

# **A fibrinháló képződésének és lízisének morfológiai és nanomechanikai vizsgálata atomerő-mikroszkópiával**

**Doktori értekezés**

**Dr. Feller Tímea**

**Semmelweis Egyetem**

**Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola**



Témavezető: Dr. Kellermayer Miklós DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kiss Levente PhD, egyetemi adjunktus

Dr. Végh Attila Gergely PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Prohászka Zoltán DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Dobay Orsolya PhD, egyetemi docens

Dr. Grama László PhD, egyetemi docens

**Budapest  
2019**

# Tartalomjegyzék

<b>1</b>	<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>4</b>
1.1	RÖVIDÍTÉSEK .....	4
1.2	FIZIKAI VÁLTOZÓK.....	5
1.3	DEFINÍCIÓK ÉS GYAKRAN HASZNÁLT KIFEJEZÉSEK ÉRTELMEZÉSE .....	5
<b>2</b>	<b>BEVEZETÉS .....</b>	<b>8</b>
2.1	A VÉRALVADÁS BIOLÓGIAI JELENTŐSÉGE .....	8
2.2	A FIBRINHÁLÓ SZEREPE A HEMOSZTÁZISBAN.....	9
2.3	A FIBRINOGÉN ÁTALAKULÁSA, A FIBRINHÁLÓ KIALAKULÁSA ÉS SZERKEZETE .....	9
2.3.1	<i>A fibrinogén.....</i>	<i>10</i>
2.3.2	<i>A fibrin monomer képződése .....</i>	<i>11</i>
2.3.3	<i>A protofibrillumok kialakulása és szerkezete .....</i>	<i>12</i>
2.3.4	<i>A fibrinszálak kialakulása és szerkezete .....</i>	<i>14</i>
2.3.5	<i>A fibrinháló kialakulása.....</i>	<i>16</i>
2.3.5.1	Trombin hatása a fibrinháló szerkezetére .....	17
2.3.5.2	Faktor XIII hatása a fibrinháló szerkezetére.....	17
2.4	A FIBRIN MECHANIKAI JELLEMZŐI.....	18
2.4.1	<i>A hálózatos szerkezetből adódó mechanikai tulajdonságok .....</i>	<i>18</i>
2.4.1.1	Oscillációs elven alapuló reométerek.....	19
2.4.1.2	Trombelasztográfia.....	21
2.4.2	<i>Az egyedi szálak szerkezetéből adódó mechanikai tulajdonságok .....</i>	<i>23</i>
2.4.3	<i>A mechanikai tulajdonságok molekuláris eredete.....</i>	<i>24</i>
2.4.3.1	A coiled coil régió szerepe a fibrin mechanikai tulajdonságaiban .....	25
2.4.3.2	Az $\alpha$ C régió szerepe fibrin mechanikai tulajdonságaiban .....	25
2.5	AZ ALVADÉK FEOLDÁSA: FIBRINOLÍZIS .....	26
2.6	ATOMERŐ-MIKROSKÓPIA (AFM) ELVE, ALKALMAZÁSA.....	29
<b>3</b>	<b>CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>MÓDSZEREK.....</b>	<b>34</b>
4.1	FELHASZNÁLT ANYAGOK.....	34
4.2	FIBRINHÁLÓ KÉSZÍTÉSE PLAZMAMINTÁBÓL, MECHANIKAI TULAJDONSÁGOK MÉRÉSE AFM-MEL: NANO-TROMBELASZTOGRÁFIA .....	35
4.3	FIBRINHÁLÓ KÉSZÍTÉSE PLAZMAMINTÁBÓL, TOPOLOGIAI ANALÍZIS AFM-MEL.....	35
4.4	PLAZMÁBÓL ALVASZTOTT HÁLÓ FIBRINOLÍZISE SZTREPTOKINÁZZAL.....	36

4.5	KVÁZI-2D FIBRINHÁLÓ ELŐÁLLÍTÁSA TISZTÍTOTT FIBRINOGENBŐL.....	36
4.6	TISZTÍTOTT FIBRINOGEN FXIII TARTALMÁNAK VÁLTOZTATÁSA .....	37
4.7	KVÁZI-2D HÁLÓ FIBRINOLÍZISE PLAZMINNAL.....	37
4.8	AFM KÉPALKOTÁS KVÁZI-2D HÁLÓN .....	37
4.9	AZ AFM TŰ GEOMETRIÁJÁNAK HATÁSA A SZÁLAK MORFOLÓGIAI KÉPÉRE .....	38
4.10	A SZÁLAK MORFOLÓGIÁJÁNAK STATISZTIKAI ÖSSZEHASONLÍTÁSA .....	39
<b>5</b>	<b>EREDMÉNYEK.....</b>	<b>40</b>
5.1	FIBRINHÁLÓ MECHANIKAI JELLEMZÉSE NANO-TROMBELASZTOGRÁFIÁVAL (NTEG) 40	
5.1.1	<i>A rugólapka fel-le mozgási sebességének változtatása nTEG során .....</i>	<i>45</i>
5.1.2	<i>Sztreptokináz (STK) indukált fibrinolízis követése nTEG-gel.....</i>	<i>47</i>
5.2	A FIBRINHÁLÓ ÉS A SZÁLAK MORFOLÓGIÁJA, LÍZISE .....	48
5.3	KVÁZI-2D FIBRINHÁLÓ KÉSZÍTÉSE TISZTÍTOTT FIBRINOGENBŐL, A HÁLÓ JELLEMZÉSE	50
5.3.1	<i>Az AFM tű geometriájának hatása a szálak morfológiai képére .....</i>	<i>52</i>
5.3.2	<i>A fibrinháló szerkezetét befolyásoló tényezők.....</i>	<i>52</i>
5.3.2.1	Trombinaktivitás csökkentése .....	52
5.3.2.2	Kloridion koncentráció csökkentése .....	53
5.4	KVÁZI-2D HÁLÓ PLAZMIN-INDUKÁLT FIBRINOLÍZISE .....	55
5.4.1	<i>Dehidrációs lépések hatása a hálóra és az emésztésre.....</i>	<i>57</i>
5.4.2	<i>Fibrinogén FXIII tartalma és a plazminolízis összefüggése. ....</i>	<i>60</i>
5.4.2.1	FXIII mentes fibrinogénből alvasztott minta morfológiai képe és lízise.....	61
5.4.2.2	Hozzáadott FXIII hatása az alvasztott minta morfológiai képére és lízisére.....	63
5.4.3	<i>Egyedi szál emésztésének valós idejű követése .....</i>	<i>65</i>
5.4.4	<i>Szálak oldalirányú összerendeződése a lízis során.....</i>	<i>67</i>
<b>6</b>	<b>MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>69</b>
6.1	A FIBRINHÁLÓ MECHANIKAI TULAJDONSÁGÁNAK MÉRÉSE NANO-TROMBELASZTOGRÁFIÁVAL (NTEG).....	69
6.1.1	<i>A hálózatos mechanikai tulajdonságok vizsgálata.....</i>	<i>70</i>
6.1.2	<i>A rugólapka fel-le mozgási sebességének változtatása.....</i>	<i>72</i>
6.1.3	<i>nTEG és TEG eredmények összevetése.....</i>	<i>73</i>
6.1.4	<i>Fibrinolízis vizsgálata nTEG-gel.....</i>	<i>75</i>
6.2	PLAZMÁBÓL ALVASZTOTT ÉS LIZÁLT FIBRINHÁLÓ ÉS FIBRINSZÁL MORFOLÓGIÁJA ...	75
6.3	KVÁZI-2D HÁLÓ.....	77
6.3.1	<i>A kvázi-2D háló és az azt felépítő szálak morfológiai képe .....</i>	<i>77</i>

6.3.2	<i>Trombin és NaCl hatása a szálak morfológiájára</i> .....	78
6.3.3	<i>Az egymást követő dehidrációs lépések hatása a szálakra</i> .....	78
6.3.4	<i>FXIII hatása a szálak morfológiájára és emésztésére</i> .....	79
6.3.5	<i>Egyedi fibrinszál emésztésének időbeli követése</i> .....	80
6.3.6	<i>Szálak oldalirányú összerendeződése a lízis folyamán</i> .....	81
6.4	PLAZMIN INDUKÁLT EMÉSZTÉS MODELLJE .....	82
<b>7</b>	<b>KÖVETKEZTETÉSEK</b> .....	<b>84</b>
<b>8</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	<b>86</b>
<b>9</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>87</b>
<b>10</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	<b>88</b>
<b>11</b>	<b>SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE</b> .....	<b>95</b>
<b>12</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	<b>96</b>

# 1 Rövidítések jegyzéke

## 1.1 Rövidítések

2D	Kétdimenziós
AFM	Atomic force microscope = Atomierő-mikroszkóp
Da	Dalton = atomi tömegegység, $1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
DLS	Dynamic light scattering = dinamikus fényszórásmérés
FpA	Fibrinopeptid A
FpB	Fibrinopeptid B
FTIR	Fourier transzformációs infravörös spektroszópia
FWHM	Full width at half maximum = félmagasságnál mért szélesség
FXII	12-es alvadási faktor
FXIII	13-as alvadási faktor
FXIIIa	Aktivált 13-as alvadási faktor
IU	International Unit = Nemzetközi egység
MFP	Molecular Force Probe = Molekuláris erőpróba
MQ	Millipore készülékkel előállított, $\geq 18 \text{ M}\Omega$ ellenállású tisztított víz
NET	Neutrophil extracellular trap = Neutrofil extracelluláris csapda
nTEG	Nano-trombelasztográfia
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis = poliakrilamid gélelektroforézis
PPP	Platelet poor plasma = Trombocitaszegény plazma
PRP	Platelet rich plasma = Trombocitagazdag plazma
SAXS	Small-angle X-ray scattering = kisszögű röntgenszórás
SD	Standard deviation = szórás az adott mintán belül
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate = nátrium dodecil-szulfát
SEM	Standard error of the mean = középérték közepes hibája
STK	Sztreptokináz
TEG	Trombelasztográfia
tPA	Szöveti plazminogén aktivátor
uPA	Urokináz típusú plazminogén aktivátor

## 1.2 Fizikai változók

Név	Jelölése	Mértékegység
Erő	F	[N]
Mechanikai feszültség	F/A	[Pa] vagy [N/m <sup>2</sup> ]
Erőkülönbség	$\Delta F$	[N]
Young modulus	$\Delta\sigma/\Delta\varepsilon$	[N/m]
Gyorsulási erő	F	g

## 1.3 Definíciók és gyakran használt kifejezések értelmezése

**a:** atto,  $10^{-18}$

**A és B knob:** Fibrinogén-molekula  $\alpha$  és  $\beta$  láncának N terminális végén, trombin hatására szabaddá váló peptidszakaszok, melyek részt vesznek az E és D domének közötti A:a és a B:b knob-hole kötés kialakításában.

**A:a knob-hole:** az A-knob és a-hole között kialakuló erős kölcsönhatás, mely a fibrin polimerizáció kezdeti és elengedhetetlen lépése.

**a- és b-hole:** Fibrinogén molekula D doménjén mindig jelenlévő lyukszerű szekvencia, melybe az A- és B knob kötődik. Részt vesznek az a:A és B knob-hole kötés kialakításában.

**$\alpha$ -hélix:** Fehérjék másodlagos térszerkezete, melyben az aminosavak egy jobbmenetes spirálba (hélixbe) rendeződnek.

**$\beta$ -redő:** Fehérjék másodlagos térszerkezete, melyben az aminosavak lemezszerűen rendeződnek el, egyfajta hullámvonalat alkotnak.

**Coiled-coil:** Olyan struktúra, mely az  $\alpha$ -helikális fehérjeláncok egymás köré tekeredésének eredményeként alakul ki.

**Dilatáns folyadék:** Olyan nemnewtoni folyadék, melynek viszkozitása a sebességgradiens növekedésével nő. A dilatáns viselkedés szuszpenziókra, kolloid oldatokra jellemző erőválasz.

**Disszipált energia:** Mechanikai manipuláció során vissza nem nyert energia. Mértékét a húzási és az engedési görbék által bezárt terület nagysága jellemzi. (lásd 12. Ábra D része) Mértékegysége: [J]

**Disszipált energia (%):** A rendszer által disszipált energiának a teljes befektetett energiához viszonyított százalékos értéke. Mértékét a húzási és engedési görbék által bezárt területet és a húzási görbe alatti terület hányadosa adja, százalékban kifejezve.

**Erőkülönbség ( $\Delta F$ ):** a húzási görbe minimuma és maximuma közti erőkülönbség (lásd **12. Ábra D része**). Mértékegysége: [N]

**Hiszterézis:** A húzási és engedési görbék által bezárt terület (lásd **12. Ábra D része**).

**Húzási felkeményedés:** Növekvő mechanikai feszültség hatására a test rugalmasságát jellemző Young modulus növekszik.

**f:** femto,  $10^{-15}$

**Fibrin(ogén):** A fibrin és fibrinogén együttes jelenlétére utaló kifejezés.

**Fibrinszál:** Protofibrillumok oldalirányú kapcsolódásának eredményként létrejövő struktúra. Az oldalirányú kapcsolódás mellett a protofibrillumok hosszirányban is növekednek.

**Fibrinfibrinháló:** A fibrinszálakból, azok elágazása révén felépülő háromdimenziós polimer, a véralvadék háromdimenziós váza.

**Fibrin köteg:** Különálló fibrinszálak összekapcsolódásának eredményeként keletkező struktúra.

**Mechanikai feszültség ( $\sigma$ ):** Szilárd testek deformált állapotában a test belsejében fellépő feszültség. Mértékegysége: [Pa]

**n:** nano,  $10^{-9}$

**Nyírófeszültség:** Egységnyi felületre vonatkoztatott/ normalizált nyíróerő. Mértékegysége: [N/m<sup>2</sup>]

**Oligomer:** 20-25 monomerből álló rövid protofibrillum.

**p:** piko,  $10^{-12}$

**Protofibrillum:** A fibrin monomerekből létrejövő struktúra, amelyből a későbbiekben a fibrinszálak felépülnek (lásd **2. Ábra A része**). Kétmolekula vastag sodronyszerű szerkezet, amelyen belül a monomerek egymáson átlapoló módon, fél monomerhosszal elcsúsztatva kötődnek egymáshoz (half struggled double stranded).

**Pseudoplasztikus folyadék:** Olyan folyadék, melynek viszkozitása növekvő sebességgradiens mellett csökken. Ilyen például a vér.

**Rugalmassági modulus, Young modulus:** egységnyi megnyúláshoz ( $\Delta\varepsilon$ ) szükséges mechanikai feszültség ( $\Delta\sigma$ ). Mértékegysége: [Pa]



## 2 Bevezetés

A véralvadás során a vérben keringő fibrinogénből egy háromdimenziós szerkezet, a fibrinháló alakul ki. A fibrinháló az alvadék vázataként szolgál. Ellenállva a véráramlás következtében fellépő nyíróerőnek, fontos mechanikai szerepet játszik a hemosztázisban. A háló bonyolult térbeli szerveződése viszont nagyban megnehezíti a kialakult fibrinszálak szerkezeti és mechanikai tulajdonságainak vizsgálatát. Többek között a nanobiofizikai eszközök fejlődése, így doktori munkám fő vizsgálati eszközét jelentő AFM lehetővé tették a fehérvérjék, így a fibrinháló szerkezeti és mechanikai tulajdonságainak további megismerését. PhD munkám témája a véralvadás és fibrinolízis nanobiofizikai vizsgálata AFM alkalmazásával, ezért a következő részben először a vizsgálataim tárgyát képező biológiai rendszert, majd az atomierő-mikroszkópos képalkotás és erőspektroszkópia elvét és alkalmazását mutatom be az irodalom tükrében.

### 2.1 A véralvadás biológiai jelentősége

A fibrinháló a biomechanikai erőknek ellenálló véralvadék háromdimenziós váza. Érsérülésre bekövetkező vérzés megállítására szolgáló mechanizmus során a keringő fibrinogén molekulákból képződik. A fibrinogénből kialakuló fibrinalvadék a természet egyik legerősebb szálaiból felépített háló. Képződése során magába köti és lokalizálja a hemosztázis sejtes- (trombociták, vörösvértestek, fehérvérsejtek) és humorális (alvadási faktorok, molekulák) elemeit (1). A fiziológiás sebgyógyulás során a fibrinháló elbomlik, az érfal regenerálódik.

A véralvadás tehát az ér sérülése esetén elinduló folyamat, melynek célja a vérvesztés megakadályozása. Az érfal endotél rétegének sérülése következtében a keringő vér humorális és celluláris elemei kapcsolatba kerülnek az endotél alatti, ám a sérülés során felszabaduló tromboaktív anyagokkal, rostokkal, mint például a szöveti faktorról és a kollagénnel. Ezáltal elindul a trombusképződés és az alvadási kaszkád összetett folyamata. Eredményeképpen a további vérvesztést megakadályozó alvadék, vérrög jön létre. Patológiás esetben az alvadékképződés lehet elégtelen vagy túlzott, amely két ellentétes folyamathoz, vérzési rendellenességhez vagy trombózishoz vezet.

A véralvadás folyamata a hemosztázis celluláris és humorális faktorai és az érfalat felépítő sejtek és a biomechanikai erők pontosan szabályozott együttműködését

feltételezi. A biomechanikai erők, amelyeket a vér áramlása, az érfal feszessége és a vérnyomás kelt, többségében nyíró-, sűrűdési- és húzóerők. Ezen biomechanikai erők szabályozzák az érfal fejlődését, a vaszkuláris homeosztázis fenntartását és a trombusképződés-vérzés egyensúlyi folyamatát.

## **2.2 A fibrinháló szerepe a hemosztázisban**

Az áramlás által keltett nyíró-, sűrűdési és húzóerőknek ellenálló alvadék mechanikai tulajdonságait a fibrinháló biztosítja. Ezek az erők a fibrinháló, ezáltal az alvadék szükségszerű deformációját is eredményezik (2-4). Az erők nagysága fiziológiai körülmények között jelentősen különbözik a keringési rendszer különböző pontjain. Például a nyírófeszültség vénákban alacsony (0,1 Pa), míg az artériákban magas (7 Pa). Az eltérő nagyságú erők miatt a létrejövő alvadék is különböző: vénás rendszerben a fibrinogéndús, artériásban trombocitadús alvadék képződése a jellemző. A trombocitadús alvadékban a trombociták kontrakciója is egy fiziológiai esemény, ami szintén a fibrinháló deformációjához vezet (5). A fibrinháló mechanikai jellemzői alapvetően meghatározzák a különböző vérzéses vagy trombotikus események kimenetelét (6), ezt részletesen a 2.4 fejezetben tárgyalom. Az alvadék feloldása/ lízise is nagymértékben függ a kialakult alvadék mechanikai tulajdonságaitól, és mind a fibrinképződés mind a lebomlás folyamata trombólízis kialakulásához vezethet, amennyiben jól szabályozott mechanizmusuk meghibásodik.

A hemosztázis biokémiai és laboratóriumi diagnosztikai vizsgálatának alapja az alvadást gátolt vérből differenciál-centrifugálással készített trombocitadús vagy trombocitaszegény plazma. A trombocitadús plazma a celluláris hemosztázis-, ezen belül is elsősorban a trombociták hatásának vizsgálatára szolgál, míg a trombocitaszegény plazma a humorális alkotók, többek között a fibrinogénből képződő alvadék és a fibrinháló jellemzésére alkalmas.

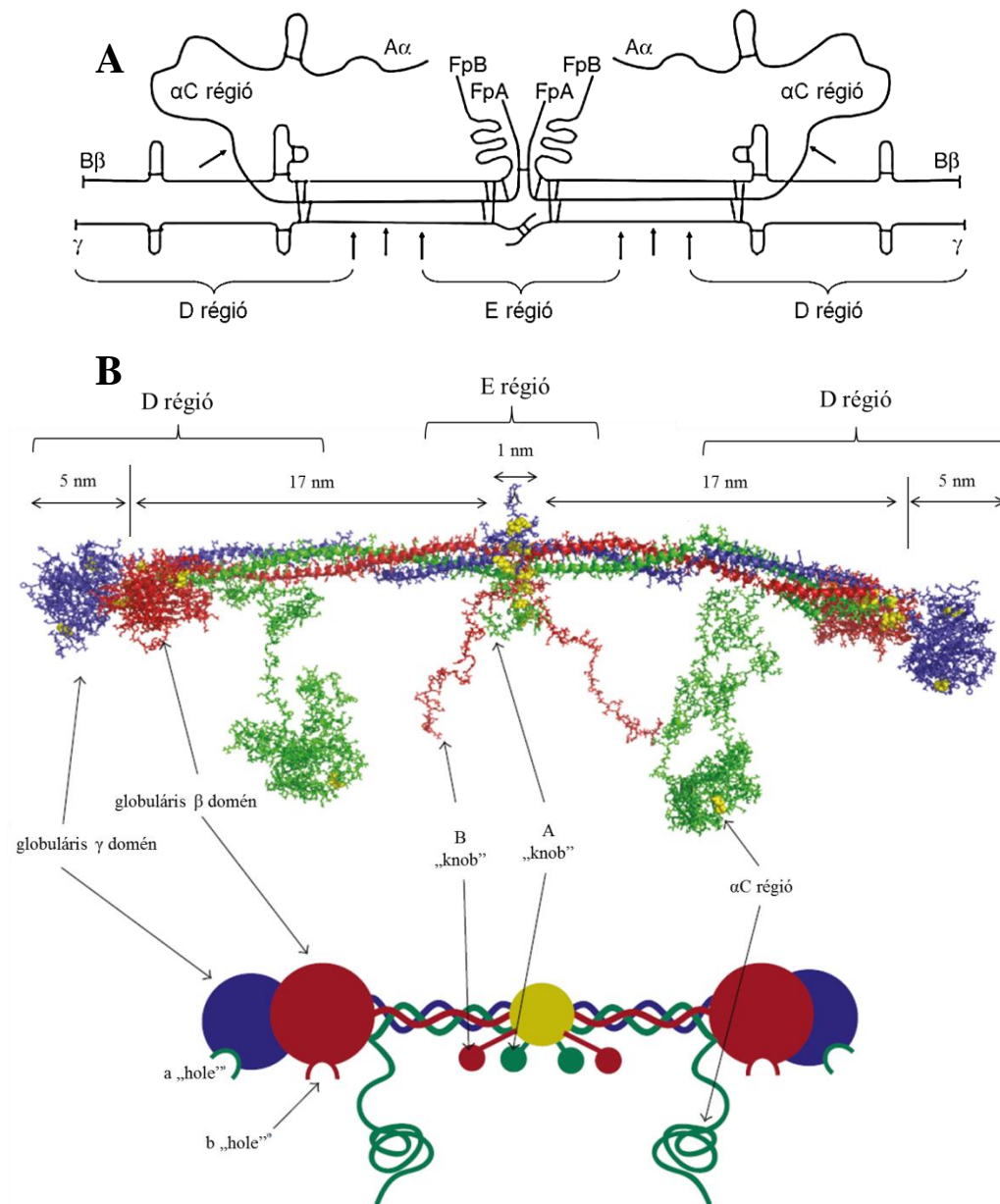
## **2.3 A fibrinogén átalakulása, a fibrinháló kialakulása és szerkezete**

Az alvadék vázaként szolgáló fibrinháló kialakulása többlépcsős folyamat. Először a vérben monomerként keringő fibrinogén trombin hatására összekapcsolódásra képes fibrin molekulává alakul át. A fibrin monomerek először oligomerekké polimerizálódnak, amelyekből protofibrillumok majd szálak épülnek fel. Végül a szálak elágazásainak eredményeként létrejön a háromdimenziós fibrinháló.

### 2.3.1 A fibrinogén

A vérben keringő fibrinogén a fibrinháló alapmolekulája. A fibrinogén monomer egy 340 kDa méretű glikoprotein, mely három pár polipeptid láncból, az A $\alpha$  B $\beta$  és  $\gamma$  láncokból épül fel, melyeket 29 diszulfid híd tart össze (**1. Ábra A része**). Az A $\alpha$  és a B $\beta$  láncok jelölésében az A és B betűk a trombin által később lehasított fibrinopeptid A-t és B-t jelölik (7). A fibrinogén monomer hossza megközelítőleg 45 nm, átmérője 4,5 nm (8).

Az N-terminális régiókban diszulfid hidakkal összekapcsolt molekulalánc-párok középső része a fibrinogén-molekula E régiója. A  $\beta$  és  $\gamma$  láncok C terminális végein lévő globuláris szerkezet a D régió, melyet egy „coiled-coil” szakasz köt össze a középső globuláris E régióval. A „coiled-coil” az  $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\gamma$  láncok egymás köré tekeredő  $\alpha$ -helikális szakaszaiból áll (9).



**1. Ábra. A rész:** Fibrinogén-molekula sematikus szerkezeti képe. Medved, 2009 (7)ábrája módosítva. **B rész:** Fibrin monomer szerkezetének sémája krisztallográfias és molekuladinamikai módszerrel meghatározva. Az  $\alpha$  láncot zöld, a  $\beta$  láncot piros, míg a  $\gamma$  láncot kék szín jelöli. Hudson, 2017 (10) ábrája módosítva. A távolságok Litvinov, 2017 (11) alapján jelölve.

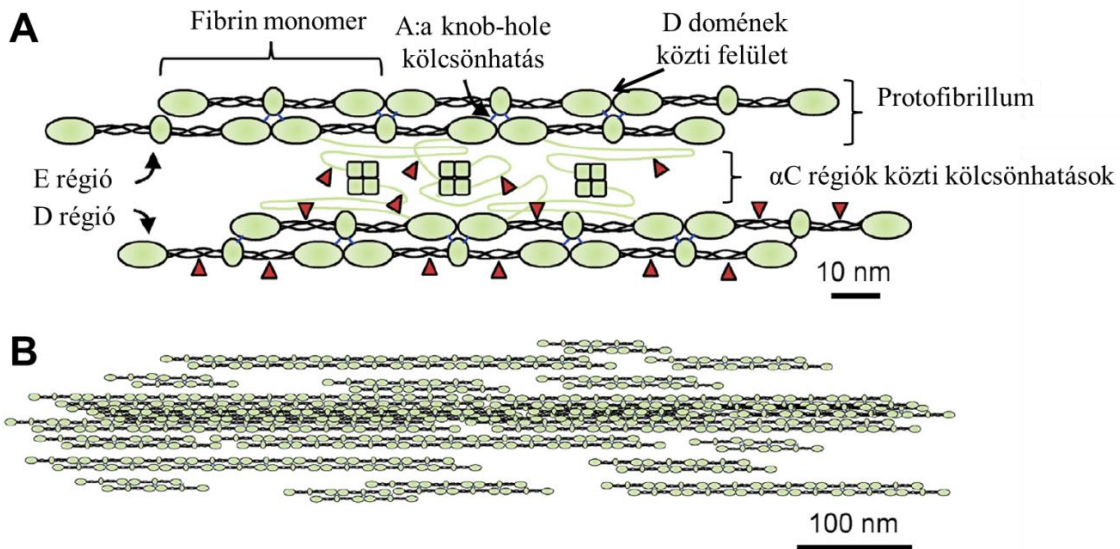
### 2.3.2 A fibrin monomer képződése

A fibrinogén hasítását egy szerin proteáz, a trombin nevű enzim végzi, amely először a fibrinopeptid A-t (FpA), majd a fibrinopeptid B-t (FpB) hasítja le a fibrinogén E régiójában, ezáltal fibrin keletkezik. A FpA és FpB a keringésbe távozik. Az  $\alpha$

valamint a  $\beta$  láncok N terminális végeinek konformáció-változásával a fibrin polimerizációjához szükséges A és B „knob” szabaddá válik (**1. Ábra B része**). A konformációs átalakulások következtében a fibrinogén-molekula központi E doménjéről szabaddá válik az  $\alpha$  lánc egy része, az  $\alpha C$  régió is (12). A monomerként keringő fibrinogén így térhálósodásra képes fibrinné alakul át. Ez a fibrin monomer, amelyet a diszulfid hidakkal összetartott  $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\gamma$  láncpárok alkotnak.

### 2.3.3 A protofibrillumok kialakulása és szerkezete

A szabaddá váló A „knob” erős, specifikus kölcsönhatást létesít egy másik fibrinmolekula  $\gamma$  láncának globuláris végén található „a hole”-lal. A kölcsönhatást A:a "knob-hole" kötésnek nevezi az irodalom. A polimerizáció következő lépésében a harmadik monomer az előző dimerhez a globuláris D régiókon keresztül gyenge D:D kölcsönhatással kapcsolódik (13). A monomerek így egymáshoz kapcsolódva egy kétmolekula vastag sodronyszerű szerkezetet építenek fel, melyet protofibrillumnak nevezünk (**2. Ábra A része**). A monomerek egymáshoz kapcsolódásának, a polimerizációnak szükséges feltétele az A:a "knob-hole" kötés kialakulása. Az A:a "knob-hole" kötések önmagukban elegendőek a fibrin további polimerizációjához (14), de más, gyengébb kötések is meghatározóak a polimerizáció során. Nagyfelbontású atomerő-mikroszkópiás felvételeken alapuló molekuladinamikai szimulációkkal kimutatták, hogy a "knob-hole" kötések mellett más, D-D és D-E régiók között kialakuló kapcsolatok is jelen vannak, amelyek irányítják az oligomerizációt és erősítik a fibrin protofibrillumokon belüli kölcsönhatásokat (15).



**2. Ábra. A fibrinszál felépülése. A rész:** Hat fibrin monomerből felépülő protofibrillum. A monomerek közötti kapcsolat az  $\alpha$ C régiókon keresztül valósul meg. A dolgozatban később lesz szó a piros nyilfejekkel jelzett plazmin hasítási helyekről. Az  $\alpha$ C régió két szakaszból áll: a rendezetlen szerkezetű 61 nm hosszú  $\alpha$ C összekötő régióból (ábrán zöld vonal jelöli) és a feltekeredett  $\alpha$ C doménből (zöld négyszögekkel jelölve). **B rész:** A protofibrillumok elhelyezkedésének modellje a fibrin szálban. A Guthold munkacsoport (16) ábrája alapján.

A protofibrillumok a fibrin polimerizációjának kritikus fontosságú köztes termékei. A protofibrillum fibrin monomerekből felépülő kettős fehérjelánc, ahol a két lánc egymáshoz képest fél monomerral el van csúsztatva (**2. Ábra A része**) („two stranded, half staggered” (7)).

A protofibrillumok spirális szerkezetűek, de egy spirálmenet hossza és a spirál sugara is nagymértékű változatosságot mutat. Nagyfelbontású AFM felvételek alapján a polimerizáció során a D:D domének egymáshoz viszonyított helyzete egyenes konformációból hajlított konformációba alakulhat át. Ilyenkor a protofibrillumok csavarodottabb, kompaktabb szerkezetet vesznek fel. A konformációs átalakulás következtében a spirálmenet hossza 400 nm-re, míg a spirál sugara 5 nm-re csökken (17).

### 2.3.4 A fibrinszálak kialakulása és szerkezete

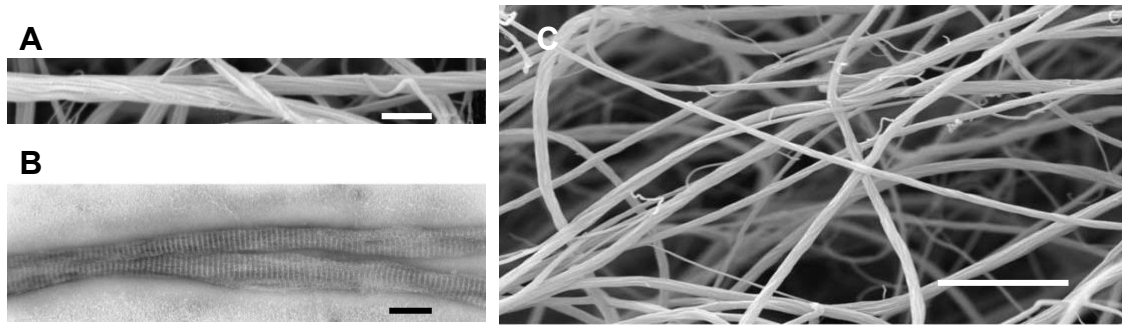
Megközelítőleg 20-25 monomerhossznyi protofibrillum képződése után a protofibrillumok egymással oldalirányú kölcsönhatásokat létesítenek (14). A protofibrillumok oldalirányú kölcsönhatása révén létrejött struktúrák a fibrinszálak, amelyek szélessége és magassága tág határokon belül változhat. DLS és SAXS mérések alapján a szál felépítő protofibrillumok száma nagymértékű változatosságot mutat. Akár 200 protofibrillumot is tartalmazhat egy szál (18, 19), de már a két protofibrillum oldalirányú kapcsolódásának eredményként létrejövő struktúrát is szálnak nevezzük. Nemcsak a szálon belüli protofibrillumok száma különbözhet, hanem a protofibrillumoknak a szál keresztmetszetére vonatkoztatott sűrűsége is nagymértékű változatosságot mutat különböző alvadási körülmények esetén. A szálon belüli protofibrillumok száma, sűrűsége és a közöttük kialakuló oldalirányú kölcsönhatások meghatározzák a képződő szál átmérőjét, ezáltal hatással vannak a kialakult szál mechanikai jellemzőire is (19, 20). A szál mechanikai tulajdonságait nagymértékben meghatározó fontos szerepük ellenére a protofibrillumok közötti oldalirányú kölcsönhatások létrejöttének pontos mechanizmusa, az ebben szerepet játszó struktúrák és a kialakulásukat vezérlő erők nagyrészt ismeretlenek (17). A B:b "knob-hole" kölcsönhatásoknak szerepük van a protofibrillumok közötti oldalirányú kölcsönhatásokban is (21). Bár a B:b "knob-hole" kölcsönhatások jelenléte nem szükségszerű feltétele a szálak kialakulásának, hiányuk vékony szálakból felépülő hálót eredményez (14). Más munkák az  $\alpha C$  domén szerepét emelik ki az oldalirányú kölcsönhatások esetében (22, 23). AFM felvételek alapján az elágazási pontokban összefonódó  $\alpha C$  régiók találhatóak, melyek a protofibrillumokat „cipzárszerűen” kapcsolják össze (12). Az  $\alpha C$  összeköttetések fontos tényezők a kialakult szál mechanikai tulajdonságaiban (24), a kialakult szálak vastagságát is befolyásolhatják (17) (lásd 2.4.3.2) (**2. Ábra**). A XIII-as alvadási faktor (FXIII) a kialakult  $\alpha C$  összeköttetéseket  $\alpha$ - $\alpha$  keresztkötések által stabilizálja,  $\alpha$  polimereket hoz létre, ezáltal szintén megváltoztatva a szál mechanikai tulajdonságait (25).

