomassie késsel festve az enzimaktivitás helyén a gél szintelen marad (2. ábra). Detektálni tudtuk az MMP-9 enzimaktivitását zimográfiával, ugyanakkor a termelt enzim alacsony mennyisége miatt kísérleteinkhez nem volt elegendő.

Az MMP-8-at HEK-293 sejtek lizátumából tisztítottuk. A fehérje N-terminálisán HIS-tag-el (6 darab egymás utáni hisztidin aminosav) volt fuzionáltatva, ami a tisztítását nagymértékben leegyszerűsítette, hiszen a tisztításához használt HIS-Select gyantán immobilizált Zn^{2+} ionhoz a HIS-tag specifikusan képes kötődni. Az enzim termelődését és tisztulását immunblottal sikerült kimutatnunk (2. ábra), ugyanakkor a Metodikák vonatkozó részében leírtak szerint, a vásárolt enzimmel ellentétben APMA-val az általunk enzimfehérje nem volt aktiválható (APMA-val történő kezelés után a kollagént nem emésztette).



2. ábra

A: U-937 sejtfelülűszóból tisztított MMP-9 enzimaktivitás detektálása zselatin – zimográfiával. A minták futtatása után az enzimet a gélben renaturáljuk, az aktív enzim a körülötte lévő zselatint elbontja, Coomassie kék festés után a terület így színtelen marad, míg ahol a zselatin nem bomlott le, kék lesz. Az ábra az egyik tisztítás során a zselatin-Sepharose gyantáról eluált 4 elúciós frakcióban lévő enzimaktivitást mutatja.

B: HEK-293 sejtültumból rekombináns MMP-8 tisztításának ellenőrzése és kimutatása immunblottal. Az MMP-8 a második elúciós frakciókban (5) az 50 kDa-os markeresík magasságában látható, ez megfelel a plazmidban megklónozott méretének. Magyarázat: 1.: sejtültum, 2.: gyantához nem kötődő frakció, 3.: mosó frakció, 4., 5., 6.: elúciós frakciók.

4. 2. Aorta dekorin tisztítása

A dekorin az érfalból nagy mennyiségben izolálható extracelluláris mátrixfehérje. A kaotropikus guanidin-hidrokloridot tartalmazó pufferben homogenizálva a szövetet, annak disszociációja után az enyhén savas (pH 5,6) közegben a Q-Sepharose gyantához főleg csak a GAG oldalláncot tartalmazó fehérjék kötődnek. A legnehezebb feladat a dekorin biglikántól való elválasztása, hiszen a fehérjerészük több mint 50 %-os homológiát mutat, és a GAG láncuk is szinte egyforma lehet (ugyan a biglikánnak két GAG oldallánca van, mérete ezáltal lényegesen nagyobb). Elválasztásuk leghatékonyabban hidrofób kromatográfiával lehetséges. Az

tömegspektrométerrel meghatározott szekvenciák alapján a mintában egyértelműen a dekorin azonosítható.

Az érfalkomponensek fibrinszerkezet módosító hatásának vizsgálatához olyan alvadékokat hoztunk létre, melyek külön – külön tartalmazták az egyes anyagokat.

Előzetes kísérleteinkben többféle koncentrációt használtunk az egyes anyagokra nézve. Ezek a kollagén fragmentumok esetében 5, 50, 100, 250 µg/ml, a dekorin fehérje és a glikozilált aorta dekorin esetében 2 és 10 µg/ml, a dermatán-szulfátnál és a kondroitin-szulfátnál pedig 2, 10, 50, 100 és 200 µg/ml-es (vég)koncentrációk voltak.

Mint az már a szakirodalomból jól ismert volt, a fibrinszálak átmérőjére a trombin koncentrációja (illetve a trombin/fibrinogén arány) jelentős hatással bír. Alacsony trombin koncentrációt alkalmazva vastag szálak jönnek létre, magas trombin koncentrációnál viszont vékonyak (155). Kétféle trombin koncentrációt vizsgáltunk előzetesen, a rendszerünkben vastag szálakat létrehozó 8 nM, és a vékonyabb fibrinszálakat létrehozó 20 nM-os koncentrációkat. Az érfalkomponensek hatásának tendenciája a fibrinszálak átmérőjére vonatkozóan mindkét trombin koncentráció esetében hasonló volt, nem fejtenek ki különböző irányú hatásokat a vastag és a vékony fibrinszálak keletkezése során, bár hatásuk a vékony szálak esetében jobban megnyilvánul. Ezért további vizsgálatainkban mindig olyan körülményeket teremtettünk, amelyek a vékony szálak kialakulását preferálták. A méréseink során ugyan különböző fibrinogén koncentrációkat használtunk, de az alvasztáshoz használt trombin mennyiségét mindig úgy választottuk meg, hogy az az adott rendszerben vékony fibrinszálak kialakulásához vezessen.

Mindegyik esetben azzal a legalacsonyabb mátrixkomponens koncentrációval dolgoztunk tovább, amely szignifikáns változást eredményezett a lízisidőben vagy a fibrinszálak átmérőjében. A kollagén fragmentumok, DS és CS esetében 50 µg/ml, a dekorinoknál 2 µg/ml (50 nM) mennyiségeket alkalmaztunk.

4. 3. Érfalkomponensek hatása a fibrinszerkezetre

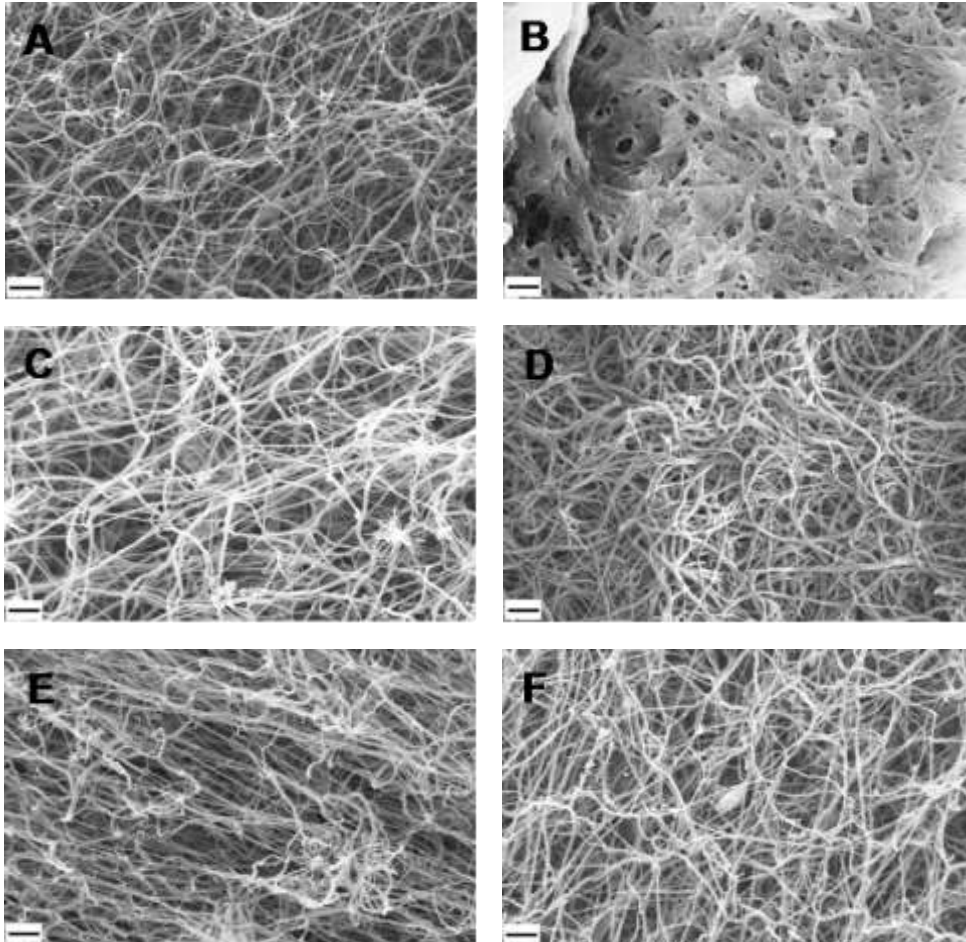
Az érfalkomponensek fibrinszerkezet módosító hatásának vizsgálatához scanning elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk a mesterségesen létrehozott fibrinalvadékokról (4. ábra), és morfometriásan elemeztük azokat (5. ábra). A legjelentősebb változás az aortából tisztított glikozilált dekorin esetében (4. B ábra) jelentkezett: a fibrinszálak átmérőjét lényegesen megnövelte a csak fibrint tartalmazó alvadékhoz képest (85 ± 40 nm-ről 187 ± 121 nm-re, 5. ábra A és B). A kollagén fragmentumok és a dekorin fehérje jelenléte szintén szignifikánsan emelte a fibrinszálak átmérőjét (98 ± 46 nm a kollagén, 102 ± 46 nm a dekorin fehérje esetében). Megjegyzendő, hogy amennyiben a kollagén fragmentumok koncentrációja a fibrinben $250 \mu\text{g/ml}$ volt, a fibrinszálak átlagos átmérője a csak fibrint tartalmazó kontroll szintjére, vagy az alá esett vissza (vastag szálak esetében a kontroll 132 ± 48.5 nm-ről 101 ± 86 nm-re, vékony szálak esetén $91,8 \pm 33,3$ nm-re csökken). Méréseink alapján megállapítható, hogy az összes vizsgált anyag hatása koncentrációfüggő, habár a koncentráció emelésével nem egyenes arányban változik az általuk létrehozott hatás. Csak a legmagasabb koncentrációban vizsgált kollagén fragmentumok esetében tapasztaltunk csökkenést a fibrinszálak átmérőjében, $5 - 100 \mu\text{g/ml}$ tartományban vizsgálva a szálátmérők folyamatos növekedését okozza.

A DS és CS által módosított alvadékok szálátmérője szignifikánsan nem változik a kontrollhoz képest (4. és 5. ábra E és F). A DS vagy CS GAG láncot hordozó aorta dekorin szerkezetmódosító hatása ez esetben nem magyarázható sem a GAG láncának, sem a core fehérjéjének a hatásával, hiszen a kétféle komponens együttesen sem hoz létre olyan mértékű fibrinszálátmérő növekedést, mint az aorta dekorin önmagában.

4. 4. A módosított alvadékok lítikus rezisztenciája

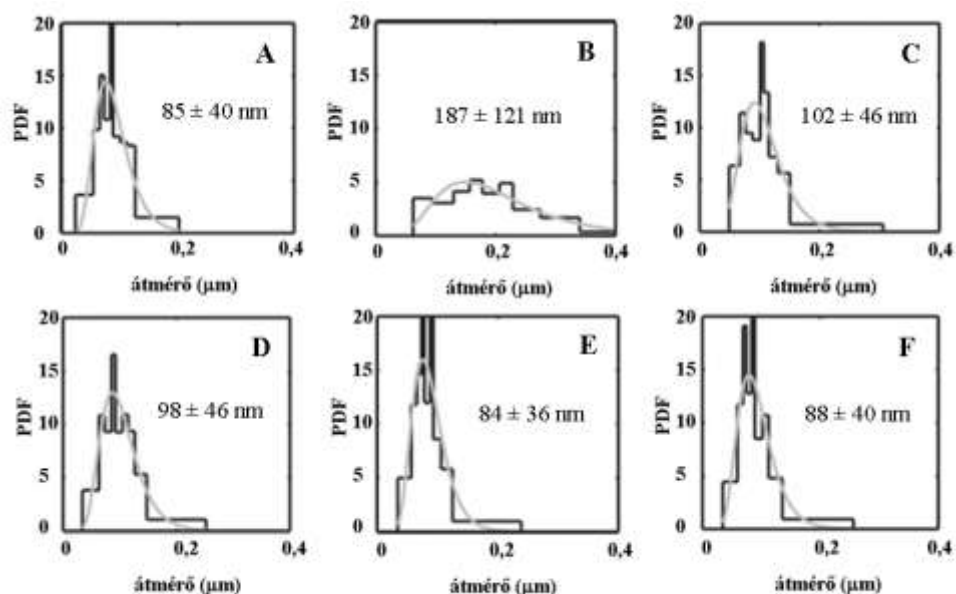
Az érfalkomponensek fibrinszerkezet módosító hatása az *in vitro* létrehozott alvadékok elektronmikroszkópos vizsgálata alapján tehát jelentős lehet. Továbbiakban az így megváltoztatott alvadékok rezisztenciáját vizsgáltuk a plazmin általi lebontással szemben. Ennek a modellezésére fibrinogénbe az előző részben ismertetett komponenseket: kollagén fragmentumokat, dekorin fehérjét, glikozilált dekorint,

dermatán-szulfátot és kondroitin szulfátot kevertünk külön-külön, ezt követően az alvadásban és az alvadék lízisében történő változásokat követtük. In vivo körülményekhez hasonlóan az alvadást és a lízist egy időben indítottuk, amit a fibrinogénhez egyidejűleg hozzáadott trombinnal és plazmával végeztünk. Ebben a



4. ábra

Fibrinháló szerkezetének változása érfalkomponensek jelenlétében. 4,8 μ M fibrinogént alvasztottunk 1 órán keresztül 20 nM trombinnal (A) 50 nM aorta dekorin (B), 50 nM dekorin fehérje (C), 50 μ g/ml kollagén fragmentum (D) és 50 μ g/ml kondroitin-szulfát (E) illetve 50 μ g/ml dermatán-szulfát (F) jelenlétében. A szkennelő elektronmikroszkópos felvételek glutáraldehydes fixálás, majd dehidratáció után készültek. Méretarány: 1 μ m.

