

Gyulladásához és fertőzéshez köthető változások  
a fibrin szerkezetében, biomechanikájában és  
lítikus érzékenységében

Tézisfüzet

**Dr. Farkas Ádám Zoltán**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Oláh Zsolt, Ph.D.  
Dr. Fazakas János, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Domján Gyula,  
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Blaskó György, az  
MTA doktora, egyetemi  
tanár  
Dr. Bőgel Gábor, Ph.D.,  
adjunktus

Budapest  
2021

## BEVEZETÉS

A kardiovaszkuláris, fertőző betegségek és malignus daganatok halálozása továbbra is magas, patofiziológiájukban fontos elem a vérrögképződés. A jobb prognózis érdekében új terápiás célpontokra van szükség. Emiatt fontos megértenünk az alvadékok szerkezetét, mechanikai és lítikus tulajdonságait, valamint ezek könnyen mérhető prediktorait.

A *Staphylococcus aureus* egy Gram-pozitív baktérium, amely számos patológias állapotért felelős (pl.: tályogképződés, endocarditis). Egyik fontos virulenciafaktora a stafilokoaguláz (SCG), egy fehérje, amely a protrombin (PT) exosite I részéhez köt. A létrejövő SCG-PT komplex a protrombin nem-enzimatis zimogén aktivációját követően trombinszerű aktivitással rendelkezik, mely képes a fibrinogént fibrinné alakítani. A SCG-PT a trombin egyéb fiziológias szubsztrátjaihoz, inhibitoraihoz nem kötődik, mely kontrollálatlan fibrinképződéshez vezet. A hagyományos antitrombotikus gyógyszerek is hatástalannak bizonyultak, csupán a kis méretű inhibitorok (pl.: argatroban, dabigatran) használhatók a komplex gátlása céljából.

A polimorfonukleáris sejtek különböző (mikrobiális, endogén, egyéb) stimulusok hatására hálószerű struktúrákat, neutrofil extracelluláris csapdákat (NETeket) bocsájtanak ki az extracelluláris térbe a NETózis folyamata során, melyek főként dekondezált kromatinból és antimikrobiális fehérjékből állnak. Legfőbb komponensei a DNS és hisztonfehérjék. A NETek a vérrögképződés során képesek az alvadékba beépülni. Korábbi vizsgálatok eredménye alapján alkotóelemei fokozzák az alvadékok lítikus- és mechanikai erővel szembeni ellenállását is. Emiatt fontos megismernünk a NETek arányát, valamint azok mennyiségét befolyásoló tényezőket vérrögökben.

A NETózis során felszabaduló peptidil-arginin-deimináz 4 (PAD4) fehérjék arginin oldalláncainak deiminációját katalizálja, amely során töltés nélküli citrullin keletkezik. A hisztonfehérjék deiminációja fontos lépés a NETózis folyamatában, mivel elősegíti a kromatin dekondezációját. A PAD4 azonban fibrinogént is képes citrullinálni (citFg), mely több trombin felismerési pontot is érint, akadályozva ezáltal a trombin katalizálta fibrinogén hasítást, fibrin polimerizációt. A citFg jelenléte továbbá akadályozza a natív fibrin polimerizációját is.

A daganatos megbetegedésekben a vénás tromboembóliás (VTE) rizikó 4-7-szeresen emelkedett az átlag populációhoz képest. Az emelkedett fehérvérsejtszám gyakori az ilyen jellegű betegségekben, emellett a fehérvérsejtszám összefüggést mutat a VTE-s szövődeményekkel. Az aktivált neutrofilek neutrofil elasztázt, NET-eket, PAD4-et bocsájtanak ki az extracelluláris térbe. Bizonyos rosszindulatú daganatok esetén (hasnyálmirigy, tüdő) a vérplazma citrullinált hiszton H3 (cH3, NET markerként használatos) tartalma összefüggést mutatott a VTE-s szövődeményekkel. Emellett mások emelkedett extracelluláris DNS vérplazma koncentrációt találtak daganatos megbetegedésekben. DNáz alkalmazása csökkentette a fokozott VTE rizikót tumoros egerekben, amely a neutrofilek, NETek kiemelkedő szerepére utal a trombotikus szövődeményekben.

## CÉLKITŰZÉS

### **A stafilokoaguláz hatásai fibrin- és plazmaalvadékok szerkezetére, mechanikai tulajdonságaira és lízisére**

1. Az SCG-PT hatására létrejött alvadékok szerkezetének vizsgálata.
2. Az ilyen alvadékok viszkoelasztikus paramétereinek meghatározása.
3. A fibrinolízisben bekövetkező változások karakterizálása SCG-PT indukálta alvadékokban.
4. Az SCG trombinra kifejtett hatásainak feltérképezése.

