

**ÉRFALKOMPONENSEKKEL MÓDOSÍTOTT FIBRINHÁLÓ
MECHANIKAI ÉS LÍTIKUS STABILITÁSA**

Doktori tézisek

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

BEVEZETÉS

In vivo trombusok nem csak fibrinhálóból állnak, hanem kialakulásuk során beleépülnek sejtes elemek (vérelemek, vörösvérsejtek, fehérvérsejtek), sejteredetű makromolekulák és a vérben megtalálható egyéb fehérjék is. Ezek a fibrinháló szerkezetét képesek közvetlenül módosítani, illetve a fibrinszerkezetet létrehozó trombin és a lebontó plazmin működésére is hatással lehetnek.

A vérrög az érfalhoz tapadva alakul ki. Munkacsoportunk előzetes eredményei alapján kiderült, hogy a trombus kialakulásakor az odaseregülő neutrofil granulocitákból felszabaduló proteázok képesek az érfal struktúrájának módosítására. Erek ateroszklerotikus területein az érfalat felépítő extracelluláris mátrix komponensek nagyfokú átrendeződése figyelhető meg, ami például az I-es és III-as típusú fibrilláris kollagének és glükózaminoglikán oldallánccal rendelkező decorin fokozódott termelésében, másrészt többek között ugyanezen fehérjék különféle mátrix metalloproteázok általi degradációjában nyilvánul meg. A sérült plakksapka felszínén, illetve fehérvérsejt eredetű proteázok működése révén ezáltal nagy mennyiségben fordulhatnak elő az érfal proteolizált komponensei a kialakuló trombus környezetében. Ezek a részben degradált makromolekuláris elemek is beépülhetnek a kialakuló

fibrinhálóba, és a vér eredetű komponensekhez hasonlóan befolyásolhatják annak szerkezeti és lítikus tulajdonságait.

CÉLKITŰZÉSEK

In vivo a vérrög kialakulása helyén 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 fibrinfelszínen végbemenő plazminogén aktivációra vonatkozóan.

MÓDSZEREK

TURBIDIMETRIÁS MÉRÉSEK

Mikrotiter lemezek mérőhelyeiben fibrinogént kevertünk össze a vizsgált érfalkomponensekkel (kollagén fragmentumokkal / dekorin fehérjével / glükózaminoglikán láncot hordozó dekorinnal / dermatán-szulfáttal / kondroitin-szulfáttal). Az alvasztást és a lízist egyidejűleg adott

trombinnal és plazminnal indítottuk. A folyamatok során megfigyelhető turbiditás változásokat spektrofotométerben követtük nyomon, az abszorbancia folyamatos mérésével. Az alvadási és lízis időket a maximális turbiditás értékek felének eléréséhez szükséges időként definiáltuk.

PÁSZTÁZÓ ELEKTRONMIKROSKÓPOS VIZSGÁLATOK

A fibrinfelszínek részletes vizsgálatához érfalkomponensekkel módosított alvadékokat hoztunk létre. Fixálás, dehidratálás után ezeket szénkorongokra rögzítettük és aranybevonattal fedtük be. Az alvadékokról felvételeket készítettünk a fibrinszálmérők meghatározása céljából, mely során a szálak hossztengegyére merőlegesen húzott vonal méretét adtuk meg. Egy felvételen legalább 300 fibrinszálmérőt határoztunk meg. A mért értékekhez elméleti eloszlást illesztettünk és ábrázoltuk a valószínűségi előfordulás függvényében.

KONFOKÁLIS MIKROSKÓPIA

Az előző rendszerhez hasonlóan érfalkomponensekkel módosított alvadékokat hoztunk létre, melyekben a fibrinogén 2 %-a vörös fluorokrómmal volt jelölve. Az alvadékok lítikus tulajdonságának vizsgálatához Yellow Fluorescent Proteinnel jelölt tPA-t rétegeztünk az alvadékok felszínére, majd

konfokális mikroszkópban követtük a lítikus front (a fibrinfelszínen koncentálódó YFP-tPA) mozgását, melyről egymás utáni felvételeket készítettünk.

PLAZMINOGÉN AKTIVÁCIÓS TESZT

Trombinnal alvasztott, érfalkomponensekkel módosított fibrin alvadékok felszínére tPA-t, és a plazmin egyik szintetikus szubsztrátját, a Spectrozyme-PL-t rétegeztük. A fibrinbe az alvasztás elején belekevert plazminogén a tPA hatására aktiválódik, és szintetikus szubsztrátjából a színes p-nitroanilint hasítja ki. A színes termék felhalmozódása követhető abszorbanciájának folyamatos mérésével. A mért értékeket az idő négyzetének függvényében ábrázolva lineáris összefüggést kapunk, mely egyenesek meredeksége a plazmin látszólagos aktivációs sebességét írja le.

REOLÓGIAI MÉRÉSEK

A módosított szerkezetű fibrinhálók viszkoelasztikus tulajdonságainak meghatározásához az általunk létrehozott fibrin alvadékokat oszcillációs reométerben vizsgáltuk. A minta tárolási modulusz és veszteségi modulusz értékeinek időbeli lefolyását követtük. A fibringél folyáshatárának meghatározásához a nyírófeszültséget lépcsőzetesen növeltük, és a relatív deformáció mérésének felhasználásával követtük a viszkozitást, amely a fibrinháló mechanikai szétesésénél

nullához közelít. A kritikus nyírófeszültség értékét a viszkozitás nullára történő extrapolációjával kaptuk meg, ez az érték jellemzi a gél – folyadék fázisátmenet (fibrinszálak elszakadásának) határát.