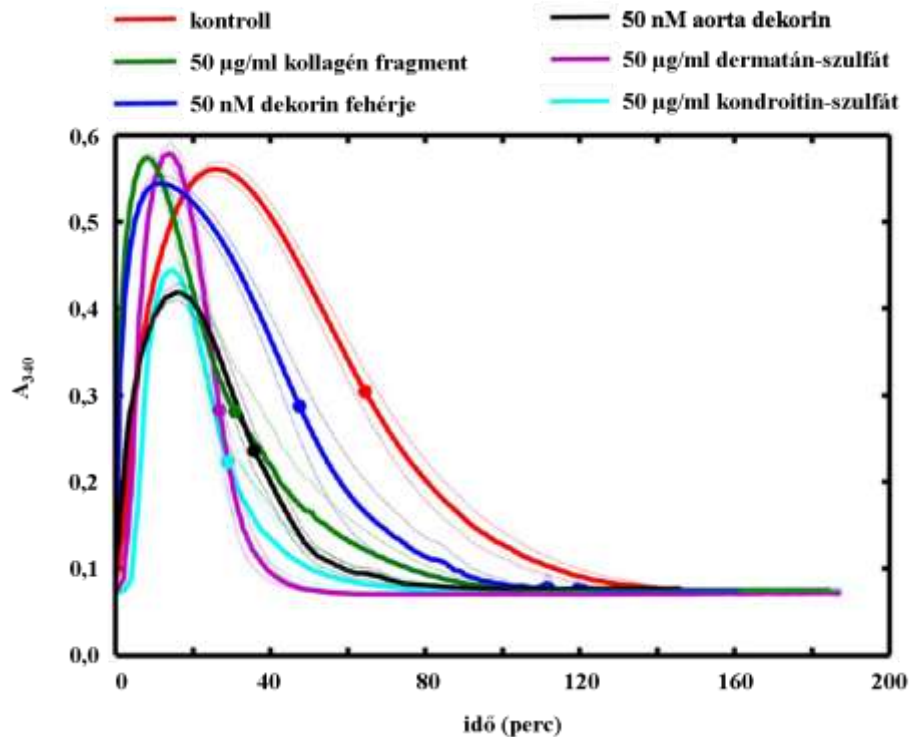


5. ábra

A szkennelő elektronmikroszkópos képek (4. ábra) morfológiai elemzése. Mindegyik felvételen 300 fibrinszálnak az átmérőjét mértük le. Az oszlopok a fibrinszálatmérték mért értékeit, a görbék az erre illesztett elméleti eloszlást ábrázolják a PDF (valószínűségi előfordulás) függvényében. A feltüntetett adatok az elméleti eloszlás alapján számolt medián \pm interkvartilis fibrinszálatmérték értékeket jelentik.

rendszerben a fibrinháló stabilitása a plazminra nézve vizsgálható (eltekintve a fibrinolízis első fázisától, a plazminogén aktivációjától). A vizsgált anyagok ugyan lokálisan nagy mennyiségben vannak jelen az érfalban, a fibrinbe épülve, annak mennyiségéhez képest sokkal alacsonyabb koncentrációban is már jelentős destabilizáló hatással bírnak, ami a plazmin okozta lényegesen gyorsabban lejátszódó lízisben nyilvánult meg (6. ábra, és 1. táblázat). Leginkább szembetűnő a változás a CS-al és DS-al módosított alvadékok esetében, melyekben a lízis kevesebb mint feleannyi idő alatt zajlott le. A szulfatált cukorlánc hatása egyértelmű abban az esetben is, amikor a módosító anyag dekorin fehérje, illetve az aorta dekorin, ugyanis a kettőt összehasonlítva utóbbi esetben jóval gyorsabb a fibrinháló lebomlása. A folyamat kezdetén az emelkedő turbiditás értékek a trombin működését jelzik, a fibrinogénből az $A\alpha$ és $B\beta$ fibrinopeptidok lehasadása révén megtörténik a protofibrillumok kialakulása,

majd laterális asszociációja, végül a fibrinháló kialakulása. A polimerizáció fázisa során az abszorbancia egyre növekszik addig, amíg az oldatból a fibrinogén nagy része



6. ábra

Fibrinogénbe kevert érfalkomponensek hatása az alvasztás és lízis folyamataira. A turbiditás változását 340 nm-en, folyamatosan rögzítettük. Az alvasztást 20 nM trombinnal indítottuk (görbék felszálló ága). A lízist a fibrinogénbe kevert 6 nM plazmin végezte (görbék leszálló ága). 3 független kísérlet 8 párhuzamos mérésének átlagait folyamatos vonallal, a görbék szórását (SD) pontozott vonallal jelöltük. A szimbólumok a maximális turbiditás értékek feléhez tartozó lízisidőket jelölik, értékeiket az 1. táblázat mutatja.

el nem fog, vagy amíg a plazmin működésének túlsúlya nem valósul meg. A görbe itt éri el maximumát. A görbék emelkedő fázisában is találunk különbségeket a csak fibrin tartalmazó kontrollhoz képest. Amennyiben a fibrinbe valamelyik fehérjerész tartalmazó érfalkomponenst kevertünk, rövidebb idő alatt történik meg a maximális abszorbancia értékek elérése, míg a szulfatált cukorpolimerek esetében vagy nem mutatható ki lényegi változás, vagy lassul ez a fázis (1. táblázat). Esetükben az alvadási folyamat kezdetén rövid fáziskésés is megfigyelhető (6. ábra). Az aorta dekorin és a

kondroitin-szulfát esetében a maximális abszorbancia (max A_{340}) értékek jóval alacsonyabbak mint az összes többi esetben, ami arra utalhat, hogy a fibrinszerkezetet hasonlóképpen változtatják meg. Feltehetően a polimerizációs folyamatnak teljesen végbe kell mennie ahhoz, hogy az elektronmikroszkóppal megfigyelt hatást lássuk CS esetében.

1. táblázat

A 6. és 9. ábrán látható, a jelzett mennyiségű érfalkomponensekkel módosított alvadékok alvadási és lízis felezési ideje. A táblázat értékei 3 független kísérlet 8 mérésének átlagát \pm szórását (SD) jelentik. (Kolmogorov – Smirnov teszt alapján a *-al jelölt értékek $p < 0.05$ szignifikancia szintet alkalmazva eltérnek a kontrolltól).

érfalkomponens	idő (perc \pm SD)			
	fibrin alvadás	fibrin lízis	fibrin max A_{340}	plazma lízis
kontroll	5.6 \pm 0.3	63.9 \pm 8.7	0.56 \pm 0,02	167.8 \pm 6.3
50 nM aorta dekorin	2.9 \pm 0.1*	34.9 \pm 4.4*	0.42 \pm 0.02*	95.9 \pm 10.0*
50 nM dekorin fehérje	1.1 \pm 0.1*	47.6 \pm 8.9*	0.54 \pm 0.02*	127.3 \pm 1.4*
50 μ g/ml kollagén fragment	0.9 \pm 0.1*	30.4 \pm 12.2*	0.57 \pm 0,01*	157.7 \pm 5.3*
50 μ g/ml dermatán-szulfát	5.4 \pm 0.1	25.8 \pm 3.1*	0.58 \pm 0,02*	NA
50 μ g/ml kondroitin-szulfát	7.1 \pm 0.3*	28.0 \pm 6.4*	0.45 \pm 0.03*	149.6 \pm 3.8*

A megfigyelt eltérések eredhetnek abból, hogy az érfalalkotók közvetlenül befolyásolják a trombin és a plazmin enzimaktivitását. Ennek eldöntésére ezen enzimek aktivitását vizsgáltuk fibrinmentes környezetben, szintetikus szubsztrátokon (Spectrozyme-TH a trombinhoz, Spectrozyme-PL a plazminhoz).

Ilyen körülmények közt a trombin K_m értéke 8.49 – 10.04 μ M tartományban mozog. Amennyiben a vizsgált érfalkomponensek is a rendszerben vannak, a vizsgált anyagtól függően ez az érték 7.96 – 11.35 μ M közt változik. A trombinra vonatkozó V_{max} érték, ami 0.24 – 0.32 μ M/s, a vizsgált anyagok jelenlétében 0.23– 0.31 μ M/s-ra változik.

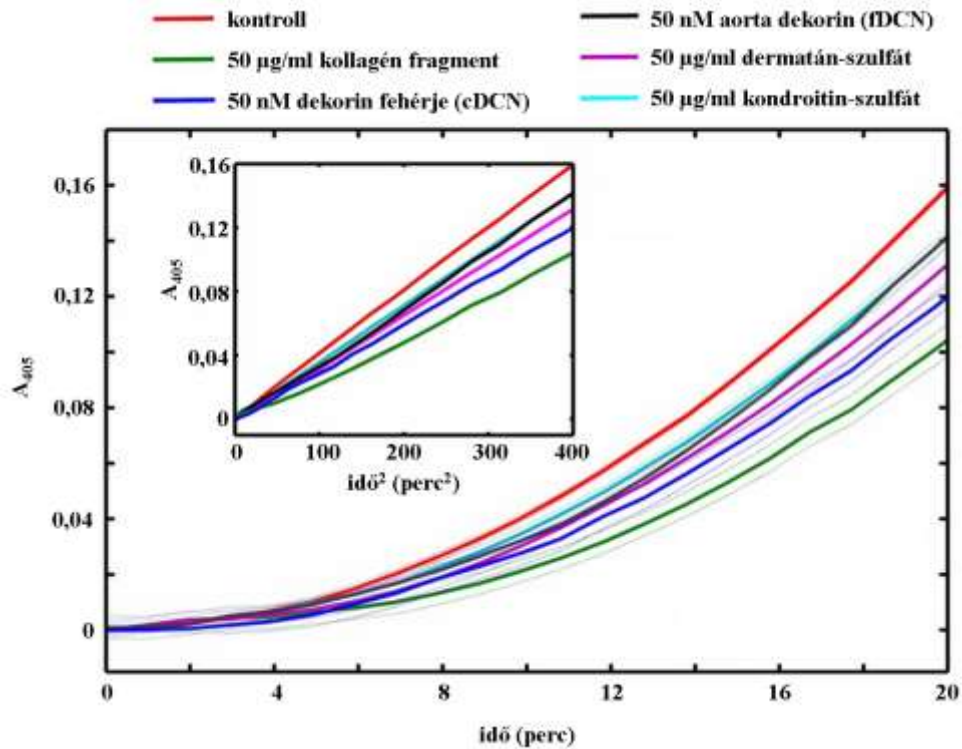
A plazmin esetében kontrollhoz viszonyítva (K_m : 21.61 \pm 2.78 μ M, illetve V_{max} : 0.44 \pm 0.02 μ M/s) a módosító anyagok jelenlétében 18.31 – 22.96 μ M K_m , és 0.40 –

0.44 $\mu\text{M/s}$ V_{max} értékek mérhetőek (sem a trombin, sem a plazmin esetében nem szignifikánsak az eltérések). Az általunk alkalmazott vizsgálati körülmények közt tehát egyik enzim amidolitikus aktivitása sem változik.

4. 5. Plazminogén aktivációjának vizsgálata

A tPA indukálta aktiváció esetében a fibrin a plazminogénnek kofaktora, és a képződő aktív plazminnak szubsztrátja is egyben. Egyik esetben sem mindegy, hogy milyen a fibrinháló szerkezete. A plazminogén aktivációját befolyásoló fibrinháló szerkezeti változásokat nehéz értelmezni annak ismeretében, hogy a plazmin működését is befolyásolja a folyamatosan módosuló szubsztrát. Érdekes tehát a plazminműködés (aktiváció és lízis) folyamatait külön-külön vizsgálni, hogy meghatározhassuk, melyikre milyen hatással vannak a vizsgált érfal mátrix molekulák.

A fibrinháló felszínére helyezett tPA hatására a fibrinbe kevert plazminogén aktiválódik. Ez a folyamat nyomon követhető akkor, ha a plazmin szintetikus szubsztrátját, a Spectrozyme-PL-t jelentős moláris feleslegben adjuk a rendszerbe. Ez a kis méretű peptid szubsztrát a fibrinnel kompetál a plazminhoz való kötődésért, megfelelő koncentrációban alkalmazva a fibrinháló emésztődését gátolni képes. A látszólagos plazminogén aktivációs sebesség (V_{app}) szignifikánsan csökken abban az esetben, amikor a vizsgált érmátrix alkotók is jelen vannak a fibrin polimerizációja során (7. ábra). Akár 30 %-os sebességcsökkenés is mérhető az aktivációs folyamatban (2. táblázat). A lassulás oka kétféle lehet: a plazmin katalitikus aktivitása (k_{cat}) csökken le, vagy a tPA fibrinbe történő penetrációja gátlódik (a fibrinháló felszíni rétegében a $[tPA]$ csökken), ugyanis $V_{app}=k_{cat}*[tPA]$. Fibrinfelszín nélküli plazminogén aktiváció során a vizsgált makromolekulák nem változtatják meg a plazminogén aktiváció sebességét, ezért annak változásának oka az általuk megváltoztatott fibrinfelszínben keresendő, amely befolyásolja a tPA és a plazminogén kötődését is.