A szálon belül a protofibrillumok térbeli elhelyezkedése nem teljesen ismert. A szál egy porózus szerkezet, térfogatának 20-30%-a fehérje, 70-80%-a víz. Lehetséges, hogy a szál parakristályos szerkezetű, azaz hosszirányban rendezettebb mint oldalirányban. A protofibrillumok közti távolság nem homogén a szálon belül, növekvő

sugárral növekedhet (20, 26). Más források kvázikristályos, azaz ismétlődő egységekből felépülő szerkezetet javasolnak  $19 \times 19 \times 45$  nm-es cellaállandóval (27), melyet AFM és kisszögű röntgenszórás (SAXS) mérések alapján fraktál szerkezettel egészítettek ki (18, 28). A különböző átmérőjű szálak elszakításához szükséges erő az átmérő 1,3-as hatványával arányos. Ez alapján kiszámították, hogy a protofibrillumok sűrűsége az átmérő 0,6 hatványával arányos, azaz a vékonyabb szálakban a protofibrillumok sűrűbben rendezettek, mint a vastag szálakban (29). A jelenleg rendelkezésünkre álló modellek egyike sem veszi figyelembe a protofibrillumokat összekötő  $\alpha$  polimereket (10).

A szálakat a csavart szerkezetű protofibrillumok egymás köré tekeredve építik fel. Weisel szerint a protofibrillumokból kialakuló szálak 20-60 nm széles csavart („twisted”) szerkezetként jelennek meg elektronmikroszkópiás felvételeken, melyben egy csavarment hossza  $\sim 2000$  nm (26) (**3. Ábra A része**). A csavart szerkezet mellett a fibrin monomerek globuláris doménjeinek elhelyezkedése a szál felszínén hosszirányban 22,5 nm-es periodicitást hoz létre (**3. Ábra B része**). Ennek értéke érdekes módon minden irodalmi adat szerint megtartott, függetlenül az alvadás körülményeitől vagy a kialakult szál vastagságától. A meghatározott ismétlődési távolság következménye, hogy a szál képződése során, a keresztmetszet növekedésével, az újabb beépülő monomerek egyre inkább meg kell nyúlnia, hogy a csavarodott szerkezet ellenére a 22,5 nm-es periodicitás megmaradjon. Ez akár a szál keresztmetszeti növekedésének egyfajta termodinamikai kontrollja is lehet: egy újabb monomer csak akkor tud hozzáadódni a szálhoz, ha a bekötődésével felszabaduló energia nagyobb, mint ami a megnyúláshoz szükséges (14).





**3. Ábra.** Elektronmikroszkópos felvétel fibrinszálaokról és a hálóról. A Weisel munkacsoport ábrái (30). **A rész:** pásztázó elektronmikroszkópiás felvétel fibrinszálaokról. A csavart szerkezet jól megfigyelhető. Osztás:  $1\mu\text{m}$ . **B rész:** Transzmissziós elektronmikroszkópiás felvétel fibrinszálaokról. A  $22,5\text{ nm}$ -es periodicitás jól megfigyelhető. Osztás:  $0,2\mu\text{m}$ . **C rész:** Fibrinháló pásztázó elektronmikroszkópos képe. Osztás:  $5\mu\text{m}$ .

### 2.3.5 A fibrinháló kialakulása

A háromdimenziós háló a fenti mechanizmussal kialakult fibrinszálaokból épül fel (**3. Ábra C része**). Más fehérje beékelődése a hálózatos szerkezet kialakításához nem szükséges (31). A háromdimenziós szerkezet elágazások által valósul meg (11, 12), melyek jellemzően három, ritkább esetekben négy szálból felépülő elágazási pontok (32). Jelenlegi ismereteink szerint a protofibrillumok oldalirányú kapcsolódása, ezáltal a szál szélességének, vastagságának a növekedése és az elágazás kompetitív folyamatok. Ha a minta a protofibrillumok közötti oldalirányú kapcsolatok létrehozására hajlamos, vastag szálaokat eredményez kevés elágazással, míg ha elágazásra hajlamos, akkor vékony szálaokat kapunk és a hálón belül gyakori az elágazás (14, 31).

A fibrinszálaok átmérője a háló szerkezetére és mechanikai tulajdonságaira is hatással van (lásd 2.4 fejezet). Nagyobb átmérőjű szálaokból képződött hálóban nagyobb lyukak, pórusok vannak a szálaok között, míg kisebb szálaokból felépülő hálóban a pórusok kisebbek. A szálaok méretét a protofibrillumok kialakulása és a kialakult protofibrillumok oldalirányú kapcsolódása közben zajló molekuláris mechanizmusok határozzák meg (21). Fiziológias és különböző kísérleti körülmények között a kialakuló szálak méretét leginkább meghatározó tényező a trombin és a FXIII aktivitása, de sok egyéb tényezőről ismert, hogy a szálaok méretét megváltoztatja. Ilyen például a kalcium és a kloridion lokális koncentrációja az alvadás folyamán, a FXII lokális mennyisége

(33), DNS, neutrofil extracelluláris csapdák (NET) illetve hisztonok jelenléte (34),  $\gamma'$  fibrinogén mutáció és a mutálódott  $\gamma'$  fibrinogén relatív mennyisége (35), vörösvérsejtek jelenléte (36), vagy akár a légszennyezés mértéke (37) illetve az alkalmazott puffer koncentrációja (38). A kloridion egy kaotróp ion, melyről ismert, hogy koncentrációjának csökkentése az alvadás során szélesebb, magasabb szálakat eredményez (18, 39). A következő fejezetekben a trombinnak és a FXIII-nak a szerkezetre gyakorolt hatásáról rendelkezésünkre álló ismereteket mutatom be röviden, mivel munkám során ezt is vizsgáltam.

### **2.3.5.1 Trombin hatása a fibrinháló szerkezetére**

*In vitro* mérések alapján a fibrinszálak átmérője fordítottan arányos a trombin aktivitásával. Növekvő trombin aktivitás mellett a szálak átmérője csökkent (32), míg alacsony trombin aktivitás mellett a vastag szálak jellemzőek, a szálak között pedig nagy pórusok találhatóak (40). Ennek megfelelően magas trombin koncentráció mellett vékonyabb szálakat kapunk gyakoribb elágazásokkal. A szálak átmérőjének növekedése és az elágazások képződése kompetitív folyamat, a magasabb trombin aktivitás pedig az elágazások létrejöttét segíti elő (41). A szálak belső szerkezetét vizsgálva növekvő trombin aktivitásnál a szálak felépítő protofibrillumok közti távolság nőtt, azaz a szál egységnyi keresztmetszetére vonatkoztatott protofibrillumok száma csökkent (19).

### **2.3.5.2 Faktor XIII hatása a fibrinháló szerkezetére**

A FXIII a vérplazmában és a vérlemezkékben is megtalálható transzglutamináz. A plazmában két A és B alegységből felépülő tetramerként 10  $\mu\text{g/ml}$  körüli koncentrációban van jelen, míg a vérlemezkékben csak az A dimer található (42, 43). A plazmában található inaktív tetramert, zimogént kalcium jelenlétében a trombin aktiválja. A protofibrillumok képződése folyamán az aktív FXIII (FXIIIa) az átlapoló fibrin monomereket egymással kovalensen keresztköti, ezáltal biztosítva a képződő szálak stabilitását, merevségét, a mechanikai hatásoknak való ellenállóképességét. FXIIIa által létrehozott keresztkötések az alvadék Young modulusát 3,5-szörösre növelik. A FXIIIa két szomszédos fibrinmolekula globuláris D doménjének  $\gamma$  lánc között létesít kovalens keresztkötést (44). Az  $\alpha\text{C}$  doménon, bár kisebb sebességgel, szintén képződnek kovalens keresztkötések, melyek  $\alpha$  polimereket hoznak létre. Létrejönnek ezen kívül  $\alpha$ - $\gamma$  heterodimerek is (45). Amennyiben rekombináns

fibrinogéneken a  $\gamma$ -dimerek létrehozása gátolt, az  $\alpha$ C doméneken kereszt kötött  $\alpha$ - $\alpha$  polimerek merevsége a nem kereszt kötött 1,5-szeresére növekedik (lásd 2.4.3.2) (45). A kialakult kereszt kötések következtében a szálak a fibrinolízissel szemben is ellenállóvá válnak (46).

## 2.4 A fibrin mechanikai jellemzői

A fibrinháló alapvetően mechanikai szerepet játszik a hemosztázisban. Jellemzői meghatározzák, hogy az alvadék szakadása, ebből következően esetlegesen embolizáció előfordulhat-e, illetve hogy sérülés esetén az alvadék megfelelően elzárja-e a sérülést, megakadályozva ezzel a vérvesztést. Az alvadék feloldása, a fibrinolízis is függ a háló mechanikai tulajdonságaitól (47).

A mechanikai tulajdonságok a háló morfológiai tulajdonságaival is összefüggésben állnak. Számos klinikai vizsgálat bizonyítja, hogy a normális alvadéktól eltérő, vékony szálakból felépülő, sűrűn szőtt fibrinháló összefüggésben áll a trombózis bekövetkezésének valószínűségével. Ez az abnormális háló merevebb és jobban ellenáll a fibrinolízisnek, mint a normál háló (48). Ilyen háló jellemző szív koszorúér betegség (48), mélyvénás trombózis (49) vagy stroke (50) esetén. Az alvadék szerkezeti és funkcionális tulajdonságainak, azok megváltozásának klinikai jelentősége ezáltal egyre inkább körvonalazódik, ám a mögöttes molekuláris és sejtes mechanizmusok még kevésbé ismertek (51).

Az alvadék mechanikai tulajdonsága több szinten értelmezendő: háló, szál illetve molekuláris mechanizmusok szintjén, amelyekről részletesebben a következőkben írok.

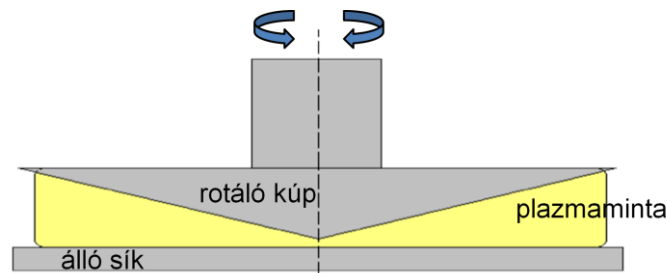
### 2.4.1 A hálózatos szerkezetből adódó mechanikai tulajdonságok

Nyíróerők hatására a testek rugalmas vagy viszkózus viselkedéssel válaszolnak. A rugalmas és viszkózus jellemzők- és az azokban bekövetkező változások követésére alkalmasak a reológiai módszerek. A kialakult alvadék mechanikai tulajdonságait korábban reológiai módszerekkel jellemezték (52), és az így nyerhető paramétereket jelenleg is használják a klinikumban és a kutatásban. A módszertan a rugalmasságot és a viszkozitást olyan értékekkel jellemzi, melyekkel az általam végzett kinetikus mérések eredményei nem vethetők össze, azonban fontosak munkám alapjait képező reológiai alapok megismeréséhez. Közülük kettőt ismertetek a továbbiakban. A

módszerek bemutatása után a módszer segítségével az alvadék mechanikai tulajdonságairól megismert jellemzőket, tulajdonságokat részletezem, illetve összevetem már meglévő ismeretekkel.

#### 2.4.1.1 Oszcillációs elven alapuló reométerek

Az oszcillációs elven alapuló reométerekben két felszín között található a minta. A felszínek egyikét szinuszos oszcillációval forgatjuk, míg a másik áll, az alvadék pedig köztük képződik (**4. Ábra**).



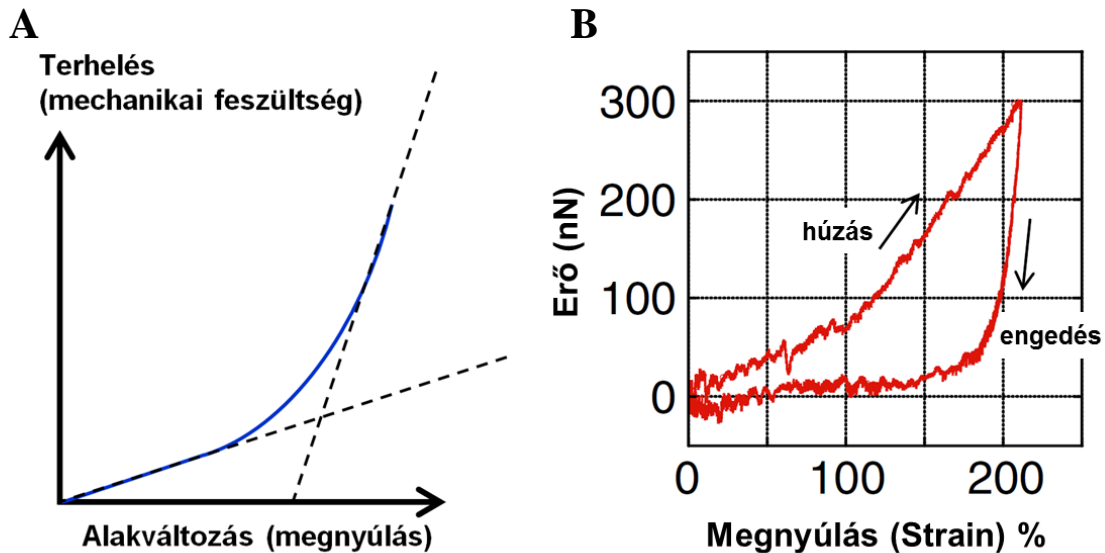
**4. Ábra.** Oszcillációs reométer sematikus ábrája.

A mozgás által keltett nyírófeszültség és az alvadékban ennek hatására kialakuló mechanikai feszültség közt fáziseltolódás tapasztalható. A fáziseltolódás felbontható egy szinusz ( $G''$ ) és egy koszinusz ( $G'$ ) függvénnyel leírható tagra. A  $G'$  tárolási modulus értéke jellemzi a minta rugalmasságát, míg a  $G''$  veszteségi modulus a viszkozitását (11).

A fibrinháló egy viszkoelasztikus polimer, melyben a rugalmas komponens ( $G'$ ) általában egy nagyságrenddel nagyobb, mint a viszkozus ( $G''$ ). A nyírás frekvenciáját növelve a fiziológias körülmények mellett alvasztott fibrinháló viszkozitása jelentősen növekszik, míg a rugalmasságban csak kismértékű növekedés tapasztalható (11).

A nyíróerőt folyamatosan növelve megkapjuk az alvadék terhelési diagramját (terhelésre bekövetkező alakváltozás függvényét) (**5. Ábra A része**). A görbe meredeksége megadja a háló Young modulusát, mely a test merevségét jellemzi. Minél nagyobb erő szükséges egy test egységnyi deformációjához, annál merevebb a test, annál magasabb a rugalmassági- vagy Young modulusa. A kialakult alvadék növekvő terhelésre egyre kisebb mértékű megnyúlással válaszol, a Young modulus értéke nő (53). A jelenséget húzási felkeményedésnek hívjuk. Szálakból felépülő

fehérjepolimerek jellemzően rendelkeznek ezzel a tulajdonsággal. Nemcsak a fibrinhálónál, az egyedi fibrinszálaknál is megfigyelhető a húzási felkeményedés (**5. Ábra B rész**). A FXIIIa által keresztkötött fibrinháló Young modulusa minden terhelésnél magasabb, mint a nem keresztkötött hálóé (53).



**5. Ábra. Húzási felkeményedés.** Az alvadék növekvő terhelésre egyre kisebb mértékű megnyúlással válaszol. **A rész:** Sematikus ábrázolása a húzási felkeményedésnek. **B rész:** Egyedi fibrinszál erőválasza növekvő megnyúlás esetén. Guthold munkacsoport ábrája alapján (54). A húzási görbén a húzási felkeményedés látható. Az engedési görbe más utat jár be mint a húzási görbe, közöttük hiszterézis jelenik meg. A hiszterézis mértéke a viszkózus tulajdonságot jellemzi.

Érdekes módon a nyírási kísérletekben több, egymást követő oszcillációs ciklus során nem tapasztalható a fibrinháló ciklusról ciklusra történő merevedése. Ez egyfajta dinamikus újraépülésre utal. Az újraépülésnek élettani jelentősége lehet, ugyanis így az alvadékból nem szakadnak le darabok, melyek a vérárammal továbbsodródva elzáródást, embolizációt okozhatnak. Jelenlegi ismereteink szerint alacsonyabb nyíróerők esetén a fibrinháló szintjén történik az újraépülés (55), míg magasabb nyíróerőknél egyfajta plasztikus újraépülés tapasztalható, mely a "knob-hole" kötések felszakadása és újbóli kiépülése által valósul meg (14).

Az alvadékokat nagymértékű nyújthatóság is jellemzi, amely fiziológiás szempontból hasznos tulajdonság, ugyanis ennek köszönhetően nagyobb nyíróerők hatására a fibrinháló inkább megnyúlik és nem szakadás következik be. Az esetleges

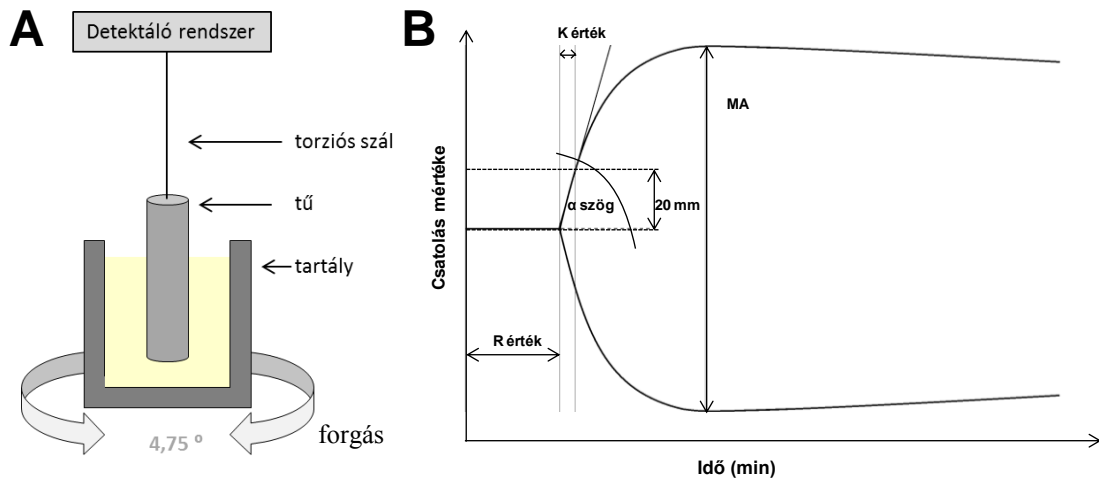
szakadás a trombus elszabadulásához, embolizációhoz vezethet a későbbiekben. FXIII jelenlétében, plazmából alvasztott hálók fibrin szálai szakadás előtti nyugalmi hosszuknak átlagosan 2,7-szeresére nyújthatók (56). Az alvadék  $550 \text{ mN/mm}^2$  mechanikai feszültségnél szakadt el (57).

A kialakult fibrinháló mechanikai tulajdonságait sok tényező befolyásolja. A háló rugalmasságára hatással vannak különböző fizikai (58, 59) és biokémiai (60) paraméterek, illetve a vér különböző alkotóelemei is (61). Az alvadékban jelen levő vörösvérsejtek számának növekedésével az alvadék rugalmassága csökken, viszkozitása növekszik (62).

Fiziológias körülmények között az extracelluláris mátrix sejtjeinek miozin-vezérelt kontrakciója is a fibrinháló merevedését okozza, melynek szerepe lehet sebgyógyulás vagy tumorsejtek képződése során (63).

#### **2.4.1.2 Trombelasztográfia**

A trombelasztográfia (TEG) lehetővé teszi az alvadás folyamán az alvadék mechanikai tulajdonságának időbeli követését (64). Mivel az általunk kidolgozott nano trombelasztográfival (nTEG) olyan értékeket, paramétereket mérhetünk, melyek változása a TEG paramétereinek időbeli változásával sok hasonlóságot mutat, a TEG módszertanára itt részletesebben is kitérek. Elvi alapja egy mechanikai csatolás, amelyet a kialakuló alvadék hoz létre egy álló és egy mozgó elem között. Egy  $37^\circ\text{C}$ -ra temperált mintatartóba helyezük a plazma- vagy teljes vérmintát, ebbe pedig egy torziós szálon függő hengert merítünk. Attól függően, hogy a mozgó elem a tartály vagy a henger, illetve hogy a detektálás elektro-mechanikusan vagy optikai úton történik, a módszert trombelasztográfának vagy rotációs trombelasztometriának (ROTEM) nevezzük (65).



**6. Ábra.** *A rész:* A trombelastográfia sematikus működési elve. *B rész:* Trombelastogram a jellemző paraméterekkel.

Az alvadék által létrehozott mechanikai csatolás időbeli változását ábrázoló görbe a trombelastogram (**6. Ábra**), melyről a következő paraméterek olvashatók le. Az R-érték az alvadás kezdetétől az első, a háló képződése miatt kialakult erőjel megjelenéséig eltelt időt jelenti. Normál értéke 3,9-9,8 perc. A maximális amplitúdó (MA) az alvadás harmincadik percében mért csatolás mértéke. Normál értéke műszerenként változik, átlagosan 49,7-72,7 mm körüli érték. Nagysága a kialakult alvadék stabilitását jellemzi. Az R érték végétől a 20 mm-es amplitúdóig eltelt idő a K-érték, mely az alvadási folyamat sebességét jellemzi. Normál értéke 0,7-3,4 perc (66). Az  $\alpha$ -szög pedig TEG esetén a K-szakasz meredeksége, míg ROTEM esetén a 2 mm-es amplitúdónál felvett érintő meredeksége, mely a K-értékhez hasonlóan az alvadás kezdeti sebességét jellemzi. Normál értéke TEG esetén 47,8-77,7° (67). Fontos megjegyezni, hogy az ismertetett értékek közül egyedül a időmérés standardizált, a többi a gyártó által definiált érték.

A trombelastogramok az értéktartományok segítségével jellemezhetők. Fontos megjegyezni, hogy több paraméter jelentősen eltér egészséges egyének között is (fibrinogén koncentráció, trombocitaszám és funkció, GP IIb/IIIa receptorainak száma), ezáltal a mért értékek egyénenként nagyon különbözőek lehetnek. A módszer leginkább akkor alkalmazható megfelelően, ha első lépésben felvesszünk egy egyénre jellemző alapgörbét, és a változásokat ehhez viszonyítjuk. Az alapgörbe felvétele után a módszer jól használható klinikumban májtranszplantációs vagy kardiopulmonáris bypass

műtétek közben az alvadás monitorozására (68). Antikoaguláns terápiák (dabigatran, rivaroxaban, apixaban) hatásának követése is sikeres volt trombelasztográfia segítségével (69).

A trombelasztográfiaival mért értékek a plazmába merülő henger kitéréséből származtatott értékek, így más, például reológiai mérésekkel közvetlenül nem vethetők össze. Az értékek ezen kívül az alvadás során bekövetkező mechanikai változások egészét jellemzik, a viszkózus és elasztikus tulajdonságkomponens elkülönített vizsgálatára nincs lehetőség. Az alvadéokra ható erők közül leginkább a nyíróerők dominálnak, melyek a mozgó elem közelében elég nagyok ahhoz, hogy a rugalmas válaszok kiátlagolódását és a viszkózus jellemzők előtérbe kerülését okozzák. A nagymértékű nyíróerők az alvadás folyamán fellépő kisebb mechanikai válaszok kiátlagolódását is okozhatják. Hajlító, húzó vagy nyújtóerők ebben a rendszerben kevésbé jellemezhetők.

#### 2.4.2 Az egyedi szálak szerkezetéből adódó mechanikai tulajdonságok

A háromdimenziós fibrinháló mechanikai tulajdonságainak nagy része a szálak mechanikai jellemzőinek ismeretében értelmezhető. A szálak mérete széles tartományon belül változhat, mely a mechanikai tulajdonságokat nagymértékben meghatározza. A vékonyabb szálak például 100-szor merevebbek, mint a vastagok (20).

Guthold és munkatársai atomierő-mikroszkóppal egyedi szálak oldalirányú nyújtását végezték. FXIII-al nem keresztkötött szálak szakadás előtt eredeti hosszuk 3,3-szorosára nyújthatók, míg a keresztkötött szálak eredeti hosszuk 2,5-szeresére (54). A szálak szintjén is megfigyelhető volt a húzási felkeményedés, jellemzően 110%-nál nagyobb deformáció esetén (**5. Ábra B része**). Ekkor a nem keresztkötött szálak Young modulusa 3-szoros, a keresztkötött szálaké pedig 1,9-szeres növekedést mutatott (54). Ha egy szálat nyújtunk, a húzási felkeményedés miatt a szál Young modulusa megnövekszik a környező szálakhoz képest. Mivel a szálak egymással közvetlen kapcsolatban állnak a háromdimenziós hálóban, a felkeményedett szál továbbítja a mechanikai terhelést a vele kapcsolatban álló, alacsonyabb Young-modulusú szálaknak. A mechanikai terhelés így eloszlik a hálóban (70). Húzási felkeményedés előtt a nem keresztkötött szálak Young modulusa  $4 \pm 3$  MPa, a keresztkötött szálaknak  $15 \pm 7$  MPa, míg a csak  $\alpha$ - $\alpha$  keresztkötött szálaknak  $10 \pm 12$  MPa.



A nem keresztkötött szálak  $233 \pm 184$  nN erőnél szakadtak el  $243 \pm 57$  %-os megnyúlásnál, a keresztkötött szálak  $581 \pm 237$  nN erőnél  $177 \pm 58$  %-os megnyúlásnál, míg a csak  $\alpha$ - $\alpha$  keresztkötött szálak  $368 \pm 289$  nN erőnél  $236 \pm 69$  %-os megnyúlásnál (71). A keresztkötés következtében a szálak nagyobb terhelésnél szakadtak el, míg a maximális megnyúlásuk lecsökkent. Csak  $\alpha$ - $\alpha$  keresztkötések esetén a megnyúlás a nem keresztkötött hálóéhoz hasonló érték volt, míg a maximális terhelés növekedett.

Az egyedi szálak Young modulusát Collet és munkatársai lézercsipesz segítségével plazmából alvasztott hálón határozták meg, és az előzőekben bemutatottakhoz hasonló értékeket kaptak. A Young modulus ezekben a mérésekben  $1,7 \pm 1,3$  MPa volt nem keresztkötött, míg  $14,5 \pm 3,5$  MPa keresztkötött szálak esetében (72).

#### 2.4.3 A mechanikai tulajdonságok molekuláris eredete

A fibrinháló az alvadék vázát képi, egy porózus szerkezetet hoz létre. A plazmából alvasztott hálók fehérjetartalmának csak megközelítőleg 0,3 tömegszázalékát teszi ki a fibrin(ogén) tömege (11). A hálót felépítő fibrinszálak rugalmas, nagymértékű megnyúlásra képes struktúrák, melyek szakadás előtt eredeti hosszuk akár háromszorosára is nyújthatók (lásd 2.4.2). Az alvadék megnyúlása viszont szerkezeti változásokkal jár (73, 74), melyek molekuláris, egyedi szál és alvadék szintjén is értelmezhetők. Az alvadékot eredeti hosszának háromszorosára nyújtva az egységnyi területen vizsgált fehérjetartalma akár 10-szeresére is növekedhet (56). Az alvadék megnyújtása során a háló vízkiszorítás közben zsugorodik, a háló sűrűbbé válik. A szálak kezdetben random orientációja a megnyújtás irányába rendeződik. A szálak elvékonyodnak, egymáshoz közelebb kerülnek, kötegekbe rendeződnek (56). A már kialakult háló megnyújtása közben bekövetkező változásokat okozhatja egyrészt a szálakon belüli protofibrillumok egymáshoz viszonyított helyzetének változása, másrészt a protofibrillumokat felépítő fibrin monomerek szerkezetében történt változás.

A protofibrillum szerkezete túl komplex ahhoz, hogy az egyes részeihez tartozó kitekeredési eseményeket egyértelműen azonosítani lehessen. Atomerő-mikroszkópiával végzett erőspektroszkópiai mérések egy szálból álló oligomereken történtek (13, 75). A fibrin(ogén) megnyúlása főként két régióhoz volt köthető: a

„coiled-coil”  $\alpha$ -hélix reverzibilis megnyúlásához és a monomer végén található globuláris  $\gamma$ -domén lépcsőzetes kitekeredéséhez.

Megnyúlás során a fibrin monomerek három régiójáról ismert, hogy bennük szerkezeti változás történik. Ezek az  $\alpha$ -helikális „coiled-coil” régió, a feltekeredett  $\gamma$  régió és a monomerekből kilógó  $\alpha$ C régió.

#### **2.4.3.1 A coiled coil régió szerepe a fibrin mechanikai tulajdonságaiban**

A széli és központi globuláris doméneket összekötő „coiled-coil” régióról régóta feltételezik, hogy nyújtás hatására a másodlagos szerkezete  $\alpha$ -hélixből  $\beta$ -redővé alakul át. A jelenség ismert több más, rugalmas fehérjéből felépülő száznál és hálónál (76). A fibrinháló esetében az  $\alpha$ -hélix- $\beta$ -redő átmenetet alátámasztják röntgenszórási kísérletek, illetve a kongóvörös festés pozitív eredménye (74), bár az utóbbi módszer specifikussága az  $\alpha$ -hélix- $\beta$ -redő átmenetre csak más fehérjék esetében igazolt, fibrin esetében még nem. Az  $\alpha$ -hélix- $\beta$ -redő átmenetet igazolható lenne krisztallográfiás mérésekkel is. Fibrin esetében ez viszont nem valósítható meg, ugyanis a fibrin monomerek kialakulásuk után azonnal kapcsolódnak egymáshoz, protofibrillumokat képezve. A fibrinogén-molekula krisztallográfiás szerkezetét felhasználva az  $\alpha$ -hélix- $\beta$ -redő átmenetet molekuladinamikai szimulációk is alátámasztják (35). Kiszögű röntgenszórással végzett vizsgálatokban a 22,5 nm-es periodicitás, amely a globuláris domének elhelyezkedését jellemzi, megnyújtott alvadék esetében nem változott, vagyis a szálak fokozatos megnyúlása nem következett be. A csúcs megnyújtott alvadékoknál kiszélesedett, mely a rendezetlenség növekedésére, kitekeredésre utal (56). Fourier transzformációs infravörös spektroszópiával (FTIR) vizsgálva, az alvadék megnyújtása során a fibrinben az abszorbanciacsúcsok eltolódása szintén  $\alpha$ -hélix-  $\beta$ -redő átmenetre utal. Az átalakulás mértéke korrelált a megnyújtás mértékével (77).

#### **2.4.3.2 Az $\alpha$ C régió szerepe fibrin mechanikai tulajdonságaiban**

Az  $\alpha$ C régió egy feltekeredett  $\alpha$ C doménből és egy rendezetlen  $\alpha$ C konnektorból áll, mely utóbbin keresztül kapcsolódik a fibrinogén  $A\alpha$  láncához (7). A fibrin polimerizációja során a fibrin molekulák és a protofibrillumok az  $\alpha$ C régión keresztül oldalirányú kölcsönhatásokat létesítenek egymással, melyet a későbbiekben a FXIIIa stabilizál,  $\alpha$ - $\alpha$  keresztkötéseket hozva létre (78). A protofibrillumokon belül és a protofibrillumok között is jönnek létre ilyen módon  $\alpha$ - $\alpha$  keresztkötések. Az  $\alpha$ C régió

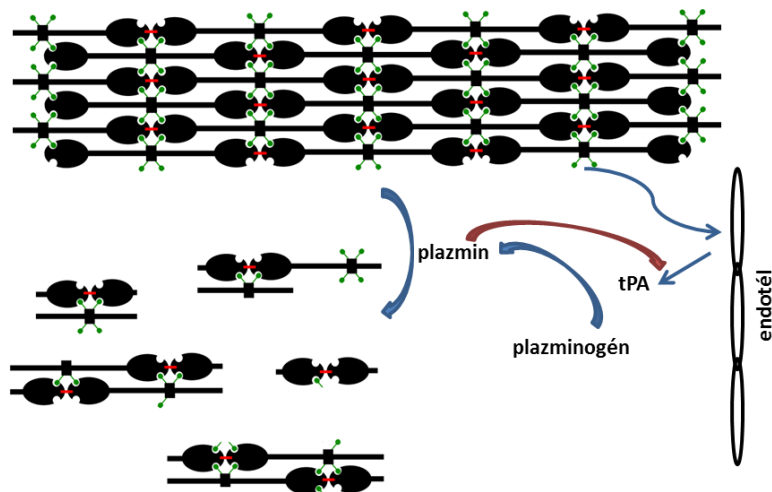
nem feltétlenül szükséges a protofibrillumok közti oldalirányú kölcsönhatások kialakításához, de erősíti azokat. Az  $\alpha$ C régiót nem tartalmazó fibrinogénből létrejött alvadékban gyakoribbak az elágazások és vékonyabbak a szálak (79), ami gyengébb oldalirányú kapcsolatokra utal a protofibrillumok között. Az  $\alpha$ C régiókon keresztül kialakult  $\alpha$ - $\alpha$  keresztkötéseknek fontos szerepük van a szálak gyors rugalmas erőválaszának kialakulásában is (80). Az  $\alpha$ C régió jelenlétében a szálak Young modulusa lecsökken (71), nyújthatóságuk megnő és lehetséges, hogy a húzási felkeményedés is az  $\alpha$ - $\alpha$  keresztkötések által valósul meg (lásd 2.3.5.2) (81).

