

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

Doktori Tézisek

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

1 Bevezetés

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.

A 3D fibrinháló a vérben keringő fibrinogénből alakul ki. A trombin hasítás után kialakuló fibrin monomerek összekapcsolódnak, kialakítva ezáltal egy kétmolekula vastag szerkezetet, a protofibrillumot. A protofibrillumok egymással oldallirányú kölcsönhatásokat alakítanak ki, így hozzák létre a fibrinszálat. Bár az oldallirányú kapcsolatok nagymértékben meghatározzák a szál, a háló, ezáltal az alvadék mechanikai tulajdonságait, az oldallirányú kölcsönhatások létrejöttének pontos mechanizmusa, az ebben szerepet játszó struktúrák és a kialakulásukat vezérlő erők nagyrészt ismeretlenek. AFM felvételek alapján a fibrin α C régiójának lehet fontos szerepe az oldallirányú kapcsolatok kialakításában.

A fibrinháló mechanikai tulajdonságai a háló háromdimenziós szerkezete miatt kevésbé ismert annak ellenére, hogy a fibrinogén monomer szerkezete és mechanikai tulajdonságai nagyrészt feltártak. A háló mechanikai erőválasza különbözik az egyedi molekulák és szálak mechanikai válaszáétól, bár azok a háló mechanikai tulajdonságait alapvetően meghatározzák. A fibrinháló összetett erőválaszának vizsgálatára jelenleg a trombelasztográfia és reológiai módszerek állnak rendelkezésre.

2 Célkitűzés

PhD munkám során az alábbi célokat tűztem ki.

1. Alvadás 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 előállítás, amelynek mikrostruktúrája AFM-el jól analizálható.
4. A szálak morfológiájában bekövetkező változások vizsgálata kloridion koncentráció és trombin aktivitás függvényében.
5. Plazminhatás mikroszkopikus mechanizmusának feltárása egyedi fibrinszálak emésztésén keresztül. A mechanizmus ismeretében a fibrinolízis modelljének felállítása.

3 Módszerek

3.1 Fibrinháló készítése plazmamintából. A mechanikai tulajdonságok mérése AFM-mel: Nano-trombelasztográfia.

100 μl kevert humán plazmamintához 200 μl Hepes puffert (10 mM Hepes, 150 mM NaCl) adtunk, majd 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), melynek rugólapkája a mérés során végig az oldatba merült. Minden méréshez MSCT-AUHW típusú rugólapkát használtunk (Bruker, Billerica, MA, USA). Erőméréseink előtt az AFM szoftvere által vezérelt termikus kalibrációval határoztuk meg a rugólapka rugóállandóját. Az általunk használt lapkák rugóállandója 0,05 – 0,2 N/m közé esett. A rugólapkát 1 μm távolságon mozgattuk 0,25 – 2,5 $\mu\text{m/s}$ közti sebességgel. Az adatok kiértékeléséhez az Igor Pro 5.05A szoftvert használtunk.

3.2 Fibrinolízis vizsgálata nTEG-el

Az nTEG mérés során kialakult alvadék lízisét sztreptokinázzal (STK) indítottuk. 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.

3.3 Kvázi-2D fibrinháló előállítása tisztított fibrinogénből és lízise

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 CaCl₂-ot adtunk, a trombint pedig tovább hígítottuk 2 IU/ml-re. A fibrinogén és trombin oldatokból 10-10 µl-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 µl-es alvadék így 1,13 cm² felületen terült szét. A végső minta általános esetben 1 mg/ml fibrinogént, 1 IU trombint, 5 mM kalciumot és 150 mM NaCl-ot tartalmazott. Az alvadás magas páratartalmú, zárt környezetben történt, 25 °C-on legalább 90 percig. A mintát ezután először nitrogén gázzal óvatosan rászárítottuk a csillámfelszínre, majd nagy tisztaságú ioncserélt vízzel (MQ) mostuk és nitrogén gázzal újra szárítottuk.

A lízis előtt a 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 megkezdjük 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.