7. ábra

Plazminogén aktiváció érfalkomponensekkel módosított, plazminogén tartalmú fibrin felszínen. Alvadás után a tPA és a szintetikus szubsztrát SpPL keverékét rétegeztük a rög tetejére, majd követtük a minták abszorbancia változását 405 nm-en. A görbéket 3 független kísérlet 8 párhuzamos mérése alapján átlagoltuk (folyamatos vonalak). Az egyes görbékhez tartozó szórások (SD) értékeit pontozott vonallal jelöltük. Belső ábra: a 405 nm-en mért értékeket az idő négyzetének függvényében ábrázolva egyeneseket kapunk, melyek meredeksége adja a plazminogén aktiváció sebességét. Ezeket az értékeket a 2. táblázatban tüntettük fel.

4. 6. tPA penetrációja a fibrinbe

Az általunk alkalmazott kísérleti körülmények közt szintetikus szubsztráttal vizsgálva az érfalkomponensek nem változtatják meg a plazminogén aktivációját fibrinmentes közegben. A fibrin felszínén követve a plazminogén aktiváció folyamatát viszont eltérő mértékű gátlások figyelhetők meg. Az aktiváció gátlásának mértéke a

vizsgált anyagokon különböző, ami csak az általuk eltérően módosított fibrin felszínekkkel magyarázható.

2. táblázat

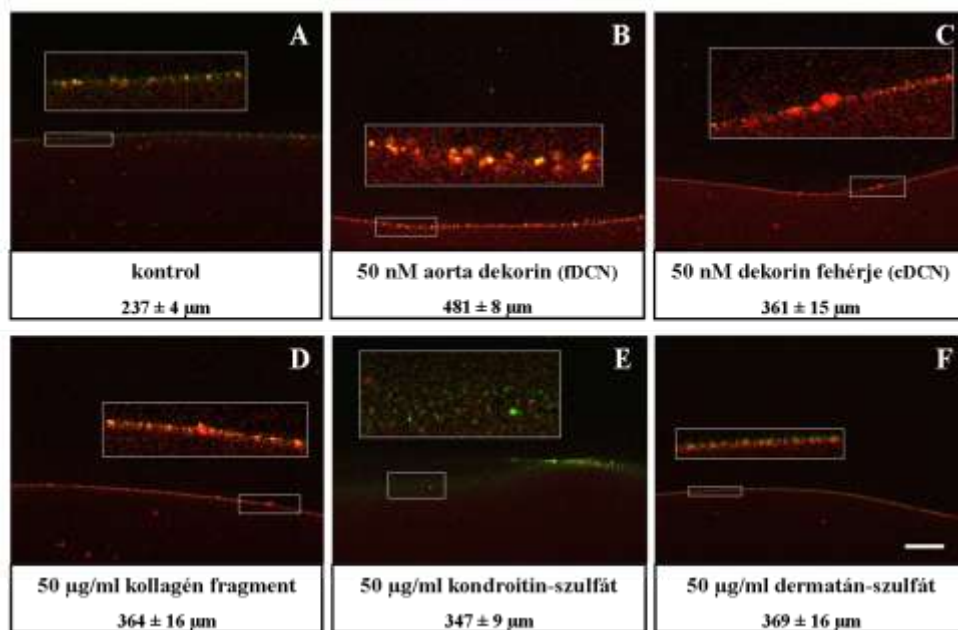
3 μM fibrint tartalmazó alvadékokra, melyekbe előzőleg 0.1 μM plazminogént, 50 nM dekorin fehérjét / aorta dekorint, 50 $\mu\text{g/ml}$ kollagén fragmentumot / DS-t / CS-t kevertünk bele, 16 nM tPA-t és 600 μM Spectrozyme-PL-t rétegeztünk, és a 6. ábra belső ábráján látható egyenesek meredeksége alapján meghatároztuk az egyes alvadékokra a plazminogén látszólagos aktivációs sebességét. A táblázatban feltüntetett értékek 3 független kísérlet legalább 8 mérésének átlagát és szórását (SD). A relatív aktivációs sebesség értékeit a táblázat első sora alapján számítottuk ki. A tPA réteg relatív mozgási sebességeit a 7. ábra értékei alapján határoztuk meg. A *-al jelölt értékek $p < 0.05$ szignifikancia szintet alkalmazva a kontrolltól szignifikánsan eltérnek.

	kollagén					
	kontroll	fDCN	cDCN	fragm.	DS	CS
plazminképződés látszólagos sebessége (nM/perc)	0.18 \pm 0.007	0.160 \pm 0.011*	0.139 \pm 0.008*	0.130 \pm 0.015*	0.150 \pm 0.015*	0.161 \pm 0.011*
plazminogén relatív aktivációs rátája	1	0.87	0.76	0.71	0.82	0.88
tPA front relatív migrációs sebessége	1	2.03	1.52	1.54	1.46	1.56

A megváltoztatott fibrin felszín befolyásolhatja - a plazminogén fibrinfelszíni aktivációján kívül - a tPA és a plazminogén kötődését a fibrin szálakhoz. Bármelyik esemény módosul, az hatással van a keletkező plazmin mennyiségére, ezáltal a lízis sebességére. A tPA-t olyan mesterséges fibrinrög felszínére helyezve, melyben plazminogén van eloszlva, (kívülről indított oldás) a tPA diffúziója a rögben nem lesz akadálytalan, eloszlása benne nem lesz egyenletes, hanem egy felszíni határrétegben dúsul fel. In vivo trombolízis esetében is a külsőleg adott trombolitikumok a vérrög felszínét képesek csak kezdetben elérni. Ebben a felszíni rétegben azonban a vérben lévő koncentrációjukhoz képest mennyiségük jelentősen megemelkedik.

Konfokális mikroszkóp segítségével, Yellow Fluorescent Proteinnel (YFP) jelölt tPA eloszlása és a lítikus front mozgása (amely a képződő plazmin működésének eredménye) detektálható a módosított fibrin felszíneken (8. ábra). Mindegyik vizsgált

módosító komponens esetében a YFP-tPA kezdetben egy vékony rétegbe tömörül a rögök felszínén. A lítikus front az idő előrehaladtával, a képződő plazmin működése révén elmozdul a rög belseje felé. Ezen front vándorlási sebessége vizsgálatainkban a plazmin által történő fibrin lízis sebességével korrelál, kevésbé függ a plazmin képződésének sebességétől. A kondroitin – szulfát esetében egy szélesebb, homogén tPA határrejteget figyeltünk meg a fibrin felszínén, a többi esetben a tPA a vékony fibrinfelszíni rétegben maradt, illetve a részlegesen degradált fibrin csomókhoz kolokalizálódott. A csomók a fehérjekomponensekkel kevert fibrinokban sokkal kifejezettebben jelentek meg, mint a CS, DS esetében. Legjelentősebb változás a fDCN-el módosított alvadék esetében nyilvánult meg. A tPA hasonló granuláris akkumulációja esetében vastag fibrin szálakon leírtak már gyorsabb lízist és ugyanakkor lassabb plazminogén aktivációt, ami a fibrin struktúrájának eltérő szerepére utal a fibrinolitikus folyamat mindkét fázisában.



8. ábra

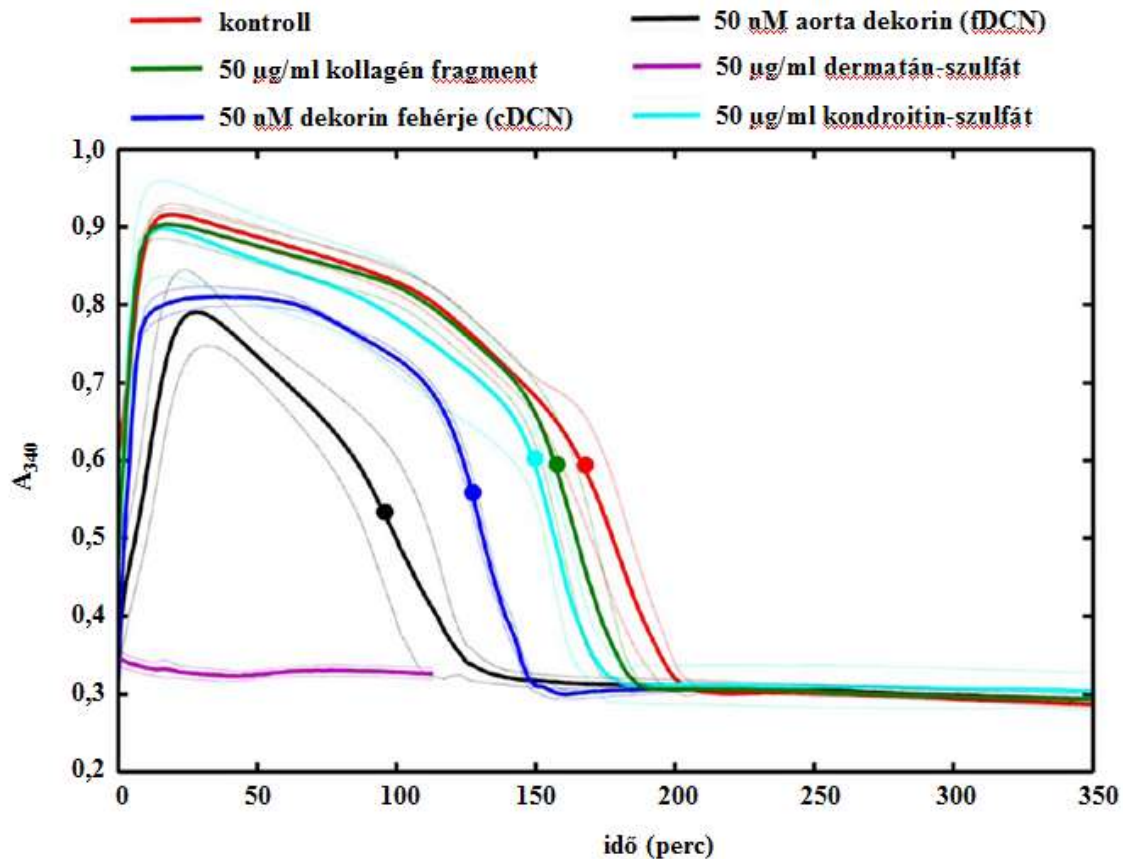
Érfalkomponensek hatása a felszíni, tPA indukálta fibrinolízisre. 6 μM fibrinogénbe (melyből 2% Alexa⁵⁴⁶ jelölt volt) 1,5 μM plazminogént és az ábrán feltüntetett mennyiségű érfalkomponenseket kevertünk, majd 16 nM trombinnal fél órán keresztül alvasztottuk. 4 μg/ml YFP-jelölt tPA-t rétegeztünk az alvadékok felszínére, majd a

képződő plazmin hatására a fibrinfelszín migrációját, illetve a tPA-val való kolokalizációját vizsgáltuk. A fibrinfelszín a 0. percben a képek felső szélénél helyezkedett el, a bemutatott felvételek a YFP jelölt tPA hozzáadása utáni 25. percben készültek. A tPA zöld, míg a fibrin vörös színű, kolokalizációjuk sárga. A felszíni réteg egy darabját 4-szeresére nagyítottuk (belső ábrák). A feltüntetett értékek a YFP-tPA réteg által az első 25 percben megtett átlagos távolságot \pm szórást (SD) jelentik, Kolmogorov-Smirnov teszt alapján mindegyik érték szignifikánsan eltér a csak fibrint tartalmazó kontrolltól $p < 0,05$ szignifikancia szinten vizsgálva. Méretarány = 100 μ M.

4. 7. Vérplazmát tartalmazó alvadékok vizsgálata

In vivo a trombus kialakulása és feloldódása összetett folyamat, kísérletesen teljesen reprodukálni nem lehetséges. Meg kell különböztetnünk a trombolízist a fibrinolízistől, utóbbi lényegében egy letisztult, zavaró tényezőktől mentesített rendszer, amelyben egy (vagy néhány) paramétert változtatva az adott kísérleti változót jellemezni lehet. In vivo a trombin és a plazmin(ogén) is egy komplexebb molekuláris környezetben kell hogy működjön a trombus kialakulásakor és lebomlásakor, nem is beszélve arról, hogy ezen aktív enzimek működése mennyire jól szabályozott folyamat. A trombusba többféle, a vérben jelen lévő / megjelenő molekula vagy sejt is bezáródhat, amik alapvetően befolyásolhatják annak szerkezetét, és ezáltal a lízis folyamatát.

Az érfal mátrix egyes alkotóinak hatását jellemeztük csak fibrint tartalmazó rendszerben, ugyanakkor érdemes vizsgálni hatásukat egy jóval komplexebb környezetben is, amely megközelíti az in vivo kialakuló fiziológias körülményeket. Amennyiben a kísérleteinkben használt puffert sejtmentes vérplazmára cseréljük, a lízis során a dermatán-szulfát hatása azonnal szembetűnő, hiszen esetében nem alakul ki fibrinháló (9. ábra). A többi érfalkomponens hatása hasonló a csak fibrines rendszerben tapasztaltakhoz: a lízis felgyorsul minden esetben, mint ahogy azt a plazmával indított lízis során láthattuk (1. táblázat). Ugyan a 6. és 9. ábra közvetlen összehasonlításra nem alkalmas, az azonban megfigyelhető, hogy a lízisidők vérplazma esetében hosszabbak.



9. ábra

Citrátos vérplazmából *in vitro* készített fibrinrögök lízise. A vérplazmába 50 ng/ml tPA-t és az ábrán feltüntetett koncentrációjú érfalkomponenseket kevertünk. Az alvasztás során megjelenő turbiditásváltozást 340 nm-en követtük. Az alvasztás 12,5 mM CaCl₂ és 15 nM végkoncentrációjú trombinnal történt. Az ábrán 3 független kísérlet egyenként 8 párhuzamos mérésének átlaga folyamatos vonalakkal, az ezekhez tartozó szórás értékek (SD) vékony pontozott vonallal jelöltek. A folyamatos vonalakon látható szimbólumok a lízis folyamán a 340 nm-en mért maximális turbiditás értékek felének eléréséhez szükséges időt jelentik (Kolmogorov-Smirnov teszt, a kontrollhoz képest mindegyik görbére $p < 0.05$).