### **Neutrofil extracelluláris csapdák, *ex vivo* artériás és vénás trombusok szerkezete**

1. Meghatározni *ex vivo* vérrögök fibrintartalmát, fibrinszálak átmérőjét, elemezni bennük NET komponensek arányát.
2. Meghatározni a vérrögök NET-tartalmát és ennek kapcsolatát klinikai paraméterekkel.
3. A NET-tartalom vizsgálata daganat-asszociált vénás trombózisban (humán hasnyálmirigy tumort hordozó egerekben kontroll egerekkel összehasonlítva).
4. Citrullinált fibrinogén jelenlétében kialakult alvadékok szerkezetének, viszkoelasztikus tulajdonságainak és lízisének vizsgálata.

## MÓDSZEREK

### **Stafilokoaguláz**

Kollaboránsaink (Craig Thelwell) által expresszált SCG-t alkalmaztunk vérrögök létrehozására.

### **Artériás trombusok**

Artériás trombusok kerültek eltávolításra akut miokardiális infarktuszban (CAD, 66 fő, katéteres trombusaspiráció), perifériás artériás trombózisban (PAD, 64 fő, trombandarterectomia), és akut ischaemiás strokeban (AIS, 78 fő, stent trombectomia) szenvedő betegek artériáiból. Alapvető klinikai jellemzők, laboreredmények, társbetegségek is feljegyzésre kerültek.

### **Tumor- és vénás trombózis-modell egerekben**

Prof. Nigel Mackman laborjában luciferáz-expresszázó BxPc-3 humán pancreas tumorsejteket injektáltak Crl:NU-*Foxn1<sup>tmu</sup>* hím egerek hasnyálmirigyébe, ahol a tumorok 7-10 hétig növekedtek. Ezután vena cava inferior stasis modellt alkalmaztak vénás trombusok nyérése céljából. Ezek szerkezetét vizsgáltuk.

## **Scanning elektronmikroszkópos vizsgálatok (SEM)**

Az *in vitro* alvadékokat és *ex vivo* trombusmintákat glutáraldehiddel fixáltuk, felszálló alkoholsorral, acetonnal dehidratáltuk, majd CO<sub>2</sub>-kritikus-pont szárítás történt. A minták arannyal történő bevonása után véletlenszerűen kiválasztott régiókról készültek képek EVO40 scanning elektronmikroszkóp segítségével. A fibrinháló felszíni területét a teljes kép területének százalékos arányaként határoztuk meg a képek 864 részre osztását követően azok morfológiai osztályozásával. A mintáinkban 300 fibrinszál átmérőjének manuális lemérésével határoztuk meg azok eloszlását Matlab R2015a Image Processing Toolbox alkalmazásával.

## **Kisszögű röntgenszórás (Small angle X-ray scattering, SAXS)**

A SAXS során a fibrinszálak belső, szubmikroszkópikus szerkezetéről nyerhetünk információt. Ennek során vékony falú boroszilikát üvegapillárisokban hoztunk létre alvadékokat, majd Cu K $\alpha$  sugárzást alkalmaztunk. A röntgenszórási mintázatot hybrid pixel detector segítségével regisztráltuk.

## **Alvadék permeabilitási vizsgálatok**

Az alvadékok porozitását folyadékpermeációs vizsgálatokkal határoztuk meg. A fibrin- és plazmaalvadékokon puffert folyattunk át. Az átfolyás sebességéből és egyéb paramétereiből meghatároztuk a porozitást jellemző Darcy konstans értékét.

## **Immunfluoreszcencia**

Az *ex vivo* vérrögöket eltávolítást követően izopentánba helyeztük feldolgozásig. Metszeteket készítettünk 6  $\mu\text{m}$  vastagságban fagyasztva metszéssel. Az extracelluláris DNS jelöléséhez TOTO-3 festéket, a fibrin, valamint a cH3 festéséhez specifikus elsődleges, valamint fluoreszcens jelet adó másodlagos antitesteket alkalmaztunk. Lézer pásztázó mikroszkópiás képeket készítettünk, meghatároztuk a vérrögök fibrin/DNS, fibrin/cH3 arányát.

Emellett citrullinált fibrinalvadékok jelölését követően lézer pásztázó mikroszkópiával nagyobb szeletvastagságot alkalmazva meghatároztuk a fibrinszálak denzitását.