3.4 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, Bruker, 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 (Olympus, 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 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.

3.5 A szálak morfológiájának statisztikai összehasonlítása

Az alvadás folyamata egy enzimreakció, így a szálak magasság- és szélességeloszlása némileg eltért a

különböző alvasztásoknál. 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 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.

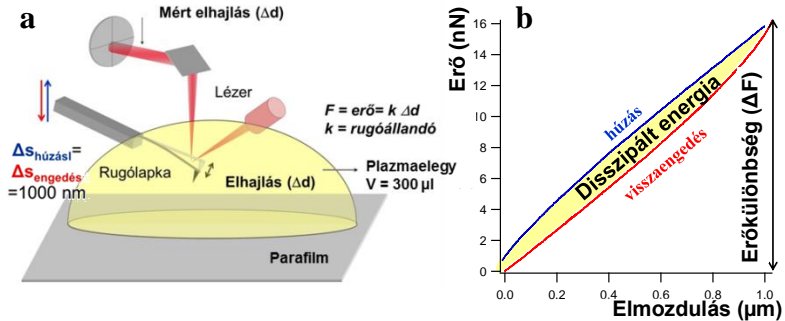
4 Eredmények

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.

4.1 Fibrinháló mechanikai jellemzése Nanotrombelasztográfiával (nTEG) (T1)

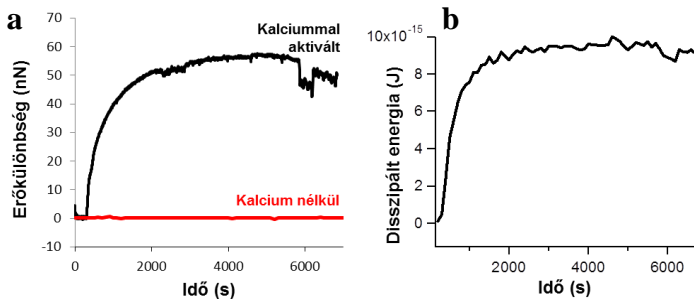
Az alvadó plazmaminta a rugólapka fel-le mozgása során a lapka elhajlását okozta. Az elhajlás mértékéből a lapka rugóállandójának ismeretében erőt mértünk (**1. Ábra a része**), melynek adott cikluson belül tapasztalt maximuma és minimuma között mérhető erőkülönbség (ΔF , **1. Ábra b része**) a plazmaminta által a rugólapkára kifejtett erőt jellemzi. A húzási-engedési

görbék között megjelenő hiszterézis területe az alvadékban disszipált energiára utal, mely az alvadék viszkózus tulajdonságkomponensét jellemzi.



1. ábra. Az nTEG sematikus rajza (a) és az egyes húzási- engedési ciklusokban kapott erő-elmozdulás görbék (b).

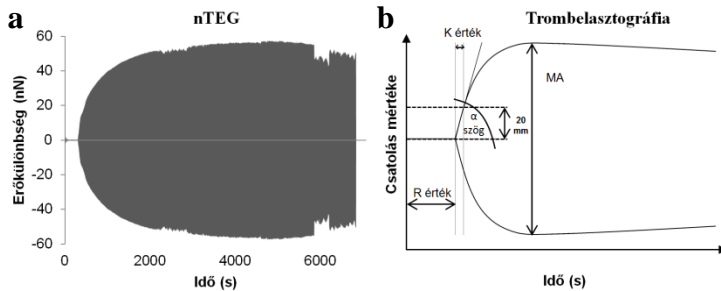
Az így mért erőkülönbség (nN) és disszipált energia (J) értékek időbeli változását követtük. Mindkét paraméter 0 érték körül változik az alvadás előtt, majd növekszik, végül elér egy platoértéket (2. Ábra).



2. ábra. Az erőkülönbség (a) és a disszipált energia (b) időbeli változását jellemző nTEG görbék.