STATISZTIKAI ELEMZÉSEK

A fibrinszálátmérő elméleti eloszlását a mért adatok alapján Monte Carlo szimulációval adtuk meg és Kuiper teszttel értékeltük az eloszlások közötti különbségeket. A többi kísérlet eredményét Kolmogorov-Smirnov teszttel elemeztük, $p = 0,05$ -ös szignifikancia szintet véve alapul.

EREDMÉNYEK

ÉRFALKOMPONENSEK HATÁSA A FIBRINSZERKEZETRE

Az érfalkomponensek fibrinszerkezet-módosító hatásának vizsgálatához pásztázó elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk a mesterségesen létrehozott fibrinalvadékokról, és morfológiásan elemeztük azokat. A legjelentősebb változás az aortából tisztított glikozilált dekorin esetében jelentkezett: a fibrinszálak átmérőjét lényegesen megnövelte a csak fibrint tartalmazó alvadékhoz képest (85 ± 40 nm-ről 187 ± 121 nm-re). A kollagén fragmentumok és a dekorin fehérje jelenléte szintén szignifikánsan emelte a fibrinszálak

átmérőjét. Csak a legmagasabb koncentrációban vizsgált kollagén fragmentumok esetében tapasztaltunk csökkenést a fibrinszálak átmérőjében, 5 – 100 µg/ml tartományban vizsgálva a szálátmérők folyamatos növekedését okozzák.

A dermatán-szulfát (DS) és a kondroitin-szulfát (CS) által módosított alvadékok szálátmérője szignifikánsan nem változik a kontrollhoz képest.

MÓDOSÍTOTT ALVADÉKOK LÍTIKUS REZISZTENCIÁJA

Az érfalkomponensekkel módosított alvadékok lítikus rezisztenciáját vizsgáltuk a plazmin általi lebontással szemben. Ennek a modellezésére fibrinogénbe 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. 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. Leginkább szembetűnő a változás a CS-al és DS-al módosított alvadékok esetében, melyekben a lízis kevesebb mint feleannyi idő alatt zajlott le. 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. Az általunk alkalmazott vizsgálati körülmények közt egyik vizsgált enzim amidolitikus aktivitása sem változott meg.

PLAZMINOGÉN AKTIVÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

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. A látszólagos plazminogén aktivációs sebesség szignifikánsan csökken abban az esetben, amikor a vizsgált érmátrix alkotók is jelen vannak a fibrin polimerizációja során.

Mivel fibrinmentes környezetben történő plazminogén aktiváció során a vizsgált makromolekulák nem változtatják meg a plazminogén aktiváció sebességét, ezért változásának oka az általuk megváltoztatott fibrinfelszínben keresendő, amely befolyásolja a tPA és a plazminogén kötődését is.

YFP-tPA PENETRÁCIÓJA A FIBRINBE

Mindegyik vizsgált komponens esetében a YFP-tPA kezdetben egy vékony rétegbe tömörül a rögek 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 határréteget figyeltünk meg a fibrin felszínén. A többi esetben a tPA a vékony fibrinfelszíni rétegben maradt, illetve a részlegesen degradált fibrin csomókhoz kolokalizálódott. Legjelentősebb változás a glikozilált dekorinnal módosított alvadék lízisében nyilvánult meg, esetében a tPA front relatív migrációs sebessége kétszer gyorsabb a csak fibrint tartalmazó kontrollhoz képest.

VÉRPLAZMÁT TARTALMAZÓ ALVADÉKOK VIZSGÁLATA

A vizsgált anyagokat sejtmentes vérplazmával keverve a tPA-val indított lízis során az érfalkomponensek hatása hasonló a csak fibrines rendszerben tapasztaltakhoz: a lízis felgyorsul minden esetben, mint ahogy azt a plazmával indított lízis során is láthattuk. Dermatán-szulfát esetében igazoltuk annak antitrombotikus hatását, hiszen jelenlétében fibrinháló kialakulását nem tapasztaltuk.

A FIBRINHÁLÓ MECHANIKAI STABILITÁSA

Az érfalkomponensekkel módosított fibrinhálók szerkezeti

stabilitását reológiai paramétereik mérésével vizsgáltuk. Az aorta dekorint és a kollagén fragmentumokat kivéve egyik vizsgált komponens sem befolyásolta szignifikánsan a vizsgált G' (tárolási modulus) és G'' (veszteségi modulus) értékeket. A kollagén fragmentumok kis mértékben csökkentik a G' értéket. Az aorta dekorin esetében tapasztalható a legjelentősebb rigiditásbeli eltérés. A dekorin fehérjét kivéve a többi érmátrix komponens 16 – 45 % közt csökkentették a kritikus nyírófeszültség értéket.

KÖVETKEZTETÉSEK

Az *in vitro* létrehozott fibrinalvadék mechanikai stabilitása jelentősen kisebb abban az esetben, ha kialakulása során érfalkomponensek is beépülnek szerkezetébe. A szerkezeti stabilitás csökkenése mellett a plazmin katalizálta fibrinolízis sebessége viszont megemelkedik. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy amennyiben az *in vivo* körülmények közt kialakuló trombus proteázok által az érfalból felszabadított makromolekuláris komponenseket is magába zár, mechanikai erők hatására, illetve a trombolitikus folyamatok következtében keletkezése helyéről könnyebben leválhat, növelve ezzel az emboliás szövődmények és az ischaemiás szöveti károsodások valószínűségét.

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 ÉRTEKEZÉSHEZ 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.