4. 8. A fibrinháló mechanikai stabilitása

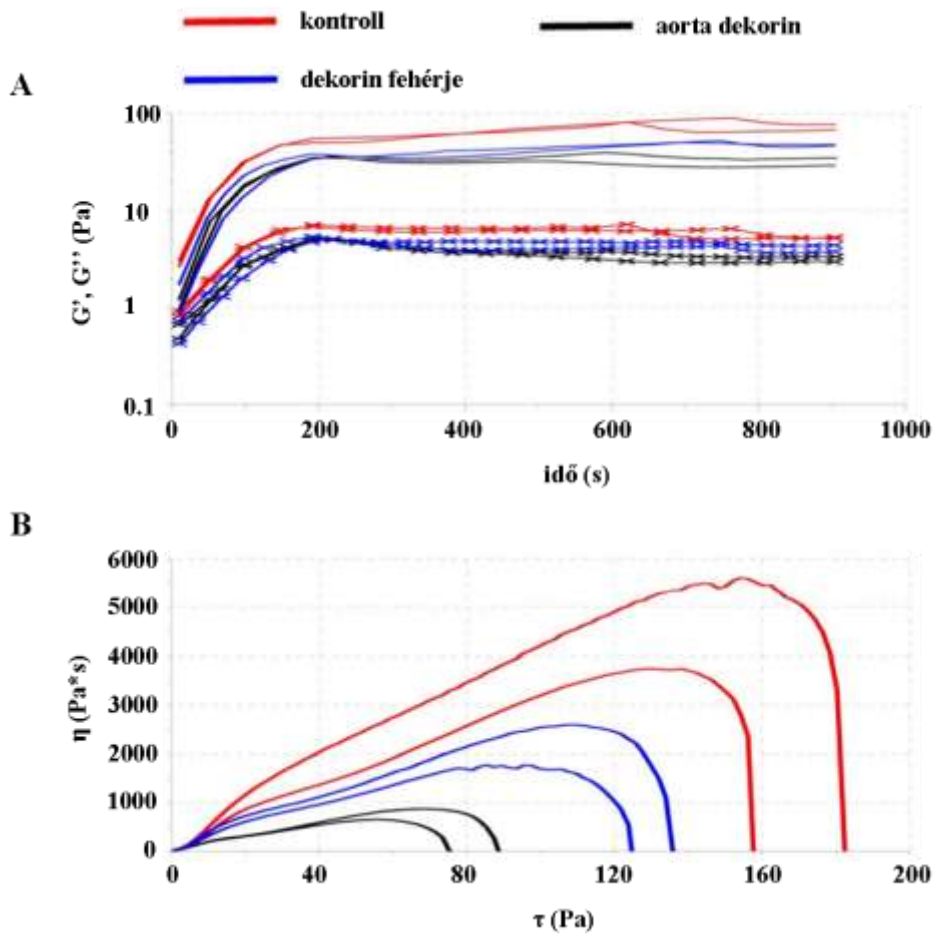
A fibrinháló egy viszkoelasztikus polimer, melynek fizikai tulajdonságai alapvetően befolyásolják a vér áramlása során fellépő nyomás, és (súrlódási) erők

ellenében kifejtett ellenállását. Az érfalkomponensekkel módosított fibrinhálók szerkezeti stabilitását reológiai paramétereik mérésével vizsgáltuk (10. ábra). Az aorta dekorint és a kollagén fragmentumokat kivéve egyik vizsgált komponens sem befolyásolta szignifikánsan a vizsgált G' (tárolási modulus) és G'' (veszteségi modulus) értékeket (3. táblázat). A kollagén fragmentumok kis mértékben csökkentik a G' értéket. Az aorta dekorin esetében tapasztalható a legjelentősebb rigiditásbeli eltérés, hiszen a G' értéket 40 %-kal csökkenti, míg a G'' érték 25 %-kal csökken (3. táblázat). A dekorin fehérjét kivéve az összes vizsgált érmátrix komponens szignifikánsan csökkenti a kritikus nyírófeszültség értéket (τ_0) (3. táblázat).

3. táblázat

*A mesterségesen létrehozott, érfalkomponensekkel módosított szerkezetű fibrinalvadékok mechanikai stabilitásának vizsgálata. 7,4 μM fibrinogént kevertünk össze 50 nM aorta dekorinnal / 50 nM dekorin fehérjével / 50 $\mu\text{g/ml}$ kollagén fragmentummal / 50 $\mu\text{g/ml}$ kondroitin-szulfáttal / 50 $\mu\text{g/ml}$ dermatán-szulfáttal, majd alvasztottunk 10 nM trombinnal. Oszcillációs reométer segítségével vizsgáltuk az egyes alvadékok tárolási modulus (G'), veszteségi modulus (G'') és veszteségi tangens (G''/G') értékek változását. A táblázat az alvás 15. percének értékeit mutatja. A folyáshatár megállapításához szükséges kritikus nyírófeszültség értéket (τ_0) a viszkozitáscsökkenés 0-ra történő extrapolációjával kaptuk meg. A táblázat értékei 3 független mérés átlagát \pm szórást (SD) jelentik, mindegyik *-gal jelölt értékek $p < 0,05$ szinten szignifikáns eltérést mutatnak a kontrolltól.*

	G' (Pa)	G'' (Pa)	G''/G'	τ_0 (Pa)
kontroll	54.29 \pm 12.98	4.58 \pm 0.9	0.086 \pm 0.015	154.42 \pm 24.34
fDCN	33.20 \pm 3.68*	3.38 \pm 0.5*	0.102 \pm 0.006*	85.58 \pm 10.65*
cDCN	47.04 \pm 0.62	4.07 \pm 0.43	0.086 \pm 0.008	130.25 \pm 7.85
kollagén fragm.	40.70 \pm 2.88*	3.83 \pm 0.38	0.094 \pm 0.008	95.56 \pm 9.40*
DS	41.13 \pm 10.68	3.77 \pm 0.65	0.093 \pm 0.007	103.89 \pm 8.50*
CS	47.81 \pm 9.20	4.45 \pm 0.74	0.094 \pm 0.006	111.01 \pm 15.81*



10. ábra

Az érfalkomponensek hatása a fibrinháló mechanikai stabilitására. $7,4 \mu\text{M}$ fibrinogénbe 50 nM dekorin fehérjét / 50 nM aorta dekorint kevertünk és alvasztottuk 10 nM trombinnal. A rész: Oszillációs reométerben követtük a tárolási modulus (G' , folyamatos vonal) és a veszteségi modulus (G'' , x-el jelölt vonalak) változásait, a trombin hozzáadása utáni 15 percig. B rész: a viszkozitás változása lépcsőzetesen növelt nyíróerő hatására. A folyáshatár eléréséhez szükséges nyírófeszültség értékeket (τ_0) a 3. táblázatban tüntettük fel.

5. MEGBESZÉLÉS

A hemosztázis az életben maradáshoz alapvetően szükséges folyamat akkor, ha az érpálya valamely része sérül. A folyamat első lépése a vazokonstrikción, amit a vér egyes sejtjes és molekuláris elemeinek a sérülés környékére való kitapadása, majd aktiválódása követ. Az utolsó fázis ebben a folyamatban a véralvadási kaszkád által generált trombin által katalizált fibrinogén – fibrin átalakulás, melyet a fibrinmonomerek polimerizációja, vagyis a fibrinháló kialakulása követ. Ebbe a hálóba szövődnek bele a sérülés helyére kitapadt sejtek, lényegében ez a kialakuló szerkezet stabilizálja az ott lévő sejtek közt kialakult kapcsolatot, egyfajta mechanikai védelmet adva azoknak a vér által kifejtett nyíróerők ellen. Mindezen folyamatok a vérzés megállításában kulcsfontosságúak, bármelyik lépés nem megfelelő működése megfelelően nagy sérülés esetén súlyos következménnyel járhat.

Az artériák falában kialakuló ateroszklerotikus plakkokat is értelmezhetjük egyfajta érsérülésként akkor, ha a felszínük valamilyen okból sérül, ezáltal a normálisan az érfalat borító endotélium alatt lévő trombogén felszín a vérrel érintkezésbe lép, beindítva ezáltal a véralvadási kaszkádot, amely „rosszul értelmezvén” a kialakult jelzést (hiszen vérzés ilyenkor nem történik) végeredményben trombust alakít ki a sérült plakk felszínén. Amennyiben ennek a trombusnak a kapcsolata az érfallal nem elég stabil, elválhat attól, az érpálya más részén gátolhatja a megfelelő véráramlást, pl. iszkémiás, stroke-os megbetegedéseket idézve ezzel elő.

In vivo a trombus tehát nagyrészt sejtjes elemekből és fibrinhálóból áll. Azonban sokféle, a vérben lévő fehérje, illetve a trombusba zárt sejtekből kiszabaduló sejtalkotó befolyásolhatja a trombus szerkezetét és ezáltal a stabilitását. Ezeknek a makromolekuláknak egy része már jól ismert, hatásuk jól jellemzett.

Kevésbé feltárt terület viszont, hogy az erek falában lévő mátrixkomponensek hogyan befolyásolják a kialakuló fibrinháló stabilitását. Az érfal kollagén rostjai például alapvető funkciójúak a von Willebrand-faktor mediált trombocita kikötődés folyamán. Ugyanakkor a sérülés helyére az aktivált trombociták által toborzódó leukociták nagy mennyiségű extracelluláris mátrix komponenseket bontó proteázokat szekretálnak, melyek az adott helyen proteolitikusan módosítják az érfalat (156), ezáltal makromolekuláris komponenseket szabadítanak fel abból, melyek a kialakuló

fibrinhálóba épülhetnek. Atheroszklerotikus plakkok területén nagyfokú az extracelluláris mátrix komponensek termelődése és lebontása. Utóbbi folyamat főleg mátrix metalloproteázok működésének az eredménye. A plakksapka sérülése során kialakuló trombus egy olyan felszínen alakul ki, ahol az érfalat alkotó makromolekuláris komponensek nagyfokú és folyamatos átrendeződése tapasztalható. Nagy eséllyel kerülnek be tehát a kialakuló trombusba – a leukociták által termelt proteázok működéséhez hasonlóan - érfalból származó proteolitikus emésztés következtében létrejövő mátrixmolekulák, vagy annak darabjai.

Kísérleteinkben ezen hatásokat modelleztük a fibrinháló szerkezetére és stabilitására vonatkozóan. Az ECM nagy mennyiségben tartalmaz főleg I-es és III-as típusú kollagént, és a - kollagének fibrillogenezisében fontos szerepet játszó – dekorint. Ezek a molekulák előfordulása a szervezet szinte minden sejtközi állományában általános, választásunk ezekre, illetve a dekorinon lévő kondroitin / dermatán-szulfát láncoknak a vizsgálatára esett. Bár felszabadulásuk helyén jóval nagyobb mennyiségben lehetnek jelen, a vérplazmában normál körülmények közt lévő ionkörnyezetet és fibrinogén koncentrációt alapul véve a vizsgált makromolekulák viszonylag kis mennyisége (a fibrinhez képest legfeljebb 2,5 %-ban) jelentősen képesek befolyásolni a fibrinháló általunk vizsgált tulajdonságait.

A fibrin alvadék stabilitását kétféleképpen értelmezhetjük. Érthetjük alatta a véráram által kifejtett nyomó/nyíróerők elleni mechanikai ellenállását, illetve az érsérülés után, mikor a vérzéscsillapító/megállító funkcióját már ellátta, a fibrinszálakat lebontó lítikus rendszer működésére kifejtett rezisztenciáját.

A mechanikai stabilitás jelentősen kisebb abban az esetben, ha a vizsgált makromolekulák a fibrin polimerizációja során jelen vannak. Az aorta dekorin, a szulfatált glükózaminoglikán láncok és a kollagén fragmentumok is jelentősen csökkentik azt a nyírófeszültséget, ami a fibrinszálak elszakításához szükséges (τ_0 , 3. táblázat). A fibrinszerkezet reológiai paramétereit (veszteségi és tárolási modulusok, illetve ezek hányadosa) leginkább az egyébként legnagyobb szerkezetváltozást okozó aorta dekorin befolyásolja. Vastagabb fibrinszálak esetében már leírták a veszteségi tangens (G''/G') növekedését. Ennek értelmezése szerint a mechanikai erők hatására a profibrillumokon belüli monomerek, vagy a fibrinszálakon belül a profibrillumok ideiglenesen disszociálnak, majd újra kapcsolódnak, miközben az eredeti kötéseken

tárolt energia elvész. Újabb eredmények (157) az előző mechanizmust bizonyítják, igaz abban az esetben a vizsgált anyag DNS volt. Vékony fibrinszálak esetében könnyen elképzelhető a gomb – lyuk kapcsolatok felbomlása majd újraalakulása más helyen, hiszen egy vékony szálaban kevesebb ilyen kötésnek kell felbomlania, nagyobb eséllyel születhetnek újra ilyen kapcsolatok, mint vastag szál esetében (95). Az aorta dekorin esetében pedig ahogy az elektronmikroszkópos képen is megfigyelhető, jóval vastagabb szálakat láthatunk, ahol jóval több monomer – monomer kapcsolatnak kellene szimultán felbomlania. A glikozilált dekorin esetében tehát mégsem zárható ki teljesen az, hogy a profibrillumok közti kapcsolat bomlik fel illetve struktúráldik át nyomóerők hatására az irreverzibilis deformáció során.