Kalciummal nem aktivált, azaz meg nem alvadt plazmaminta végig 0 érték körül változott, nem mutatott növekedést. A késlekedési idő, amit a maximális erőkülönbség eléréséig mérhetünk, 7 mérés alapján átlagosan 1274 s (± 597 s SD) volt, míg a platónál mérhető maximális erő átlaga 21 nN ($\pm 16,5$ nN SD).

Az erőkülönbség görbéket az x-tengelyre tükrözve a trombelasztográfiában mértékhez hasonló görbét kapunk (3. Ábra).



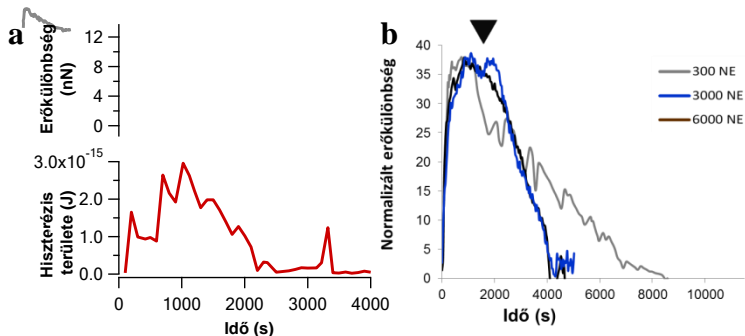
3. ábra. nTEG görbéket az x-tengelyre tükrözve nyert nano-trombelasztogram (a). A TEG módszerrel mért trombelasztogram sematikus rajza a vizsgált paraméterekkel (b).

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. Ha erőkülönbség eredményeink fizikai jelentését figyelmen kívül hagyva csak grafikusán értékeljük, azok időbeli változása (úgy mint R és K érték) összevethető a TEG eredményekkel. Ám míg a TEG az alvadék mechanikai

tulajdonságait csak közvetetten jellemző amplitúdójelet mérni, nTEG méréseink esetében a változásokat jól definiált fizikai paraméterrel, az erőkülönbséggel [nN] és a disszipált energiával [J] jellemeztük. Az nTEG módszer esetén az erőkülönbség és a disszipált energia mérésével a rugalmas és a viszkózus tulajdonságkomponens időbeli változása az alvadás során egymástól elkülönítve vizsgálható. Az nTEG-nél alkalmazott rövidebb úthossz és alacsonyabb mozgási sebességek alkalmazása által lehetőség nyílik az alvadás során a viszkoelasztikus tulajdonságokban bekövetkező olyan kismértékű változások követésére, melyek a TEG esetében átlagolódnak.

4.2 Fibrinolízis vizsgálata nTEG-el (T2)

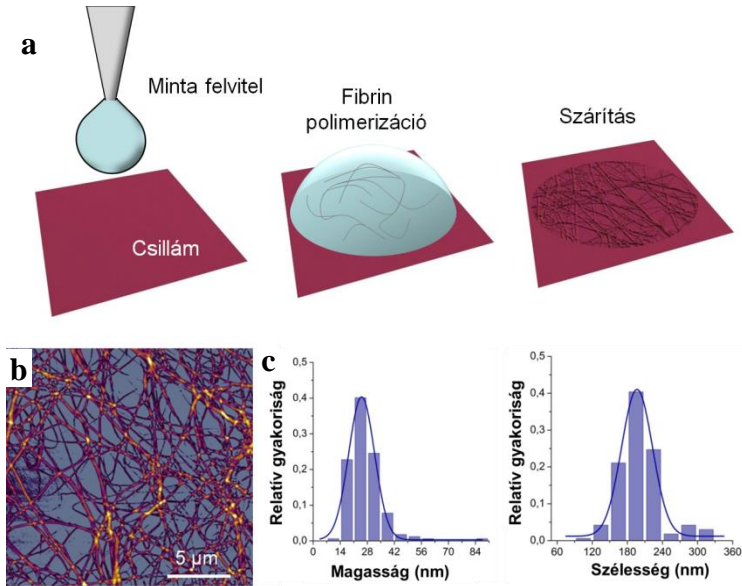
Sztreptokináz (STK) hatására mind az erőkülönbség, mind a disszipált energia értéke csökkenni kezdett, végül 0 körüli értéket vett fel (**4. Ábra a része**). A csökkenő szakasz meredeksége a lízis sebességét jellemzi. 3000 NE STK a lízist háromszorosára gyorsította 300 NE STK-hoz képest. 6000 NE STK esetén a lízis további gyorsulását nem tapasztaltuk (**4. Ábra b része**).