## **Reometria: viszkoelasztikus és mechanikai tulajdonságok**

Fibrin- és plazmaalvadékok elaszticitását és viszkozitását vizsgáltuk oszcillációs reometria során. A tárolási (elaszticitást jellemzi) és veszteségi modulus (viszkozításra utal) meghatározását követően az alvadékok dezintegrációjához szükséges kritikus nyíróerőt határoztuk meg ún. folyáshatár görbék regisztrálásával.

## **Fibrinolízis vizsgálata**

Fibrin- és plazmaalvadékokat hoztunk létre kollaboránsaink közreműködésével SCG-PT, stafilokoaguláz-trombin (SCG-T), citrullinált fibrinogén jelenlétében. Az SCG-(P)T jelenlétében készült alvadékok plazminogént, szöveti típusú plazminogén aktivátort (tPA) is tartalmaztak. A citFg-t tartalmazó minták lízisét két módszerrel követtük. A fibrinalvadékok lízisét aktivált plazmin hozzáadásával indítottuk. Ezt követően turbidimetriás méréssel követtük azok lízisét, meghatároztuk a maximális turbiditás felére történő csökkenésig szükséges időt.

Emellett IBIDI tárgylemezek mikrocatornáiban citFg és plazminogén jelenlétében hoztunk létre

plazmaalvadékokat, majd tPA hozzáadását követően fotozással követtük a lítikus frontvonal haladását.

### **Statisztikai elemzés**

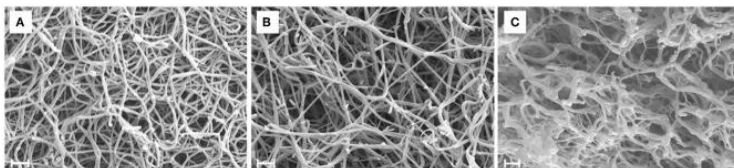
A trombusokban található fibrin arányának vizsgálatánál a különböző csoportok adatainak eloszlását Kuiper-teszttel, mediánjait pedig egyoldalú Bootstrap-statisztikai tesztekkel hasonlítottuk össze.

A mért fibrinszálátmérő empirikus adataira teoretikus eloszlásgörbéket illesztettünk és Kuiper-teszttel hasonlítottuk össze a csoportok eredményeinek eloszlását. A kisebb mintaszámú ( $n < 9$ ) adatoknál az eloszlásokat Kolmogorov-Smirnov, két oldalú t-próbával, míg a három vagy több adathalmazzal rendelkező kísérleteket Kruskal-Wallis teszttel, ANOVA-val elemeztük. A statisztikai próbákat a GraphPad Prism 6 és 7 szoftver, illetve a Matlab 7.3 statisztikai eszköztárának segítségével végeztük. Az eredményeket átlag  $\pm$  standard error of mean (SEM) értéként jelöltük, emellett számos eredmény esetén a medián és az alsó-felső kvartilis értékek, interkvartilis range kerültek feltüntetésre. Minden esetben  $P < 0.05$  értékeket tekintettünk szignifikánsnak.

## EREDMÉNYEK

### **Stafilokoaguláz jelenlétében kialakult alvadékok**

Általában véve a SCG-T, SCG-PT hatására a trombin kontrollokhoz képest vastagabb szálú fibrinmátrix keletkezett (1. ábra). A SAXS során kapott eredményeink szerint ennek háttérében a protofibrillumok keresztmetszeti számának emelkedése állt. A permeabilitási vizsgálatok során leggyakrabban a porozitás növekedését tapasztaltuk a (trombin) kontroll alvadékokhoz képest.



**1. ábra.** Fibrinalvadékok scanning elektronmikroszkópos képei. Fibrinalvadékokat hoztunk létre fibrinogénből trombin (A), stafilokoaguláz-trombin (B) és stafilokoaguláz-protrombin (C) segítségével. Alvadékonként 4-6 képet készítettünk, melyet morfometriai analízis követett.

A reológiai mérések során az SCG hatására létrejött alvadékok kevésbé elasztikusnak és viszkózusnak bizonyultak, emellett azok (főként SCG-PT jelenlétben)