Elképzelhető, hogy a DNS esetében a cukorfoszfát gerinc negatív töltésű foszfátcsoportjai, az aorta dekorin esetében az ugyancsak negatív töltésű szulfátcsoportok hozzájárulnak a fibrinháló erőhatásokkal szembeni csökkent stabilitásához. Ugyanakkor önmagában sem a dermatán-szulfát, sem a kondroitin-szulfát láncok nem képesek a G''/G' értéket annyira megnövelni mint az aorta dekorin, tehát a fehérje és a glükózaminoglikán lánc együttes hatása révén jön létre a változás. Másik magyarázat lehet még a glükózaminoglikán láncok hosszának eltérése. Az általunk tisztított aorta dekorinon lévő GAG lánc hosszabb, mint az izolált GAG láncok. A méretbeli különbség is okozhat lényeges változásokat a kialakuló fibrinszerkezetben, mint az tapasztalható a polifoszfátok esetében.

Az aorta dekorinnal módosított fibrinháló tehát jóval hajlamosabb struktúrájának újrendezésére, mint a nem módosított szerkezetű fibrin. (annak ellenére, hogy a G' és a G'' érték is csökken).

A fibrinháló ellenállását a mechanikai hatásokkal szemben nagyban befolyásolja az, hogy a szálak FXIII-al keresztkötöttek-e vagy sem. Amennyiben keresztkötések jönnek létre a fibrinalvadékban, a szerkezet jóval merevebb, rigidebb lesz. (adott erőhatásra kevésbé lesz deformálható mint a nem keresztkötött). Az általunk használt fibrinogén preparátum FXIII-al szennyezett volt. Kimutatták, hogy abban a fibrinalvadékban, amely FXIII-at tartalmaz, a keresztkötések még 2 órával a szilárd alvadék létrejötte után is keletkezhetnek (158), módosítva ezzel reológiai tulajdonságait (lassabban éri el a plató fázist a rendszer). Amennyiben CaCl_2 nincs jelen a rendszerben, az FXIII sem képes működni, így reológias kísérleteinket ilyen körülmények közt

végeztük. Más vizsgálatainknál viszont fiziológias koncentrációjú CaCl_2 -t adtunk a rendszerbe, hogy az in vivo körülményeket hűen modellezzük, illetve más típusú méréseinknél a keresztkötések kialakulása nem befolyásolta a vizsgálatok végeredményeit.

A fibrinolízis alapvetően kétféle folyamatra bontható: a plazminogén valamely plazminogén aktivátor általi aktiválására, illetve az aktív plazmin általi enzimátikus fibrinháló-bontásra. A két folyamat összességében adja meg a fibrinolízis sebességét.

Kísérleteinkben a plazminogén aktiváció vizsgálatát a fibrin felszínre helyezett tPA indította olyan fibrinalvadékban, amelyben a trombin általi alvasztás előtt plazminogént kevertünk a fibrinogénhez, eloszlása ezáltal homogénnek volt tekinthető. A csak fibrint tartalmazó alvadékhoz képest, amennyiben érfalkomponensek is jelen vannak a fibrinalvadékban, minden esetben alacsony fokú aktiváció gátlás figyelhető meg. Az aktiváció látszólagos maximális sebességét a kollagén fragmentumok és a dekorin fehérje csökkentik a legjobban, akár 30 %-os is lehet a gátlás mértéke. A szulfatált GAG láncok jelenlétében 12 - 18 %-os lassulás mérhető (2. táblázat). Ez a gátló hatás csak akkor tapasztalható, ha fibrin jelen van az aktivációs folyamat során, nélküle ilyen hatás nem tapasztalható. A gátlás magyarázható azzal, hogy a vizsgált elemek módosítják az aktivációban részt vevő fibrinfelszín szerkezetét. Vastagabb fibrinszálak gyengébb kofaktorként funkcionálnak a fibrinfüggő tPA általi plazminogén aktivációban. A kollagén fragmentumok és a dekorin fehérje is emeli a fibrinszálak átmérőjét, hatásuk tehát ezzel magyarázható. A legnagyobb szerkezeti változást létrehozó aorta dekorin viszont nem mutat nagyobb gátló hatást mint az előző két fehérje(fragmentum). Ez esetben tehát úgy tűnik, hogy a fehérjén lévő GAG lánc gyorsítja az aktivációt a dekorin fehérjéhez képest, ugyanakkor a GAG láncok önmagukban nem okozzák az aktiváció gyorsulását, hanem az aorta dekorinhoz hasonló mértékben lassítják azt. Az is megfigyelhető azonban, hogy a fibrinszál átmérőben a GAG láncok nem okoznak számottevő változást. A GAG láncok hatása tehát kétféle lehet, vastagabb fibrinszálakon gyorsítják, vékonyabbakon lassítják a plazminogén aktivációját.

Az is elképzelhető azonban, hogy a GAG láncok hatására (önálló és fehérjéhez kötött formában is) jobban koncentrálódik a tPA a fibrin felső, az aktiváció

szempontjából fontos rétegébe. Ezt az elméletet támasztja alá az is, hogy a GAG láncok jelenléte „felfüggeszti” a dekorin fehérje általi lassabb aktivációt. Érdemes megjegyezni, hogy az aorta dekorin által módosított fibrinszerkezetben lényegesen kisebbek a pórusok mint a csak GAG láncot tartalmazóban, ami a tPA diffúzióját gátolhatja. A gátlás viszont ugyanakkora mértékű, mindkét esetben, ami ugyancsak a GAG lánc tPA koncentráló hatását támasztja alá.

A tPA fibrinbe való diffúziójának és eloszlásának vizsgálatához, illetve a lízis követéséhez fluoreszcensen jelölt tPA-t rétegeztünk az előzőhöz hasonló kísérleti elrendezésekben az alvadékok tetejére. Az már ismert volt eddig is, hogy a vastagabb fibrinszálak individuálisan ugyan lassabban bomlanak le mint a vékonyabbak (kevesebb molekulán kell átvágnia magát a plazminnak utóbbi esetben, hogy a fibrinszál hasadjon, illetve a vastagabb szál rosszabb felszín a plazminogén aktiváció szempontjából), ha viszont nem egyes szálakat nézünk hanem egy egész rögöt, a vékony szálakat tartalmazó lassabban esik szét. Ennek az a magyarázata, hogy adott térfogatban jóval több vékony szál foglalhat helyet, mint vastag, aminek átvágásához összességében több idő kell. Ennek megfelelően a fibrinszálmérőt legnagyobb mértékben növelő aorta dekorinnal módosított fibrinalvadék lízise a leggyorsabb, ami a lítikus front gyorsult mozgásán is jól követhető (8. ábra). Ugyanakkor mindegyik vizsgált anyag a lítikus front gyorsabb előrehaladását eredményezi, az előzően vázolt trendnek ellentmondóan a fibrinszálmérőt lényegesen nem módosító GAG láncok is. Ez a megfigyelés ugyancsak a GAG láncok tPA fibrinfelszíni koncentráló szerepére utal. CS esetében a lítikus front jóval szélesebb mint a DS esetében, ahol a többi anyaghoz hasonlóan egy vékony rétegbe tömörül, a front mozgásának sebességében viszont nincs lényegi eltérés a két anyag közt. Lehetséges, hogy CS esetében a tPA könnyebb diffúziója valósul meg, ezért szélesebb a front, és gyorsabb a lízis.

Vastag fibrinszálak lízisét spektroszkópiásan követve a folyamat kezdetén átmeneti turbiditásnövekedés tapasztalható (155), ami aggregátumok képződésével magyarázható. Ezen granulákhoz a tPA kötődése is kimutatható. Valószínűleg ezek fibrin degradációs termékek, amik a lízis folyamán átmenetileg az alvadékhoz tapadva maradnak. Kollagén fragmentumokkal illetve a kétféle dekorinnal módosított fibrinalvadékokban is megfigyelhetjük ezen aggregátumok létrejöttét (8. ábra). F domén hiányos tPA variáns által mutatott lítikus front kezdetben vékony felszíni rétegben

jelentkezik, majd egy idő után diffúzzá válik (155), a kondroitin-szulfáttal módosított alvadékhoz hasonlóan. Lehetséges, hogy a CS gátolja a tPA F (vagy valamely más) doménjén keresztüli kötődést a fibrinhez.

A plazmin általi lízis folyamatát spektrofotométerben végigkövetve (6. ábra, görbék leszálló része) hasonló eredmény mutatkozik, mint amit a fluoreszcens lítikus front mozgásánál megfigyeltünk (8. ábra). Vastagabb szálak a kontrollként használt csak fibrint tartalmazó alvadékhoz képest gyorsabban oldódnak fel (a fehérjéket tartalmazó alvadékok esetében). A dekorin fehérje negyedével csökkenti az alvadék teljes széteséséhez szükséges időt, míg az összes többi vizsgált érmátrix komponens esetében a tiszta fibrinhez képest feleannyi idő is elég (1. táblázat). CS és DS a fibrinszálak átmérőjének változtatása nélkül képesek a lízist gyorsítani. Egyik esetben sem tudtuk kimutatni, hogy a vizsgált anyagok a plazmin amidolitikus aktivitását befolyásolták volna, DS és CS esetében a fibrinszerkezet a szálátmérő változása nélkül módosul olyan módon, ami a lízist gyorsabbá teszi.

Nemcsak a plazmin mediált fibrinolízisben, hanem a trombin általi alvasztási fázisban (6. ábra, felszálló ágak) is vannak különbségek. Általánosságban a gyorsabb lízishez gyorsabb alvadás társult, a CS és DS esetében azonban nem változott illetve lassabb lett az alvasztási fázis (1. táblázat). Mivel egyik vizsgált anyag sem változtatja meg a trombin amidolitikus aktivitását, a megoldást a DS CS által megváltoztatott fibrin(ogén) szolgáltathatja. A vérben a fibrinogénhez asszociáltan makromolekulák keringenek (159,160,161), melyek megváltoztathatják a fibrin monomer kialakulásának, illetve polimerizációjának kinetikáját, beépülnek a képződő trombusba, módosítva annak szerkezetét. 6. ábrán a CS és DS felszálló görbéinek elején jelentkező rövid fáziskésés ezt az elméletet igazolja.

A heparin kofaktor II (HCII) egy a vérben jelenlévő szerin-proteáz inhibitor, mely heparin vagy dermatán szulfát jelenlétében 1000x hatékonyabb gátlószere a trombinnak, mint ezek hiányában (122). A HCII savas karakterű N-terminális doménjéhez kötődő H vagy DS más konformációba alakítja a HCII ezen részét, amely eztán könnyebben kapcsolódik a trombin exosite I-hez, gátolva ezzel az enzim működését (162). Hatását antitrombin hiányában képes kifejteni, illetve a véralvadási kaszkád más enzimeire nincs hatással. A trombint képes a fibrinhez kötött állapotában is

gátolni, megállítva ezzel a trombus növekedését (163, 164). Mindezek fényében az alvasztás előtt a plazmába kevert DS alvadásgátló hatása nem meglepő (9. ábra).

Ellentétben az általunk kapott eredményekkel, fibrin-mentes környezetben kimutatták, hogy a DS serkenti a tPA és uPA általi plazminogén aktivációját (165). Feltételezhetően egy trimolekuláris plazminogén – DS – plazminogén aktivátor komplex alakul ki, ahol a DS mint egy „aktivációs felszín” játszik szerepet. Ez a komplex nem keletkezik fibrin jelenlétében, sőt a kompetáló kötő molekula csökkenti a hatékonyabb kofaktor (fibrin) hatását plazminogén-aktiváció mérsékelt gátlását eredményezve (7. ábra).

Egy másik tanulmányban, melyben a CS és DS hatását vizsgálták a fibrinalvadék kialakulására vonatkozóan, a fibrinszálmérők jelentős növekedését tapasztalták, amit igazoltak turbidimetriás méréseik is (166), ugyanakkor az alvadékképződés elején jelentkező fáziskésés rövidüléséről számoltak be. Minden esetben a CS mutatott nagyobb eltérést a kontrollhoz képest. Ezzel szemben az általunk létrehozott körülmények közt a fibrinszálmérők nem változtak jelentősen, a fáziskésés hosszabbodott DS és CS esetében, a turbidimetriás eredményeink viszont egybevágóak, növekvő koncentrációval a turbiditás is növekszik. A különbségek adódhatnak a vizsgálatok eltérő körülményeiből, hiszen az említett cikkben jóval nagyobb CS és DS koncentrációkkal dolgoztak mint mi (mg/ml tartományt vizsgáltak), amely esetekben ugyan lényeges különbségeket sikerült kimutatniuk, viszont ezek a mennyiségek feltehetően jóval a fiziológiás koncentrációtartomány fölé esnek.

Dekorin fehérjét vizsgálva (133) kimutatták, hogy a fibrinszálak átmérőjét csökkenti, valószínűleg a coiled – coilhez kötődve, a protofibrillum – protofibrillum interakciót befolyásolva. Ugyanakkor érdekes módon ezeken a vékonyabb szálakon gyorsabban ment végbe a lízis, ami az eddigi ismereteknek ellentmond. Kísérleteinkben a dekorin fehérje a kontrollhoz képest vastagabb fibrinszálakat hoz létre (4. ábra), ugyanakkor eredményeink szerint az általa módosított alvadékban gyorsabb a fibrinolízis folyamata. Nem pontosan tisztázott még tehát a dekorin szerkezetbefolyásoló szerepe, az viszont egyértelmű, hogy az így módosított alvadék in vivo a plazminnak kevésbé ellenálló.