4. ábra. Erőkülönbség és disszipált energia adatok időbeli változása 300 IU STK-val kezelt alvadék esetén (a). Normalizált erőkülönbség időbeli változása különböző aktivitású STK hatására (b). Az STK hozzáadása a fekete nyíllal jelölt időpillanatban történt.

4.3 Kvázi-2D fibrinháló készítése tisztított fibrinogénból, a háló jellemzése (T3)

A fibrinogén és trombin csillámfelületen történő kis térfogatú elegyítésével alvasztás és szárítás után egy olyan mintát kaptunk, ahol a szálak nem rétegekben fekszenek egymáson, hanem egyetlen réteget, egy kvázi-2D struktúrát alkotnak (5. Ábra a és b részei). A háló vastagsága (z-irányú dimenziója) 5 nagyságrenddel (100.000×) kisebb, mint a háló szélessége (x-y irányú kiterjedése), így a hálót kvázi kétdimenziósnek nevezhetjük annak ellenére is, hogy a szálak némely területeken egymással átfedésben vannak. Az így kialakított kvázi-2D háló alkalmas AFM-mel végzett topológiai mérésre, az egyedi szálak magassága és szélessége vizsgálható (5. Ábra c része).



5. ábra. Kvázi-2D fibrinháló előállítás AFM analízisre (a). A háló AFM képe (b). Az egyedi szálak magasságának és szélességének eloszlása (c) ($n=167$).

A mosás előtti szárítás egy fixálási lépés is. A minta így stabilan rögzült a csillámfelületen és a mosás során se vált le a felületről. Amennyiben ezt nem végeztük el, az alvadék a csillámfelületről lemosható maradt, a hálónak csak töredékét láttuk további képalkotásink során.

4.4 Különböző NaCl koncentráció és trombin aktivitás mellett létrehozott kvázi-2D fibrinháló morfológiai vizsgálata

Alacsonyabb NaCl koncentráció mellett alvasztott kvázi-2D hálóban a szálak magassága és szélessége is magasabb átlagos értéket vett fel. Az alvadás során

alacsonyabb trombin aktivitást alkalmazva szintén magasabb, szélesebb szálakat kaptunk (**1. Táblázat**).

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

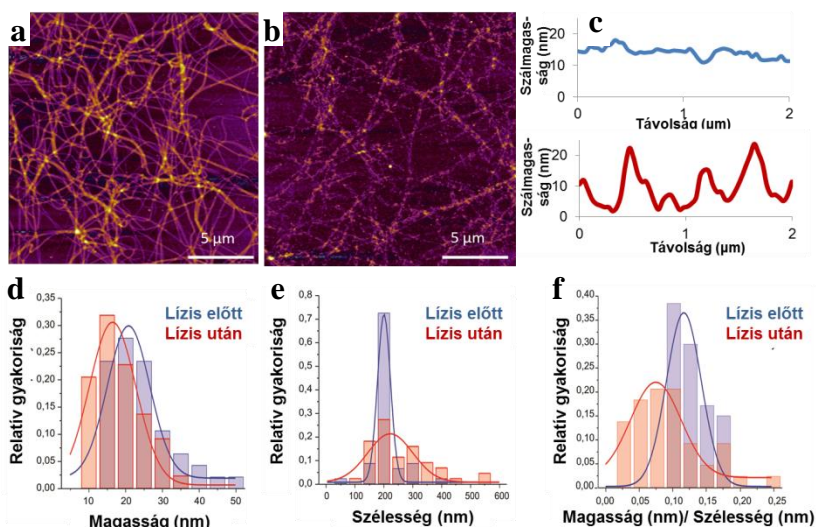
	Szélesség (nm)	SD (nm)	Magasság (nm)	SD (nm)
1 IU/ml trombin	160	± 37,5	18	± 9,8
0,1 IU/ml trombin	177	± 43	26	± 8,2
0,01 IU/ml trombin	250	± 69,5	34	± 9,6
150 mM NaCl	153	± 30	21	± 7
75 mM NaCl	217	± 65	23	± 8
20 mM NaCl	242	± 70	28	± 8