## 2.5 Az alvadék feloldása: fibrinolízis

A véralvadás és a fibrinolízis egymással ellentétes folyamatok: alvadás során az alvadék felépül, míg lízis során lebomlik. Fiziológias körülmények között a két folyamat együttesen zajlik. Érzékeny egyensúlyuk a hemosztázis, melynek zavara esetén túlzott vérzés vagy trombotikus események következhetnek be.

A fibrinolízis enzime egy szerin proteáz, a plazmin. A fibrin(ogén) szerin-lizin és szerin-arginin aminosavak közti peptidkötést hasítja. A plazmin 86 kDa tömegű enzim, a vérben inaktív plazminogénként található meg. Aktivációja az endotél által termelt szöveti típusú plazminogén aktivátorral (tPA), vagy az urokináz típusú plazminogén aktivátorral (uPA) történik. Ezen aktivátorok működése fibrinhez kötött, a plazminogén hasítását plazminná fibrin jelenlétében végzik (8). Fiziológias körülmények között az alvadás során a plazminogén beépül a fibrinhálóba, plazminná hasítása is ott történik. A fibrinháló jelenlétében kis mennyiségű tPA szabadul fel az ép endotél sejtekből, mely az inaktív plazminogént aktív plazminná alakítja át. A plazmin megjelenése pozitív visszacsatolásként hat az endotél tPA termelésére, ezáltal a plazmin nagy mennyiségben jelenik meg azon az érszakaszon, ahol a lebontandó fibrinháló is található (7. Ábra).

A plazminogén aktiválására képes a fentiekén kívül egy sztreptokináz (STK) nevű fehérje, melyet a *Streptococcus haemolyticus* nevű baktérium termel. Az STK plazminogénnel komplexet képez, ezáltal a plazminogén felszínén kifejeződik egy addig rejtett struktúra, egy proteáz triád (82). A STK-plazminogén komplex ezután már képes további plazminogének aktiválására, ezáltal a plazmin képződése a tPA esetében leírt aktivációhoz viszonyítva akár százszorosára is felgyorsulhat.



7. Ábra. Aktív plazmin kialakulása. A piros nyíl pozitív visszacsatolást mutat.

Bármilyen módon indukáljuk a fibrinolízist, a végső lépésként minden esetben a plazmin darabolja fel a fibrinhálót. Bár a plazmin nem válogat a hasítási helyek között és a fibrin(ogén) molekulán több ilyen hely is található (83), a hasítás mégis csupán néhány meghatározott helyen indul meg (lásd 2. Ábra). Azt, hogy az enzim melyik hasítási helyen kezdi az emésztést, valószínűleg nagymértékben befolyásolja a hasítási helyek térbeli elrendeződése, hozzáférhetősége. Azaz, egyes hasítási helyekhez az enzim az emésztés kezdetén még nem fér hozzá (16). A lízist így nem csak az enzimaaffinitás befolyásolja, hanem olyan további tényezők is meghatározzák, mint az alvadék szerkezete. A plazmin számára legkönnyebben elérhető hasítási helyek az  $\alpha$ C doménen találhatók. Ebben a régióban legalább 10 különböző hasítási hely van, így a lízis kezdetén megjelenő korai emésztési végtermékek is különbözőek (84). Az  $\alpha$ C domén hasítása nagy valószínűséggel a protofibrillumok közötti oldalirányú kölcsönhatásokat szakítja fel. Következő lépésben a hasítás a „coiled-coil” régióban történik. Ahhoz, hogy a szál hasítása keresztirányban maradéktalanul megtörténjen, a monomerek „coiled-coil” régiójában mindhárom ( $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\gamma$ ) fehérjelánc hasítása szükséges (84).

A kialakult háló szerkezete befolyásolja az emésztést, de ennek mechanizmusa nem teljesen ismert. Egyes *in vitro* kísérletek alapján a vékonyabb, sűrűn szőtt háló jobban ellenáll a lízisnek (85, 86). Ez egyezik a 2.4 fejezetben már említett klinikai vizsgálatok eredményével. Más kutatások a vékonyabb szálakból felépülő háló gyorsabb líziséről számoltak be (87, 88). Fontos megjegyezni, hogy míg fiziológias

körülmények között a lízisben résztvevő prekursorok, például a plazminogén, az alvadás során is jelen vannak és így beépülnek a hálóba, az *in vitro* kísérletek többségében a plazmint vagy a szöveti plazminogén aktivátort (tPA-t) a már kialakult alvadékhoz adják hozzá. Ezáltal a plazmin diffúziója határozta meg a lízis sebességét (10, 14). Ugyancsak megjegyzendő, hogy tisztított fibrinogént alkalmazó munkákban a fibrinogén FXIII tartalma nincs megadva, illetve a FXIII-mentesség nem minden esetben igazolt.

A fibrinolízis mechanizmusa a szál szintjén sem teljesen ismert. Turbidimetriás és AFM mérésekből arra következtettek, hogy plazminmolekulák sokasága a szál teljes hosszán végzi az emésztést, így a szál átmérője a lízis folyamán csökken (89, 90). Elektronmikroszkópiás és fluoreszcencia-mikroszkópiás mérésekben a szál keresztirányú szétvágását tapasztalták a lízis során (82, 86). Megfigyelhető a szálak vastagabb kötegekbe rendeződése is (86, 91). Bucay és munkatársai fluoreszcens mikroszkópiával vizsgálták egyedi szálak lízisét (87). A szálak keresztirányú hasítása mellett a szálak megközelítőleg 30%-a hosszában növekedett a lízis során. A megnyúlás vastagabb,  $200 \pm 30$  nm-nél nagyobb átmérőjű szálakon gyakrabban következett be, utána az emésztési sebesség nagyban lecsökkent. Feltételezték, és többféle modellel alá is támasztották, hogy a plazmin aktivitása függ a megnyúlási feszültségtől. A protofibrillumok közti oldalirányú kapcsolatok kialakulását eddigi ismereteink szerint limitálhatja az a megnyúlási feszültség, amely a szálak enyhén csavart struktúrája miatt növekvő átmérővel növekszik (14) (lásd 2.3.4). A vastagabb szálak belső rétegeiben elhelyezkedő protofibrillumok kevésbé megnyúltak, így a lecsökkent megnyúlási feszültség miatt a plazmin hozzáférése gátolt, az emésztés lelassul.

Varjú és munkatársai megfigyelték, hogy az alvadékot megnyújtva az alvadék emészthetősége csökkent (47). Guthold munkacsoportja a fibrinszálak lízisét vizsgálta fluoreszcencia és konfokális mikroszkópiával (16). A nem megnyújtott szálak vastagodtak és hosszabbá váltak lízis hatására. A szálak keresztirányú hasításáról nem számoltak be. A lízis mértékét a szálak eredeti hosszához viszonyított megnyúlásában adják meg. A szálak 200-250 %-os megnyújtása 2,5-dére lassította a nem kereszt kötött, 1,7-edére a kereszt kötött szálak lízisét. Lehetséges, hogy a megnyúlás következtében a „coiled-coil” régió kitekeredik, hidrofób régiók kerülnek felszínre, így a plazminkötő

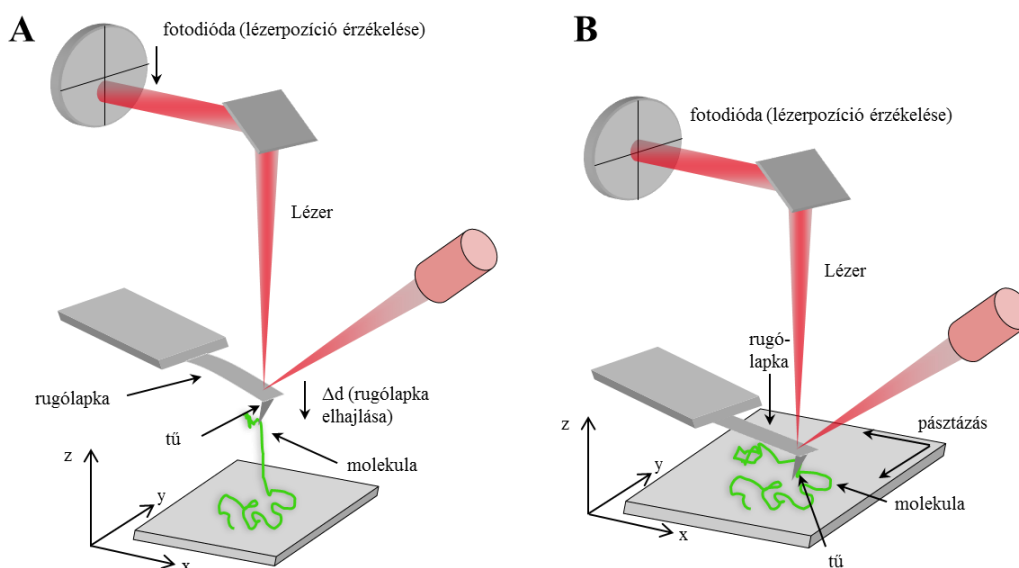
helyek is blokkoltá válnak (56). Ezáltal megnyújtott szálakban csak az  $\alpha$ C régió hasítására van lehetőség.

## 2.6 Atomierő-mikroszkópia (AFM) elve, alkalmazása

Az atomierő-mikroszkópia (AFM) a pásztázó tűszondás mikroszkópiák közé tartozik. A pásztázó mikroszkópos módszerek megjelenése és elterjedése a nyolcvanas években történt. 1981-ben Heinrich Rohrer és Gerd Binnig kifejlesztette a pásztázó alagúteffektus mikroszkópot, mely munkájukért 1986-ban fizikai Nobel díjat kaptak. Pásztázó alagúteffektus mikroszkópiánál egy igen hegyes tű nagyon közel halad el egy elektromosan vezető felszínhez. Az alagúteffektus következtében a tű és a felszín között áram folyik, melynek erőssége a tű és a felszín közti távolság függvényében változik. A módszer így alkalmas a tű és a felszín közti igen kis távolságok nagyon pontos meghatározására (92). A pásztázó mikroszkópos módszerek nem diffrakció-limitált technikák, így nagy előnyük, hogy feloldási határukat nem limitálja a fény hullámtermészete. A pásztázó mikroszkópok működési elve különböző, de minden esetben egy szonda pásztázza a vizsgált minta felszínét, mely topológiai képet eredményez. A tű precíz mozgatását a felszín felett piezoelektromos átalakítók végzik. A felbontást a tű alakja és a tű hegyének mérete határozza meg.

Binnig 1985-ben találta fel a pásztázó atomierő-mikroszkópiát, mely a minta és a szonda között fellépő atomi kölcsönhatások mérésén alapul. A pásztázó alagúteffektus mikroszkópiával szemben az AFM előnye, hogy elektromosan nem vezető minta topológiai képe is felvehető, így biológiai minták, például fehérjék leképezésére is alkalmas. Az AFM szonda a rugólapka, mely egy rugalmas lemezből és annak a végén található igen hegyes tűből áll. A mérés elve a következő: nagyon hegyes, néhány atomnyi görbületi sugarú tű és a felszín között vonzó és taszító atomi kölcsönhatások ébrednek. A rugólapka pozíciójában bekövetkező változások a lapka felszínére vetített majd onnan visszavert lézersugár segítségével követhetők, melyet egy pozícióérzékelő kvadráns fotodióda detektál.

Az AFM két fő felhasználási területe a molekuláris erőmérés és a topológiai képalkotás (**8. Ábra**).



**8. Ábra.** Az AFM működésének sematikus rajza. **A rész:** molekuláris erőmérés. **B rész:** topológiai képalkotás.

Molekuláris erőmérésnél a mintával specifikus vagy aspecifikus kölcsönhatásban álló rugólapka függőleges irányú mozgásával ( $Z$  irányú elmozdulás, lásd **8. Ábra A rész**), molekulák megnyújtására nyílik lehetőség. A molekulák megnyúlása során azok erőválasza regisztrálható. A molekuláris erőméréshez minden esetben szükséges a rugólapka rugóállandójának ismerete. A rugóállandó egy testre jellemző érték, mely megadja, hogy egységnyi deformáció ( $\Delta x$ ) következtében a testben mekkora visszatérítő erő ( $\Delta F$ ) ébred (Hooke törvény,  $K = -\Delta F/\Delta x$ ). A rugólapka esetében a deformáció a rugólapka elhajlása. A rugóállandó a kalibráció során a rugólapka termikus rezgési spektrumából határozható meg. A rugólapka egy harmonikus oszcillátor, így adott  $x$  kitérés mellett a lapkában  $E_r = 1/2 \cdot K \cdot \langle x^2 \rangle$  energia tárolódik.  $K$ -val a rugóállandót jelöltem,  $\langle x^2 \rangle$  pedig a rugólapka átlagos négyzetes elmozdulása. A rugólapka csak függőleges elmozdulásra képes, egy szabadsági foka van, melyre jutó átlagos termikus energia az ekvipartíció tétele alapján:  $E_t = 1/2 \cdot k_B \cdot T$ , ahol  $k_B$  a Boltzmann állandó,  $T$  pedig a hőmérséklet. Az  $E_t$  energia eredménye a rugólapka kitérése, mely a rugólapkában  $E_r$  energiaként tárolódik:

$$\frac{1}{2} K \langle x^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T$$

Ebből a rugóállandó kifejezhető:

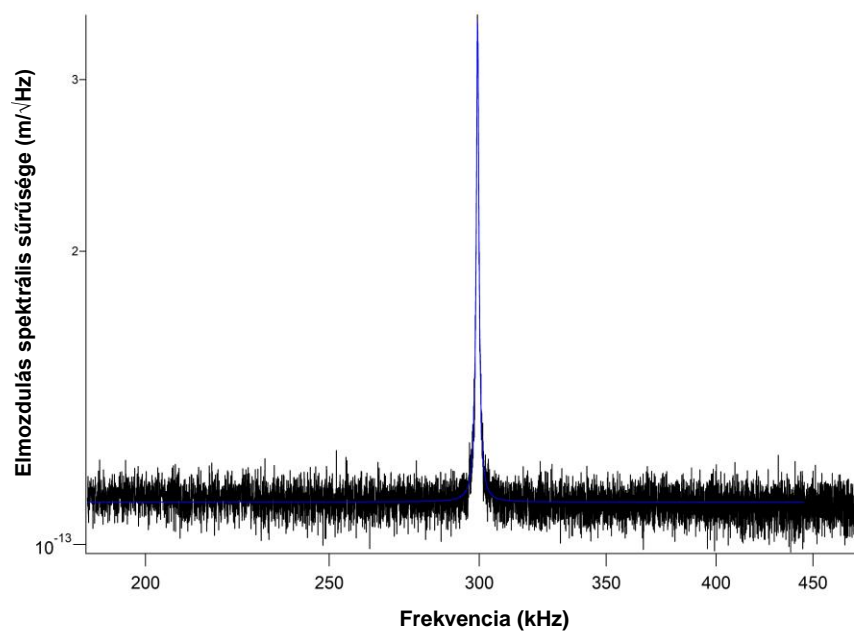
$$K = \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle}$$

vagyis a rugólapka átlagos négyzetes elmozdulását detektálva a hőmérséklet ismeretében a rugóállandó meghatározható.

A topográfiai képalkotás során a rugólapka X-Y irányú elmozdulását piezoelektromos kristály vezérli, amely a minta pásztázását, így a topológiai képalkotást teszi lehetővé (**8. Ábra B része**). A képalkotás több módon is megvalósítható, melyek közül a méréseink során használt AC módot részletezem. A rugólapkát a sajátfrekvenciájához közeli frekvencián rezgésbe hozzák. A felszínhez közeledve a tű hegye és a minta atomjai között fellépő vonzó atomi kölcsönhatások következtében a rugólapka sajátfrekvenciája lecsökken. A piezo által keltett kényszerrezgés frekvenciája viszont nem változik, így a rezgés amplitúdójának csökkenése tapasztalható, aminek mértéke a felszíntől való távolsággal arányos. Amennyiben a rugólapka felszíntől távol mért amplitúdója (szabad amplitúdó) egy általunk előre beállított értékre csökken (célamplitúdó), feltételezzük, hogy a rugólapka adott, nagyon kis távolságban van a felszíntől. Amennyiben a rugólapka tartja az általunk beállított célamplitúdót, a minta topográfiai képe akár század nanométernyi pontossággal rekonstruálható. A mérés előtt szükséges a rugólapka sajátfrekvenciájának meghatározása, a kalibráció. Termikus gerjesztés hatására a rugólapka különböző frekvenciájú rezgései detektálhatóak, melyeket a műszer Fourier analízissel frekvenciájuk alapján felbont (**9. Ábra**). Az így kapott amplitúdó-frekvencia görbe csúcsának helye a rugólapka sajátfrekvenciája.

A fibrinháló reprodukálható atomierő-mikroszkópiás vizsgálatához alapkövetelmény a háló csillámfelületen való előállítás. Atomierő-mikroszkóppal kétdimenziós topológiai képalkotás valósítható meg, míg a háló szerkezete háromdimenziós. Csillámfelületen kétdimenziós háló előállításának eddig nem volt módszertana. A fibrinháló mikrostruktúrája, a fibrinszálak morfológiája és lízise fiziológias közel körülmények között válik vizsgálhatóvá egy olyan noninvazív módszerrel, mint az atomierő-mikroszkópia. A szálak lízisének nagyfelbontású *in situ* követésére nyílik lehetőség, mely más módszerekkel nem valósítható meg, vagy a módszer diffrakciólimitált jellege miatt (optikai módszerek), vagy a preparálás során minta fiziológias tulajdonságainak elvesztése miatt (elektronmikroszkópia).





**9. Ábra.** AC160 rugólapka termikus spektruma. A kék vonal a kalibráció során illesztett görbe, mely alapján a rugólapka sajátfrekvenciája meghatározható.

### 3 Célkitűzések

PhD munkám során az alábbi célokat tűztem ki.

1. Alvas során képződő fibrinháló mechanikai tulajdonságaiban bekövetkező változások nanoskálájú, valós idejű követésére atomi erőmikroszkóppal történő módszer kidolgozása trombocitaszegény plazmára.
2. Fibrinháló mechanikai tulajdonságaiban bekövetkező változások jellemzése sztreptokináz (STK) indukált emésztés hatására.
3. Háromdimenziósból kvázi-kétdimenziós (2D) fibrinháló reprodukálható előállítása, amelynek mikrostruktúrája AFM-el jól analizálható.
4. A szálak morfológiájának változásának vizsgálata kloridion koncentráció és trombin aktivitás függvényében.
5. Plazminhatás mikroszkopikus mechanizmusának feltárása egyedi fibrinszálak emésztésén keresztül. A mechanizmus ismeretében a fibrinolízis modelljének felállítása.

## 4 Módszerek

### 4.1 Felhasznált anyagok

**Hepes puffer:** 10 mM Hepes 150 mM NaCl, pH 7,4-re, szűrve 0,22 µm pórusméretű membránon szűrve.

**Fibrinogén törzsoldat:** A liofilizált fibrinogént Hepes pufferben oldottuk úgy, hogy koncentrációja 10 mg/ml legyen. Az így elkészített oldatot Slide-A-lyzer dialízis kazettákban Hepes puffer ellenében szobahőmérsékleten dializáltuk, hogy a liofilizátumból származó sóterhelést fiziológiásra csökkentjük. A dialízis 8 órán át tartott, a puffert 2 óránként cseréltük. A dializált fibrinogén törzsoldatot felhasználásig 20 µl-es aliquotokban tároltuk, -20 °C-on. A liofilizátum 1-es típusú, humán plazmából izolált tisztított fibrinogén. (Katalógusszám: F3879, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Németország.)

**Trombin törzsoldat:** Liofilizált, humán plazmából származó trombint (katalógusszám: T6884, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Németország) Hepes pufferben oldottunk úgy, hogy 1500 IU/ml aktivitást érjünk el. A törzsoldatot felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

**Plazmin törzsoldat:** A fibrinháló lízisének vizsgálatához humán plazmint (P1867, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Németország) használtunk, melyet Hepes pufferrel 6 µM-ra hígítva 5 µl-es aliquotokban tároltuk, -80 °C-on.

**Kevert humán plazma:** Méréseinkhez átlagosan 6 betegtől vett trombocitaszegény kevert humán plazmát használtunk. A minták a Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetéből származtak. Alvadásgátlóként 0,11 M koncentrációjú nártium-citrát oldat volt a vérvételi csőben mely a vérmintával 1:9 térfogatarányban lett elegyítve a vér levételekor. Az egyéni plazmaminták protrombin idejének meghatározása a Laboratóriumi Medicina Intézet BSC-XP (Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH, Martburg, Németország) műszerével történt és értéke minden esetben a normál tartományon belül volt.

## **4.2 Fibrinháló készítése plazmamintából, mechanikai tulajdonságok mérése AFM-mel: Nano-trombelasztográfia**

100  $\mu\text{l}$  kevert humán plazmamintához 200  $\mu\text{l}$  Hepes puffert adtunk, majd  $\text{CaCl}_2$  oldattal aktiváltuk úgy, hogy kalciumra nézve a végkoncentráció 5 mM legyen. Tárgylemezen kialakítottunk egy parafilmmel szegélyezett 15 mm belső átmérőjű gyűrűt, melybe a kalciummal aktivált oldatot injektáltuk, majd a tárgylemezt a műszer mintatartó részébe helyeztük. A vizsgálathoz használt műszer egy erőmérő AFM készülék (MFP1D, Asylum Research, Santa Barbara, CA), melyhez invertált optikai mikroszkóp tartozik. A mikroszkóp segítségével ellenőriztük, hogy az AFM rugólapkája teljesen belemerül-e az oldatba. Minden méréshez MSCT-AUHW típusú rugólapkát használtunk (Bruker, Billerica, MA, USA). Erőméréseink előtt minden esetben az AFM szoftvere által vezérelt termikus kalibrációval határoztuk meg a rugólapka rugóállandóját (lásd 2.6 fejezet). Az általunk használt lapkák rugóállandója 0,05 – 0,2 N/m közé esett. A rugólapkát 1  $\mu\text{m}$  távolságon mozgattuk 0,25 – 2,5  $\mu\text{m/s}$  közti sebességgel. Az adatok kiértékeléséhez az Igor Pro 5.05A szoftvert használtunk.

## **4.3 Fibrinháló készítése plazmamintából, topológiai analízis AFM-mel**

Frissen hasított csillámfelületen plazmamintát elegyítettünk 5 mM kalciumtartalmú Hepes pufferrel, 1:2 arányban. 20 percig inkubáltuk a mintát, majd desztillált vízzel mostuk, végül nagy tisztaságú  $\text{N}_2$ -gázzal óvatosan szárítottuk. Az így elkészített minta alkalmas AFM-el végezhető morfológiai mérésre, melyet tapogató (AC) módban végeztünk MFP-3D atomerő-mikroszkóppal (Asylum Research, Santa Barbara, CA). Szilícium-nitrid rugólapkát használtunk (AC160TS, Olympus, Tokyo, Japan), 300 kHz környéki rezonancia-frekvenciával. A pásztázást viszonylag magas amplitúdókon végeztük, hogy a minta és a rugólapka közti kötések kialakulását elkerüljük. Jellemzően 0,75-1,25 V szabad-amplitúdóval és 0,6-1,0 V felszín közeli amplitúdóval. 512\*512 pixel felbontásnál 0,3-0,6 Hz vonalmenti pásztázási frekvencián történt a képek felvétele. A szálak morfológiai analízisét Igor Pro szoftverrel végeztük. A szálmagasságot a szál tengelyének és a háttérnek a magasságkülönbsége adta. A szál szélességét a magasság fél értékénél mértük (FWHM), így korrigáltuk a tú geometriája

miatti arteficiális kiszélesedést. Az átlagos szálátmérő és szálmagasság meghatározása minden esetben legalább 40 mintából történt.

#### **4.4 Plazmából alvasztott háló fibrinolízise sztreptokinázzal**

A plazmából kialakult alvadékokat mind nTEG méréseink során mind a morfológiai vizsgálatokban sztreptokinázzal (STK-val) emésztettük.

Az nTEG méréseknél az enzim mennyiségét a kialakult alvadék tömegének megfelelően alkalmaztuk úgy, hogy az STK aktivitása 300-10000 IU között legyen mintánként. A lízis szobahőmérsékleten zajlott és jellemzően 40-60 percig tartott.

Morfológiai méréseinknél a minta alvasztása a 4.3 pontban leírtnak megfelelően történt: a kevert plazmamintát 1:2 arányban elegyítettük pufferrel csillám felszínen. 10 perc alvasztás után 45 000 IU aktivitású STK-t hozzáadásával indítottuk az emésztést, melyet 7 perc után a minta desztillált vízzel történő mosásával és nitrogén gázzal történő szárításával állítottunk le. Az így elkészített mintáról MFP-3D AFM segítségével készítettünk felvételeket, melyeket a továbbiakban analízisre használtunk fel, a korábban leírt szoftverrel.

#### **4.5 Kvázi-2D fibrinháló előállítása tisztított fibrinogénből**

A háló előállításához a fibrinogén aliquotot 30 percig 37 °C-on inkubáltuk majd Hepes pufferrel hígítottuk 2 mg/ml koncentrációra. Időközben a trombin oldatot Hepes pufferrel 50 IU/ml-re hígítottuk majd felhasználásig jégen tároltuk. Alvasztás előtt közvetlenül a fibrinogén oldathoz  $\text{CaCl}_2$ -ot adtunk, a trombint pedig tovább hígítottuk 2 IU/ml-re. A fibrinogén és trombin oldatokból 10-10  $\mu\text{l}$ -t elegyítettünk a felszínen, így a fibrinogén aktivációja trombinnal közvetlenül a csillám felszínén történt. A mintát egy 12 mm-es átmérőjű kör alakú csillámfelszínen alvasztottuk, a 20  $\mu\text{l}$ -es alvadék így 1,13  $\text{cm}^2$  felületen terült szét. A végső minta általános esetben 1 mg/ml fibrinogént, 1 IU trombint, 5 mM kalciumot és 150 mM NaCl-ot tartalmazott (amennyiben ettől eltértünk, az adott mérésnél jelzem). Az alvadás magas páratartalmú, zárt környezetben történt, 25 °C-on legalább 90 percig. A mintát ezután először nagy tisztaságú nitrogén gázzal óvatosan rászárítottuk a csillámfelszínre, majd nagy tisztaságú ioncserélt vízzel (MQ) mostuk és nitrogén gázzal újra szárítottuk.

#### **4.6 Tisztított fibrinogén FXIII tartalmának változtatása**

A fibrinogén minták FXIII-mentesítése ammónium-szulfátos kicsapással történt, Smith és mtsai módszere alapján (93). A 10 mg/ml koncentrációjú fibrinogén oldathoz kevertetés közben 4 °C-on először CaCl<sub>2</sub>-ot majd ammónium szulfátot ([NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) adtuk úgy, hogy a végkoncentráció az előbbire nézve 10 mM, az utóbbira nézve pedig 20 vegyes százalék (w/v%) legyen. Az ammónium-szulfát hozzáadását követően fehér csapadék kiválása tapasztalható. További 90 percig kevertettük az elegyet, majd 20 percig 3000 g-vel 4 °C-on centrifugáltuk. További kísérleteinkhez a felülúszót használtuk, ugyanis ez tartalmazta a FXIII mentes fibrinogént. A mintát dializáltuk, majd további felhasználásig -20 °C-on tároltuk. A FXIII-mentes mintából SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) ellenőriztük a keresztkötés képződés hiányát. Az így előállított FXIII mentes mintát a továbbiakban „FXIII<sup>-</sup>”-ként jelölöm.

Magasabb FXIII-tartalmú alvadékot az alvasztás előtt humán FXIII (233501, Merck, Darmstadt, Németország) hozzáadásával készítettük úgy, hogy a faktor mennyisége 1 IU/ml legyen. Ezt a továbbiakban „FXIII<sup>+</sup>”-ként jelölöm. A korábbi mérésekben is használt humán plazmából tisztított fibrinogént, mely FXIII-at tartalmazhat, „FXIII<sup>0</sup>”-ként jelölöm.

#### **4.7 Kvázi-2D háló fibrinolízise plazmával**

A lízis előtt az 4.5 alapján előállított kvázi-2D háló felszínére 50 µl Hepes puffert pipettáztunk majd szobahőmérsékleten 10 percig inkubáltuk. Az így rehidrált mintához 50 µl plazmin oldatot adva indítottuk a háló lízisét. Az alkalmazott plazmin aktivitása különböző volt a méréseknél. A lízis indítása után a minta pásztázását azonnal megkezdtük Cypher S illetve ES AFM-el és a lízis folyamatát vizes közegben pásztázva követtük. Ezután a mintát MQ vízzel mostuk és nitrogén-gázzal szárítottuk a további analízishez.

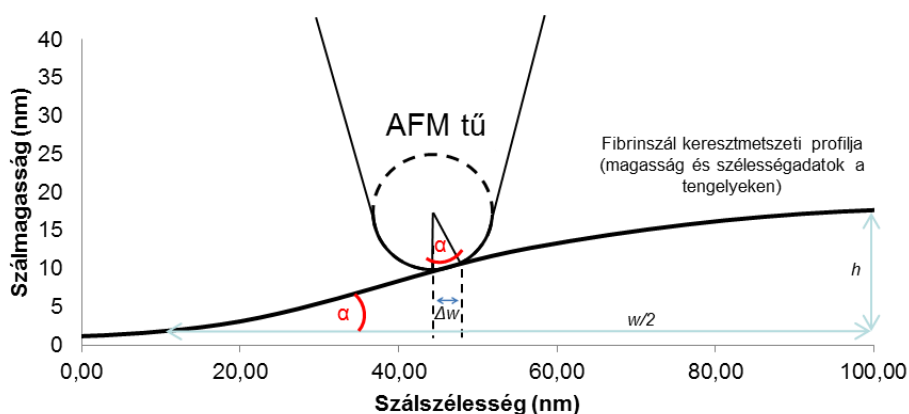
#### **4.8 AFM képképzés kvázi-2D hálón**

A kvázi-2D háló morfológiáját Cypher S vagy ES atomerő-mikroszkóppal vizsgáltuk (Asylum Research, Santa Barbara, CA). A száraz minták pásztázásához

szilícium-nitrid rugólapkát használtunk (OTESPA-R3, Brucer, Billerica, Massachusetts) viszonylag magas, 1 V-os szabad amplitúdón, 0,7 V célamplitúdó mellett. A fibrinolízis folyamatát úgy követtük, hogy a rugólapka a mintára felcseppentett enzimet tartalmazó pufferoldatba merült. Ezekhez a mérésekhez BL-AC40TS-C2 (Olympos, Tokyo, Japan) rugólapkát használtunk. Az alkalmazott amplitúdók ez esetben viszonylag alacsonyak voltak: 220 mV célamplitúdót alkalmaztunk 300 mV szabad amplitúdó mellett. A képek analízise Igor Pro szoftverrel történt. A szálak magasságának és szélességének elemzését a 4.3 pontban leírtak szerint végeztük.

#### 4.9 Az AFM tű geometriájának hatása a szálak morfológiai képére

A szál keresztmetszeti topográfiai profilján mértük a szál magasságát ( $h$ ) és szélességét ( $w$ ), melyet a 10. Ábra mutat. A magasságot a felszín és a szál legmagasabb pontja közti különbségből kaptuk. A szélességet szintén a keresztmetszeti profilból, a szál félmagasságánál mértük meg. A szál keresztmetszeti profilja (10. Ábra) legjobban egy hegyesszögű háromszöggel közelíthető. A magasságot ( $h$ ) a szélesség felével ( $w/2$ ) elosztva az érték tangenséből kiszámolható az  $\alpha$  szög. A hegy sugarának és az  $\alpha$  szög ismeretében ( $r \cdot \sin \alpha$ ), a hasonló háromszögek elvén a szélesség hibája ( $\Delta w$ ) kiszámolható. Méréseinkhez OTESPA R3 rugólapkát használtunk (Olympos, Tokyo, Japan). A rugólapkára vonatkozó számlást az eredményeknél, az 6.3.1 fejezetben részletezem.



10. Ábra. Becsült hiba ( $\Delta w$ ) a szálak szélességének meghatározásánál

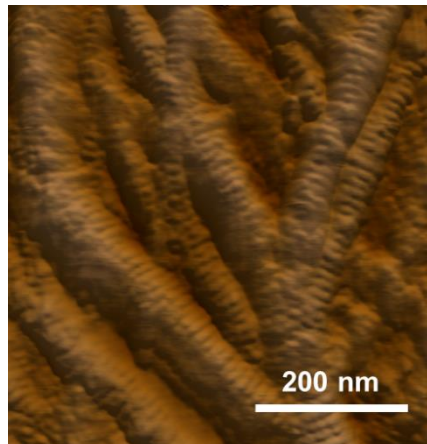
#### **4.10 A szálak morfológiájának statisztikai összehasonlítása**

Az alvadás folyamata egy enzimreakció, így a szálak magasság- és szélességeloszlása némileg eltért a különböző alvasztásoknál (lásd 2.3.4). Ezért az összehasonlító mérésekhez leginkább az volt a megfelelő, ha egyazon mintán történő változásokat vizsgáltuk. Mérési adataink (mint statisztikai minták) esetében nem feltételeztük a szórások azonosságát, ezért a Welch-próbát választottuk a minták összehasonlításakor. A módszer segítségével a két adatsoporthoz tartozó ismeretlen várható értéket hasonlítottunk össze egymással a két populációból vett, egymástól függetlenül kiválasztott minta alapján. A Welch-féle t-próba feltétele, hogy a változók normális eloszlásúak legyenek, viszont a szórások nem feltétlenül egyenlők, amelyet a méréseink jellegéből adódóan elfogadtunk. A próba nullhipotézise, hogy a várható értékek egyeznek. Az egyezés valószínűségét a p-érték adja meg, mely minél kisebb érték, annál kisebb az egyezés valószínűsége az adott mintáknál.