Az érfalban lévő mátrixalkotók csak az érfal sérülése esetén exponálódnak az érlumen felé. A fibrin szerkezete a kialakuló trombuson belül nem homogén például annak függvényében sem, hogy az érfalból a proteázok hatására felszabaduló mátrixkomponensek egyfajta az érlumen felé csökkenő koncentrációjú grádiens hozhatnak létre. Mivel eredményeink szerint az érfalkomponensekkel módosított fibrinháló lebomlása gyorsabban megy végbe, mint az általuk nem érintett területeken, ez a vérrög könnyebb elszakadását eredményezheti az érfaltól, ami embóliás, stroke-os kórképeket eredményezhet. Az így módosított fibrin keletkezése elsősorban az atheroscleroticus plakk gyulladáson alapuló környezetben valószínűsíthető. A sérült plakkterületen kialakuló trombus olyan érfelülettel kapcsolódik, amelyben nagy mennyiségben fordultak elő proteázok által degradált extracelluláris mátrixkomponensek, amelyek bekerülhetnek a kialakuló alvadékba. Ezzel szemben a vérzéscsillapító funkciójú alvadék a mechanikai sérüléstől eltekintve megtartott szerkezetű érfaréteg felett keletkezik és így kisebb mértékben van kitéve a mechanikai és litikus stabilitását csökkentő hatásoknak. Az érfal eredetű mátrixmolekulákra vonatkozó eredményeink jobban tükrözik a patológiás körülmények között kialakuló trombusban létrejövő változásokat, amely új lehetőségeket tár fel a fiziológiás (vérzéscsillapító) és patológiás alvadékok differenciálására terápiás beavatkozások során.

6. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA, KÖVETKEZTETÉSEK

1. Érfal eredetű fehérjekomponensek képesek a fibrinalvadék szerkezetének módosítására, megnövelik a fibrinszálak átmérőjét. A legjelentősebb szálátmérő növekedés a glükózaminoglikán láncot hordozó aorta dekorin esetében tapasztalható. A dermatán – szulfát és a kondroitin – szulfát az alvadék szerkezetében nem okoz változást.
2. Amennyiben érfalból származó fehérjék jelen vannak az alvadás kezdetén, a véralvadék kialakulása gyorsabban megtörténik. Minden vizsgált anyag gyorsítja a plazmin mediált fibrinolízis folyamatát, a legnagyobb hatása a szerkezetet nem befolyásoló glükózaminoglikán oldalláncoknak van.
3. Vérplazmát tartalmazó mesterséges fibrinalvadékok lízisekor is tapasztalható a gyorsult fibrinolitikus folyamat, eltekintve a dermatán – szulfáttól, amelynek esetében nem alakul ki fibrinháló.
4. Fibrinmentes környezetben a vizsgált komponensek hatására nem változik sem a trombin, sem a plazmin amidolitikus aktivitása.
5. Plazminogén aktivációja az érfalkomponensekkel módosított fibrinfelszínen lassul, 12 – 29 %-os gátlások mérhetőek. Ez a gátló hatás a fibrinfelszín megváltozott jellegével van összefüggésben.
6. A vizsgált mátrixkomponensek elősegítik a tPA diffúzióját a fibrinalvadékba. A lítikus front vándorlási sebessége a fibrin lízis sebességével korrelál.
7. A fibrinháló reológiai tulajdonságait az aorta dekorin és a kollagén fragmentumok befolyásolják leginkább, ezek csökkentik a tárolási modulus és a veszteségi modulus értékeit. Az összes vizsgált anyag csökkenti a kritikus nyírófeszültség értéket, jelenlétükben a fibrin szerkezete kevésbé ellenálló lesz fizikai hatásokkal szemben.

ÖSSZEFOGLALÁS

A trombus felépítésében a fibrinhálón kívül sejtes elemek, például trombociták, vörösvértestek, illetve vér eredetű makromolekulák is szerepet játszanak. Ezek hatásai a kialakuló fibrinháló szerkezetére, és ezáltal a trombolízisre jól jellemzettek. A korábbi eredményekből egyértelművé vált, hogy a trombolízist nem lehet egyszerűen fibrinolitikus folyamatként definiálni. Ateroszklerotikus plakkok területén nagyfokú az érfal extracelluláris mátrix komponenseinek a szintézise és lebontása, utóbbi folyamatban nagy szerepet kapnak a mátrix metalloproteázok. Amennyiben a plakksapka sérül, az érlumen felé exponálódó felszínen trombus alakul ki, melybe bekerülhetnek a proteolitikus enzimek által degradált, érfal eredetű extracelluláris mátrix komponensek is. Vizsgálatainkkal célul tűztük ki annak tisztázását, hogy ezek a makromolekuláris elemek hogyan befolyásolják a kialakuló fibrinháló tulajdonságait.

Szkennelő elektronmikroszkóppal vizsgálva, érfalkomponensek jelenlétében a fibrinalvadék szerkezetének módosulása tapasztalható. A legszembetűnőbb hatást kiváltó glikozilált dekorin az átlagos szálátmérőt 85 nm-ről 187 nm-re növeli. Ugyan a szulfatált glükózaminoglikán oldalláncok (GAG) a fibrinalvadék szerkezetét kevésbé jelentősen befolyásolják, spektrofotométerben követve a fibrinalvadék plazmin mediált lízisét, jelenlétükben a folyamat több mint kétszeres sebességgel játszódik le. A dekorin fehérje esetében a lízisidő 25 %-al rövidül, a többi vizsgált anyag esetében a lízis gyorsulásának mértéke a GAG oldalláncokéhoz viszonyítható. VÉRPLAZMÁT TARTALMAZÓ ALVADÉKOK SPEKTROFOTOMETRIÁS VIZSGÁLATAKOR IGAZOLTUK A DERMATÁN – SZULFÁT VÉRALVADÁSRA KIFEJTETT GÁTLÓ HATÁSÁT. A módosított fibrinalvadékok rövidebb idő alatt történő lebomlása nem a hatékonyabban működő plazmin munkája révén valósul meg, hiszen egyik érfalkomponens sem változtatja meg fibrinmentes környezetben sem a K_m , sem a V_{max} értékeit az enzimnek. A plazminogén tPA-val történő aktivációja az érfalkomponensekkel módosított fibrinfelszíneken 12 – 29 %-os lassulást mutatott, ugyanakkor konfokális mikroszkóppal vizsgálva a fluoreszcensen jelölt tPA front migrációs sebessége az alvadékok belseje felé másfél – kétszeres. Reométerben vizsgálva az összes anyag 15 – 45 % közt csökkenti a kritikus nyírófeszültség értéket.

Eredményeink alapján kiderült, hogy a vizsgált érfal mátrixkomponensek csökkentik a fibrinalvadék lítikus és mechanikai stabilitását.

SUMMARY

In vivo the structure of the thrombi is modified by platelets, red blood cells and various blood-derived macromolecules. The effects of these components on the clot architecture and fibrinolytic process are well defined. Results of these experiments clearly demonstrate that thrombolysis is not identical with fibrinolysis, the former takes place in a more complex environment.

Synthesis and degradation of the extracellular matrix components of the vessel wall on the sites of atherosclerotic plaques are intensive. The latter process is coupled mainly to the locally expressed matrix metalloproteases. Rupture or erosion of the atherosclerotic cap exposes a thrombogenic surface to the lumen and leads to the development of thrombi. During the formation of the thrombi, the components of the proteolytically modified vessel wall can incorporate into the fibrin mesh. Our goal was to define how these macromolecular elements influence the structure and stability of the clot.

Scanning electron microscopy showed that the presence of the extracellular matrix components during fibrin formation generates thicker fibrin fibers. The change is most pronounced in the case of glycosaminoglycan chain bearing decorin which increases the average fiber diameter from 85 nm to 187 nm. Although the presence of the sulfated glycosaminoglycan side chains (GAG) have a less pronounced effect on the structure of the fibrin mesh, our spectrophotometric analysis indicated that when GAGs are incorporated in the clot they speed up the plasmin mediated fibrinolysis about 2-fold like all other investigated components except decorin protein, which decreases the lysis time by 25 %. When examined blood plasma clots, blocking of the coagulation process by dermatan – sulfate was verified. In a fibrin free system K_m and V_{max} values of plasmin are unchanged, whereas on the modified fibrin surfaces plasminogen activation by tPA slows down by 12 – 29 %. Investigated with confocal microscopy the migration rate of the fluorescent tPA front inside the clot increases one and a half - twofold. In a rheometer the critical shear stress for all tested materials when incorporated in the clot decreased between 15 – 45 %.

These results suggest that the presence of the vessel wall components in the fibrin clot decreases its lytic and mechanical stability.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Karenberg A. (2004) Johann Jakob Wepfer (1620-1695). *J Neurol*, 251: 501-502.
2. Ingram GIC. (1976) The history of haemophilia. *J clin Path*, 29: 469-479.
3. Allam AH, Thompson RC, Wann LS, Miyamoto MI, Thomas GS. (2009) Computed tomographic assessment of atherosclerosis in ancient Egyptian mummies. *JAMA*, 302: 2091-2094.
4. Clemetson KJ. (2012) Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res*, 129: 220-224.
5. Mann KG, Butenas S, Brummel K. (2003) The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 17-25.
6. Fenton JW 2nd, Fasco MJ, Stackrow AB. (1977) Human thrombins. Production, evaluation, and properties of alpha-thrombin. *J Biol Chem*, 252: 3587-3598.
7. Butkowski RJ, Elion J, Downing MR, Mann KG. (1977) Primary structure of human prethrombin 2 and alpha-thrombin. *J Biol Chem*, 252: 4942-4957.
8. Bode W, Turk D, Karshikov A. (1992) The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci*, 4: 426-471.
9. Dodt J, Köhler S, Baici A. (1988) Interaction of site specific hirudin variants with alpha-thrombin. *FEBS Lett*, 229: 87-90.
10. Henschen A, Lottspeich F, Kehl M, Southan C. (1983) Covalent structure of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci*, 408: 28-43.
11. Huang S, Cao Z, Davie EW. (1993) The role of amino-terminal disulfide bonds in the structure and assembly of human fibrinogen. *Biochem Biophys Res Commun*, 190: 488-495.
12. Fornace AJ Jr, Cummings DE, Comeau CM, Kant JA, Crabtree GR. (1984) Structure of the human gamma-fibrinogen gene. Alternate mRNA splicing near the 3' end of the gene produces gamma A and gamma B forms of gamma-fibrinogen. *J Biol Chem*, 259: 12826-12830.

13. Chung DW, Davie EW. (1984) gamma and gamma' chains of human fibrinogen are produced by alternative mRNA processing. *Biochemistry*, 23: 4232-4236.
14. Mosesson MW, Finlayson JS, Umfleet RA. (1972) Human fibrinogen heterogeneities. 3. Identification of chain variants. *Biol Chem*, 247: 5223-5227.
15. Wolfenstein-Todel C, Mosesson MW. (1980) Human plasma fibrinogen heterogeneity: evidence for an extended carboxyl-terminal sequence in a normal gamma chain variant (gamma'). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77: 5069-5073.
16. Medved LV, Gorkun OV, Privalov PL. (1983) Structural organization of C-terminal parts of fibrinogen A alpha-chains. *FEBS Lett*, 160: 291-295.
17. Kollman JM, Pandi L, Sawaya MR, Riley M, Doolittle RF. (2009) Crystal structure of human fibrinogen. *Biochemistry*, 48: 3877-3886.
18. Tsurupa G, Pechik I, Litvinov RI, Hantgan RR, Tjandra N, Weisel JW, Medved L. (2012) On the mechanism of α C polymer formation in fibrin. *Biochemistry*, 51: 2526-2538.
19. Veklich YI, Gorkun OV, Medved LV, Nieuwenhuizen W, Weisel JW. (1993) Carboxyl-terminal portions of the alpha chains of fibrinogen and fibrin. Localization by electron microscopy and the effects of isolated alpha C fragments on polymerization. *J Biol Chem*, 268: 13577-13585.
20. Lewis SD, Shields PP, Shafer JA. (1985) Characterization of the kinetic pathway for liberation of fibrinopeptides during assembly of fibrin. *J Biol Chem*, 260: 10192-10199.
21. Ruf W, Bender A, Lane DA, Preissner KT, Selmayr E, Müller-Berghaus G. Thrombin-induced fibrinopeptide B release from normal and variant fibrinogens: influence of inhibitors of fibrin polymerization. *Biochim Biophys Acta*. (1988) 965: 169-175.
22. Martin PD, Robertson W, Turk D, Huber R, Bode W, Edwards BF. (1992) The structure of residues 7-16 of the A alpha-chain of human fibrinogen bound to bovine thrombin at 2.3-Å resolution. *J Biol Chem*, 267: 7911-7920.
23. Stubbs MT, Oschkinat H, Mayr I, Huber R, Anglikar H, Stone SR, Bode W. (1992) The interaction of thrombin with fibrinogen. A structural basis for its specificity. *Eur J Biochem*, 206: 187-195.