4.5 Kvázi-2D háló plazmin-indukált fibrinolízise

Pásztázás után a hálót 30 percig emésztettük 3 nM végkoncentrációjú plazminnal, majd mosás és szárítás után pásztáztuk. A lízis előtti és utáni felvételeket egymással vetettük össze. Emésztés után a hálózatos elrendeződés megtartott. Az egyedi szálak viszont töredezetté, szakaszossá, részben feldarabolttá váltak. (**6. Ábra a és b részei**). A szálak hosszirányú topológiai profilja a lízis után nagymértékű ingadozásokat mutatott, ami a lízist megelőzően nem volt jellemző (**6. Ábra c része**). A szálak átlagos magassága 21 nm-ről (± 8 nm SD, n=47) 16 nm-re (± 7 nm SD, n=44) csökkent, míg a szála szélességének átlaga növekedett, 185 nm-ről (± 47 nm SD, n=47) 248 nm-re (± 137 nm SD, n=44). Emésztés után a szélesség adatok szórása is nagymértékben növekedett (**6. Ábra d és e részei**). A lízis előtti és utáni értékeket Welch féle t-próbával összevetve mind a

magasságban mind a szélességben szignifikáns változás történt, a p-érték mindkét esetben 0,0001-nél kisebb volt.

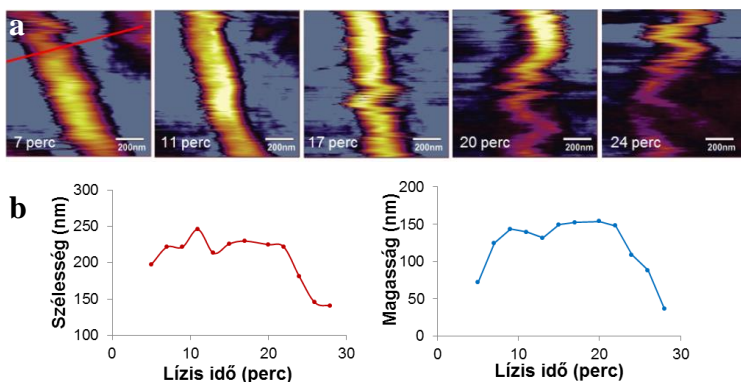
A csökkent magasság és növekedett szélesség értékelésére bevezettünk egy új paramétert, a magasság-szélesség arányt. Ez a paraméter a lízis során lecsökkent: a lízis előtti 0,115-ről ($\pm 0,027$ SD, $n=47$) 0,081-re ($\pm 0,052$ SD, $n=44$) (6. Ábra f része). A változás szignifikáns volt.



6. ábra. Kvázi-2D fibrinháló lízis előtt (a) és lízis után (b). Egyedi szálak topológiai profilja a lízis előtt (piros) és a lízis után (kék) (c). A szálak magasságának (d), szélességének (e) és magasság-szélesség arányának (f) eloszlása a lízis előtt és után.