## 5 Eredmények

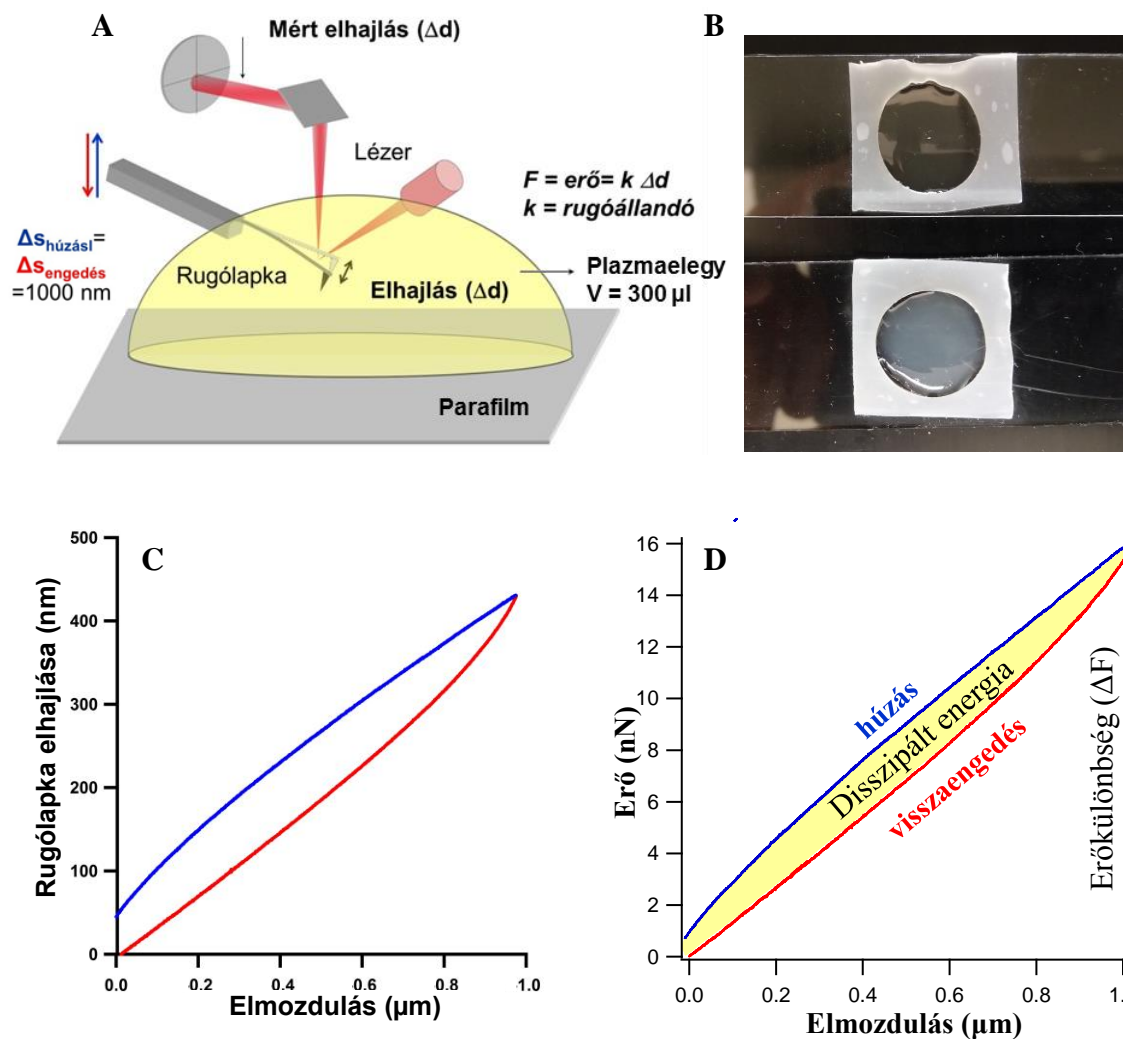
Méréseink során jellemeztük a háromdimenziós fibrinháló mechanikai tulajdonságainak változását az alvadás és a lízis folyamán. Jellemeztük a fibrinháló morfológiai képét a háló emésztése előtt, közben és az emésztés után. A morfológiai méréseknél egyes esetekben nem csak a háromdimenziós szerkezet, hanem a globuláris domének közötti 22,5 nm-es periodicitás is megfigyelhető volt (*11. Ábra*). A periodicitás megjelenése plazmából alvasztott minták esetén volt jellemző.



*11. Ábra.* Trombocitaszegény vérplazmából (PPP) alvasztott fibrinháló atomierő-mikroszkópiás amplitúdó-kontraszt felvétele. A szálak felszínén a monomerek globuláris doménjei által létrehozott 22,5 nm-es horizontális periodicitás is megfigyelhető.

### 5.1 Fibrinháló mechanikai jellemzése Nano-trombelasztográfiával (nTEG)

A véralvadék mechanikai tulajdonságának időbeli követésére dolgoztuk ki az atomierő-mikroszkópián alapuló nano-trombelasztográfia (nTEG) módszerét. Az AFM rugólapkáját méréseink során teljesen belemerítettük kalciummal aktivált vérplazmába, majd állandó, meghatározott sebességgel fel-le mozgattuk. A rugólapka minden egyes ciklusban 1  $\mu\text{m}$ -t mozdult el a felszín felé majd a felszíntől távolodva úgy, hogy a felszínt nem érte el és a mérés folyamán mindvégig teljesen a mintába merült (*12. Ábra A része*). A *12. Ábra B része* mutatja a tárgylemezre felcseppentett plazmacseppet.

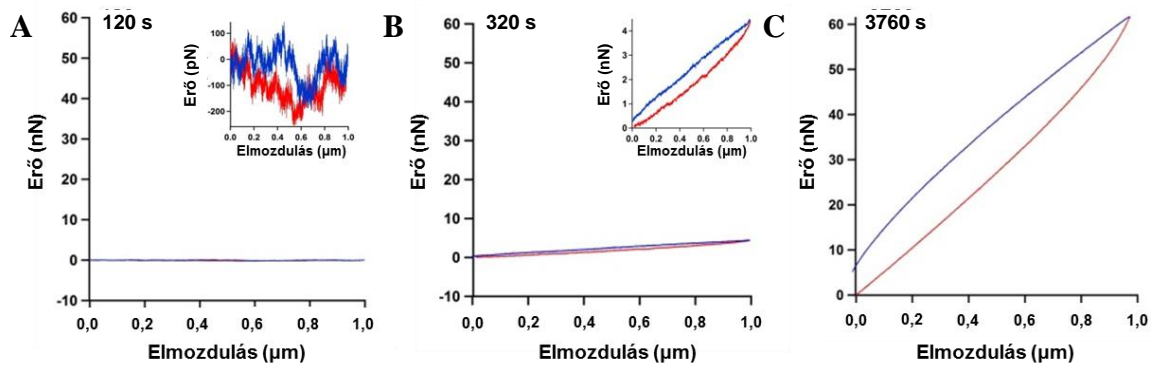


**12. Ábra.** Az nTEG és a mért értékek. **A rész** Az nTEG elvi felépítése. A plazmacseppbe teljesen bemeztett rugólapkát 1000 nm távolságon ( $\Delta s$ ) fel-le mozgattuk. A rugólapka elhajlásából az alvadó plazmacsepp mechanikai tulajdonságait jellemző erőválaszt kaptunk. **B rész:** Nem megalvad (felül) és megalvad (alul) plazmaminta. **C rész:** A rugólapka elhajlása egy ciklus során az alvadás késői fázisában. A kék görbét a felszíntől távolodva, a pirosat a felszín felé közeledve mértük. **D rész: Erőválasz.** Analízis során a legkisebb és legnagyobb erőérték közti különbséget számoltuk ki (Erőkülönbség  $\Delta F$ , ábrán jelölve). A két görbe között hiszterézis mérhető, melynek területe az alvadék által disszipált energiát adja meg. Az A rész és a B rész erőgörbéjének felvétele az alvadás két különböző időpontjában történt.

A 12. Ábra C része a műszer által detektált rugólapka elmozdulást mutatja az idő függvényében. A rugólapka rugóállandójának ismeretében az elhajlásból

kiszámítható a rugólapkára az alvadék által kifejtett erő, melyet a **12. Ábra D része** mutat. A rugólapka  $0,5 \mu\text{m/s}$  sebességgel mozgott. Kék vonal jelöli az adott fizikai paramétert a felszíntől távolodva, míg a piros a felszínhez közeledve. Amennyiben a húzási görbe lineáris, az erőválasz teljesen rugalmasnak tekinthető és így megadható a testet (a vérplazmában kialakuló háromdimenziós hálót) jellemző rugóállandó. Ennek értéke a **12. Ábra D részének** esetében  $15 \text{ pN/nm}$ , az alvadás adott pillanatában jellemzi a háló merevségét. A görbén azonban láthatjuk, hogy az erőválasz csak megközelítőleg lineáris. Minél nagyobb a rugólapka elmozdulása, annál nagyobb erővel hat a lapka a hálóra, annál jellemzőbbé válik a nemlineáris erőválasz. Az elhajlás mértéke egyre inkább a rugólapka által megtett úttal válik összemérhetővé (**12. Ábra C része**). Ebből adódóan a rugólapka adott ciklus során mérhető maximális elhajlását és az ebből számolható erőkülönbséget ( $\Delta F$ ) használtuk a továbbiakban analízisre, nem a görbe meredekségét. A húzási görbe kezdetén és a visszaengedési görbe végén tapasztalt erőértékek némileg különböztek, melyet nagy valószínűséggel a rugólapka kismértékű elmozdulása, "drift"-je okozott. Fontos kiemelni, hogy a húzási és az engedési görbék jellemzően nem ugyanazt az útvonalat járják be a húzási-engedési ciklus során, köztük hiszterézis jelenik meg (**12. Ábra C és D részei**). A hiszterézis a mechanikai manipuláció során a disszipált energiának felel meg (54), ezért a továbbiakban a hiszterézis területét disszipált energiának nevezem. Értéke méréseink esetében  $10^{-15} \text{ J}$ , azaz femtojoule (fJ) tartományban van, részletes magyarázatát lásd a **6.1.1** fejezetben. A disszipált energia a viszkózus viselkedés jellemzője.

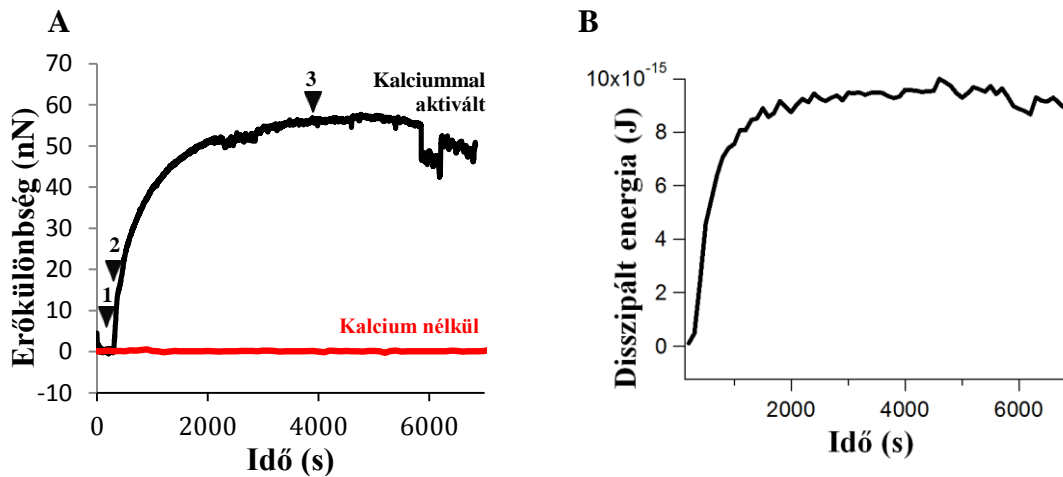
Három, az alvadás különböző időpontjaiban felvett húzási-engedési görbét mutat a **13. Ábra**. Az alvadás kezdetén, 120 s-al a mérés indítása után még csak  $0,2\text{-}0,3 \text{ nN}$  mértékű erőfluktuációk figyelhetők meg (**13. Ábra A része, felnagyított görbe**), míg az erőkülönbség értéke  $69 \text{ pN}$ . Ekkor az alvadék még nem alakult ki, vagy nem elég erős ahhoz, hogy a rugólapkát visszatartsa mozgásában. Ezt az állapotot még alvadás előtti állapotnak neveztük. 320 s-nál  $4 \text{ nN}$ -os erőkülönbség mérhető (**13. Ábra B része**), míg 3760 s-nál az erőkülönbség értéke már  $56 \text{ nN}$  (**13. Ábra B része**).



**13. Ábra.** A kialakult alvadéokra jellemző erőgörbék az alvadás 120.(A), 360.(B), 3760.(C) másodpercében. Mivel az alvadás elején a 60 nN-os skálán az erőgörbe nem figyelhető meg jól, az A és B részekben betétábra mutatja a megfelelő görbét nagyobb y-tengely felbontással.

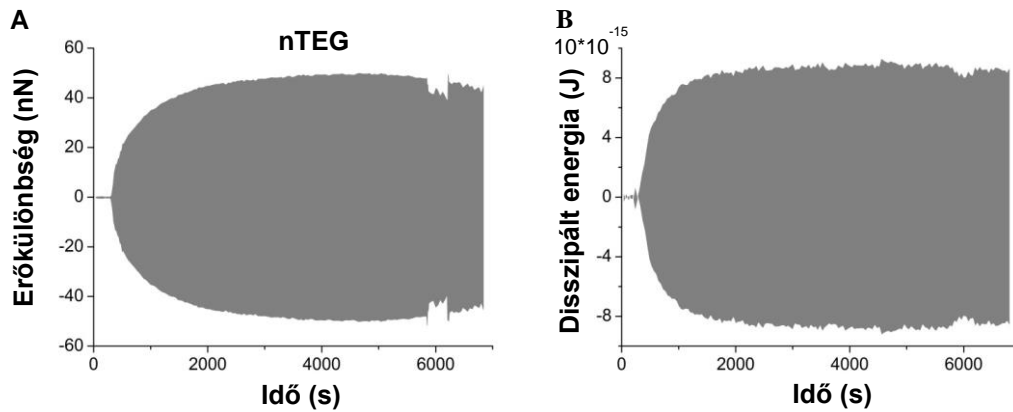
Kalciummal aktivált plazmamintában az egymást követő fel-le ciklusokban az erőkülönbség egy folyamatos, nemlineáris növekedést mutat az idő előrehaladtával, mely 50 nN értéknél éri el a maximumát, megközelítőleg 50 perccel az alvadás kezdete után (**14. Ábra A része**). Ezzel ellentétben kalciummal nem aktivált mintában az erőkülönbség értéke nulla, a rugólapka nem hajlott el a mérés kezdete után 1 órával sem. A platóig, azaz a maximális erőkülönbség eléréséig eltelt idő és a maximális erőkülönbség mintánként változik. A késlekedési idő, amit a maximális erőkülönbség eléréséig mérhetünk, 7 mérés alapján átlagosan 1274 s ( $\pm 597$  s SD) volt, míg a platónál mérhető maximális erő átlaga 21 nN ( $\pm 16,5$  nN SD).

Az erőkülönbséghez hasonlóan a disszipált energia időbeli változását is tudjuk követni, melyet a **14. Ábra B része** mutat. Az alvadékban disszipált energia is egy folyamatos, nemlineáris emelkedést mutat és korábban éri el a maximumát, mint az erőkülönbség. A disszipált energiát – ami a húzási-engedési görbék által bezárt terület – összevetve az egyes húzási-engedési görbéknél mért teljes energiával – ami a húzási görbe alatti terület – megkapjuk a disszipált energia százalékos arányát. Értéke átlagosan 27%.



**14. Ábra. A rész:** A rugólapka felfelé megtett útja során a maximum és minimum erő között mért  $\Delta F$  erőkülönbség időbeli lefutása. A fekete görbe mutatja a kalciummal aktivált, a piros görbe a kalciummal nem aktivált mérésort. Az erőkülönbséget minden 40-edik másodpercben mértük és ábrázoltuk értékét. A kalciummal aktivált mintát fekete, míg a kalcium nélküli mintát piros színnel jelöltük. Az 1, 2, 3 pontokhoz tartozó húzási-engedési görbéket a **13. Ábra** mutatja. **B rész:** A húzási és engedési görbe között mért hiszterézis területéből számított disszipált energia időbeli változása.

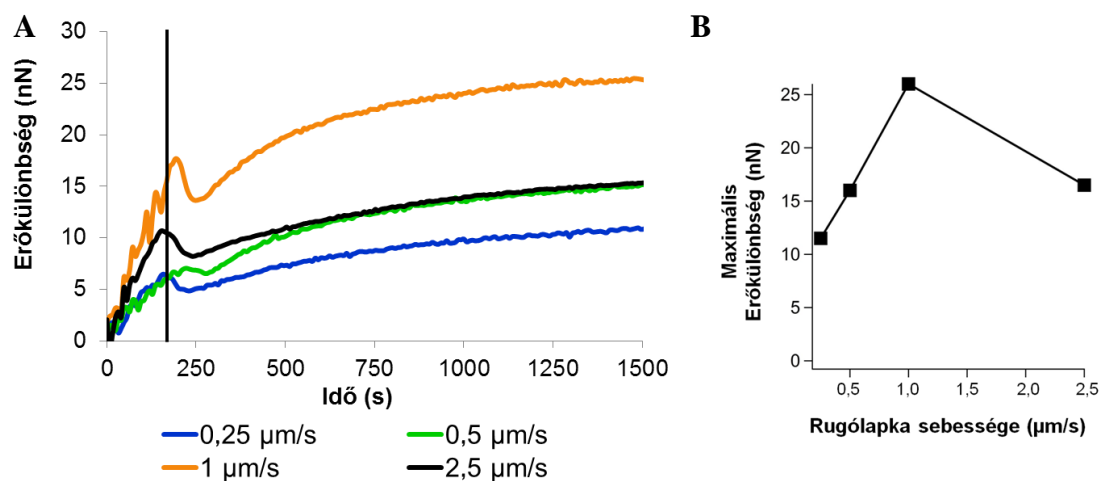
Az erőkülönbség és disszipált energia változásának időbeli lefutását ábrázoló görbét (**14. Ábra**) az x-tengelyre tükrözve a hagyományos trombelasztogramhoz hasonló görbét kapunk (**15. Ábra**), azzal az előnyös különbséggel, hogy a rugólapka fizikai tulajdonságainak ismeretében az nTEG standardizált mérés és SI rendszerben kifejezett fizikai mértékegységekkel jellemezhető, míg a klasszikus TEG megállapodás szerinti egységeket használ.



**15. Ábra.** *A rész: Nano trombelasztogram (nTEG). Az erőkülönbség értékek időbeli változása az x-tengelyre tükrözve. B rész: A disszipált energia időbeli változása az x-tengelyre tükrözve.*

### 5.1.1 A rugólapka fel-le mozgási sebességének változtatása nTEG során

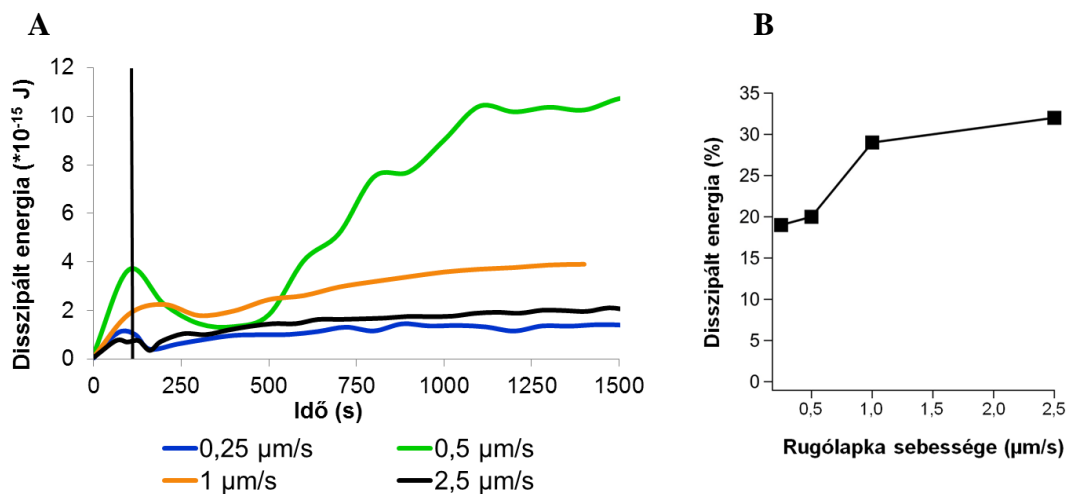
Méréseink során változtattuk a rugólapka fel-le mozgási sebességét, míg a rugólapka által megtett távolság minden esetben  $1 \mu\text{m}$  volt. Különböző sebességeket alkalmazva a görbéken mérhető maximális erőkülönbség (**16. Ábra**) és a húzási-engedési ciklus során befektetett teljes energiához viszonyított disszipált energia aránya (**17. Ábra**) megváltozik. A legmagasabb maximális erőkülönbséget  $1 \mu\text{m/s}$ -os húzási-engedési sebességnél értük el,  $25 \text{ nN}$  értéknél (**16. Ábra B része**). A rugólapka mozgásának sebességét tovább növelve  $2,5 \mu\text{m/s}$ -os sebességnél újra lecsökken a maximális erőkülönbség,  $16 \text{ nN}$ -ra. Ez az érték egyezik a  $0,5 \mu\text{m/s}$ -os sebességnél tapasztalt maximális erőkülönbséggel. A maximális erőkülönbséget a rugólapka fel-le mozgásának sebességének függvényében vizsgálva láthatjuk, hogy a maximális erőkülönbség  $1$ - $1,5 \mu\text{m/s}$ -os rugólapka sebesség alkalmazásánál veheti fel a legnagyobb értéket (**16. Ábra B része**).



**16. Ábra.** A rugalmas tulajdonság változása különböző rugólapka mozgatósi sebességeknél. A méréseket egyazon plazmaminta aliquotjaiból végeztük, minden méréshez új plazmacseppet és rugólapkát használtunk. **A rész:** Az egyes erőgörbéken megmért erőkülönbség értékek 1 μm-es úthosszon történő időbeli változása különböző rugólapka-mozgatósi sebességeknél. A görbék az első alvadási erőjeltől indulnak. Minden görbe kezdeti szakaszán egy ugrásszerű növekedés majd egy ezt követő csökkenés látható 180 s környékén (fekete vonallal jelölve). **B rész:** Különböző sebességeknél mért maximális erőkülönbségek változása a rugólapka mozgatósi sebességének függvényében.

A disszipált energia legmagasabb értékét 0,5 μm/s sebességnél kapjuk (**17. Ábra**). A teljes rendszerbe befektetett energia a húzási görbe alatti terület, míg a húzási és engedési görbe közötti hiszterézis területe jellemzi az alvadék által disszipált energiát. Ha az adott húzási-engedési ciklusban disszipált energiát elosztjuk a húzás során befektetett energiával, egy százalékos disszipált energia értéket kapunk, melyet a **17. Ábra B részén** Disszipált energia (%) -ként jelöltünk. A százalékos disszipált energia megadja, hogy az adott húzási-engedési ciklusban a rugólapka mozgatóásával befektetett energia hányadrésze disszipálódik az alvadékban. A disszipált energia (%) monoton növekedést mutat a növekvő rugólapka mozgatósi sebességekkel. Összességében megállapíthatjuk, hogy az alvadék viszkozitása sebességfüggő. Mivel a viszkozitás a növekvő sebességekkel növekszik, az alvadék dilatáns anyagnak tekinthető.

Érdekes módon minden erőkülönbség-görbe elején tapasztaltunk egy csúcsot (16. Ábra A része), az első erőjel megjelenésétől számítva 150-200 s-al később. Ez az emelkedés-csökkenés a disszipált energia görbéjén is megjelenik (17. Ábra A része), viszont az erőkülönbség változásánál korábban, 80-150 s-nál. Ez egyezik a korábbi tapasztalatainkkal, miszerint a viszkózus tulajdonságbeli változások az alvadás kezdeti szakaszában más karakterisztikát mutatnak, mint a rugalmas tulajdonságban bekövetkező változások.



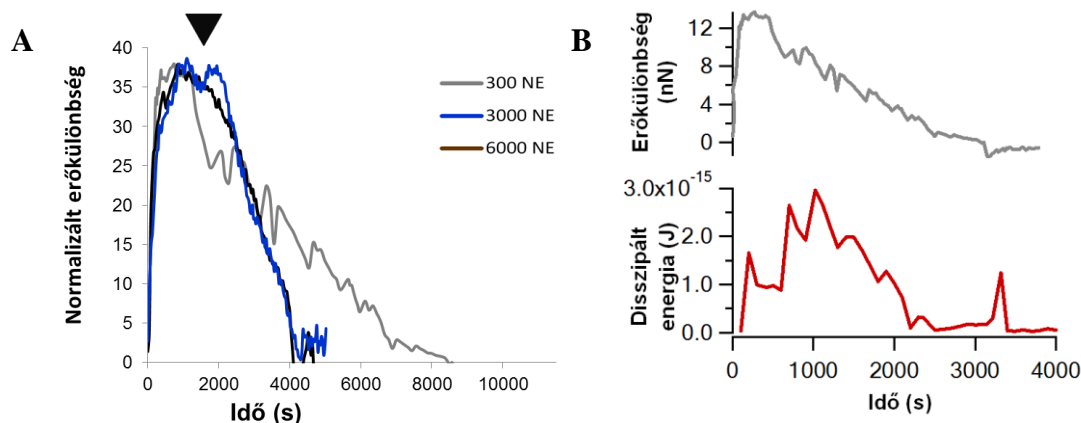
**17. Ábra.** A viszkózus tulajdonság változása különböző rugólapka mozgatási sebességeknél. **A rész:** A disszipált energia változása az alvadás előrehaladtával. A görbék az első alvadási erőjeltől indulnak. A görbék kezdeti szakaszán a 110 s körül megjelenik az ugrásszerű növekedés majd csökkenés (fekete vonallal jelöltem). **B rész:** A disszipált energia % változása különböző rugólapka mozgási sebességek mellett.

### 5.1.2 Sztreptokináz (STK) indukált fibrinolízis követése nTEG-gel

A vérplazmából kialakult alvadékhoz 300-6000 IU STK-t adtunk. Az enzim hozzáadása az alvadás során fellépő erőkülönbség-értékek telítődése (szaturációja) után történt. Az enzim hatására az erőkülönbség csökkenni kezdett, végül eltűnt (18. Ábra). Az erőkülönbség-érték, amelyet az emésztés végeztével kaptunk, 0 nN körül változott. Ez az érték jellemezte a kalciummal nem aktivált, így meg nem alvadt mintát is (14. Ábra piros görbe). Az enzim aktivitását 300 IU-ról 3000 IU-ra emelve a fibrinolízis ideje lecsökkent. Az enzimaktivitást 3000 IU-ról 6000 IU-ra növelve nem tapasztaltuk az emésztés további gyorsulását. A disszipált energia is csökkent az enzim hozzáadását



követően, végül elérte az alvadás kezdeti szakaszára jellemző nulla értéket. Egy reprezentatív görbe mechanikai tulajdonságainak időbeli változását mutatja a **18. Ábra B) része**.



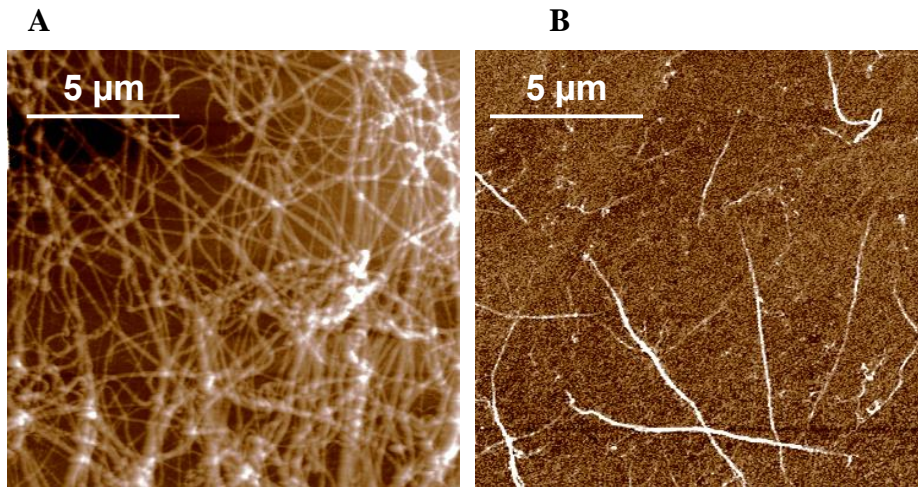
**18. Ábra. Sztreptokináz hatása az alvadék mechanikai tulajdonságaira. A rész:** 300  $\mu$ l-es alvadékhoz adott 300, 3000, 6000 IU STK hatására az erőjel csökkent, majd az alvadás megelőző állapothoz hasonló nulla körüli értéket vett fel. Az adatsorokat azon maximális erőértékre normáltuk, ahol a STK-t hozzáadtuk a rendszerhez. Az ábrán ezt a fekete nyíl jelöli. **B rész:** Normalizálatlan erőkülönbség és disszipált energia adatok idő függvényében a 300 IU STK-val kezelt alvadék esetén.

## 5.2 A fibrinháló és a szálak morfológiája, lízise

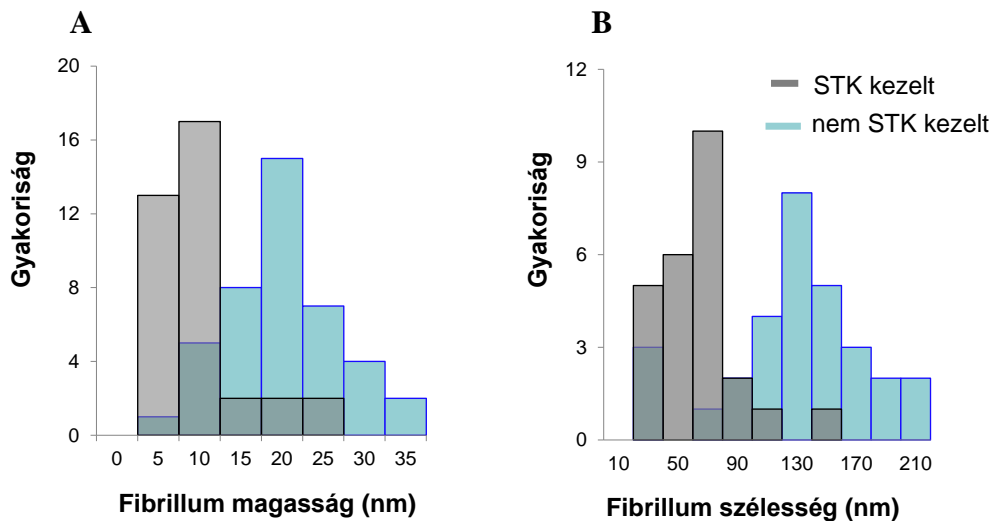
A plazmamintát frissen hasított csillámfelületen *in situ* kalciummal aktiváltuk, majd az így kialakuló hálón vizsgáltuk a szálak morfológiáját. Amely mintákon az alvadás szabad szemmel is megfigyelhető volt, ott a csillámfelületen jelen volt a fibrinháló. A háló morfológiáját, a szálak magasságát és szélességét pásztázó atomerő-mikroszkópiával vizsgáltuk. Az így kapott magasságkontraszt-képek egyikét mutatja a **19. Ábra**. A háló sűrű, a fibrinszálak gyakran elágaztak és a szálak szélessége is nagyon változatos volt: 11,7 nm-től 196 nm-ig terjed. Az átlagos szálszélesség 119 nm ( $\pm$  48 nm SD, n = 30) volt. A szálak magassága Gauss-eloszlást mutatott 17,4 nm-es átlaggal ( $\pm$  6,46 nm SD, n = 42) (**20. Ábra**).

A csillámfelületre olvasztott hálót *in situ* STK-val kezeltük. Az enzim hatására a mintán kevesebb hosszú szál fordult elő, miközben több kis fragmentum jelent meg a minta felületén (**19. Ábra**). A hálózatos struktúra kevésbé jellemző, helyette elvékonyodó végű egyedi szálak jelentek meg. A STK-val kezelt szálak magassága és szélessége is lecsökkent az enzimmel nem kezelt mintához viszonyítva. Az átlagos

szélesség 76,2 nm ( $\pm 27,0$  nm SD, n = 25), míg az átlagos magasság 7,3 nm ( $\pm 4,88$  nm SD, n = 36) volt.



**19. Ábra. Plazmából alvasztott fibrinháló morfológiája.** *A rész:* Kalciummal aktivált plazmaminta magasságkontraszt képe 20 perccel az alvadás kezdete után. *B rész:* A háló 7 percig 40 000 IU STK-al történt emésztés után.