24. Binnie CG, Lord ST. (1993) The fibrinogen sequences that interact with thrombin. *Blood*, 81: 3186-3192.
25. Kaminski M, McDonagh J. (1987) Inhibited thrombins. Interactions with fibrinogen and fibrin. *Biochem J*, 242: 881-887.
26. Binnie CG, Lord ST. (1991) A synthetic analog of fibrinogen alpha 27-50 is an inhibitor of thrombin. *Thromb Haemost*, 65: 165-168.
27. Vali Z, Scheraga HA. (1988) Localization of the binding site on fibrin for the secondary binding site of thrombin. *Biochemistry*, 27: 1956-1963.
28. Koopman J, Haverkate F, Lord ST, Grimbergen J, Mannucci PM. (1992) Molecular basis of fibrinogen Naples associated with defective thrombin binding and thrombophilia. Homozygous substitution of B beta 68 Ala----Thr. *J Clin Invest*, 90: 238-244.
29. Liu CY, Koehn JA, Morgan FJ. (1985) Characterization of fibrinogen New York 1. A dysfunctional fibrinogen with a deletion of B beta(9-72) corresponding exactly to exon 2 of the gene. *J Biol Chem*, 260: 4390-4306.
30. Siebenlist KR, DiOrio JP, Budzynski AZ, Mosesson MW. (1990) The polymerization and thrombin-binding properties of des-(B beta 1-42)-fibrin. *J Biol Chem*, 265: 18650-18655.
31. Kaczmarek E, McDonagh J. (1988) Thrombin binding to the A alpha-, B beta-, and gamma-chains of fibrinogen and to their remnants contained in fragment E. *J Biol Chem*, 263: 13896-13900.
32. Pratt KP, Côté HC, Chung DW, Stenkamp RE, Davie EW. (1997) The primary fibrin polymerization pocket: three-dimensional structure of a 30-kDa C-terminal gamma chain fragment complexed with the peptide Gly-Pro-Arg-Pro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 7176-7181.
33. Lord ST. (2007) Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis. *Curr Opin Hematol*, 14: 236-241.
34. Bowley SR, Merenbloom BK, Okumura N, Betts L, Heroux A, Gorkun OV, Lord ST. (2008) Polymerization-defective fibrinogen variant gammaD364A binds knob "A" peptide mimic. *Biochemistry*, 47: 8607-8613.

35. Weisel JW. (1986) The electron microscope band pattern of human fibrin: various stains, lateral order, and carbohydrate localization. *J Ultrastruct Mol Struct Res*, 96: 176-188.
36. Shainoff JR, Dardik BN. (1983) Fibrinopeptide B in fibrin assembly and metabolism: physiologic significance in delayed release of the peptide. *Ann N Y Acad Sci*, 408: 254-268.
37. Okumura N, Terasawa F, Haneishi A, Fujihara N, Hirota-Kawadobora M, Yamauchi K, Ota H, Lord ST. (2007) B:b interactions are essential for polymerization of variant fibrinogens with impaired holes 'a'. *J Thromb Haemost*, 5: 2352-2359.
38. Medved' L, Ugarova T, Veklich Y, Lukinova N, Weisel J. (1990) Electron microscope investigation of the early stages of fibrin assembly. Twisted protofibrils and fibers. *J Mol Biol*, 216: 503-509.
39. Collet JP, Moen JL, Veklich YI, Gorkun OV, Lord ST, Montalescot G, Weisel JW. (2005) The alphaC domains of fibrinogen affect the structure of the fibrin clot, its physical properties, and its susceptibility to fibrinolysis. *Blood*, 106: 3824-3830.
40. Mosesson MW. (2005) Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost*, 3: 1894-1904.
41. Mosesson MW, DiOrio JP, Müller MF, Shainoff JR, Siebenlist KR, Amrani DL, Homandberg GA, Soria J, Soria C, Samama M. (1987) Studies on the ultrastructure of fibrin lacking fibrinopeptide B (beta-fibrin). *Blood*, 69: 1073-1081.
42. Weisel JW, Nagaswami C. (1992) Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J*, 63: 111-128.
43. Henschen AH. (1993) Human fibrinogen--structural variants and functional sites. *Thromb Haemost*, 70: 42-47.
44. Hoffman M. (2008) Alterations of fibrinogen structure in human disease. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 6: 206-211.
45. Booth NA, Bennett B. (1994) Fibrinolysis and thrombosis. *Baillieres Clin Haematol*, 7: 559-572.

46. Raum D, Marcus D, Alper CA, Levey R, Taylor PD, Starzl TE. (1980) Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science*, 208: 1036-1037.
47. Castellino FJ, McCance SG. (1997) The kringle domains of human plasminogen. *Ciba Found Symp*, 212: 46-60; discussion 60-65.
48. Knudsen BS, Silverstein RL, Leung LL, Harpel PC, Nachman RL. (1986) Binding of plasminogen to extracellular matrix. *J Biol Chem*, 261: 10765-10771.
49. Petersen TE, Martzen MR, Ichinose A, Davie EW. (1990) Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system. *J Biol Chem*, 265: 6104-6111.
50. Thorsen S. (1975) Differences in the binding to fibrin of native plasminogen and plasminogen modified by proteolytic degradation. Influence of omega-aminocarboxylic acids. *Biochim Biophys Acta*, 393: 55-65.
51. Lucas MA, Fretto LJ, McKee PA. (1983) The binding of human plasminogen to fibrin and fibrinogen. *J Biol Chem*, 258: 4249-4256.
52. Komorowicz E, Kolev K, Machovich R. (1998) Fibrinolysis with des-kringle derivatives of plasmin and its modulation by plasma protease inhibitors. *Biochemistry*, 37: 9112-9118.
53. Wu HL, Chang BI, Wu DH, Chang LC, Gong CC, Lou KL, Shi GY. (1990) Interaction of plasminogen and fibrin in plasminogen activation. *J Biol Chem*, 265: 19658-19664.
54. Takada A, Takada Y, Sugawara Y. (1984) Fluorescence spectrophotometric studies on the conformational changes induced by omega-aminoacids in two isozymes of Glu-plasminogen (I and II). *Thromb Res*, 33: 461-469.
55. Lijnen HR, Van Hoef B, Collen D. (1981) On the role of the carbohydrate side chains of human plasminogen in its interaction with alpha 2-antiplasmin and fibrin. *Eur J Biochem*, 120: 149-154.
56. Pirie-Shepherd SR, Jett EA, Andon NL, Pizzo SV. (1995) Sialic acid content of plasminogen 2 glycoforms as a regulator of fibrinolytic activity. Isolation, carbohydrate analysis, and kinetic characterization of six glycoforms of plasminogen. *J Biol Chem*, 270: 5877-5881.

57. Robbins KC, Summariá L, Hsieh B, Shah RJ. (1967) The peptide chains of human plasmin. Mechanism of activation of human plasminogen to plasmin. *J Biol Chem*, 242: 2333-2342.
58. Horrevoets AJ, Smilde AE, Fredenburgh JC, Pannekoek H, Nesheim ME. (1995) The activation-resistant conformation of recombinant human plasminogen is stabilized by basic residues in the amino-terminal hinge region. *J Biol Chem*, 270: 15770-15776.
59. Marshall JM, Brown AJ, Ponting CP. (1994) Conformational studies of human plasminogen and plasminogen fragments: evidence for a novel third conformation of plasminogen. *Biochemistry*, 33: 3599-3606.
60. Fredenburgh JC, Nesheim ME. (1992) Lys-plasminogen is a significant intermediate in the activation of Glu-plasminogen during fibrinolysis in vitro. *J Biol Chem*, 267: 26150-26156.
61. Ellis V, Behrendt N, Dano K. (1991) Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. *J Biol Chem*, 266: 12752-12758.
62. megnézni otthon mi van a tPA ról MacGregor IR, Prowse CV. (1983) Tissue plasminogen activator in human plasma measured by radioimmunoassay. *Thromb Res*, 31: 461-474.
63. Horrevoets AJ, Smilde A, de Vries C, Pannekoek H. (1994) The specific roles of finger and kringle 2 domains of tissue-type plasminogen activator during in vitro fibrinolysis. *J Biol Chem*, 269: 12639-12644.
64. Tsurupa G, Medved L. (2001) Identification and characterization of novel tPA- and plasminogen-binding sites within fibrin(ogen) alpha C-domains. *Biochemistry*, 40: 801-808.
65. Yakovlev S, Makogonenko E, Kurochkina N, Nieuwenhuizen W, Ingham K, Medved L. (2000) Conversion of fibrinogen to fibrin: mechanism of exposure of tPA- and plasminogen-binding sites. *Biochemistry*, 39: 15730-15741.
66. Galántai R, Módos K, Fidy J, Kolev K, Machovich R. (2006) Structural basis of the cofactor function of denatured albumin in plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *Biochem Biophys Res Commun*, 341: 736-741.

67. Kolev K, Machovich R. (2003) Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost*, 89: 610-621.
68. Kasai S, Arimura H, Nishida M, Suyama T. (1985) Proteolytic cleavage of single-chain pro-urokinase induces conformational change which follows activation of the zymogen and reduction of its high affinity for fibrin. *J Biol Chem*, 260: 12377-12381.
69. Darras V, Thienpont M, Stump DC, Collen D. (1986) Measurement of urokinase-type plasminogen activator (u-PA) with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on three murine monoclonal antibodies. *Thromb Haemost*, 56: 411-414.
70. Ellis V, Scully MF, Kakkar VV. (1989) Plasminogen activation initiated by single-chain urokinase-type plasminogen activator. Potentiation by U937 monocytes. *J Biol Chem*, 264: 2185-2188.
71. Shemirani AH, Haramura G, Bagoly Z, Muszbek L. (2006) 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*, 1764: 1420-1423.
72. Greenberg CS, Shuman MA. (1982) The zymogen forms of blood coagulation factor XIII bind specifically to fibrinogen. *J Biol Chem*, 257: 6096-6101.
73. Francis CW, Marder VJ. (1988) Increased resistance to plasminic degradation of fibrin with highly crosslinked alpha-polymer chains formed at high factor XIII concentrations. *Blood*, 71: 1361-1365.
74. Gladner JA, Nossal R. (1983) Effects of crosslinking on the rigidity and proteolytic susceptibility of human fibrin clots. *Thromb Res*, 30: 273-288.
75. Sakata Y, Aoki N. (1980) Cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *J Clin Invest*, 65: 290-297.
76. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Chung KH, McKee PA. (2004) A novel plasma proteinase potentiates alpha2-antiplasmin inhibition of fibrin digestion. *Blood*, 103: 3783-3788.
77. McBane RD 2nd, Ford MA, Karnicki K, Stewart M, Owen WG. (2000) Fibrinogen, fibrin and crosslinking in aging arterial thrombi. *Thromb Haemost*, 84: 83-87.

78. Váradi B, Kolev K, Tenekedjiev K, Mészáros G, Kovalszky I, Longstaff C, Machovich R. (2004) Phospholipid barrier to fibrinolysis: role for the anionic polar head charge and the gel phase crystalline structure. *J Biol Chem*, 279: 39863-39871.
79. Skarlatos SI, Rao R, Dickens BF, Kruth HS. (1993) Phospholipid loss in dying platelets. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 64: 241-245.
80. Machovich R, Ajtai K, Kolev K, Owen WG. (1997) Myosin as cofactor and substrate in fibrinolysis. *FEBS Lett*, 407: 93-96.
81. Kolev K, Tenekedjiev K, Ajtai K, Kovalszky I, Gombas J, Váradi B, Machovich R. (2003) Myosin: a noncovalent stabilizer of fibrin in the process of clot dissolution. *Blood*, 101: 4380-4386.
82. Ruiz FA, Lea CR, Oldfield E, Docampo R. (2004) Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *J Biol Chem*, 279: 44250-44257.
83. Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, Rohloff P, Docampo R, Morrissey JH. (2006) Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 903-908.
84. Mutch NJ, Engel R, Uitte de Willige S, Philippou H, Ariëns RA. (2010) Polyphosphate modifies the fibrin network and down-regulates fibrinolysis by attenuating binding of tPA and plasminogen to fibrin. *Blood*, 115: 3980-3988.
85. Smith SA, Morrissey JH. (2008) Polyphosphate enhances fibrin clot structure. *Blood*, 112: 2810-2816.
86. Rábai G, Váradi B, Longstaff C, Sótonyi P, Kristóf V, Timár F, Machovich R, Kolev K. (2007) Fibrinolysis in a lipid environment: modulation through release of free fatty acids. *J Thromb Haemost*, 5: 1265-1273.
87. Marcus AJ, Ullman HL, Safier LB. (1969) Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets. *J Lipid Res*, 10: 108-114.
88. Rampling MW. (1981) The binding of fibrinogen and fibrinogen degradation products to the erythrocyte membrane and its relationship to haemorheology. *Acta Biol Med Ger*, 40: 373-378.
89. Lominadze D, Dean WL. (2002) Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte aggregation. *FEBS Lett*, 517: 41-44.