4.6 Egyedi szál emésztésének valós idejű követése (T4)

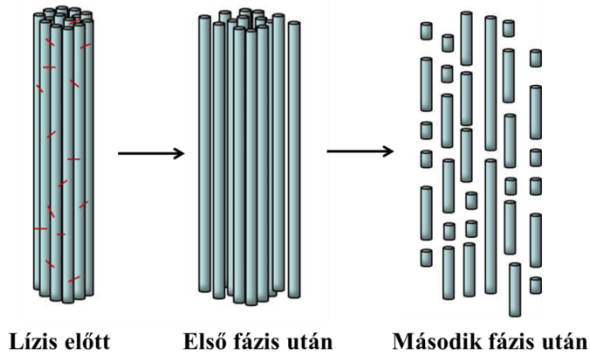
Egyedi fibrinszálon a fibrinolízis hatására történő nanobiofizikai változásokat vizsgáltuk a szál nagyfelbontású és valós idejű követésével az emésztés folyamán. 2,5 nM plazmin jelenlétében a teljes emésztés megközelítőleg 30 percig tartott, mely idő alatt akár 20 kép felvételére is lehetőségünk volt. Kezdetben a szál magasságának növekedését láttuk, majd a szál pásztázás közben elmozdult, cikkcakkossá vált, végül elszakadt (7. **Ábra a képsorozat**). Az első képkockáján jelölt piros vonal mentén vettük fel a szálak magasságprofilját minden egyes képen. A szál magassága és szélessége megnövekedett, majd egy platófázis után a szál teljes fragmentálódásának következtében lecsökkent (7. **Ábra b része**). A magasság és a szélesség egyidejű növekedése a szál térfogatbeli növekedésére utal.



7. *Ábra.* Egyedi szál topológiájában történő változások az emésztés folyamán (a). Egyedi fibrinszál szélességének és magasságának időbeli változása a lízis folyamán (b).

4.7 Plazmin indukált emésztés modellje (T4)

A fibrinszál magasságában, szélességében tapasztalt változásokból a szál eddig kevésbé ismert szerkezeti jellemzőire, az emésztés következtében bekövetkező szerkezeti változásokra következtethetünk. Magát az emésztést két fázisra bonthatjuk (**8. Ábra**). 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. A plazmin számára legkönnyebben elérhető hasítási helyek a lízis kezdetén az αC régió található. Hasítása esetén a szálat 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.



8. Ábra. Egyedi szál emésztésének fázisai.

5 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.

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 viszkozításban 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 viszkozitás-tulajdonság-komponensének időbeli változása az alvadás egyes szakaszaiban különbözött a rugalmas komponens változásától. A plazma alvadékban sztreptokináz (STK) indukált emésztés hatására az erőkülönbség és a hiszterézis terület csökkenése is megfigyelhető volt, azaz a lízis során nem csak az alvadék rugalmassága, hanem a viszkozitása is csökken.

Reprodukálható módon létrehoztuk a háromdimenziós szerkezetből egy kvázi-2D fibrinhálót. A háló mikrosztruktúrája, az egyedi szálak magassága és szélessége analizálható volt ezen a rendszeren AFM-el. A szálak magassága és szélessége NaCl koncentráció és trombin aktivitás változtatásával szabályozható. A hálóban a plazmin okozta lízis következtében megjelenő változások mérhetők, analizálhatók. 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.

A dolgozat új tudományos eredményeit következő pontokban foglalom össze:

- T1. Kidolgoztam az nTEG módszertanát, mellyel lehetőség nyílik a háromdimenziós fibrinháló viszkoelasztikus tulajdonságaiban bekövetkező változások nanoskálájú követésére az alvadás során.
- T2. Az nTEG módszertannal jellemeztem a viszkoelasztikus tulajdonságokban bekövetkező nanoskálájú változásokat a STK indukált fibrinolízis során.
- T3. Kidolgoztam a kvázi-2D fibrinháló előállításának módszertanát, mely AFM-el végzett topológiai vizsgálatok által lehetőséget nyújt a fibrinháló és egyedi fibrinszálak tulajdonságainak feltárására.
- T4. Felállítottam az emésztés kétfázisú modelljét. A lízis hatására az egyedi szálak kezdetben fellazulnak, térfogatuk megnövekszik. Ezután történik a szálak axiális feldarabolódása.

6 Publikációk

6.1 Értekezéshez kapcsolódó közlemények

- [1] 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. IF₂₀₁₇: 3,489
- [2] 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. IF₂₀₁₄: 3.10