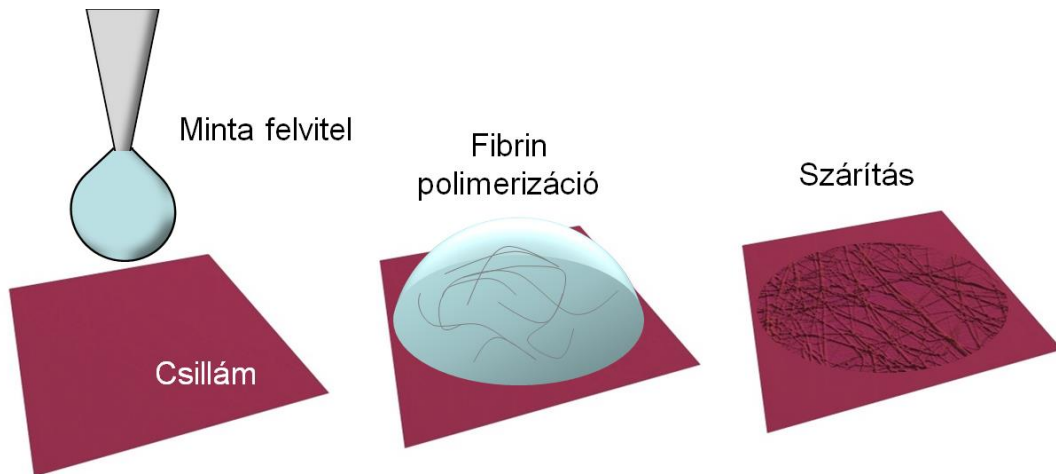


**20. Ábra. Plazmából alvasztott hálót felépítő fibrinszálak morfológiája.** *A rész:* A szálak magasságkontraszt képe STK kezelés nélkül és STK kezelés után. A kezeletlen szálak átlagos magassága 17,4 nm, az STK-kezelt szálaké pedig 7,3 nm volt. *B rész:* STK kezelés nélküli és STK kezelt szálak szélesség-histogramja. A kezeletlen szálak átlagos szélessége 119 nm, az STK-kezelt szálak átlagos szélessége pedig 76,2 nm volt. Szórásokat és elemszámokat lásd a vonatkozó szövegrészben.

### 5.3 Kvázi-2D fibrinháló készítése tisztított fibrinogénből, a háló jellemzése

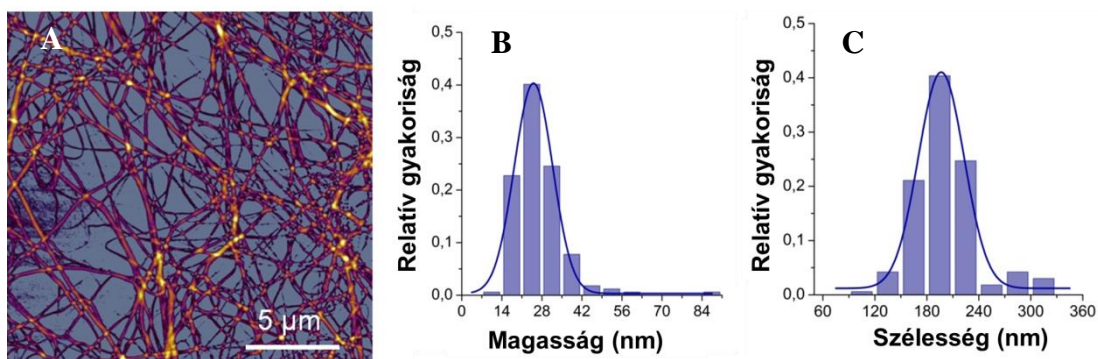
A fibrinháló egy háromdimenziós rendszer, melynek morfológiai jellemzését tűztük ki célul. A hálót felépítő egyedi szálak szélessége az optikai mikroszkópiával elérhető felbontási határ közelében, vagy az alatt van, így ezen módszerek nem alkalmasak vizsgálatainkhoz. Jobb felbontást érhetünk el atomerő-mikroszkópiával, ahol a háló fiziológiás körülmények között vizsgálható. Mivel az AFM topológiai képet alkot, első lépésben a háromdimenziós szerkezet kétdimenziós lenyomatát kellett reprodukálható módon előállítanunk.

Fibrinogén és trombin oldatot kalcium jelenlétében csillámfelszínen elegyítettünk és *in situ* indítottuk el az alvadás folyamatát. Az alvadás legalább 90 percig zajlott, majd a mintát nagy tisztaságú nitrogén gázzal szárítottuk rá a felszínre. Így az alvadás során kialakult háromdimenziós hálónak egy kétdimenziós lenyomatát kaptuk szárítás után. Az alvasztásnál használt puffer fiziológiás koncentrációban tartalmazott NaCl-ot, ezért szárítás után a visszamaradó sófelesleg eltávolítása érdekében a mintát desztillált vízzel mostuk, majd újra szárítottuk. A mosás előtti szárítás egy fixálási lépés is. Az első szárítás következtében a minta stabilan rögzült a csillámfelszínen és a mosás során se vált le a felszínről (**21. Ábra**). Amennyiben ezt nem végeztük el, az alvadék a csillámfelszínről lemosható maradt, a hálónak csak töredékét láttuk atomerő-mikroszkópiás képalkotásaink során. Az így kialakult minta átlagos magassága 50 nm volt.



**21. Ábra. Kvázi-2D háló készítésének sematikus ábrázolása.** A minta felvitelénél először 10  $\mu\text{l}$  fibrinogén oldatot cseppentettünk a felszínre, melyet közvetlenül a felcseppentés előtt kalciummal aktiváltunk. Egyből ezután 10  $\mu\text{l}$  trombin oldattal indítottuk el az alvadást. 90-120 perces alvadási idő után a mintát nitrogén gázzal szárítottuk majd MQ vízzel mostuk, végül újra szárítottuk.

A kvázi-2D háló AFM képét mutatja a **22. Ábra**. A felszínt különböző méretű szálak borítják, melyeknek a magasságát és szélességét vizsgáltuk. A szálak átlagos magassága 20 nm ( $\pm 9$  nm SD,  $n = 167$ , **22. Ábra B része**), átlagos szélessége 165 nm ( $\pm 40$  nm SD,  $n = 167$ , **22. Ábra C része**) volt.



**22. Ábra. A kvázi-2D háló és az azt felépítő szálak morfológiája.** **A rész:** A háló AFM képe. Különböző méretű szálak figyelhetők meg a felszínen. Alvasztási körülmények: 0,5 mg/ml fibrinogén, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 IU trombin. **B rész:** A szálak magasság eloszlása. **C rész:** Szálak szélességének eloszlása.

### 5.3.1 Az OTESPA R3 tű geometriájának hatása a szálak morfológiai kékére

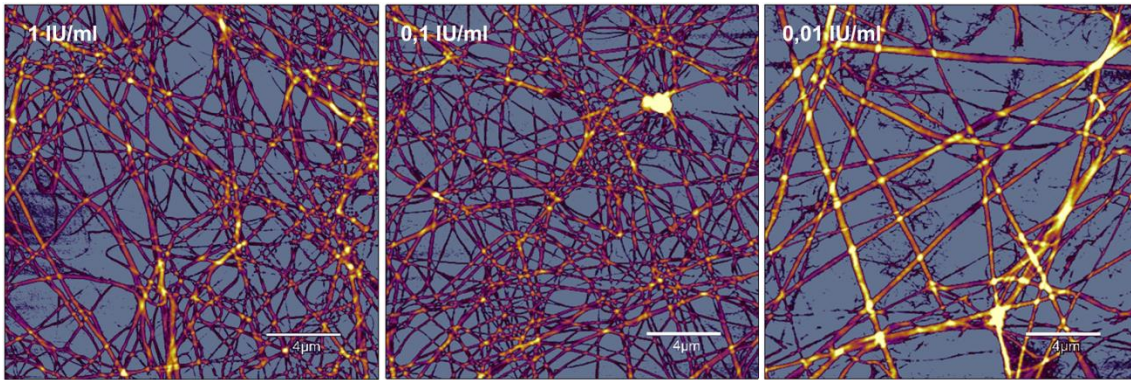
AFM képkalkotás esetében a pásztázott tárgy szélességét a rugólapka geometriája befolyásolhatja, így a vizsgált tárgy a képen nagyobb szélességgel jelenik meg, mint a tárgy valódi szélessége. Ennek a hibának a mértékét a **4.9** fejezetben ismertetett módszerrel határoztuk meg. Vegyük példának egy átlagos, a **4.9** fejezetben már említett szálát 20 nm magassággal és 200 nm szélességgel. A szálát jellemző  $\alpha$  szög ez esetben  $12^\circ$ , az általunk használt OTESPA R3 rugólapka sugara pedig  $r \sim 8,5$  nm volt. A szélesség hibája ( $r \cdot \sin \alpha$ ) 1,8 nm-nek adódik. A mérés relatív hibája a szálak szélességével összevetve 2% alatt volt, tehát a szálak szélességével összehasonlítva a tű által okozott relatív kiszélesedés kismértékű. A továbbiakban a mért szélesség értékeinket nem korrigáltuk a tű okozta kiszélesedéssel.

### 5.3.2 A fibrinháló szerkezetét befolyásoló tényezők

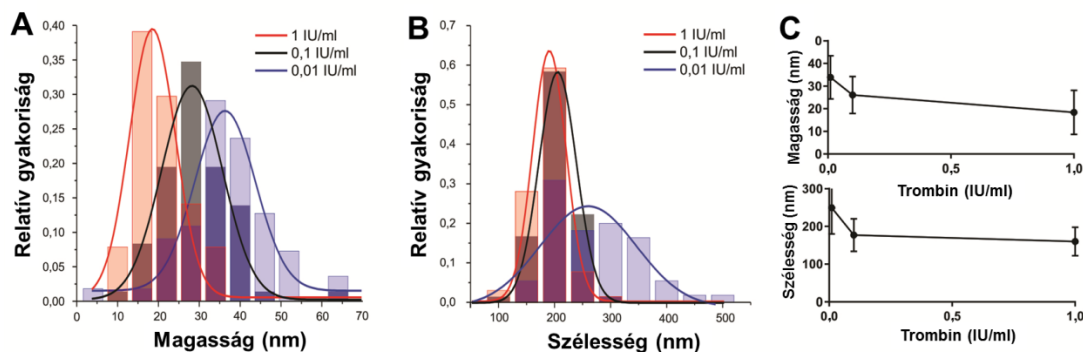
A kialakult alvadékban a szálak méretét, a fibrinháló szerkezetét több tényező is befolyásolhatja (lásd 2.3.5). Közülük mi a klorid-, mint kaotróp ion koncentráció- és a trombin aktivitás változásának a hatását vizsgáltuk.

#### 5.3.2.1 Trombinaktivitás csökkentése

Az alvadás során a trombin lehasítja a fibrinopeptid A-t és fibrinopeptid B-t a fibrinogénről. Az így kialakuló fibrin monomerek már képesek protofibrillumok, majd szálak képzésére. Amennyiben az alvadás során alacsonyabb aktivitásban alkalmaztuk a trombint (1-0,01 IU között), szélesebb és magasabb, vagyis vastagabb szálakat kaptunk (**1. Táblázat, 23. Ábra, 24. Ábra**). Ez egyezik az irodalomban eddig leírt megfigyelésekkel (**2.3.5.1** fejezet).



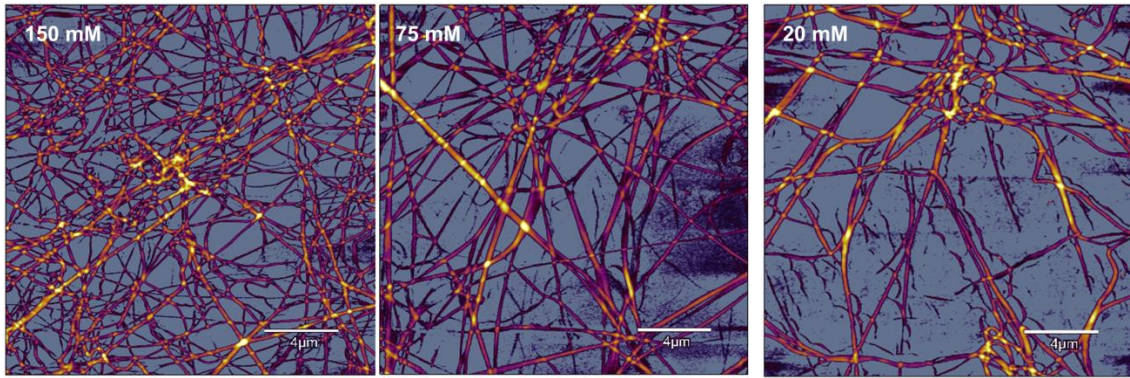
**23. Ábra.** Az alvadás során alkalmazott különböző trombinaktivitások hatása a háló és a szálak morfológiájára. 0,5 mg/ml fibrinogén, 150 mM NaCl és 5 mM CaCl<sub>2</sub> mellett alvasztott 2D hálók, 1 IU/ml; 0,1 IU/ml; 0,01 IU/ml trombin hatására.



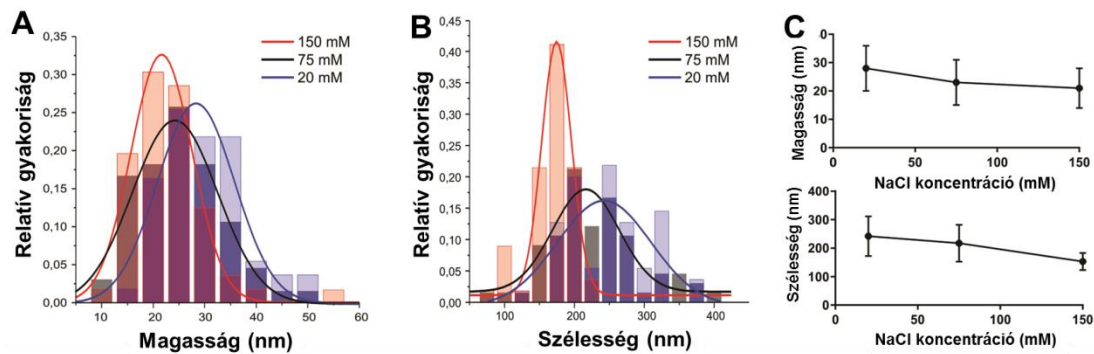
**24. Ábra.** 0,5 mg/ml fibrinogén, 150 mM NaCl és 5 mM CaCl<sub>2</sub> mellett alvasztott 2D hálókban mért szálak morfológiai jellemzése. **A rész:** A magassáértékek relatív gyakoriság eloszlása különböző trombinaktivitás mellett alvasztott hálókban. **B rész:** Az egyedi szálak szélességeinek relatív gyakoriság eloszlása különböző trombin-aktivitás mellett alvasztott hálókban. **C rész:** A szálak magasság és szélesség értékeinek átlaga növekvő trombinaktivitással csökken.

### 5.3.2.2 Kloridion koncentráció csökkentése

A kloridion egy kaotróp ion, melyről ismert, hogy koncentrációjának csökkentése az alvadás során szélesebb, magasabb szálakat eredményez (18, 39). Méréseink során is ezt tapasztaltuk: a fiziológias 150 mM NaCl koncentrációt 75, majd 20 mM-ra csökkentve szélesebb és magasabb szálakat kaptunk. (**25. Ábra, 26. Ábra**) (**1. Táblázat**)



**25. Ábra.** Az alvadás során alkalmazott kloridkoncentráció hatása a fibrinszálak morfológiájára. 0,5 mg/ml fibrinogén, 1 IU/ml trombin és 5 mM  $\text{CaCl}_2$  mellett alvasztott hálók 150 mM; 75 mM és 20 mM NaCl jelenlétében.



**26. Ábra.** AFM képek elemzése. 0,5 mg/ml fibrinogén, 1 IU/ml trombin és 5 mM  $\text{CaCl}_2$  mellett alvasztott 2D hálókban mért szálak morfológiai jellemzése. **A rész:** A magasságvértékek relatív gyakoriság eloszlása különböző NaCl-koncentrációk mellett alvasztott hálókban. **B rész:** Az egyedi szálak szélességeinek relatív gyakoriság eloszlása különböző NaCl-koncentrációk mellett alvasztott hálókban. **C rész:** A szálak magasság és szélesség értékeinek átlaga növekvő NaCl-koncentrációval csökken.

**1. Táblázat.** Különböző trombin és NaCl koncentrációk mellett előállított szálak morfológiai jellemzői.

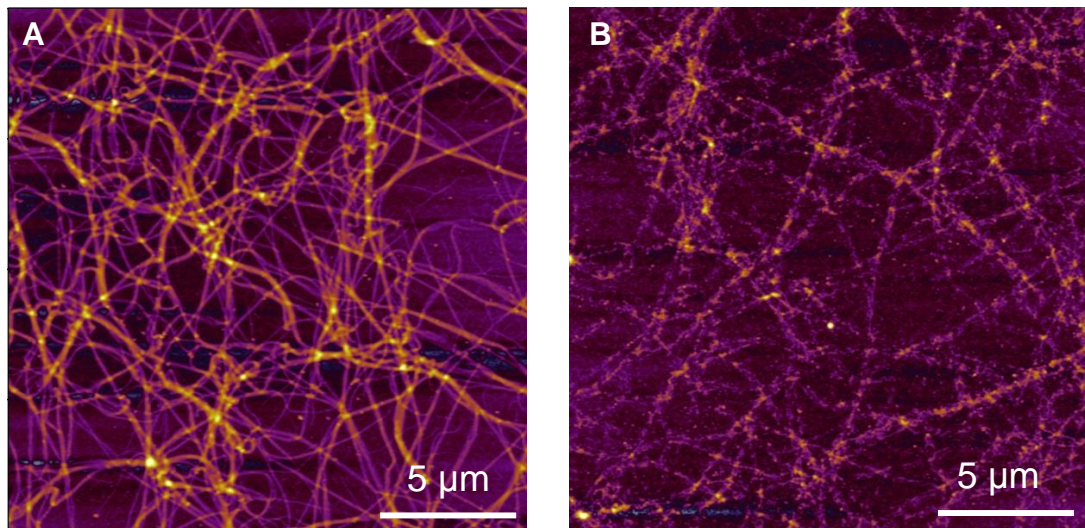
	Szélesség (nm)	SD (nm)	Magasság (nm)	SD (nm)
1 IU/ml trombin	160	± 37,5	18	± 9,8
0,1 IU/ml trombin	177	± 43	26	± 8,2
0,01 IU/ml trombin	250	± 69,5	34	± 9,6
150 mM NaCl	153	± 30	21	± 7
75 mM NaCl	217	± 65	23	± 8
20 mM NaCl	242	± 70	28	± 8

#### 5.4 Kvázi-2D háló plazmin-indukált fibrinolízise

Az előállított kvázi-2D fibrinháló lehetőséget nyújt a háló feloldásának, lízisének vizsgálatára nemcsak a háló, hanem egyedi szálak szintjén is. Az emésztést egyedi szálakon követve a lízis mechanizmusának pontosabb megismerésére nyílik lehetőségünk.

Az előbbi fejezetben a kvázi-2D háló analízise igazolta, hogy a háló megfelelően reprodukálható, így lehetőséget nyújt a fibrinolízis vizsgálatára. A továbbiakban pásztázás után közvetlenül rehidráltuk a hálót Hepes pufferrel és 3 nM végkoncentrációjú plazminnal 30 percig emésztettük, majd ezt a hálót is előkészítettük pásztázásra. Tehát újra mostuk, szárítottuk és ezután pásztáztuk. Az emésztés előtti és utáni kép csak akkor hasonlítható össze megfelelő hibahatáron belül, ha egyazon kvázi-2D hálót pásztázzuk.

Emésztés után a hálózatos elrendeződés megtartott. Az egyedi szálak viszont töredezetté, szakaszossá, részben feldarabolttá váltak. A **27. Ábra** egyazon háló két részletét mutatja emésztés előtt (**A**) és után (**B**).

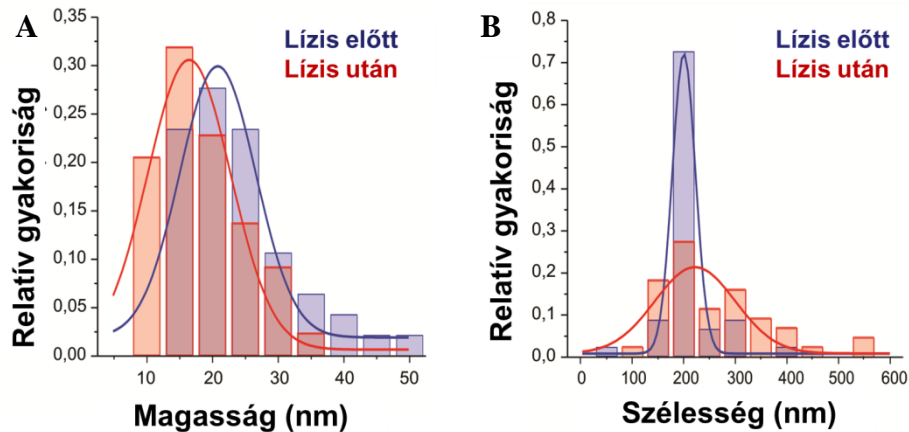


**27. Ábra.** 2D fibrinháló lízis előtt (A) és lízis után (B). A háló alvasztása 1 mg/ml fibrinogén, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> és 1 IU/ml trombin mellett történt. A lízis okozta morfológiai változásokat 30 perc emésztés után vizsgáltuk.

A szálak átlagos magassága lecsökkent a lízis következtében, 21 nm-ről ( $\pm 8$  nm SD, n=47) 16 nm-re ( $\pm 7$  nm SD, n=44) (**28. Ábra**). Nem várt módon lízis hatására



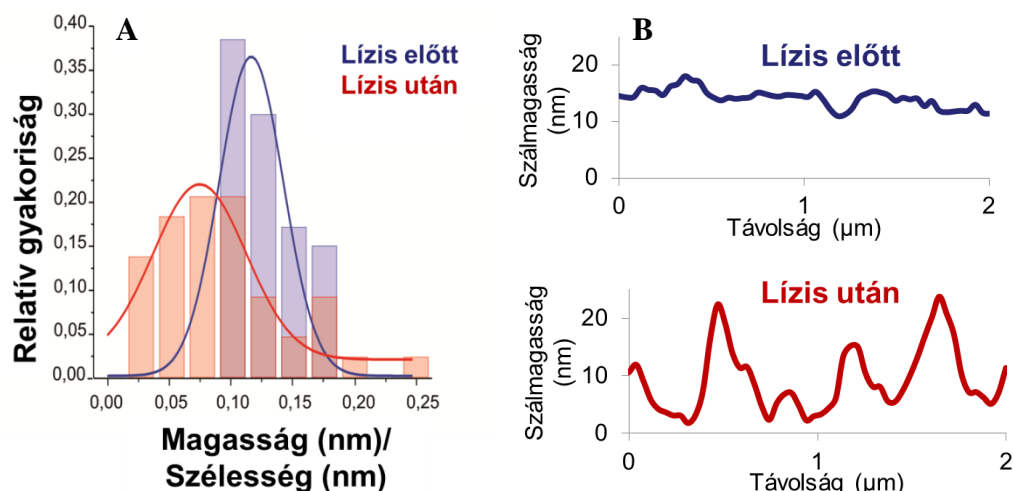
a szálak szélessége növekedett. A szálmagasság felénél mért szélesség (FWHM) 185 nm-ről ( $\pm 47$  nm SD,  $n=47$ ) 248 nm-re ( $\pm 137$  nm SD,  $n=44$ ) növekedett (**28. Ábra**). Emésztés után a szélességadatok szórása is nagymértékben, az emésztés előtti érték közel háromszorosára növekedett. A lízis előtti és utáni értékeket t-próbával összevetve mind a magasságban mind a szélességben szignifikáns változás történt, a p-érték mindkét esetben 0,0001-nél kisebb volt.



**28. Ábra.** A szálak magasság és szélességeloszlása lízis előtt és után.

A csökkent magasság és növekedett szélesség jellemzőnek látszik a lízisre. Ennek értékelésére bevezettünk egy új paramétert, a magasság-szélesség arányt. Minden egyes szál magasságát elosztottuk a szélességével. Ez a paraméter a lízis során 30%-al csökkent: a lízis előtti 0,115-ről ( $\pm 0,027$  SD,  $n=47$ ) 0,081-re ( $\pm 0,052$  SD,  $n=44$ ). A változás szignifikáns (**29. Ábra, A rész**).

A lízisre jellemző fontos változás, hogy bár a hálózatos szerkezet és a szálak orientációja a hálón belül felismerhető maradt, az egyedi szálak darabolttá váltak. Ezzel együtt a felszínük is érdekesebbé vált. A szálak felszínét a hossz tengelyen követve a topológiai profil lényegesen nagyobb kitéréseket mutatott lízis után, mint azt megelőzően (**29. Ábra B rész**).



**29. Ábra.** A lízis okozta morfológiai változások.

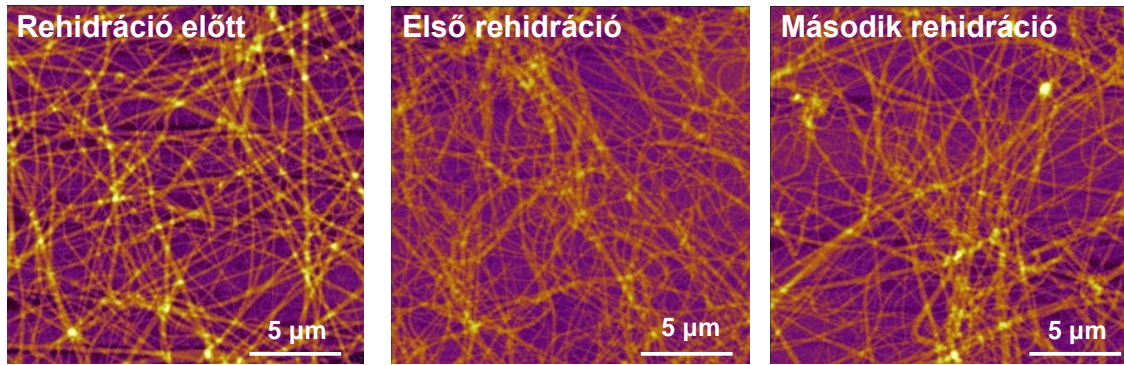
**A rész:** A szálak magasság-szélesség arányának változása a lízis során.

**B rész:** Egyedi szálak topológiai profilja nagyobb ingadozást mutat lízis után (B ábra alsó része) mint lízis előtt (B ábra felső része).

#### 5.4.1 Dehidrációs lépések hatása a hálóra és az emésztésre

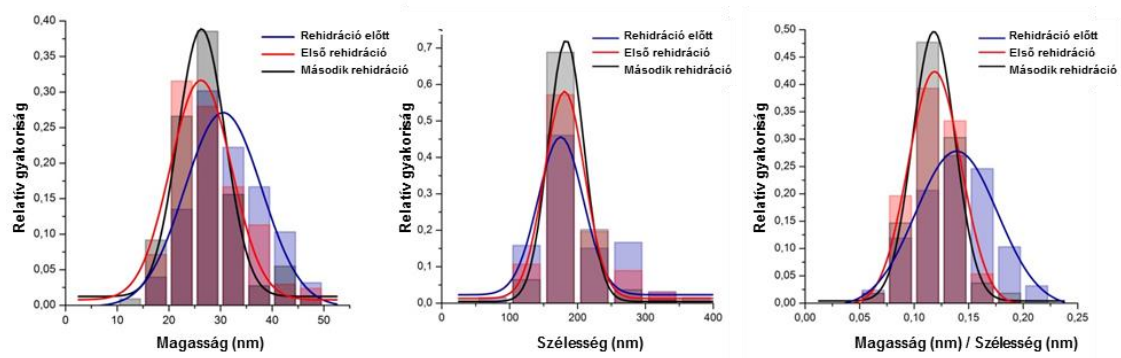
A minta előállítása során két szárítási, azaz dehidrációs lépésen is átesik. A plazmával végzett emésztésnek feltétele a már pásztázott háló rehidrációja. Emésztés után, a következő pásztázás előtt a mintát újból le kell szárítani, így átesik még egy dehidrációs lépésen. A dehidrációs-rehidrációs lépések módosíthatják a háló szerkezetét. Annak érdekében, hogy ezt a hatást jellemezzük, megmértük a szálak magasságát, szélességét és magasság-szélesség arányát két egymást követő rehidrációs lépés után.

Az először elkészített kvázi-2D hálót pásztáztuk, ezt neveztük első rehidráció előtti állapotnak. A mintát ezután 15 percig 150 mM NaCl-ot tartalmazó Hepes pufferben inkubáltuk (első rehidráció), MQ-vízzel történő mosás után nitrogén gázzal szárítottuk (dehidráció), majd AFM-el pásztáztuk. Ez volt az első rehidrációs ciklus. Újbóli 15 perces rehidráció, mosás és szárítás utáni pásztázásból kapott képeket neveztük második rehidrációnak. A pásztázások során kapott képeket mutatja a **30. Ábra**.



**30. Ábra.** A háló morfológiája rehidráció előtt és az egymást követő rehidrációs lépéseket követően.

A szálak magasságának, szélességének és magasság-szélesség arányának változását az egymást követő rehidrációs ciklusokban a **31. Ábra** mutatja.



**31. Ábra.** Szálak magasságának, szélességének és magasság-szélesség arányának változása az egymást követő rehidrációk következtében.

Az első rehidrációs ciklus végére érve csökkenést tapasztalunk a szálak magasságában és a magasság-szélesség arányban (**2. Táblázat**). Ezen paraméterekben tapasztalt változás szignifikáns, míg a szélesség változása nem (**3. Táblázat**). A második rehidrációs ciklus végére további szignifikáns változást nem tapasztalunk. Valószínű, hogy az első rehidráció után a szálak szerkezete stabilizálódik. Fontos kiemelni, hogy a rehidrációs ciklusok során az alvadás során képződött szálak szélességének csökkenését tapasztaltuk, míg a lízis során a növekedését, azaz a két változás egymással ellentétes irányú.

**2. Táblázat.** Az egyedi szálak magassága, szélessége és magasság-szélesség aránya az egymást követő rehidrációs ciklusokban.

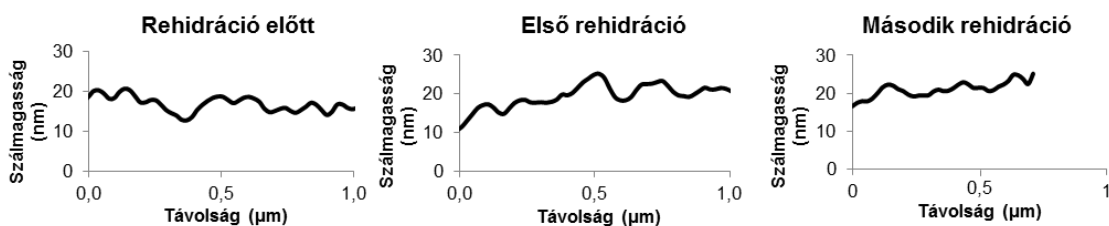
	Magasság [nm]	SD	Szélesség [nm]	SD	Magasság [nm] / szélesség [nm]	SD
Rehidráció előtt n=126	26	7	196	54	0.139	0.034
Első rehidráció n=168	23	6.8	195	45	0.119	0.022
Második rehidráció n=109	22	6.2	186	33	0.118	0.022

**3. Táblázat.** Welch-féle kétmintás t-próba p-értékei\*

	rehidráció előtti és első rehidráció utáni szálak összevetésekor kapott p-érték	Az első és 2. rehidráció utáni szálak összevetésekor kapott p-érték
Magasság	<0,0001 Szigifikáns	0,2292 Nem szignifikáns
Szélesség	0,832 Nem szignifikáns	0,0792 Nem szignifikáns
Magasság/szélesség	<0,0001 Szigifikáns	0,786 Nem szignifikáns

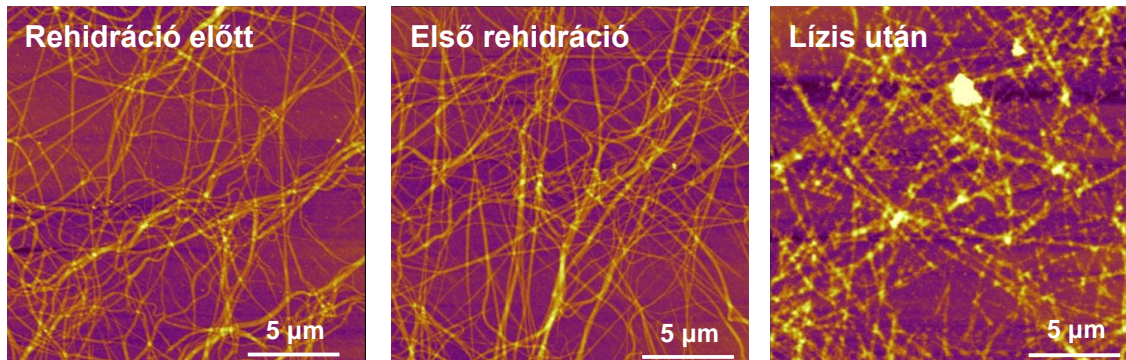
\*a p-értéket akkor vettük szignifikánsnak, ha 0,05-nél kisebb volt.

A szálak topológiai profiljában nem láttunk változást (**32. Ábra**). A lízisenél tapasztalt érdes felület egyik rehidrációs lépés után sem jelent meg.



**32. Ábra.** Szálak topológiai profilja egymást követő rehidrációs ciklusokban.

Az első rehidrációs ciklusban a magasság csökkenését tapasztaltuk. Ez lehet olyan szerkezetbeli változás következménye, ami befolyásolhatja a plazmin által történő emésztést is. A hálót ezért egy rehidrációs ciklus után emésztettük 3 nM plazminnal 30 percig (**33. Ábra**). A hálón a lízis után az emésztés jeleit láttuk, a szálak darabolódása jól megfigyelhető volt. A szálak felszíne is érdekessé vált, egyedi szálak magasságprofiljában is kiugró értékeket láttunk, ami szintén a lízisre utal (**34. Ábra**).