90. Carr ME Jr, Hardin CL. (1987) Fibrin has larger pores when formed in the presence of erythrocytes. *Am J Physiol*, 253: 1069-1073.
91. van Gelder JM, Nair CH, Dhall DP. (1994) The significance of red cell surface area to the permeability of fibrin network. *Biorheology*, 31: 259-275.
92. Gersh KC, Nagaswami C, Weisel JW. (2009) Fibrin network structure and clot mechanical properties are altered by incorporation of erythrocytes. *Thromb Haemost*, 102: 1169-1175.
93. Wohner N, Sótonyi P, Machovich R, Szabó L, Tenekedjiev K, Silva MM, Longstaff C, Kolev K. (2011) Lytic resistance of fibrin containing red blood cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 31: 2306-2313.
94. Hársfalvi J. Hemosztázis és trombózis. In vitro áramlási- és klinikai modellek. MTA doktori mű. 2011: 6-7.
95. Weisel JW. (2007) Structure of fibrin: impact on clot stability. *J Thromb Haemost*, 1: 116-124.
96. Falvo MR, Gorkun OV, Lord ST. (2010) The molecular origins of the mechanical properties of fibrin. *Biophys Chem*, 152: 15-20.
97. Gimbrone MA Jr. (1999) Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol*, 155: 1-5.
98. Borén J, Olin K, Lee I, Chait A, Wight TN, Innerarity TL. (1998) Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest*, 101: 2658-2664.
99. Funk CD, Cyrus T. (2001) 12/15-lipoxygenase, oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Trends Cardiovasc Med*, 11: 116-124.
100. Furnkranz A, Schober A, Bochkov VN, Bashtrykov P, Kronke G, Kadl A, Binder BR, Weber C, Leitinger N. (2005) Oxidized phospholipids trigger atherogenic inflammation in murine arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25: 633-638.
101. Berliner JA, Leitinger N, Tsimikas S. (2009) The role of oxidized phospholipids in atherosclerosis. *J Lipid Res*, 50: S207-212.
102. Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. (2001) Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte

- accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J Exp Med*, 194: 205-218.
103. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*, 251: 788-791.
 104. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. (1995) Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 8264-8268.
 105. Torzewski M, Bhakdi S. (2013) Complement and Atherosclerosis - United to the Point of No Return? *Clin Biochem*. 46: 20-25.
 106. Schönbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. (2000) Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 7458-7463.
 107. Libby P. (1998) The interface of atherosclerosis and thrombosis: basic mechanisms. *Vasc Med*, 3: 225-229.
 108. Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, Libby P. (1997) Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res*, 81: 448-454.
 109. Farndale RW, Sixma JJ, Barnes MJ, de Groot PG. (2004) The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost*, 2: 561-573.
 110. Gordon MK, Hahn RA. (2010) Collagens. *Cell Tissue Res*, 339: 247-257.
 111. van der Rest M, Garrone R. (1991) Collagen family of proteins. *FASEB J*, 5: 2814-2823.
 112. Gasser TC, Ogden RW, Holzapfel GA. (2006) Hyperelastic modelling of arterial layers with distributed collagen fibre orientations. *J R Soc Interface*, 3: 15-35.
 113. Shekhonin BV, Domogatsky SP, Idelson GL, Koteliansky VE, Rukosuev VS. (1987) Relative distribution of fibronectin and type I, III, IV, V collagens in normal and atherosclerotic intima of human arteries. *Atherosclerosis*, 67: 9-16.
 114. Murata K, Motayama T, Kotake C. (1986) Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis*, 60: 251-262.

115. Katsuda S, Okada Y, Minamoto T, Oda Y, Matsui Y, Nakanishi I. (1992) Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arterioscler Thromb*, 12: 494-502.
116. Rekhter MD. (1999) Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc Res*, 41: 376-384.
117. Nikkari ST, Geary RL, Hatsukami T, Ferguson M, Forough R, Alpers CE, Clowes AW. (1996) Expression of collagen, interstitial collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in restenosis after carotid endarterectomy. *Am J Pathol*, 148: 777-783.
118. Lenglet S, Thomas A, Chaurand P, Galan K, Mach F, Montecucco F. (2012) Molecular imaging of matrix metalloproteinases in atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost*, 107: 409-416.
119. Scott JE. (1988) Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem J*, 252: 313-323.
120. Gallagher JT, Lyon M, Steward WP. (1986) Structure and function of heparan sulphate proteoglycans. *Biochem J*, 236: 313-325.
121. Faham S, Hileman RE, Fromm JR, Linhardt RJ, Rees DC. (1996) Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science*, 271: 1116-1120.
122. Tollefsen DM, Pestka CA, Monafu WJ. (1983) Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate. *J Biol Chem*, 258: 6713-6716.
123. Andrew M, Mitchell L, Berry L, Paes B, Delorme M, Ofosu F, Burrows R, Khambalia B. (1992) An anticoagulant dermatan sulfate proteoglycan circulates in the pregnant woman and her fetus. *J Clin Invest*, 89: 321-326.
124. Delorme MA, Saeed N, Sevcik A, Mitchell L, Berry L, Johnston M, Andrew M. (1993) Plasma dermatan sulfate proteoglycan in a patient on chronic hemodialysis. *Blood*, 82: 3380-3385.
125. Lauricella AM, Castañon MM, Kordich LC, Quintana IL. (2013) Alterations of fibrin network structure mediated by dermatan sulfate. *J Thromb Thrombolysis*, 35: 257-263.
126. Seidler DG, Dreier R. (2008) Decorin and its galactosaminoglycan chain: extracellular regulator of cellular function? *IUBMB Life*, 60: 729-733.

127. McEwan PA, Scott PG, Bishop PN, Bella J. (2006) Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans. *J Struct Biol*, 155: 294-305.
128. Järveläinen HT, Kinsella MG, Wight TN, Sandell LJ. (1991) Differential expression of small chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans, PG-I/biglycan and PG-II/decorin, by vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *J Biol Chem*, 266: 23274-23281.
129. Zamfir AD, Flangea C, Sisu E, Seidler DG, Peter-Katalinić J. (2011) Combining size-exclusion chromatography and fully automated chip-based nanoelectrospray quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry for structural analysis of chondroitin/dermatan sulfate in human decorin. *Electrophoresis*, 32: 1639-1646.
130. Vogel KG, Paulsson M, Heinegård D. (1984) Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J*, 223: 587-597.
131. Lin H, Wilson JE, Roberts CR, Horley KJ, Winters GL, Costanzo MR, McManus BM. (1996) Biglycan, decorin, and versican protein expression patterns in coronary arteriopathy of human cardiac allograft: distinctness as compared to native atherosclerosis. *J Heart Lung Transplant*, 15: 1233-1247.
132. Dugan TA, Yang VW, McQuillan DJ, Höök M. (2003) Decorin binds fibrinogen in a Zn²⁺-dependent interaction. *J Biol Chem*, 278: 13655-13662.
133. Dugan TA, Yang VW, McQuillan DJ, Höök M. (2006) Decorin modulates fibrin assembly and structure. *J Biol Chem*, 281: 38208-38216.
134. Jarrold BB, Bacon WL, Velleman SG. (1999) Expression and localization of the proteoglycan decorin during the progression of cholesterol induced atherosclerosis in Japanese quail: implications for interaction with collagen type I and lipoproteins. *Atherosclerosis*. 146: 299-308.
135. Riessen R, Isner JM, Blessing E, Loushin C, Nikol S, Wight TN. (1994) Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary arteries. *Am J Pathol*, 144: 962-974.

136. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Weber DK, Kutys R, Wight TN, Virmani R. (2002) Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22: 1642-1648.
137. Guidetti G, Bertoni A, Viola M, Tira E, Balduini C, Torti M. (2002) The small proteoglycan decorin supports adhesion and activation of human platelets. *Blood*, 100: 1707-1714.
138. Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 4: 617-629.
139. Klein T, Bischoff R. (2011) Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases. *Amino Acids*, 41: 271-290.
140. Murphy G, Knäuper V. (1997) Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol*, 15: 511-518.
141. Ra HJ, Parks WC. (2007) Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol*, 26: 587-596.
142. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. (1994) Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 94: 2493-2503.
143. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Libby P. (1995) Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions. *Ann N Y Acad Sci*, 748: 501-507.
144. Sarén P, Welgus HG, Kovanen PT. (1996) TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol*, 157: 4159-4165.
145. Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhöfer R, Clark S, Libby P. (1995) Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 402-406.
146. V Baroncini LA, Nakao LS, Ramos SG, Filho AP, Murta LO Jr, Ingberman M, Tefé-Silva C, Prêcoma DB. (2011) Assessment of MMP-9, TIMP-1, and COX-2

- in normal tissue and in advanced symptomatic and asymptomatic carotid plaques. *Thromb J*, 9: 6-12.
147. de Vries MR, Niessen HW, Löwik CW, Hamming JF, Jukema JW, Quax PH. (2012) Plaque rupture complications in murine atherosclerotic vein grafts can be prevented by TIMP-1 overexpression. *PLoS One*, 7: e47134.
 148. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. (1996) Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest*, 98: 2572-2579.
 149. Rånby M. (1982) Studies on the kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator. *Biochim Biophys Acta*, 704: 461-469.
 150. Tanka-Salamon A, Tenekedjiev K, Machovich R, Kolev K. (2008) Suppressed catalytic efficiency of plasmin in the presence of long-chain fatty acids. Identification of kinetic parameters from continuous enzymatic assay with Monte Carlo simulation. *FEBS J*, 275: 1274-1282.
 151. Longstaff C, Whitton CM. (2004) A proposed reference method for plasminogen activators that enables calculation of enzyme activities in SI units. *J Thromb Haemost*, 2: 1416-1421.
 152. Molnár Á. Bitumenes kötőanyagok reológiai vizsgálatai, a nyírési modulusz meghatározásának jelentősége. 2007: 20-30.
 153. Biczó – Kabai V. Kakaóvaj-egyenértékű növényi zsírok és a tárolási körülmények hatása csokoládé modellrendszerek reológiai és érzékszervi jellemzőire. Doktori (PhD) értekezés. 2011: 66-70.
 154. Choi HU, Johnson TL, Pal S, Tang LH, Rosenberg L, Neame PJ. (1989) Characterization of the dermatan sulfate proteoglycans, DS-PGI and DS-PGII, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl-sepharose chromatography. *J Biol Chem*, 264: 2876-2884.
 155. Longstaff C, Thelwell C, Williams SC, Silva MM, Szabó L, Kolev K. (2011) The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: kinetic and microscopic studies. *Blood*, 117: 661-668.

156. Wohner N, Keresztes Z, Sótónyi P, Szabó L, Komorowicz E, Machovich R, Kolev K. (2010) Neutrophil granulocyte-dependent proteolysis enhances platelet adhesion to the arterial wall under high-shear flow. *J Thromb Haemost*, 8: 1624-1631.
157. Longstaff C, Varju I, Sotonyi P, Szabo L, Krumrey M, Hoell A, Bota A, Varga Z, Komorowicz E, Kolev K. (2013) Mechanical Stability and Fibrinolytic Resistance of Clots Containing Fibrin, DNA and Histones. *J Biol Chem*, Jan 4. [Epub ahead of print]
158. Ryan EA, Mockros LF, Weisel JW, Lorand L. (1999) Structural origins of fibrin clot rheology. *Biophys J*, 77: 2813-2826.
159. Nair CH, Dhall DP. (1991) Studies on fibrin network structure: the effect of some plasma proteins. *Thromb Res*, 61: 315-25.
160. Talens S, Leebeek FW, Demmers JA, Rijken DC. (2012) Identification of fibrin clot-bound plasma proteins. *PLoS One*, 7: e41966.
161. Tollefsen DM. (1995) Insight into the mechanism of action of heparin cofactor II. *Thromb Haemost*, 74: 1209-1214.
162. Hynes RO, Yamada KM. (1982) Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol*, 95: 369-377.
163. Bendayan P, Boccalon H, Dupouy D, Boneu B. (1994) Dermatan sulfate is a more potent inhibitor of clot-bound thrombin than unfractionated and low molecular weight heparins. *Thromb Haemost*, 71: 576-580.
164. Liaw PC, Becker DL, Stafford AR, Fredenburgh JC, Weitz JI. (2001) Molecular basis for the susceptibility of fibrin-bound thrombin to inactivation by heparin cofactor ii in the presence of dermatan sulfate but not heparin. *J Biol Chem*, 276: 20959-20965.
165. Castañón MM, Gamba C, Kordich LC. (2007) Insight into the profibrinolytic activity of dermatan sulfate: effects on the activation of plasminogen mediated by tissue and urinary plasminogen activators. *Thromb Res*, 120: 745-752.
166. Carr ME Jr, Powers PL. (1989) Effect of glycosaminoglycans on thrombin- and atroxin-induced fibrin assembly and structure. *Thromb Haemost*, 62: 1057-1061.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK:

Rottenberger Z, Komorowicz E, Szabó L, Bóta A, Varga Z, Machovich R, Longstaff C, Kolev K. (2013) Lytic and mechanical stability of clots composed of fibrin and blood vessel wall components. *J Thromb Haemost*, 11: 529-538.

Rottenberger Z, Kolev K. (2011) Matrix metalloproteinases at key junctions in the pathomechanism of stroke. *Cent Eur J Biol*, 6: 471-485.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ SZOROSAN NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNY:

Szabó E, Lódi C, Korpos E, Batmunkh E, Rottenberger Z, Deák F, Kiss I, Tokés AM, Lotz G, László V, Kiss A, Schaff Z, Nagy P. (2007) Expression of matrilin-2 in oval cells during rat liver regeneration. *Matrix Biol*, 26: 554-560.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás vagyok Prof. Ádám Veronikának és Prof. Machovich Raymundnak, hogy lehetővé tették számomra azt, hogy a Semmelweis Egyetem Orvosi Biokémia Intézetének Hemosztázis Kutatócsoportjában dolgozhassak.

Külön köszönet illeti témavezetőmet, Dr. Kolev Kraszimirt, hogy munkámat nagy precizitással, végig figyelemmel kísérte. Segítsége nélkül ez a disszertáció nem készülhetett volna el.

Köszönettel tartozok a Hemosztázis kutatócsoport többi tagjának: Dr. Komorowicz Erzsébetnek, Dr. Bartha Katalinnak és Dr. Léránt Istvánnak a szakmai tanácsaikért, Oravecz Györgyinek és Magyarné Holti Krisztinának pedig a technikai segítségükért.