**33. Ábra.** A fibrinháló morfológiája rehidráció majd az azt követő lízis után

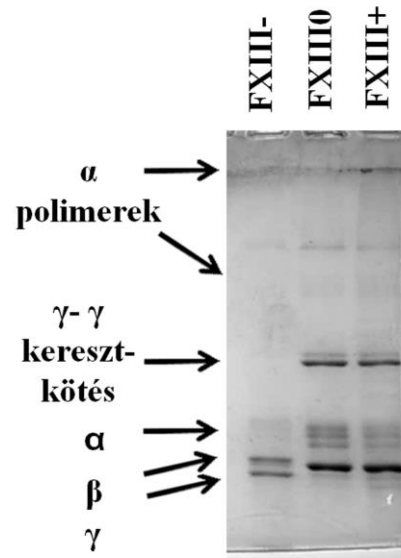


**34. Ábra.** Szálak topológiai profilja rehidráció majd lízis után.

#### 5.4.2 Fibrinogén FXIII tartalma és a plazminolízis összefüggése.

Az alvadás során a szálakon belül kovalens keresztkötések alakulnak ki, melyet a FXIII katalizál (lásd 2.3.5.2 fejezet). Célunk volt annak vizsgálata, hogy a FXIII jelenléte és mennyisége mennyiben változtatja meg a háló szerkezetét és annak lizálhatóságát. Ennek érdekében FXIII-mentes fibrinogént készítettünk: az eddigiekben használt tisztított fibrinogén oldatból alumínium szulfáttal kicsaptuk a FXIII-at (lásd 4.6 fejezet) (93).

A FXIII- és FXIII+ fibrinogén oldatokat trombinnal csillámfelületen alvasztottuk a 4.5 fejezetben leírtak szerint. SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel vizsgáltuk FXIII és FXIII+ fibrinogénből képzett alvadékokban kialakuló kereszt-kötéseket (**35. Ábra**).

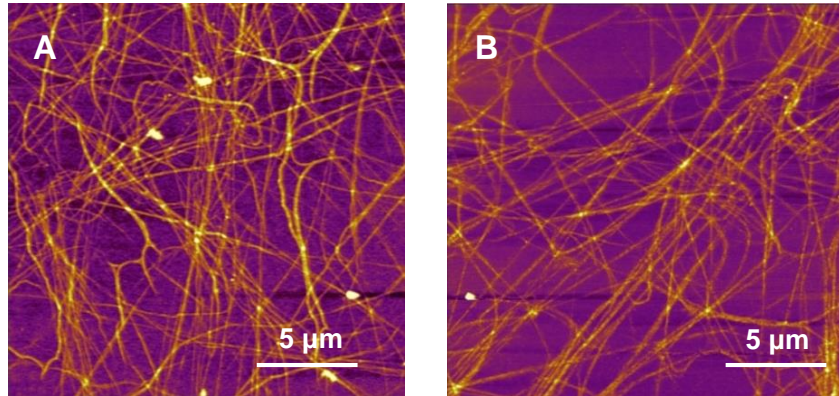


**35. Ábra. SDS-PAGE analízis.** Fibrin 2 órás trombin alvasztás után FXIII mentesített (FXIII-), a korábbi mérésekhez használt (FXIII0,) és FXIII-mal kiegészített (FXIII+) fibrinogénből. A molekulatömeg referencia markerrel futtatott mintát lásd a Melléklet fejezetben (M1 ábra).

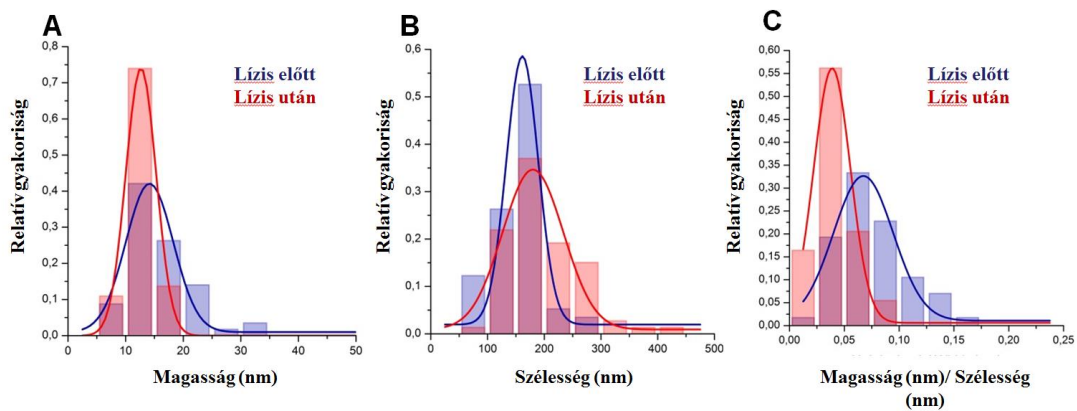
Két óra alvasztás után a FXIII- fibrinogénből alvasztott mintában nem láttunk kereszt-kötött  $\gamma$ - $\gamma$  láncokat, melyek a FXIIIa által létrehozott  $\epsilon(\gamma$ -glutamil)lizin kereszt-kötések jelenlétére utalnak. A FXIII+ fibrinogénből alvasztott mintában mind az  $\alpha$ -polimerek, mind a D dimerek sávja megfigyelhető. Ezek a sávok a FXIII0 mintában is megfigyelhetőek, viszont alacsonyabb intenzitással.

#### 5.4.2.1 FXIII mentes fibrinogénből alvasztott minta morfológiai képe és lízise

A FXIII- mintából kialakult hálót mutatja lízis előtt és után a **36. Ábra**. A szálak magasság, szélesség és magasság/szélesség eloszlását a **37. Ábra** mutatja.



36. *Ábra.* FXIII- minta lízis előtt (A) és lízis után (B).



37. *Ábra.* A FXIII- mintában a szálak magasság- (A) szélesség (B) és magasság-szélesség arányának (C) eloszlása.

Az emésztés következtében a szálak magassága csökkent, szélességük pedig növekedett (37. *Ábra*). Lízis előtt a szálak magassága és szélessége is alacsonyabb volt, mint amit normál mintában mértünk (magasság  $14,5 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm SD}$   $21 \text{ nm} \pm 8 \text{ nm SD}$  helyett, szélesség  $152 \pm 43 \text{ nm SD}$   $185 \pm 47 \text{ nm SD}$  helyett). Ezt okozhatta a FXIII eltávolítása következtében némileg lecsökkent fibrinogén koncentráció. Plazminal történt emésztés után a magasság csökkenését és a szélesség növekedését tapasztaljuk, ahogyan azt az FXIII0 fibrinogénből alvasztott minták esetében is láthattuk. A szélesség növekedése szignifikáns volt. Lízis következtében a magasság/szélesség arány 36 %-al csökkent, ami jó egyezést mutat a normál minta 30 %-os csökkenésével. A szálak hossz tengely-menti profilján emésztés után érdekesebb felszín tapasztaltunk kiugró magasságértékekkel, amiből arra következtethetünk, hogy az emésztés a szálakon végbement (38. *Ábra*).

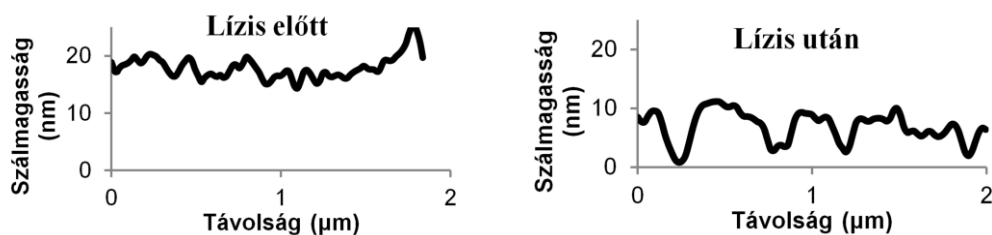
A lízis előtti és utáni állapot statisztikai jellemzését a **4. Táblázat** és az **5. Táblázat** tartalmazza.

**4. Táblázat.** A szálak magasságának, szélességének és magasság-szélesség arányának statisztikai összehasonlítása FXIII- fibrinogénből alvasztott mintán lízis előtt és után.

	Magasság (nm)	SD	Szélesség (nm)	SD	Magasság/szélesség	SD
Lízis előtt n=57	14,5	20	152	43	0,099	0,1274
Lízis után n=73	10,5	22,4	197	61	0,0629	0,18

**5. Táblázat.** Welch-féle kétmintás t-próba eredményei a lízis előtti és utáni állapot összehasonlítására FXIII- fibrinogénből alvasztott mintákban.

	P-érték
Magasság	0,3023, nem szignifikáns
Szélesség	<0,0001, szignifikáns
Magasság/szélesség	0,1831, nem szignifikáns

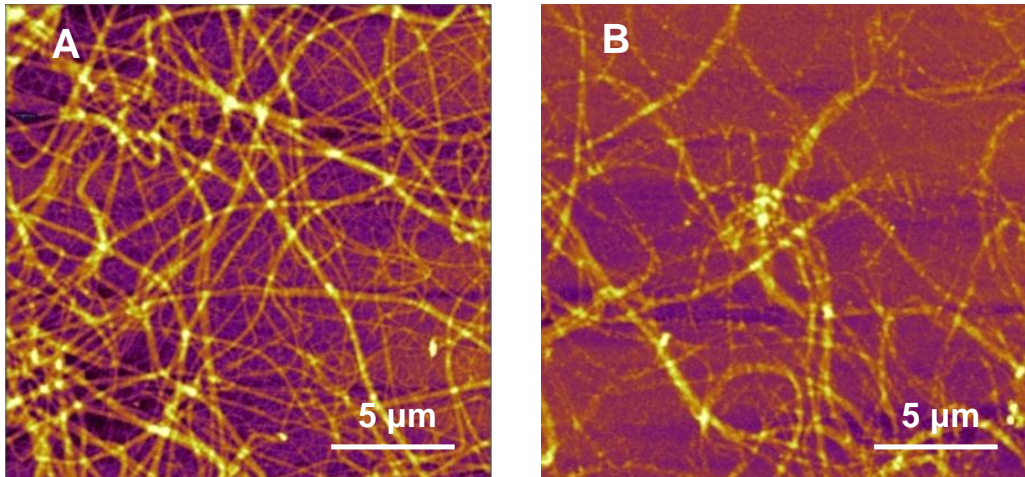


**38. Ábra.** Szálak magasságprofilja lízis előtt és lízis után FXIII- fibrinogénből alvasztott mintán.

#### 5.4.2.2 Hozzáadott FXIII hatása az alvasztott minta morfológiai képére és lízisére

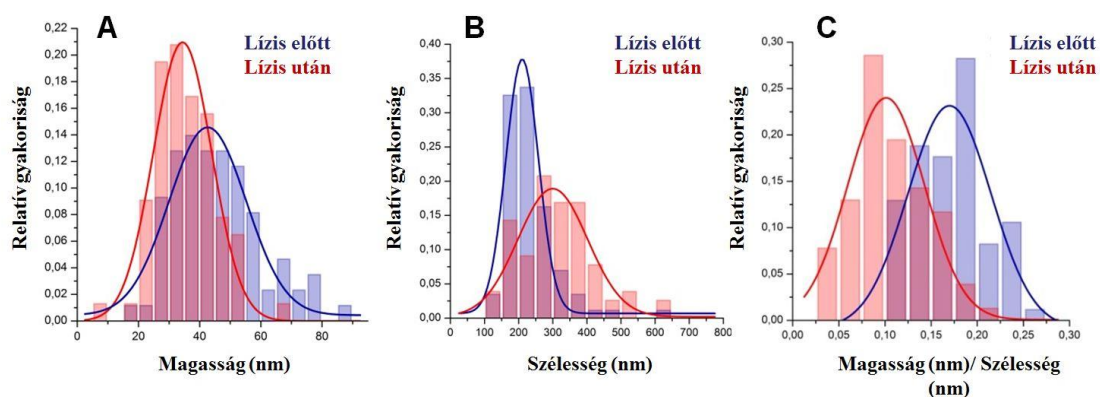
A **39. Ábra** a FXIII+ fibrinogénből alvasztott minta emésztés előtti és utáni állapotát mutatja. Az AFM-el készített topológiai képen megfigyelhetők a lízisre jellemző változások: a szálak töredezetté válnak, míg a hálózatos szerkezet megtartott.





39. *Ábra.* FXIII+ fibrinogénből alvasztott minta. *A rész:* Lizis előtt *B rész:* Lizis után

A szálak magasságának, szélességének és magasság-szélesség arányának eloszlását lysis előtt és után a **40. Ábra** mutatja. A szálakat leíró statisztikai adatokat az **6. Táblázat** és a **7. Táblázat** tartalmazza. A szálak magassága a FXIII+ fibrinogénből alvasztott mintákban nagyobb volt, mint amit a normál mintákban tapasztaltunk ( $44 \text{ nm} \pm 24 \text{ nm}$ , míg normál mintákban  $21 \text{ nm} \pm 8 \text{ nm}$ ). A szálak szélessége is némileg emelkedett értéket mutat a normál mintákkal összevetve ( $236 \pm 71,3 \text{ nm}$ , a normál mintákban  $185 \text{ nm} \pm 47 \text{ nm}$ ). A lysis következtében a szálak átlagos magassága lecsökkent, míg szélességükben növekedést tapasztaltunk. A magasság csökkenése, a szélesség növekedése és a magasság-szélesség arány változása is szignifikáns volt.



40. *Ábra.* FXIII+ fibrinogénből alvasztott minta szálainak magasság (A) szélesség (B) és magasság-szélesség arányának (C) eloszlása.

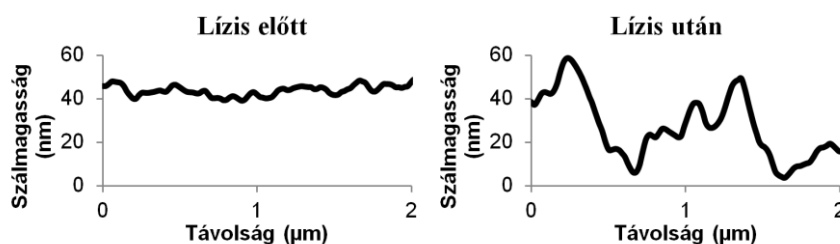
**6. Táblázat.** A szálak magasságának, szélességének és magasság-szélesség arányának statisztikai összehasonlítása FXIII+ fibrinogénből alvasztott mintán lízis előtt és után.

	Magasság (nm)	SD	Szélesség (nm)	SD	Magasság / szélesség	SD
Lízis előtt n=86	44	24	236	71	0,187	0,090
Lízis után n=77	31	9,5	319	125	0,107	0,039

**7. Táblázat.** Welch-féle kétmintás t-próba eredményei a lízis előtti és utáni állapot összehasonlítására FXIII+ fibrinogénből alvasztott mintákban.

	p-érték
Magasság	<0,0001, szignifikáns
Szélesség	<0,0001, szignifikáns
Magasság/szélesség	<0,0001, szignifikáns

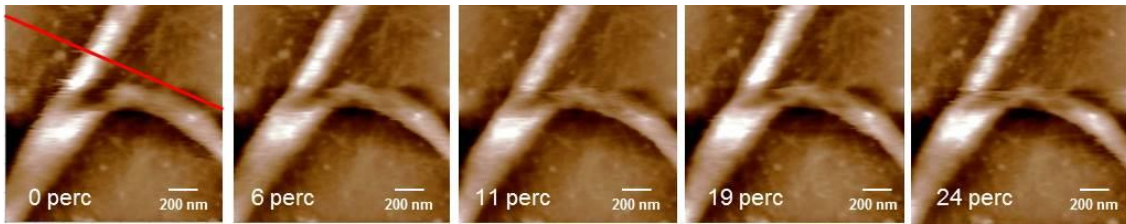
A szálak topológiai profilja egyértelműen arra utal, hogy a felület érdesebbé vált a lízis következtében (**41. Ábra**). A szálak feldarabolódása is jól látható (**39. Ábra**).



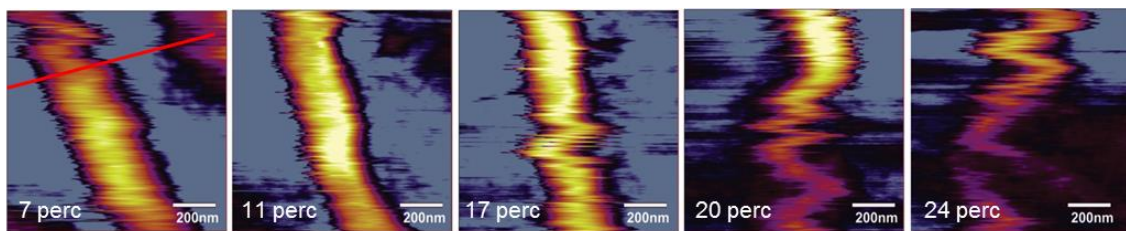
**41. Ábra.** Szálak magasság-profilja lízis előtt és lízis után FXIII+ fibrinogénből alvasztott mintán.

### 5.4.3 Egyedi szál emésztésének valós idejű követése

Egyedi szál lízisét követtük vizes közegben kisebb,  $900 \times 900 \text{ nm}^2$ -es területen folyamatos pásztázással. Rehidrációt követően, enzim hozzáadása nélkül a szálát folyamatosan pásztázva nem láttunk morfológiai változást (**42. Ábra**). Másik mintán vizsgáltuk az emésztés hatását. A megalvasztott hálót pufferrel rehidráltuk, majd plazmint adtunk hozzá úgy, hogy az enzim végkoncentrációja  $2,5 \text{ nM}$  legyen. A szálát folyamatosan pásztázva morfológiai változásokat tapasztaltunk (**43. Ábra**). Kezdetben a szál magasságának növekedését láttuk, majd a szál pásztázás közben elmozdult, cikcakkossá vált. Ez utóbbi utalhat a szál kifeszítettségének csökkenésére, azaz a szál fellazulására.

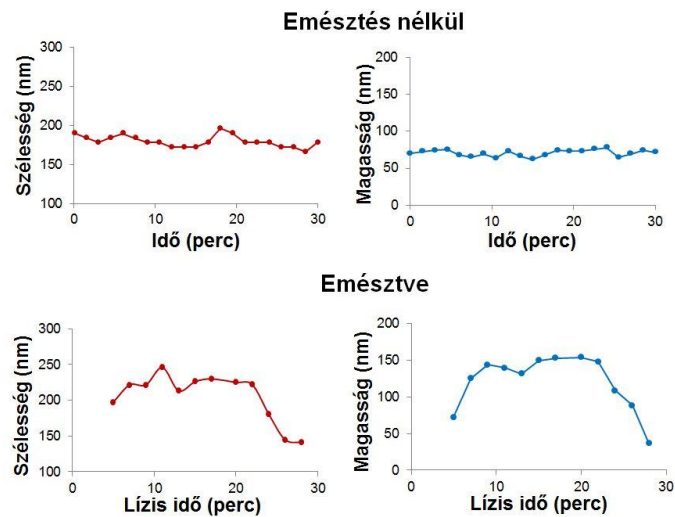


**42. Ábra.** Egyedi szál topológiája emésztés nélkül. A szál alvasztása 1 mg/ml fibrinogén, 1 IU/ml trombin, 150 mM NaCl és 5 mM Ca mellett történt. A pásztázás puffer közegben zajlott emésztés nélkül.



**43. Ábra.** Egyedi szál topológiájában történő változások az emésztés folyamán. A szál alvasztása 1 mg/ml fibrinogén, 1 IU/ml trombin, 150 mM NaCl és 5 mM Ca mellett történt. A lízis 2,5 nM plazmin végkoncentrációval indítottuk (0 perc), az emésztés 30 percig zajlott.

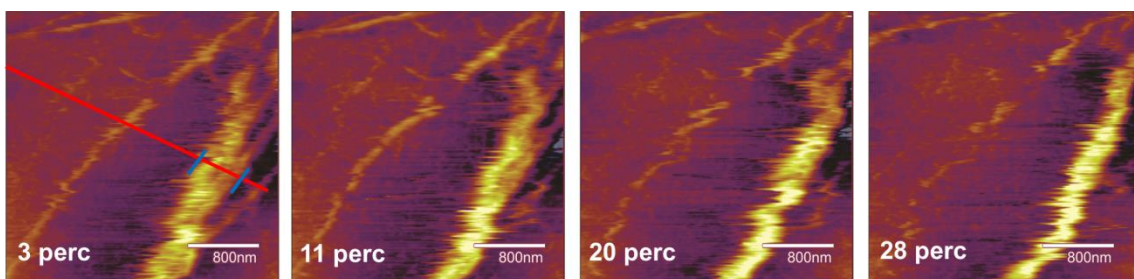
A **42. Ábra** és a **43. Ábra** első képkockáján jelölt piros vonal mentén vettük fel a szálak magasságprofilját minden egyes képen. Ennek időbeli változását mutatja a **44. Ábra**. Emésztés nélkül a szálak szélességében és magasságában is láttunk apró fluktuációkat, de tendenciaszerű változást nem tapasztaltunk. A plazminnal emésztett minta esetén az enzim hozzáadását követően az egyedi szál topológiai profiljában változás látható, melyet két szakaszra osztottunk. Az első szakaszban, megközelítőleg az enzim hozzáadása utáni 10. percig a szál magasságában és szélességében is növekedést tapasztaltunk. Ezután mindkét érték változását egy platófázis jellemezte egészen az emésztés 20. percéig. Végül egy erőteljes csökkenést láttunk mind a magasságban, mind a szélességben, melyet a szál felaprózódása kísért.



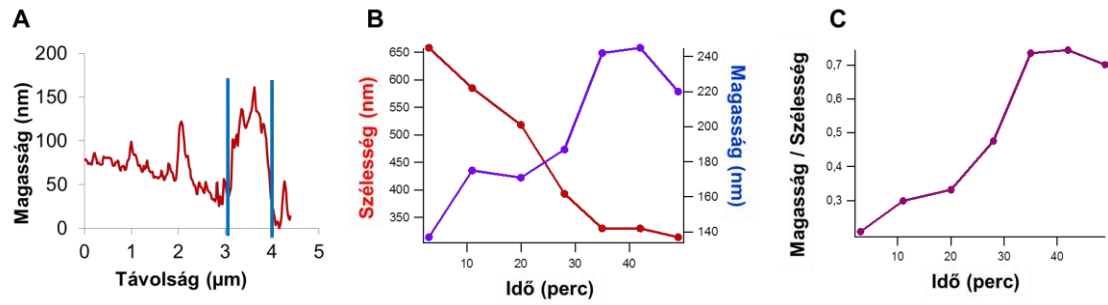
**44. Ábra.** Egyedi fibrinszál topológiai profiljának időbeli változása. A topológiai elemzés emésztés nélkül a 42. Ábra, plazmin jelenlétében a 43. Ábra piros vonallal jelzett szakaszán felvett keresztmetszeti profilon történt.

#### 5.4.4 Szálak oldalirányú összerendeződése a lízis során

Az emésztést nagyobb,  $3 \times 3 \mu\text{m}^2$  területen követtük. Az egymáshoz közeli szálak oldalirányú összerendeződést láttuk. Az egymás melletti kisebb szálak vastag, kompakt kötegekben rendeződése volt látható (46. Ábra). A kisebb szálakból összerendeződő köteg szélessége csökkent az emésztés előrehaladtával, míg magassága növekedett. A magasság-szélesség arány is növekedett ennek következtében, és csak a lízis 40. perce után kezdett el csökkenni (47. Ábra).



**45. Ábra.** A szálak oldalirányú összerendeződése emésztés közben.



**46. Ábra.** Az oldalirányú összerendeződés során a több egyedi szálból összerendeződött köteg paramétereinek időbeli változása. **A rész:** A köteg keresztmetszeti profilja. Helyét 45. Ábra piros vonala jelöli. **B rész:** A köteg szélessége csökken, míg magassága nő az emésztés előrehaladtával. **C rész:** A magasság/szélesség arány az összerendeződés következtében növekszik.

## 6 Megbeszélés

### 6.1 A fibrinháló mechanikai tulajdonságának mérése nanotrombelasztográfiával (nTEG)

A véralvadék mechanikai tulajdonságának időbeli követésére kidolgoztunk egy atomierő-mikroszkópián alapuló módszert, a nano trombelasztográfiát, amelyet alvadásgátolt vérből származó trombocitaszegény plazmára alkalmaztunk.

A módszer alapját az a feltételezésünk adta, hogy méréseink során a rugólapka fel-le mozgásával a lapka körül kialakuló háló („mikrokörnyezet”) erőválaszát vizsgáljuk. Ahogy a háló kialakul a rugólapka körül, egyre inkább akadályozza annak fel-le mozgását, ezáltal a rugólapka az útja során elhajlik. Az elhajlásból számított erőkülönbség az alvadás folyamán növekszik, majd egy értéken állandósul (**15. Ábra A része**). A rugólapka geometriájának ismeretében meghatározható, mekkora térfogatnyi alvadékot érintett közvetlenül a mechanikai manipuláció. Ismert, hogy az alvadék térfogatának 0,25 %-át teszi ki a fibrinháló térfogata (31). Morfológiai méréseink alapján ismert, hogy a fibrinszálak átlagos átmérője 100 nm körüli érték, míg Kim és tsai munkája alapján a szálak átlagos hossza 2,86  $\mu\text{m}$  (94). Ezen adatok ismeretében kiszámítottuk, hogy megközelítőleg 120 fibrinszál állt közvetlen kapcsolatban a rugólapkával a mechanikai manipuláció során. Kiszámítottuk azon felületnek a nagyságát is, melyen a rugólapka és a környező szálak érintkeztek, értéke 28,05  $\mu\text{m}^2$ . A rugólapka mozgásának következtében a szálak megnyúltak és bennük mechanikai feszültség ébredt. A kialakuló mechanikai feszültség értéke megadható, ha a szára ható maximális erőértéket elosztjuk a keresztmetszeti felülettel. Az egyes húzási-engedési ciklusokban mért legnagyobb erőkülönbség 56 nN volt, erre kiszámolva a húzási feszültség ( $\sigma_{max}$ ) maximális értéke 1,996 kPa. A fibrinszálra jellemző Young modult megkaphatjuk, ha a húzási feszültséget elosztjuk a relatív megnyúlással. Kim és tsai alapján a fibrinszálak átlagos hossza 2,86  $\mu\text{m}$  (94). A rugólapka 1  $\mu\text{m}$  úthosszon mozgott, a szálakat is ennyire tudta megnyújtani. Ez a szára nézve 35 %-os megnyúlást jelent, ami alapján a Young modulus maximális értéke 1,478 kPa. Ez az érték három nagyságrenddel alacsonyabb, mint a Guthold munkacsoport által mért átlagos  $15 \pm 7$  MPa Young modulus (54), amely keresztköttött egyedi szálakra vonatkozik (lásd 2.4.2 fejezet). A fenti számolás az általunk mért legnagyobb erőkülönbség értékre vonatkozik,

pontos levezetését lásd a mellékletben. Tehát a hálóban a rugólapka mozgása keltette mechanikai feszültség mellett mért Young modulus minden mérésünk esetében lényegesen alacsonyabb volt, mint a Guthold munkacsoport által mért egyedi szálak Young modulusa.

A Young modulus mellett a szálak mechanikai válaszát egy másik fontos jelenség is meghatározza, ez a húzási felkeményedés (lásd 2.4.1.1 és 2.4.2). Ennek következtében, ha egy szátra nagyobb terhelés esik, mint a környező szálakra, a terhelés eloszlik a hálóban. A terhelés így a hálóban továbbítódik, nem vezet egyedi szálak szakadáshoz. Amennyiben a rugólapka mozgása során olyan mértékű mechanikai feszültség jönne létre egy szálon, amely az adott szál szakadását okozná, akkor az adott szál Young modulusa megnövekedne. Húzási-engedési görbéink a felkeményedés kialakulását támasztják alá: méréseink során egyszer sem kaptunk szakadásra jellemző erőválaszt.

Összefoglalva, a fibrinháló mechanikai manipulációjából számolt Young modulus értékek lényegesen kisebbek, mint az irodalomban egyedi szálak nyújtása során mért Young modulus. Emellett kialakult a húzási felkeményedés és húzási-engedési görbéink egyikén sem kaptunk szakadásra jellemző erőválaszt. Ezen tapasztalataink alapján feltételezzük, hogy méréseink során nem csak a tüvel közvetlen kapcsolatban álló szálak adták az erőválaszt, hanem a szálakhoz kapcsolódó környező háló is befolyásolta az eredményeinket. Ezáltal nem a rugólapkával közvetlen kapcsolatban álló néhány szálnak, hanem egy mikrokörnyezetnek, azaz a rugólapkát körülvevő hálórésznek a mechanikai erőválasztát jellemeztük módszerünkkel.

### 6.1.1 A hálózatos mechanikai tulajdonságok vizsgálata

Egy háló mechanikai erőválasztát alapvetően az egyedi szálak mechanikai tulajdonságai alapvetően határozzák meg, de a teljes háló erőválasza az egyedi szálakéhoz képest összetettebb (lásd 2.4). A fibrinháló komplex erőválaszának jellemzéséhez az nTEG mérési eredményeket használtuk fel.

Az alvadás egyes időpillanataihoz tartozó húzási-engedési görbéken két paraméter változását követtük: az erőkülönbséget, mely a rugalmas tulajdonságokat jellemzi és a disszipált energiát, mely a viszkózus tulajdonságoknak feleltethető meg.

Az **erőkülönbség** az az erő, amellyel a kialakuló, vagy a már kialakult alvadék a rugólapkát visszatartja annak mozgásában. Értéke az alvadás előrehaladtával növekedett, majd egy értéken állandósult. Ez az állandósult érték az a maximális erőkülönbség, amellyel a már kialakult alvadék erősségét jellemezzük.

A **disszipált energia** arányos a háló mechanikai manipulációja során megmutatkozó viszkózus tulajdonságával. Viszkoelasztikus testeket vizsgálva általánosságban kimondható, hogy minél nagyobb mértékű a rajtuk ébredt mechanikai feszültség és az ennek következtében fellépő alakváltozás között eltelt idő, annál nagyobb a hiszterézis területe, a disszipált energia (54). A disszipált energia feltételezhetően szerkezeti átalakuláshoz köthető. Kémiai vagy fizikai keresztkötések nagymértékben módosíthatják a fehérjékből felépülő hálók viszkozitását (95). Fibrin esetében a FXIII által katalizált kémiai keresztkötések kialakulásának következtében a szál rugalmassági modulusa növekszik (lásd **2.4.2**). A fibrin gél merevsége („rigidity”) csökken, ha az alvadás során magasabb a hőmérséklet, feltehetően a keresztkötések disszociációja miatt (96). A fenti megfigyeléseket figyelembe véve feltételezzük, hogy az alvadás során kialakuló és egyre nagyobb számban megjelenő keresztkötések hozzájárulnak az alvadék által disszipált energia növekedéséhez. A disszipált energia változása mögött álló egy másik lehetséges szerkezeti átalakulás az  $\alpha$ C doménekhez köthető. A szálakon belül a protofibrillumok az  $\alpha$ C doménekeken keresztül kapcsolódnak egymáshoz. Lehetséges, hogy a szálak megnyújtása közben a protofibrillumok elcsúsznak egymáson, a húzással befektetett energia pedig a protofibrillumokat összekötő  $\alpha$ C domén szerkezetének átalakulásában disszipálódik.

A disszipált energia méréseink során  $10^{-15}$  J, vagyis femtojoule tartományban mozgott. Ez az abszolút értékben alacsony szám módszerünk jellemzője: (1) korábbi számolásunk szerint a rugólapka megközelítőleg 20 fibrinszállal van közvetlen kapcsolatban, a húzási felkeményedést is figyelembe véve, ez az alvadéknak csak egy kis részét jelenti a rugólapka körüli mikrokörnyezetben; (2) húzási-engedési görbéink 1  $\mu$ m elmozdulás során nN nagyságú erőt mutatnak,  $[fJ] = [nN] * [\mu m]$ .

A disszipált energia %-os aránya is meghatározható minden egyes húzási-engedési görbéből. Ez az érték megadja, hogy a rugólapka mozgatása által befektetett energia hányad része disszipálódik az alvadék szerkezetében. Kísérleteink során a disszipált energia átlagosan a befektetett energia 27%-a volt.



### 6.1.2 A rugólapka fel-le mozgató sebességének változtatása

A növekvő mozgató sebességek következtében a rugólapka által az alvadékra gyakorolt nyíróerő is növekszik. Nagyobb nyíróerő hatására az alvadék mechanikai jellemzői megváltozhatnak, ezeket a változásokat is vizsgáltuk kísérleteink során. Négy különböző rugólapka sebességet alkalmaztunk, melyek a következők voltak: 0,25  $\mu\text{m/s}$ ; 0,5  $\mu\text{m/s}$  1  $\mu\text{m/s}$  és 2,5  $\mu\text{m/s}$ .

Más és más rugólapka mozgató sebességeket alkalmazva a maximális erőkülönbség változott (**16. Ábra B része**), azaz módszerünk esetében az az erő, amellyel a kialakult fibrinháló visszatartja a rugólapkát annak mozgásában, függ a rugólapka mozgató sebességétől.

Az alvadás során disszipált energia is nagyobb maximális értéket vett fel, ha az alvadás folyamán nagyobb rugólapka sebességet alkalmaztunk. Az alvadék dilatáns anyagként viselkedett, ugyanis a viszkózus tulajdonságkomponenst jellemző disszipált energia nagyobb nyíróerő hatására monoton növekedett.

Mind a négy erőkülönbség-görbe esetén láttunk az alvadás kezdeti szakaszában 150-200 s környékén egy erőnövekedést, melyet csökkenés követett (**16. Ábra A része**). Az alvadás kezdetén megjelenő erőkülönbség növekedést és csökkenést a korábbi méréseink során néhány esetben nem tapasztaltuk. Amennyiben az erőkülönbség-görbén megjelenik a kezdeti növekedés majd csökkenés, a disszipált energia növekedésénél is látható ez a tendencia (**16. Ábra A része**). Azonban a csúcspont előbb jelenik meg a disszipált energia változásában, mint az erőkülönbség-görbén, azaz a viszkózus tulajdonságkomponensben előbb következik be a változás, mint a rugalmas komponensben. Lehetséges, hogy a viszkozitásban bekövetkező változást az egyedi szálak vastagodása okozza. Az alvadás során a hálót felépítő szálak mérete nagyon változatos lehet (lásd 2.3.4). A kialakult szálak vastagságát a protofibrillumok közti oldalirányú kölcsönhatások határozzák meg (19). Az oldalirányú kölcsönhatások mellett a szálak elágaznak, mely folyamat elengedhetetlen a hálózatos szerkezet kiépítéséhez. A görbe elején megjelenő csúcspont akár az újabb protofibrillum beépüléséről a szál elágazásra való váltását is jelezhetik. A jövőben tervezem ezen lehetőségek kísérletes vizsgálatát.

### 6.1.3 nTEG és TEG eredmények összevetése

Az alvadék mechanikai tulajdonságait meghatározó fibrinhálóról a trombelasztográfia és a nano-trombelasztográfia is információt szolgáltat. Mindkettővel követhető a teljes alvadék mechanikai tulajdonságának időbeli változása. Amíg azonban a klasszikus trombelasztográfiában a mért paraméterek az alvadék mechanikai tulajdonságát csak közvetetten jellemzik, az általunk mért erőkülönbség jól definiált fizikai mennyiség, mellyel az alvadék által a rugólapkára ható visszatartó erő közvetlenül mérhető.

Az nTEG mérésekhez egészséges egyének mintáit használtuk. Ha az x-tengelyre tükrözött erőkülönbség-görbénk 30. percénél mért amplitúdóját hosszegységben fejezzük ki, azaz 60 mm-re normalizáljuk (ez az amplitúdó a TEG referenciaértéke), az R-idő 5,67 percnél az  $\alpha$ -szög pedig 61,4 °-nak adódott. Mindkét érték a TEG referenciatartományában található (R-idő: 3,8-9,8 perc, szög: 47,8-77,7 °) (66). Tehát ha erőkülönbség eredményeink fizikai jelentését figyelmen kívül hagyva csak grafikusán értékeljük, azok időbeli változása összevethető a TEG eredményekkel.

A TEG során mért jel a tartó edény és az abba merülő henger között kialakuló mechanikai csatolás, mely segítségével a vizsgált vérminta viszkoelasztikus tulajdonsága jól jellemezhető, viszont a rugalmas (elasztikus) és a viszkózus tulajdonságkomponens elkülönítve nem vizsgálható (97). Ezzel szemben az nTEG módszer előnye, hogy a rugalmas és a viszkózus tulajdonságkomponens időbeli változása az alvadás során egymástól elkülönítve vizsgálható.

TEG mérések során a teljes vérrel megtöltött tartóedény egy körív pályán 0,1 Hz frekvenciával oszcillál, ami a körív mentén több milliméteres elmozdulást jelent (68). Az általunk nTEG mérésekben használt rugólapka 1  $\mu\text{m}$  távolságon mozgott, amely úthossz három nagyságrenddel kisebb a TEG-ben alkalmazott elmozdulásnál. A rugólapka mozgásának sebessége is három nagyságrenddel kisebb az nTEG mérésekben, mint hagyományos TEG alkalmazott sebességek. Az általunk használt legnagyobb fel-le mozgatási sebesség 2,5  $\mu\text{m/s}$  volt. A rövidebb úthossz és alacsonyabb mozgási sebességek alkalmazása által módszerünkkel lehetőség nyílik az alvadás során viszkoelasztikus tulajdonságokban bekövetkező olyan kismértékű változások követésére, melyek a TEG esetében átlagolódnak. Az általunk felvett nano-trombelasztogramok olyan adatsorok, melyekben az alvadék valamely mechanikai

jellemzőjének (rugalmasságának, viszkozitásának) időbeli változását követjük. Az adatpontok két másodpercenként követik egymást és minden egyes adatponthoz tartozik egy erő-elmozdulás függvény. Ezen erő-elmozdulás függvények az alvadás adott időpillanataiban az alvadék mechanikai tulajdonságait mutatják, így segítségével az alvadék viszkozus és rugalmas tulajdonságainak pillanatnyi értéke jól jellemezhető. A mért értékek időbeli változását mutató nano-trombelasztogram segítségével pedig vizsgált paraméterekben az alvadás során bekövetkező változásokat tudjuk megfigyelni.

Az nTEG során fellépő erők a hagyományos TEG-hez hasonlóan periódikusak, de valószínűleg nem csak nyíróerő lép fel a mérés folyamán, hanem nyomó-, torziós- és hajlítóerők is hatással vannak a rugólapka mozgására, így egy komplexebb, összetettebb erőválaszt kapunk, mint a TEG esetében.

A TEG-nek és az nTEG-nek is előnye, hogy nem az egyedi szálát, vagy egy szálon belüli kölcsönhatásokat vizsgálja, hanem a kialakult alvadék háromdimenziós rendszerének komplex mechanikai válaszát. A TEG teljes vérből végzi a mérést, így a hematokrit érték és a trombocitaszám és funkció is befolyásolja az eredményeket. Krónikus anémia esetén például gyakran előfordul megnövekedett alvadási hajlamú mintáéhoz hasonló erőválasz (98). Mi a módszerünket trombocitaszegény humán plazmára dolgoztuk ki, az nTEG értékeket ezáltal nem befolyásolja sem a hematokrit érték, sem a trombocita-funkció. A dolgozatom témáját már nem érinti, de bevezetése óta két témában is alkalmaztam a nTEG módszert. (1) Az egyikben megmutattam, hogy van lehetőség az alakos elemek bevonására, így a módszer kiterjesztésére a véralvadási rendszer celluláris elemeire, trombocitadús plazma alvadék jellemzésére (99). (2) A másik témában tisztított fibrinogénből alvasztott mintára dolgoztam át a módszertant, így össze tudtam hasonlítani citrullinált és nem citrullinált fibrinháló mechanikai erőválasztát.

A Weisel munkacsoport véleménye alapján összefoglalva, az nTEG, mint atomerő-mikroszkópián alapuló nanoreológiai mérés lehetőséget teremt az alvadék viszkoelasztikus tulajdonságainak kis mintatérfogásban elvégezhető precíz mérésére (11).

#### 6.1.4 Fibrinolízis vizsgálata nTEG-gel

A fibrinolízis hasonló időskálán ment végbe, mint azt az irodalomban is olvashatjuk. Méréseink során a 300 µl-es plazma trombus lízise 40-60 perc alatt ment végbe. Humán miokardiális infarktus esetén a rekanalizációhoz szükséges idő („door to needle time”) STK alkalmazását követően 60 perc körüli érték volt, (100), ami az általunk mért értékekkel jó egyezést mutatott.

STK hozzáadását követően az erőkülönbség értékek csökkenése látható a nanotrombelasztogramokon (**18. Ábra**). A csökkenő szakaszra egyenest illesztve annak meredeksége jellemzi az emésztés sebességét. A csökkenő szakasz meredeksége 3000 IU STK alkalmazása esetén a 300 IU enzimmenyiségnél mértnek háromszorosa. 6000 IU STK a 3000 IU-hoz képest már nem növelte jelentősen a lízis sebességét.

A lízis során a disszipált energia csökkenését is tapasztaltuk (**18. Ábra**), azaz az STK-plazminogén-plazmin általi emésztés az alvadék viszkózus komponensét megváltoztatta. Az erőkülönbség és disszipált energia csökkenése is szerkezeti változásokkal áll összefüggésben. Li (2017) és Buckay (2015) valamint munkatársai közleménye szerint lízis során az egyedi fibrinszálak fellazulnak, hosszirányban megnövekednek (16, 87). Egyedi szálak emésztése során mi is tapasztaltuk a szál fellazulását (**5.4.3 fejezet, 43. Ábra**). A jelenség hátterében a szálon belül a protofibrillumok között létrejött oldalirányú kötések felhasítása állhat (lásd **6.2**)(16). A fellazult háló a rugólapkát egyre kevésbé képes visszatartani a mozgásában, ami az erőkülönbség csökkenéséhez vezet. A disszipált energia csökkenése a lízis folyamán a fibrinháló viszkozitásának csökkenésére utal, melyet nagy valószínűséggel a szálon belüli kereszt-kötések felszakadása okoz.

Mind a disszipált energia, mind az erőkülönbség visszatér a kezdeti értékre a lízis végére. Így megállapítható, hogy a fibrinolízis következtében kialakuló fragmentumok hasonló mechanikai tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a meg nem alvadt plazmaminta.

## 6.2 Plazmából alvasztott és lizált fibrinháló és fibrinszál morfológiája

Plazma alvasztása során keletkezett fibrinháló szálait azok magasságával és szélességével jellemeztük. Az irodalomból ismert értékekkel összehasonlítva, méréseinkben a szálak magassága (17,4 nm ± 6,46 nm SD) nagyobb, mint Evans-

Nyugen és munkatársai által AFM-el mért 5,5 nm magas fibrin egyréteg („monolayer”) (101), viszont a konfokális mikroszkópiával mért szálmagasságnál két nagyságrenddel alacsonyabb (102). Az egyedi szálak szélessége nem egységes: 11,7 nm és 196 nm között van. A szélesség átlagos értéke 119 nm, ami Hudson és munkatársai által leírt érték másfélszerese (70).

A szálak magassága, hasonlóan a szélességéhez az irodalmi adatokkal összehasonlítva elsősorban attól függően mutat eltéréseket, hogy milyen módszerrel (AFM, konfokális mikroszkópia) vizsgálták azokat. Azonban a különböző módszerekkel mért adatok között is nagyok a különbségek. Mi is nagymértékű eltéréseket tapasztaltunk a szálak magasságában és szélességében a saját méréseinken belül és az irodalmi adatokkal összevetve is. A háló egy enzimreakció végeredményeként alakul ki, a kialakuló szálak morfológiájára pedig számtalan tényező hatással van (lásd 2.3), amelyek magyarázatot adhatnak a nagymértékű különbségekre. Például a trombin/fibrinogén molarányának változtatása is lényeges különbséget okoz a szálak méretében. Ferri és munkatársai (2002) a trombin/fibrinogén arányt 0,01-ről  $10^{-5}$ -re csökkentve a szálak magasság és szélesség növekedését tapasztalta (103). Az általunk alkalmazott rendszer trombin/fibrinogén molaránya 0,15 volt. Ez egy viszonylag magas aránynak számít, ami magyarázhatja a többségében vékony szálak kialakulását.

A szálak magasságát, szélességét meghatározza a szálak belső szerkezete, a protofibrillumok szálon belüli sűrűsége. Megbecsültük, hogy az általunk használt alvadási körülmények mellett megközelítőleg 17 protofibrillum található egy szálon belül. A becslés módja a következő: A szálak keresztmetszeti profilját nézve azok szélessége lényegesen nagyobb, mint a magassága. A szálak kerülete így jó közelítéssel megadható, ha téglalapnak vesszük őket. Ezzel a közelítéssel számolva a szál kerülete  $2 \cdot 119 \text{ nm} + 2 \cdot 17,4 \text{ nm} = 273 \text{ nm}$ . Ugyanezzel a kerülettel rendelkezne egy 86,8 nm átmérőjű, kör keresztmetszetű szál. Ha a szálat felépítő protofibrillumok átmérőjét 5 nm-nek vesszük (104), megközelítőleg 17, oldalirányban aggregálódott protofibrillum alkot egy szálat a mi méréseink szerint. A szálat felépítő protofibrillumok száma megbecsülhető az irodalomban leírt DLS mérések alapján (105), ahol a mi alvasztási körülményeinkre nézve 10-20 protofibrillum várható szálanként. Összegezve, az általunk becslt 17 protofibrillum jó egyezést mutat a DLS mérések eredményei alapján becslt protofibrillumok számával.

STK-t adva a mintához a háló lizálódik. Ennek eredményeképpen a felszínen csökkent a vastag szálak száma (**20. Ábra**), ami megfelel az irodalomban leírtaknak (28). A szálak átlagos magassága 7,3 nm-re csökkent, miközben a felszínen a hálózatos struktúra helyett egyedi szálak, hálózattöredékek láthatók. Az STK aktiválta plazminogén-plazmin átalakulás (lásd 2.5) eredményeképpen a plazmin valószínűleg lehámozza, mintegy lefejt a protofibrillumokat a szál felszínéről.

## 6.3 Kvázi-2D háló

### 6.3.1 A kvázi-2D háló és az azt felépítő szálak morfológiai képe

A plazmából képzett fibrinháló morfológiai analízise felvetette azt az igényt, hogy AFM-mel jól analizálható, reprodukálhatóan mérhető fibrinhálót állítsunk elő. Az AFM egy topológiai vizsgálat, így a hálózatos szerkezetű fibrin akkor vizsgálható jól ezzel a módszerrel, ha a szálak között kevés átfedés van, azaz többnyire különálló szálakat látunk. Elsődleges célunk emiatt egy olyan háló előállítása volt, melyben minél kevesebb átfedés van a szálak között. A szálak nem rétegekben fekszenek egymáson, hanem egyetlen réteget, egy kvázi-2D struktúrát alkotnak. Ennek érdekében az alvasztást kis, 20  $\mu$ l mintatérfogatóból végeztük. A tisztított humán fibrinogén oldatot trombinnal közvetlenül a csillámpala felszínen aktiváltunk. Az alvadási folyamat végeztével a mintát szárítással fixáltuk, így mosás és szárítás után előállítottuk a hálót.

A háló vastagsága (z-irányú dimenziója) 5 nagyságrenddel ( $100.000\times$ ) kisebb, mint a háló szélessége (x-y irányú kiterjedése). Azaz a minta vastagsága annak szélességéhez viszonyítva elhanyagolhatóan kicsi, a hálót kvázi kétdimenziósnek nevezhetjük annak ellenére is, hogy a szálak némely területeken egymással átfedésben vannak.

A 2D-hálóban a szálak szélessége nyolcszor nagyobb, mint a magasságuk, a szálak ellapulnak a csillám felszínén. Fehérjeshálaknak hasonló, bár kisebb mértékű ellaposodását csillámfelszínen már leírták korábban is (106, 107). A szálak ilyen mértékű kiszélesedése nagyobb mértékű, mint amit a tű hegyének szélessége miatti pásztázási hiba okozhat. A tű okozta kiszélesedés értéke esetünkben megközelítőleg 7 nm (**10. Ábra**). Mivel a szál szerkezete egy ellaposodott háromszöghöz hasonló, a szélességben tapasztalt hiba valószínűleg még ennél is kisebb, 2 nm alatti érték, ami a szálak szélességében 2%-nál nagyobb mértékű kiszélesedést nem okozhat. Lehetséges,

hogy a szálak alkotó protofibrillumok szerveződése nem teljesen meghatározott, a csillámfelszínen így kialakulhat egy nyugalmi, ellaposodott szerkezet.

### 6.3.2 Trombin és NaCl hatása a szálak morfológiájára

A 2D hálóban a szálak átlagos magassága és szélessége is megnövekedett, ha az alvasztás során alkalmazott NaCl koncentrációt vagy trombin aktivitást csökkentettük.

A NaCl esetében feltételezzük, hogy a szálak mérete a kloridionok csökkenő koncentrációja miatt nőtt. Ez az irodalomban már megfigyelt és leírt jelenség, melyet NaF esetében nem tapasztaltak (lásd 2.3.5). A kloridion mint kaotróp ion befolyásolja a protofibrillumok közötti oldalirányú kölcsönhatásokat, ezáltal hatással van a kialakult szálak átmérőjére és a háló szerkezetére. Koncentrációjának megváltoztatásával az alvadás során alkalmazott ionerő is változik. Dinamikus és sztatikus fényszórásmérési kísérletek alapján növekvő kloridion koncentráció mellett a szálon belül egységnyi területre eső protofibrillumok száma csökken (39). Spektrometriával kombinált SAXS vizsgálatok alapján csökkenő ionerő mellett a szálak átmérője növekszik, míg a protofibrillumok közti távolság csökken (18). Méréseink során az alacsony NaCl koncentráció mellett magasabb és szélesebb szálak jellemzőek, mely jó egyezést mutat az irodalomban eddig leírtakkal.

A trombinhatás mechanizmusa még nem ismert, pedig a fibrinogén-fibrin átalakulás mérföldköveinek lerakói, köztük élen járó magyar kutatók, több mint fél évszázaddal ezelőtt leírták, hogy a fibrinogént hasító enzim (a trombin) nem feldarabolja a szubsztrátját, hanem limitált proteolízissel negatív csoportokat hasít le róla és egy közti molekula képződik. Ez a közti molekula átlapoló módon, spontán polimerizálódik, kétmolekula vastag protofibrillumokká (108, 109).

Módszerünk szempontjából lényeges következmény, hogy az alvasztás során az általunk előállított szálak mérete, ezáltal a 2D háló szerkezete egyszerű biokémiai módszerekkel beállítható, megváltoztatható.

### 6.3.3 Az egymást követő dehidrációs lépések hatása a szálakra

A kvázi-2D fibrinháló egy leszárított minta, plazmával csak akkor tudjuk emésztetni, ha rehidráljuk. A lízis után a folyamat leállítása érdekében az enzimet lemostuk és a mintát újra dehidráltuk. A minta, amelyen a fibrinolízis hatását

vizsgáltuk, átesett egy rehidrációs-dehidrációs cikluson. Ez a háló és a szálak szerkezetét is módosíthatja, így lehetséges, hogy a lízis közben tapasztalt változások egy része nem a lízis hanem az egymás utáni dehidrációk-rehidrációk miatt történik. Annak érdekében, hogy önmagában a rehidrációnak a hatását megvizsgáljuk, az emésztés idejére a mintát csak pufferrel inkubáltuk, amely plazmint nem tartalmazott, majd összehasonlítottuk a szálak morfológiáját a rehidrációs-dehidrációs ciklus előtt és után.

Az első rehidrációs ciklus után a szálak átlagos magassága, ennek következtében a magasság-szélesség aránya is szignifikánsan csökkent (**30. Ábra** és **31. Ábra, 2. Táblázat**). A lízisnél tapasztalt magasságbeli csökkenést így részben a rehidráció majd az ezt követő szárítás okozta. A második rehidrációs ciklus viszont már nem okozott további változást sem a magasságban, sem a magasság-szélesség arányban, így valószínűsíthető, hogy a szálak szerkezete az első rehidrációs ciklus végére stabilizálódott. A szálak szélessége ezzel ellentétben egyik rehidrációs lépésben sem változott, míg a lízis során a szálak szélességének növekedését tapasztaltuk.

Mivel az első rehidrációs ciklus során a szálak szerkezete megváltozhat, ez a plazmin általi emésztést is befolyásolhatja. Hogy ezt megvizsgáljuk, a hálót egy rehidrációs ciklus után plazmával emésztettük. Az emésztés mind a háló szerkezetében (**33. Ábra**), mind a szálak topológiai profilján (**34. Ábra**) jól látható. A rehidráció során a fehérjeszerkezet nem változott meg olyan mértékben, ami a lízist illetve a lizált szálak AFM mérését és értékelhetőségét akadályozná.

#### 6.3.4 FXIII hatása a szálak morfológiájára és emésztésére

A XIII-as alvadási faktor a szálakon belüli keresztkötések létrehozásával megváltoztatja, stabilizálja a háló szerkezetét (lásd 2.3.5.2). Ez befolyásolhatja a lízis folyamatát és az emésztés közben megfigyelhető morfológiai változásokat.

A fibrinogén minta, amelyet korábbi kísérleteinkhez is használtunk, kereskedelemről származó izolált fibrinogén. A fibrinogén izolálása során plazma FXIII mindig marad a mintában. Ezért megismételtük vizsgálatainkat FXIII mentesített fibrinogénnel is. A FXIII-mentesítés sikerességét SDS-PAGE gélelektroforézissel ellenőriztünk. Amennyiben a FXIII keresztkötés megtörténik, D-dimereket, vagy azonos molekulatömegű  $\gamma$ - $\gamma$  dimereket kapunk. A  $\gamma$ - $\gamma$  keresztkötések két szomszédos fibrinogén molekula  $\gamma$  láncjai között alakulnak ki, mely láncok a denaturálás során



szétválnak a fibrin  $\alpha$  és  $\beta$  láncaitól. A FXIII-mentes mintában 2 óra alvadás után sem jöttek létre  $\gamma$ - $\gamma$  keresztkötések, amely az enzim hiányára utal (**35. Ábra**). A FXIII mentes fibrinogénből alvasztott 2D hálókban a korábbi, ismeretlen mennyiségben FXIII-at tartalmazó mintákhoz képest kisebb magasság és szélességértékeket tapasztaltunk. Az SDS-PAGE kép szerint ennek az lehet az oka, hogy a FXIII-mentesítés során a fibrinogén egy részét is eltávolítjuk, nem csak a FXIII-at. Ennek következtében a FXIII mentes mintákban alacsonyabb volt a fibrinogén koncentráció, mint a nem kezelt fibrinogén mintákban. Az emésztés során a szálak magassága lecsökkent, szélességük megnövekedett (**37. Ábra**). A változás jellege és mértéke mindkét paraméter esetében jó egyezést mutat a korábbi méréseinkkel. Egyedi szál hossz tengely-menti magasságprofilján az emésztés után megjelenő érdekesség a lízis következtében jött létre a FXIII-al nem kezelt mintákban. Ezt a változást a FXIII mentes minták esetében is tapasztaltuk (**36. Ábra**).

XIII-as faktort adva a korábbi mérésekhez is használt humán fibrinogén mintákhoz, a szálak magasságának és szélességének növekedését tapasztaltuk. Az emelkedett magasság és szélességértékek ellentétesek elektronmikroszkópiával korábban megfigyelt csökkenéssel (32). Lehetséges, hogy az általunk tapasztalt növekedést a szálak megnövekedett fehérjetartalma okozta (46), illetve hogy AFM mérések során az előkészítés folyamán mintát lényegesen kevésbé dehidráltuk, mint ami az elektronmikroszkópiás mérésekhez szükséges. Emésztés során a FXIII0 mintához hasonlóan a szálak magasságcsökkenése és szélességbeli növekedése a történt. Ezen kívül a FXIII0 mintákhoz hasonlóan a szálak hossz tengelyi profilján megjelentek az emésztésre utaló topológiai érdekesség (**41. Ábra**) is.

Az alvadás során jelen lévő nagyobb aktivitású FXIII nagyszámú keresztkötést hoz létre, mely okozhatja a fibrinolízis gátlását. Méréseink során azonban erre utaló szignifikáns változást nem tapasztaltunk.

### 6.3.5 Egyedi fibrinszál emésztésének időbeli követése

Egyedi szálak emésztésének való idejű követése különböző módszerekkel különböző problémákat vet fel, így nehezen megvalósítható. A fibrinszálak átlagos szélessége megközelítőleg 170 nm, mely az optikai mikroszkópia 220 nm-es diffrakciós határa alatt van. Elektronmikroszkópiás mérésekkel nagy felbontást érhetünk el, viszont

a minta fixálása és dehidratálása szükséges, így az emésztés folyamata nem lenne követhető. Ezzel szemben az AFM lehetőséget nyújt biológiai minták nagyfelbontású topológiai vizsgálatára, a minta károsítása nélkül. Intézetünkben rendelkezésre áll egy Cypher ES atomierő-mikroszkóp, mely nagy felbontás mellett gyors pásztázást tesz lehetővé.

Egyedi fibrinszálon a fibrinolízis hatására történő nanobiofizikai változásokat vizsgáltuk a szál nagyfelbontású és valós idejű követésével az emésztés folyamán. A fibrinszál pásztázása megközelítőleg 1,5 percet vett igénybe 256·256 pixel felbontás mellett. A teljes emésztés megközelítőleg 30 percig tartott, mely idő alatt akár 20 kép felvételére is lehetőségünk volt. A pufferben pásztázott, plazminnal nem emésztett kontroll minta morfológiájának időbeli változását (**42. Ábra**) hasonlítottuk össze plazminnal emésztett minta időbeli változásával (**43. Ábra**). A plazminmentes mintában a szál morfológiájában nem tapasztaltunk változást. Plazmin jelenlétében a szál magassága és szélessége megnövekedett, majd egy platófázis után a szál teljes fragmentálódásának következtében lecsökkent. A magasság és a szélesség egyidejű növekedése egyértelműen a szál térfogatbeli növekedésére utal, melynek feltételezhető okát és magyarázatát a 0 fejezetben részletezem.

A fibrinszál magasságában, szélességében tapasztalt változásokból a szál eddig kevésbé ismert szerkezeti jellemzőire, az emésztés következtében bekövetkező szerkezeti változásokra következtethetünk. A szálat oldal és hosszirányban összetartó kötések hasítása az emésztés folyamán időben elkülönül: először az oldalirányú kötések hasadtak fel, mely a szál térfogatbeli növekedését eredményezte.

### 6.3.6 Szálak oldalirányú összerendeződése a lízis folyamán

Az egymás melletti szálak kötegekbe rendeződtek a lízis során, amelyre a köteg szélességének csökkenéséből és egyidejű magasságnövekedéséből következtettünk (45. Ábra). A kötegekbe rendeződést bizonyítja, hogy a szálak az általunk készített 2D hálóban nem teljesen helyhez kötöttek, hanem bizonyos mértékű konfigurációs szabadsággal rendelkeznek. A kötegekbe rendeződés célja a felület minimalizálása adott térfogat mellett, melyet méréseinkkel ki is mutattunk. A jelenséget feltételezéseink szerint egy felületi feszültség típusú erő okozza.

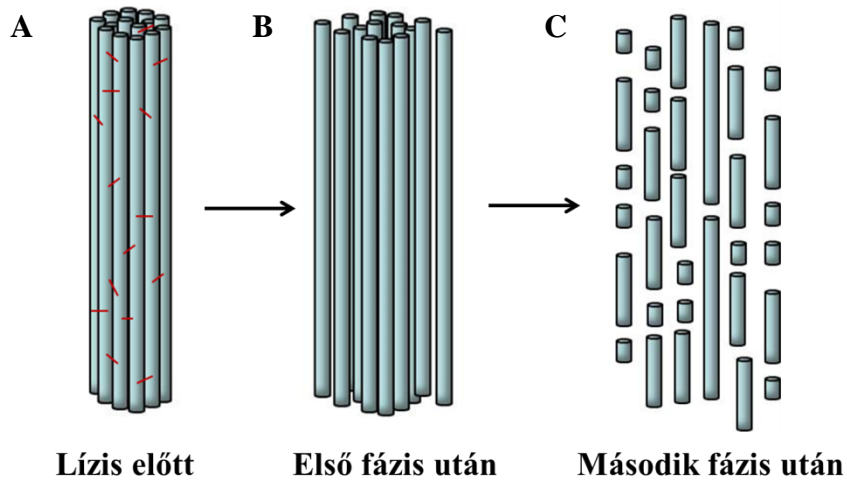
## 6.4 Plazmin indukált emésztés modellje

Emésztési vizsgálataink során szerzett eredményeink lehetővé teszik az emésztési folyamat modelljének felállítását. Lizis előtt a szálakat a protofibrillumok közötti oldalirányú kötések tartják össze (**47. Ábra A része**). Magát az emésztést két fázisra bonthatjuk. Az első fázis hosszabb ideig zajlik, ez alatt a plazmin a szálon belüli, protofibrillumok közötti interprotofibrilláris kötéseket hasítja fel. Ez fellazult, megduzzadt és képlékenyebb szálakat eredményez, melyeken belül a protofibrillumok kevésbé szorosan rendezettek (**47. Ábra B része**). Ebben a fázisban a hálózatos szerkezet megtartott, az alvadékból nem válnak le darabok. A plazmin számára legkönnyebben elérhető hasítási helyek a lízis kezdetén az  $\alpha$ C doménon találhatóak. Ez a domén kapcsolja össze egymással oldalirányban a protofibrillumokat, így alakítva ki a fibrinszálat (lásd 2.5. fejezet). Hasítása esetén a szálát összetartó oldalirányú kapcsolatok felszakadnak, a szál kevésbé szorosan rendezett, fellazult szerkezetűvé válik. A szálak fellazulásának fontos következménye lehet, hogy a plazmin az így megnyíló helyekre is be tud diffundálni, így könnyebben elérheti a fibrinszál nehezebben hozzáférhető kötőhelyeit is. Ezt követi egy gyorsan lezajló második fázis, mely során a plazmin keresztirányban hasítja a már egymástól elszakított protofibrillumokat, így a szál teljes, axiális feldarabolódása bekövetkezik (**47. Ábra C része**).

A sztérikus okok mellett affinitásbeli különbségek is szerepet játszanak az emésztés lefolyásában. Az  $\alpha$ C domén plazminaffinitása ( $K_d = 16\text{-}33$  nM) nagyobb, mint a D és E régiókat összetartó coiled coil régiók plazminaffinitása ( $K_d = 1$   $\mu$ M) (87). Az alacsony affinitás miatt a szálak keresztirányú hasításához magas plazminkoncentráció szükséges. A plazmint  $30$   $\mu$ M koncentrációban alkalmaztam, mely jóval a  $K_d$  érték felett van, így ha sztérikus okok ezt nem gátolják, a szál telítetté válik plazminra.

A fellazulási fázis a szálak gyors feldarabolódásának feltétele lehet. Ennek során a szál plazminnal telítetté válik, miközben a háló globális szerkezete megtartott. Miután a szál plazminnal telítetté vált, a szál keresztirányú feldarabolódása az előző fázishoz képest gyorsan végbemegy. A háló szálai ezáltal gyorsan, egyszerre darabolódnak fel. Amennyiben a feldarabolódás már azelőtt megkezdődne, hogy a szálak szerkezete fellazulna, kisebb darabok válhatnak le az alvadékról, melyek a

vérárammal továbbhaladva embolizációt okozhatnának. A lízis két fázisra válásának és a második fázisban végbemenő gyors fragmentációnak ezáltal fontos szerepe lehet az embolizáció megelőzésében és a trombus maradéktalan feloldásában.



**47. Ábra. Egyedi szál emésztésének fázisai.** Először a szálon belüli kötések szakadnak fel (**B rész, első fázis**) melyek a szál rugalmasságát növelik. Ezt követi a gyors axiális fragmentáció (**C rész, második fázis**).

## 7 Következtetések

Munkám során két olyan módszert, az nTEG-et és a kvázi-2D háló előállítását dolgoztam ki, melyek lehetővé teszik a fibrinháló morfológiai és mechanikai tulajdonságainak részletes megismerését. A legfontosabb eredményeim és következtetésem a következők:

1) Az nTEG segítségével lehetőségünk nyílt a trombocitaszegény plazmából kialakuló alvadék mechanikai tulajdonságainak változását valós időben vizsgálni. Az általunk tapasztalt rugalmasságbeli változásokat egy jól definiált fizikai paraméterrel, az erőkülönbséggel [nN] jellemeztük. Ezen paraméter időbeli változásának ábrázolása olyan görbéket eredményez, amelyek alakjukban a klasszikus trombelasztogramhoz hasonlítanak. Az erőkülönbség időbeli változása megfeleltethető a klasszikus trombelasztográfia önkényes és az alvadék által kifejtett erőt csak közvetetten jellemző értékének, az amplitúdónak. A viszkozitásban bekövetkező változásokat szintén egy jól definiált fizikai paraméterrel, a disszipált energiával [J] jellemeztük. A viszkozitásbeli változásokat a fehérjeszerkezetben történő energia disszipáció okozhatja. A Plazma alvadék viszkozus tulajdonság-komponensének időbeli változása az alvadás egyes szakaszaiban különbözött a rugalmas komponens változásától.

2) A plazma alvadékban sztreptokináz (STK) indukált emésztés hatására az erőkülönbség és a hiszterézisterület csökkenése is megfigyelhető volt, azaz a lízis során nem csak az alvadék rugalmassága, hanem a viszkozitása is csökken.

3) Reprodukálható módon létrehoztuk a háromdimenziós szerkezetből egy kvázi-2D fibrinhálót. A háló mikrostuktúrája, az egyedi szálak magassága és szélessége analizálható volt ezen a rendszeren AFM-el.

4) A szálak magassága és szélessége NaCl koncentráció és trombin aktivitás változtatásával szabályozható. A hálóban a plazmin okozta lízis következtében megjelenő változások mérhetők, analizálhatók.

5) Az általunk létrehozott kvázi-2D fibrinhálóban a kialakult szálak szerkezete nagy felbontás mellett vizsgálható. A lízis során bekövetkező, nanoskálán mérhető változások AFM-mel folyamatában követhetők. Eredményeink alapján a lízis modellje a következő: A lízis két fázisra osztható. Először a szálak megduzzadnak és hálón belüli feszítettségük csökken a protofibrillumok közötti kölcsönhatások felszakadása miatt. A

lízis második fázisa a szálak keresztirányú feldarabolódása, mely a lízis végső lépéseként gyorsan megy végbe.

6) A lízis első fázisa alatt kisebb szálak összerendeződése is bekövetkezhet. A kötegekben az adott térfogatra vonatkoztatott felület csökken, így valószínűsíthető, hogy az összerendeződést egy felületi feszültség jellegű erő vezérli.

## 8 Összefoglalás

A fibrinháló a véralvadék rugalmas háromdimenziós váza, mely fontos szerepet tölt be a hemosztázisban. A háló bonyolult térbeli szerveződése megnehezíti annak szerkezeti és mechanikai vizsgálatát, így a szálakon belül a protofibrillumok elhelyezkedése és a fibrinolízis pontos mechanizmusa sem ismert.

Az általunk kidolgozott és nano-trombelasztográfiának nevezett módszer segítségével a háromdimenziós fibrinháló viszkoelasztikus tulajdonságaiban bekövetkező nanoskálájú változásokat követtük mind az alvadás, mind a STK indukált fibrinolízis során. A mérések során az AFM rugólapkája egy plazmacseppbe merült. A lapka fel-lemozgása közben mért elhajlásának értékek időbeli változását vizsgáltuk. A rugólapka elhajlásából számított maximális erő értéke mintafüggő, 3-50 nN között változik, időbeli lefutása pedig a hagyományos trombelasztogramra emlékeztet. Módszerünkkel a viszkózus tulajdonságkomponens időbeli változása a rugalmastól elkülönítve vizsgálható. STK hatására a rugalmas tulajdonság aktivitásfüggő módon csökken, melyet csak késve követ a viszkózus tulajdonság csökkenése. Plazmából alvasztott mintán STK hatására a fibrinszálak vastagságának csökkenése, a háló folytonosságának megszűnése figyelhető meg.

Az általunk kifejlesztett kvázi-2D háló atomerő-mikroszkóppal végzett topológiai vizsgálatok által lehetőséget nyújt a fibrin tulajdonságainak feltárására. A háló ~50 nm-es átlagos vastagsággal rendelkezik, az egyedi szálak szerkezeti jellemzői megfigyelhetők. A minta rehidráció után plazmával emészthető: 10 nM végkoncentrációjú plazmin a teljes hálót 15 perc alatt emésztette meg. Egyedi szálak rugalmasságának növekedését tapasztaltuk, miközben a szálak hosszirányú integritása megtartott maradt. Ebből arra következtetünk, hogy a lízis első fázisában a szálon belüli protofibrillumok közti oldallirányú kötések szakadnak fel miközben a szálat összetartó hosszirányú kötések sértetlenek maradnak. Kisebb szálak esetén megfigyeltük azok kötegekbe rendeződését, amely egy köztük fellépő kohéziós erő jelenlétére utal. Az enzim a szálakat a lízisnek csak az utolsó fázisában, az előző folyamatokhoz képest gyorsan darabolta fel hosszirányban. Az általunk kifejlesztett kvázi-2D háló egyedi rálátást nyújt a fibrinháló szerkezeti és mechanikai jellemzőire, azok változására a fibrinolízis folyamán és a mögöttes molekuláris mechanizmusokra.

## 9 Summary

Fibrin network is the three-dimensional scaffold of the blood clot, thereby plays an important role in hemostasis. The complex spatial hierarchy of the network severely complicates the investigation of the structural and mechanical features. Consequently, neither the exact structure of the protofibrils inside the fiber, nor the exact mechanisms of the fibrinolysis are known.

We elaborated a so called nTEG method to investigate the nanoscale changes in the viscoelastic properties of the fibrin meshwork during clot formation and STK-induced fibrinolysis. An AFM cantilever was completely immersed in a plasma droplet and its deflection was measured during the up-and-down travel cycles. The maximal force calculated from the deflection was sample-dependent and varied between 3-50 nN, whereas the time-dependent changes corresponded well to a thrombelastogram. We could investigate the changes in the viscous properties of the clot separated from the elastic ones. In STK-induced lysis the elastic property decreased in a concentration-dependent manner, whereas the decrease in the viscous property was delayed. On topographical images we observed a decrease in the width of the fibers and the network was fragmented.

Investigating the topography of the 2D fibrin matrix with AFM we can get a unique insight to the properties of fibrin. The average height of the network was ~50 nm, and individual fibers were observable. Following rehydration, plasmin could lyse the network: upon applying 10 nM plasmin, the whole network was digested in 15 minutes. In the first phase of the lysis the flexibility of the fibers increased, while their axial integrity was maintained. Thus, in the first phase of fibrinolysis, interprotofibrillar interactions are disrupted, while the bonds holding the fiber axially together remain intact. In case of smaller fibers we observed bundling that may be due to a tension force acting on them. Plasmin fragmented the fibers and the network only in the last phase of the lysis, and this fragmentation was fast compared with the first phase.

The quasi 2D fibrin network developed here helped to investigate the structural and mechanical properties of the fibrin network, and we were able to receive a better insight to the molecular mechanisms behind the fibrinolysis process.



## 10 Irodalomjegyzék

1. Lord ST. Fibrinogen and fibrin: Scaffold proteins in hemostasis. *Current Opinion in Hematology*. 2007;14(3):236-41.
2. Gersh KC, Edmondson KE, Weisel JW. Flow rate and fibrin fiber alignment. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2010;8(12):2826-8.
3. Campbell RA, Aleman M, Gray LD, Falvo MR, Wolberg AS. Flow profoundly influences fibrin network structure: implications for fibrin formation and clot stability in haemostasis. *Thrombosis and haemostasis*. 2010;104(6):1281-4.
4. Flamm MH, Diamond SL. Multiscale systems biology and physics of thrombosis under flow. *Annals of biomedical engineering*. 2012;40(11):2355-64.
5. Lam WA, Chaudhuri O, Crow A, Webster KD, Li TD, Kita A, et al. Mechanics and contraction dynamics of single platelets and implications for clot stiffening. *Nature materials*. 2011;10(1):61-6.
6. Tran R, Myers DR, Ciciliano J, Trybus Hardy EL, Sakurai Y, Ahn B, et al. Biomechanics of haemostasis and thrombosis in health and disease: from the macro- to molecular scale. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2013;17(5):579-96.
7. Medved L, Weisel JW, Fibrinogen, Factor XSoSSCoISoT, Haemostasis. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009;7(2):355-9.
8. Longstaff C, Williams S, Thelwell C. Fibrin binding and the regulation of plasminogen activators during thrombolytic therapy. *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry*. 2008;6(3):212-23.
9. Cilia La Corte AL, Philippou H, Ariens RA. Role of fibrin structure in thrombosis and vascular disease. *Advances in protein chemistry and structural biology*. 2011;83:75-127.
10. Hudson NE. Biophysical Mechanisms Mediating Fibrin Fiber Lysis. *BioMed research international*. 2017;2017:2748340.
11. Litvinov RI, Weisel JW. Fibrin mechanical properties and their structural origins. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2017;60-61:110-23.
12. Protopopova AD, Barinov NA, Zavyalova EG, Kopylov AM, Sergienko VI, Klinov DV. Visualization of fibrinogen alphaC regions and their arrangement during fibrin network formation by high-resolution AFM. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2015;13(4):570-9.
13. Zhmurov A, Brown AE, Litvinov RI, Dima RI, Weisel JW, Barsegov V. Mechanism of fibrin(ogen) forced unfolding. *Structure*. 2011;19(11):1615-24.
14. Weisel JW, Litvinov RI. Fibrin Formation, Structure and Properties. *Sub-cellular biochemistry*. 822017. p. 405-56.
15. Zhmurov A, Protopopova AD, Litvinov RI, Zhukov P, Mukhitov AR, Weisel JW, et al. Structural Basis of Interfacial Flexibility in Fibrin Oligomers. *Structure*. 2016;24(11):1907-17.
16. Li W, Lucioni T, Li R, Bonin K, Cho SS, Guthold M. Stretching single fibrin fibers hampers their lysis. *Acta biomaterialia*. 2017;60:264-74.
17. Zhmurov A, Protopopova AD, Litvinov RI, Zhukov P, Weisel JW, Barsegov V. Atomic Structural Models of Fibrin Oligomers. *Structure*. 2018;26(6):857-68 e4.
18. Yeromonahos C, Polack B, Caton F. Nanostructure of the fibrin clot. *Biophysical journal*. 2010;99(7):2018-27.

19. Domingues MM, Macrae FL, Duval C, McPherson HR, Bridge KI, Ajjan RA, et al. Thrombin and fibrinogen gamma' impact clot structure by marked effects on intrafibrillar structure and protofibril packing. *Blood*. 2016;127(4):487-95.
20. Li W, Sigley J, Pieters M, Helms CC, Nagaswami C, Weisel JW, et al. Fibrin Fiber Stiffness Is Strongly Affected by Fiber Diameter, but Not by Fibrinogen Glycation. *Biophysical journal*. 2016;110(6):1400-10.
21. Lord ST. Molecular mechanisms affecting fibrin structure and stability. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(3):494-9.
22. Tsurupa G, Pechik I, Litvinov RI, Hantgan RR, Tjandra N, Weisel JW, et al. On the mechanism of alphaC polymer formation in fibrin. *Biochemistry*. 2012;51(12):2526-38.
23. Ping L, Huang L, Cardinali B, Profumo A, Gorkun OV, Lord ST. Substitution of the human alphaC region with the analogous chicken domain generates a fibrinogen with severely impaired lateral aggregation: fibrin monomers assemble into protofibrils but protofibrils do not assemble into fibers. *Biochemistry*. 2011;50(42):9066-75.
24. Bischof D, Graves K, Genoni M, Zollinger A, Hofer CK. Fatal disconnection of a ventricular assist device in an out-of-hospital setting. *Emergency medicine journal : EMJ*. 2012;29(3):247-8.
25. Smith KA, Pease RJ, Avery CA, Brown JM, Adamson PJ, Cooke EJ, et al. The activation peptide cleft exposed by thrombin cleavage of FXIII-A(2) contains a recognition site for the fibrinogen alpha chain. *Blood*. 2013;121(11):2117-26.
26. Weisel JW, Nagaswami C, Makowski L. Twisting of fibrin fibers limits their radial growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(24):8991-5.
27. Yang Z, Mochalkin I, Doolittle RF. A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(26):14156-61.
28. Guthold M, Liu W, Stephens B, Lord ST, Hantgan RR, Erie DA, et al. Visualization and mechanical manipulations of individual fibrin fibers suggest that fiber cross section has fractal dimension 1.3. *Biophysical journal*. 2004;87(6):4226-36.
29. Li W, Sigley J, Baker SR, Helms CC, Kinney MT, Pieters M, et al. Nonuniform Internal Structure of Fibrin Fibers: Protein Density and Bond Density Strongly Decrease with Increasing Diameter. *BioMed research international*. 2017;2017:6385628.
30. Janmey PA, Winer JP, Weisel JW. Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *Journal of the Royal Society, Interface*. 2009;6(30):1-10.
31. Weisel JW. The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophysical chemistry*. 2004;112(2-3):267-76.
32. Ryan EA, Mockros LF, Weisel JW, Lorand L. Structural origins of fibrin clot rheology. *Biophysical journal*. 1999;77(5):2813-26.
33. Konings J, Hoving LR, Ariens RS, Hethershaw EL, Ninivaggi M, Hardy LJ, et al. The role of activated coagulation factor XII in overall clot stability and fibrinolysis. *Thrombosis research*. 2015;136(2):474-80.
34. Varju I, Longstaff C, Szabo L, Farkas AZ, Varga-Szabo VJ, Tanka-Salamon A, et al. DNA, histones and neutrophil extracellular traps exert anti-fibrinolytic effects in a plasma environment. *Thrombosis and haemostasis*. 2015;113(6):1289-98.
35. Zhmurov A, Kononova O, Litvinov RI, Dima RI, Barsegov V, Weisel JW. Mechanical transition from alpha-helical coiled coils to beta-sheets in fibrin(ogen). *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(50):20396-402.

36. Byrnes JR, Duval C, Wang Y, Hansen CE, Ahn B, Mooberry MJ, et al. Factor XIIIa-dependent retention of red blood cells in clots is mediated by fibrin alpha-chain crosslinking. *Blood*. 2015;126(16):1940-8.
37. Metassan S, Charlton AJ, Routledge MN, Scott DJ, Ariens RA. Alteration of fibrin clot properties by ultrafine particulate matter. *Thrombosis and haemostasis*. 2010;103(1):103-13.
38. Kurniawan NA, van Kempen THS, Sonneveld S, Rosalina TT, Vos BE, Jansen KA, et al. Buffers Strongly Modulate Fibrin Self-Assembly into Fibrous Networks. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2017;33(25):6342-52.
39. Massimiliano Papi GA, and Marco De Spirito Simultaneous static and dynamic light scattering approach to the characterization of the different fibrin gel structures occurring by changing chloride concentration. *Appl Phys Lett*. 2005;86(183901).
40. Wolberg AS. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood reviews*. 2007;21(3):131-42.
41. Yesudasan S, Wang X, Averett RD. Coarse-grained molecular dynamics simulations of fibrin polymerization: effects of thrombin concentration on fibrin clot structure. *Journal of molecular modeling*. 2018;24(5):109.
42. Bagoly Z, Koncz Z, Harsfalvi J, Muszbek L. Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thrombosis research*. 2012;129(3):382-7.
43. Komaromi I, Bagoly Z, Muszbek L. Factor XIII: novel structural and functional aspects. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2011;9(1):9-20.
44. Mosesson MW. Cross-linked gamma-chains in fibrin fibrils bridge 'transversely' between strands: yes. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2004;2(3):388-93.
45. Standeven KF, Carter AM, Grant PJ, Weisel JW, Chernysh I, Masova L, et al. Functional analysis of fibrin {gamma}-chain cross-linking by activated factor XIII: determination of a cross-linking pattern that maximizes clot stiffness. *Blood*. 2007;110(3):902-7.
46. Hethershaw EL, Cilia La Corte AL, Duval C, Ali M, Grant PJ, Ariens RA, et al. The effect of blood coagulation factor XIII on fibrin clot structure and fibrinolysis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2014;12(2):197-205.
47. Varju I, Sotonyi P, Machovich R, Szabo L, Tenekedjiev K, Silva MM, et al. Hindered dissolution of fibrin formed under mechanical stress. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2011;9(5):979-86.
48. Collet JP, Allali Y, Lesty C, Tanguy ML, Silvain J, Ankri A, et al. Altered fibrin architecture is associated with hypofibrinolysis and premature coronary atherothrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(11):2567-73.
49. Undas A, Zawilska K, Ciesla-Dul M, Lehmann-Kopydlowska A, Skubiszak A, Ciepluch K, et al. Altered fibrin clot structure/function in patients with idiopathic venous thromboembolism and in their relatives. *Blood*. 2009;114(19):4272-8.
50. Rooth E, Wallen NH, Blomback M, He S. Decreased fibrin network permeability and impaired fibrinolysis in the acute and convalescent phase of ischemic stroke. *Thrombosis research*. 2011;127(1):51-6.
51. Ariens RA. Novel mechanisms that regulate clot structure/function. *Thrombosis research*. 2016;141 Suppl 2:S25-7.
52. Roberts WW, Lorand L, Mockros LF. Viscoelastic properties of fibrin clots. *Biorheology*. 1973;10(1):29-42.

53. Kang H, Wen Q, Janmey PA, Tang JX, Conti E, MacKintosh FC. Nonlinear elasticity of stiff filament networks: strain stiffening, negative normal stress, and filament alignment in fibrin gels. *The journal of physical chemistry B*. 2009;113(12):3799-805.
54. Liu W, Carlisle CR, Sparks EA, Guthold M. The mechanical properties of single fibrin fibers. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2010;8(5):1030-6.
55. Kurniawan NA, Vos BE, Biebricher A, Wuite GJ, Peterman EJ, Koenderink GH. Fibrin Networks Support Recurring Mechanical Loads by Adapting their Structure across Multiple Scales. *Biophysical journal*. 2016;111(5):1026-34.
56. Brown AE, Litvinov RI, Discher DE, Purohit PK, Weisel JW. Multiscale mechanics of fibrin polymer: gel stretching with protein unfolding and loss of water. *Science*. 2009;325(5941):741-4.
57. Savushkin AV. Clots of blood plasma. *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*. 2003;76(3):645-7.
58. Averett RD. Experimental mechanics of magnetic microparticle-induced strain on fibrin clots. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2014;102(12):4365-70.
59. Zhu S, Herbig BA, Li R, Colace TV, Muthard RW, Neeves KB, et al. In microfluidico: Recreating in vivo hemodynamics using miniaturized devices. *Biorheology*. 2015;52(5-6):303-18.
60. Brown AC, Baker SR, Douglas AM, Keating M, Alvarez-Elizondo MB, Botvinick EL, et al. Molecular interference of fibrin's divalent polymerization mechanism enables modulation of multiscale material properties. *Biomaterials*. 2015;49:27-36.
61. Byrnes JR, Wolberg AS. Red blood cells in thrombosis. *Blood*. 2017;130(16):1795-9.
62. Gersh KC, Nagaswami C, Weisel JW. Fibrin network structure and clot mechanical properties are altered by incorporation of erythrocytes. *Thrombosis and haemostasis*. 2009;102(6):1169-75.
63. Jansen KA, Bacabac RG, Piechocka IK, Koenderink GH. Cells actively stiffen fibrin networks by generating contractile stress. *Biophysical journal*. 2013;105(10):2240-51.
64. Brummel-Ziedins KE, Wolberg AS. Global assays of hemostasis. *Curr Opin Hematol*. 2014;21(5):395-403.
65. Whiting D, DiNardo JA. TEG and ROTEM: technology and clinical applications. *American journal of hematology*. 2014;89(2):228-32.
66. Scarpelini S, Rhind SG, Nascimento B, Tien H, Shek PN, Peng HT, et al. Normal range values for thromboelastography in healthy adult volunteers. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2009;42(12):1210-7.
67. Bolliger D, Seeberger MD, Tanaka KA. Principles and practice of thromboelastography in clinical coagulation management and transfusion practice. *Transfusion medicine reviews*. 2012;26(1):1-13.
68. Trapani LM. Thromboelastography: Current Applications, Future Directions. *Open Journal of Anesthesiology*,. 2013;3:23-7.
69. Eller T, Busse J, Dittrich M, Flieder T, Alban S, Knabbe C, et al. Dabigatran, rivaroxaban, apixaban, argatroban and fondaparinux and their effects on coagulation POC and platelet function tests. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2014;52(6):835-44.

70. Hudson NE, Houser JR, O'Brien ET, 3rd, Taylor RM, 2nd, Superfine R, Lord ST, et al. Stiffening of individual fibrin fibers equitably distributes strain and strengthens networks. *Biophysical journal*. 2010;98(8):1632-40.
71. Helms CC, Ariens RA, Uitte de Willige S, Standeven KF, Guthold M. alpha-alpha Cross-links increase fibrin fiber elasticity and stiffness. *Biophysical journal*. 2012;102(1):168-75.
72. Collet JP, Shuman H, Ledger RE, Lee S, Weisel JW. The elasticity of an individual fibrin fiber in a clot. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(26):9133-7.
73. Piechocka IK, Bacabac RG, Potters M, Mackintosh FC, Koenderink GH. Structural hierarchy governs fibrin gel mechanics. *Biophysical journal*. 2010;98(10):2281-9.
74. Purohit PK, Litvinov RI, Brown AE, Discher DE, Weisel JW. Protein unfolding accounts for the unusual mechanical behavior of fibrin networks. *Acta biomaterialia*. 2011;7(6):2374-83.
75. Brown AE, Litvinov RI, Discher DE, Weisel JW. Forced unfolding of coiled-coils in fibrinogen by single-molecule AFM. *Biophysical journal*. 2007;92(5):L39-41.
76. Miserez A, Guerette PA. Phase transition-induced elasticity of alpha-helical bioelastomeric fibres and networks. *Chemical Society reviews*. 2013;42(5):1973-95.
77. Litvinov RI, Faizullin DA, Zuev YF, Weisel JW. The alpha-helix to beta-sheet transition in stretched and compressed hydrated fibrin clots. *Biophysical journal*. 2012;103(5):1020-7.
78. Mouapi KN, Bell JD, Smith KA, Ariens RA, Philippou H, Maurer MC. Ranking reactive glutamines in the fibrinogen alphaC region that are targeted by blood coagulant factor XIII. *Blood*. 2016;127(18):2241-8.
79. Collet JP, Moen JL, Veklich YI, Gorkun OV, Lord ST, Montalescot G, et al. The alphaC domains of fibrinogen affect the structure of the fibrin clot, its physical properties, and its susceptibility to fibrinolysis. *Blood*. 2005;106(12):3824-30.
80. Hudson NE, Ding F, Bucay I, O'Brien ET, 3rd, Gorkun OV, Superfine R, et al. Submillisecond elastic recoil reveals molecular origins of fibrin fiber mechanics. *Biophysical journal*. 2013;104(12):2671-80.
81. Houser JR, Hudson NE, Ping L, O'Brien ET, 3rd, Superfine R, Lord ST, et al. Evidence that alphaC region is origin of low modulus, high extensibility, and strain stiffening in fibrin fibers. *Biophysical journal*. 2010;99(9):3038-47.
82. Wang S, Reed GL, Hedstrom L. Deletion of Ile1 changes the mechanism of streptokinase: evidence for the molecular sexuality hypothesis. *Biochemistry*. 1999;38(16):5232-40.
83. Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research*. 2014;42(Database issue):D503-9.
84. Longstaff C, Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2015;13 Suppl 1:S98-105.
85. Machlus KR, Cardenas JC, Church FC, Wolberg AS. Causal relationship between hyperfibrinogenemia, thrombosis, and resistance to thrombolysis in mice. *Blood*. 2011;117(18):4953-63.
86. Collet JP, Park D, Lesty C, Soria J, Soria C, Montalescot G, et al. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20(5):1354-61.

87. Bucay I, O'Brien ET, 3rd, Wulfe SD, Superfine R, Wolberg AS, Falvo MR, et al. Physical determinants of fibrinolysis in single fibrin fibers. *PloS one*. 2015;10(2):e0116350.
88. Kolev K, Tenekedjiev K, Komorowicz E, Machovich R. Functional evaluation of the structural features of proteases and their substrate in fibrin surface degradation. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(21):13666-75.
89. Diamond SL, Anand S. Inner clot diffusion and permeation during fibrinolysis. *Biophysical journal*. 1993;65(6):2622-43.
90. Gabriel DA, Muga K, Boothroyd EM. The effect of fibrin structure on fibrinolysis. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(34):24259-63.
91. Collet JP, Lesty C, Montalescot G, Weisel JW. Dynamic changes of fibrin architecture during fibrin formation and intrinsic fibrinolysis of fibrin-rich clots. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(24):21331-5.
92. NobelPrize.org. Heinrich Rohrer – Facts.: Nobel Media AB; [2019.01.08.]. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1986/rohrer/facts/>.
93. Smith EL, Cardinali B, Ping L, Ariens RA, Philippou H. Elimination of coagulation factor XIII from fibrinogen preparations. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2013;11(5):993-5.
94. Eunjung Kim OVK, Kellie R. Machlus, Xiaomin Liu, Timur Kupaev, Joshua Lioi,, Alisa S. Wolberg DZC, Elliot D. Rosen, Zhiliang Xu and Mark Alber. Correlation between fibrin network structure and mechanical properties: an experimental and computational analysis. *Soft Matter*. 2011(7):4983-92.
95. Carlisle CR, Sparks EA, Der Loughian C, Guthold M. Strength and failure of fibrin fiber branchpoints. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2010;8(5):1135-8.
96. Kaibara M, Fukada E. Effect of temperature on dynamic viscoelasticity during the clotting reaction of fibrin. *Biochimica et biophysica acta*. 1977;499(3):352-61.
97. Hartert H. [Thrombelastography, a method for physical analysis of blood coagulation]. *Zeitschrift fur die gesamte experimentelle Medizin*. 1951;117(2):189-203.
98. Spiezia L, Radu C, Marchioro P, Bertini D, Rossetto V, Castelli M, et al. Peculiar whole blood rotation thromboelastometry (Rotem) profile in 40 sideropenic anaemia patients. *Thrombosis and haemostasis*. 2008;100(6):1106-10.
99. Harsfalvi J, Feller, T., Domjan, G., Gado, K., Varnai, K., Barabas, E., Kellermayer, MSZ. Biophysical Characterization of Clot Retraction in Platelet Rich Plasma of Patients with Anti -phospholipid Syndrome. *ISTH 2017 Congress; 2017.07.8-13; Berlin, Germany2017*. p. 1-15.
100. Khafaji HA. Fibrinolysis in Acute Myocardial Infarction; State of the Art. *Annals of Cardiovascular Surgery*. 2018;1(3).
101. Evans-Nguyen KM, Fuierer RR, Fitchett BD, Tolles LR, Conboy JC, Schoenfish MH. Changes in adsorbed fibrinogen upon conversion to fibrin. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2006;22(11):5115-21.
102. Kim E, Kim OV, Machlus KR, Liu X, Kupaev T, Lioi J, et al. Correlation between fibrin network structure and mechanical properties: an experimental and computational analysis. *Soft Matter*. 2011;7(10):4983-92.
103. Ferri F, Greco M, Arcovito G, De Spirito M, Rocco M. Structure of fibrin gels studied by elastic light scattering techniques: dependence of fractal dimension, gel crossover length, fiber diameter, and fiber density on monomer concentration. *Physical review E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*. 2002;66(1 Pt 1):011913.

104. Fowler WE, Hantgan RR, Hermans J, Erickson HP. Structure of the fibrin protofibril. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78(8):4872-6.
105. Papi M, Arcovito, G., De Spirito, M., Amiconi, G., Bellelli, A., Boumis, G.,. Simultaneous static and dynamic light scattering approach to the characterization of the different fibrin gel structures occurring by changing chloride concentration. *Appl Phys Lett*. 2005;86.
106. Kiss B, Rohlich P, Kellermayer MS. Structure and elasticity of desmin protofibrils explored with scanning force microscopy. *Journal of molecular recognition : JMR*. 2011;24(6):1095-104.
107. Kreplak L, Herrmann H, Aebi U. Tensile properties of single desmin intermediate filaments. *Biophysical journal*. 2008;94(7):2790-9.
108. Laki K. The polymerization of proteins; the action of thrombin on fibrinogen. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1951;32(2):317-24.
109. Lorand L, Middlebrook WR. The action of thrombin on fibrinogen. *The Biochemical journal*. 1952;52(2):196-9.

## 11 Saját publikációk jegyzéke

- Feller T, Hársfalvi J, Csányi C, Kiss B, Kellermayer M. (2018) Plasmin-driven fibrinolysis in a quasi-two-dimensional nanoscale fibrin matrix. 10.1016/j.jsb.2018.05.010. J Struct Biol. 2018 Sep;203(3):273-280. IF<sub>2017</sub>: 3,489
- Feller T, Kellermayer MS, Kiss B. (2014) Nano-thrombelastography of fibrin during blood plasma clotting. 10.1016/j.jsb.2014.04.002 J Struct Biol. 2014 Jun;186(3):462-71. IF<sub>2014</sub>: 3.10



## 12 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, *Kellermayer Miklósnak* tanácsaiért, segítségéért, ötleteiért. Lelkesedése a tudomány iránt példaértékű számomra. Mint Intézetvezetőnek pedig köszönöm, hogy PhD munkámat a Biofizikai Intézetben végezhettem, ahol a legkorszerűbb műszerek álltak rendelkezésemre.

Köszönöm *Hársfalvi Jolánnak* támogatását, ötleteit. Széles körű és mély szaktudása nagy segítség volt számomra a doktori képzés ideje alatt.

Köszönöm *Kiss Baláznak*, hogy bevezetett a kutatás világába. Köszönöm az évek során nyújtott folyamatos segítségét, főként tudományos diákköri munkám alatt. Köszönöm, hogy PhD munkám során is bármikor számíthattam segítségére, tanácsaira.

Köszönettel tartozom *Csányi Csillának* az eredmények, ötletek közös átgondolásáért. Köszönöm *Iszlai Ágnes* és *Komárné Drabbant Mónika* segítségét.

Köszönöm *Várfalvi Gergőnek*, családomnak és szüleimnek a folyamatos támogatást és ötleteket, amit tőlük az évek során kaptam.

### 13 Melléklet

Az alvadék térfogatának 0,25%-a fibrin térfogata, ha az alvadék 2,5 mg/ml koncentrációban tartalmaz fibrint [1]. Ez a fibrin plazmakoncentrációjának megfelel, így kiszámítható, hogy a 300  $\mu\text{l}$ -es mintatérfogatból mekkora a fibrin térfogata ( $V_{fibrin}$ ). nTEG méréseink során 100  $\mu\text{l}$  plazmához 200  $\mu\text{l}$  Hepes puffert adtunk, így a plazma térfogata 100  $\mu\text{l}$ , ami megközelítőleg 100  $\text{mm}^3$ .

$$V_{fibrin} = 100 \text{ mm}^3 * 0,0025 = 0,25 \text{ mm}^3 = 0,25 * 10^9 \mu\text{m}^3$$

AFM méréseink során a kör keresztmetszetű szál számított átmérője ( $d$ ) 86,8 nm volt (lásd 6.2 fejezet). Egy fibrinszál hossza ( $l$ ) 2,86  $\mu\text{m}$  [2]. Ezen adatok ismeretében egy fibrinszál térfogata ( $V_{szál}$ ) így a következőképpen adható meg:

$$V_{szál} = A * l = \left(\frac{d}{2}\right)^2 * \pi * l = (0,0434 \mu\text{m})^2 * \pi * 2,68 \mu\text{m} = 16,9 * 10^{-3} \mu\text{m}^3$$

Ennek ismeretében kiszámítható, hány szál van a teljes alvadékban ( $n_{fibrin}$ ).

$$n_{fibrin} = \frac{V_{fibrin}}{V_{szál}} = \frac{0,25 * 10^9 \mu\text{m}^3}{16,9 * 10^{-3} \mu\text{m}^3} = 1,478 * 10^{10} \text{ szál/alvadék}$$

A rugólapka viszont csak az alvadéknak egy adott térfogatrészét járja be, az ott jelen levő szálakkal kerül kapcsolatba. A rugólapka egy egyenlő szárú háromszög, talppontja 18  $\mu\text{m}$  ( $x$  irány), hossza és szélessége 140  $\mu\text{m}$  ( $y$  irány), és 1  $\mu\text{m}$  távolságon mozog fel-le ( $z$  irány). A rugólapka által bejárt térfogatrész ( $V_{rugólapka}$ ) a lapka felszíne (külső és belső háromszög területének ( $A_{külső}$  és  $A_{belső}$  különbsége) és az elmozdulás távolságának ismeretében kiszámítható.

$$V_{rugólapka} = (A_{külső} - A_{belső}) * z = \left(\frac{140 \mu\text{m}^2}{2} - \frac{122 \mu\text{m}^2}{2}\right) * 1 \mu\text{m} = 2358 \mu\text{m}^3$$

A szálak egyenletes eloszlását feltételezve az alvadékon belül, a rugólapka által bejárt térfogatrészt az alvadék teljes térfogatával ( 300  $\mu\text{l}$  ) összevetve kiszámítható, hány fibrinszál volt a rugólapka által bejárt térfogatrészben.

$$n_{szál,lapkán} \frac{V_{rugólapka}}{300 \mu l} * n_{fibrin} = \frac{2358 \mu m^3}{300 * 10^9 \mu m^3} 1,478 * 10^{10} \frac{szál}{alvadék} = 116 \text{ szál}$$

A rugólapka felszínén így megközelítőleg 120 szál található. Azon felület nagysága, ahol a rugólapka és a szálak érintkeznek ( $A_{lapka-szál}$ ), a szálak felszínéből kiszámítható:

$$\begin{aligned} A_{lapka,szál} &= n_{szál,lapkán} * l_{szál} * d = 116 \text{ szál} * 2,78 \mu m * 0,0868 \mu m = 28,05 \mu m^2 \\ &= 2,805 * 10^{-11} m^2 \end{aligned}$$

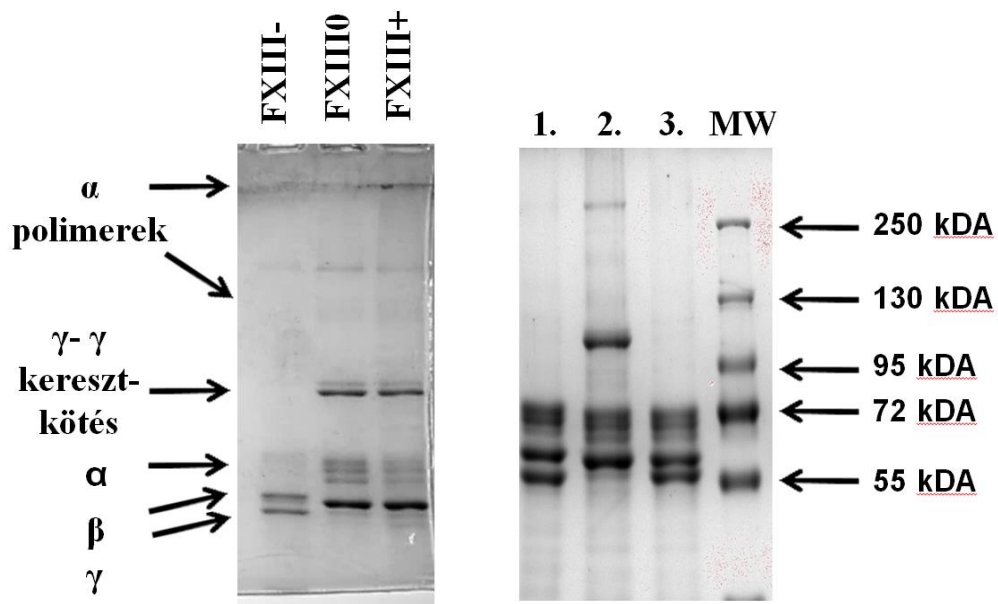
A maximális húzási feszültséget ( $\sigma_{max}$ ) megkapjuk, ha az általunk mért legnagyobb erőkülönbség értéket elosztjuk azzal a felülettel, ahol a rugólapka és a szálak érintkeznek.

$$\sigma_{max} = \frac{F}{A_{lapka,szál}} = \frac{56 * 10^{-9} N}{2,805 * 10^{-11} m^2} = 1,996 \text{ kPa}$$

A rugólapka 1  $\mu m$  úthosszon mozgott, ami a 2,86  $\mu m$  hosszúságú szálra nézve 35 %-os megnyúlást jelent. Az egységnyi megnyúlás ( $\Delta \epsilon$ ) és a húzási feszültség ismeretében a szál Young modulusa kiszámítható:

$$Young \text{ modulus} = \frac{\sigma_{max}}{\Delta \epsilon} = \frac{1,996 \text{ kPa}}{1,35} = 1,478 \text{ kPa}$$

1. Weisel, J.W., *The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians*. Biophys Chem, 2004. **112**(2-3): p. 267-76.
2. Eunjung Kim, O.V.K., Kellie R. Machlus, Xiaomin Liu, Timur Kupaev, Joshua Lioi, and D.Z.C. Alisa S. Wolberg, Elliot D. Rosen, Zhiliang Xu and Mark Alber, Correlation between fibrin network structure and mechanical properties: an experimental and computational analysis. *Soft Matter*, 2011(7): p. 4983-4992.



**M1 Ábra.** A 36. Ábrán tárgyalt SDS-PAGE összevetve a molekulatömeg-markerrel másik alvasztási próbánál. 1.: fibrinogén 2.: normál fibrinogén minta 2 óra alvasztás után 3.:FXIII mentes minta 2 óra alvadás után 4.: molekulasúly-marker.