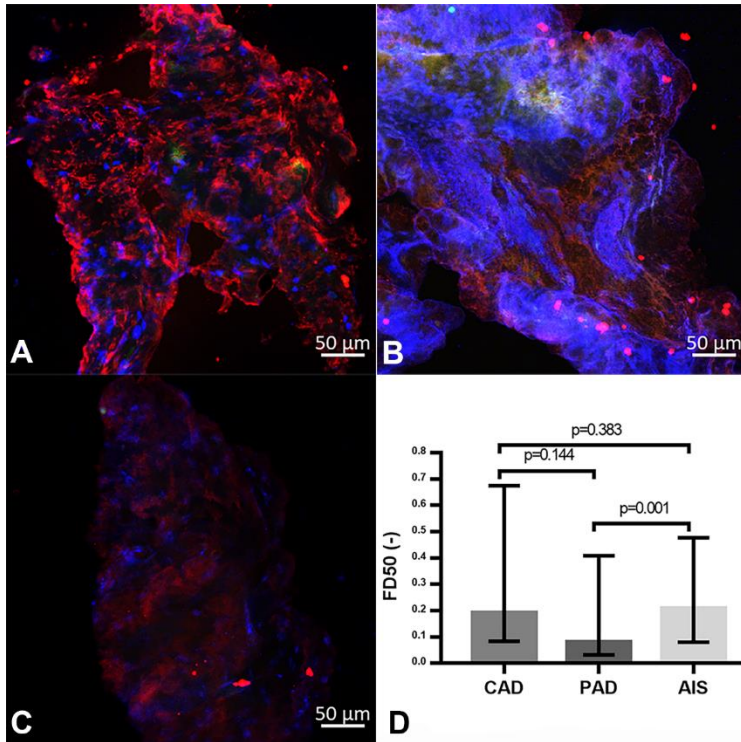
mechanikai, nyíróerőkkel szemben kevésbé voltak ellenállóak.

Az SCG hatásra általánosságban fokozott lízis volt jellemző mind fibrin-, mind pedig plazmaalvadékokban, a hatás SCG-PT esetén kifejezettebb volt.

### **Neutrofil extracelluláris csapdák**

#### **Intervenciók során eltávolított trombusok**

A NET komponensek mindhárom lokalizációból (szív-, agy- és perifériás artériák) eltávolított trombusokban kimutathatók voltak. A perifériás artériás trombusok relatív DNS tartalma magasabb volt (2. ábra). A cH3 antigén is minden alvadékban kimutatható volt, de szignifikáns különbség az egyes lokalizációk között nem volt látható.



**2. ábra. Indirekt immunfluoreszcencia és fibrin/DNS arány artériás trombusokban koronária- (CAD, A), perifériás artériás betegből (PAD, B), akut ischaemiás stroke-ból (AIS, C). Az alvadékok fagyasztva metszését és fluoreszcens jelölését követően minden vérrögben meghatároztuk a relatív fibrin (piros), citrullinált H3 hiszton (zöld) és extracelluláris DNS (kék) tartalmat 6-15 régióból, amely alapján meghatározható volt a fibrin/DNS (FD50: medián + IQR, D panel), fibrin/cH3 arány a**

trombusokban. Az alacsonyabb FD50 érték magasabb relatív DNS tartalomra utal.

Az orális antikoagulánsok megemelték az alvadékok relatív cH3 tartalmát.

A NET markerek pozitív korrelációt mutattak a betegek életkorával, gyulladásos paraméterekkel (vér fibrinogén szint, C-reaktív protein koncentráció, abszolút neutrofil szám).

A koronáriákból származó alvadékokban a fibrinszálak vastagsága szignifikánsan magasabb volt az agyi, vagy perifériás artériás trombusokhoz képest, a fibrinszálak vastagsága szintén összefüggést (parabolikus) mutatott gyulladásos paraméterekkel, valamint a tünetek kezdetétől az intervencióig eltelt idővel.

### **Humán hasnyálmirigy daganatot hordozó egérmodell**

A humán hasnyálmirigy tumort hordozó egerekben létrejött trombusok extracelluláris DNS és cH3 tartalma magasabb volt a kontroll egerekből eltávolított vérrögökéhez képest.

## **Fibrinogén citrullináció**

A citrullináció hatására a kezelés idejétől függően egyre vékonyabb szálakból álló fibrinmátrix alakult ki. A SAXS vizsgálatok szerint ez nem a rostok belüli protofibrillum-denzitás változásának tulajdonítható. A kezelés hatására a lézer pásztázó mikroszkópiás képek alapján a fibrinszálak denzitása emelkedett, melyet az alvadékok turbiditásának csökkenése is megerősített. A sűrűbben szőtt fibrinmátrixhoz csökkent porozitás társult.

A citrullinációt követően az oszcillációs reometria során nem csak a fibrinalvadékok viszkozitása és elaszticitása csökkent, hanem a kezelés idejével arányosan azok mechanikai ellenállása is.

Ez előbbi változások fokozott lítikus rezisztenciával társulnak, mind a plazmin-mediált, mind pedig a tPA-indukált lízis idő megnyúlt: az alvadékok turbiditásának 50%-os csökkenéséig eltelt idő, valamint a tárgylemezek mikroszatórnáiban a lítikus frontvonal haladása is lassult.

## KÖVETKEZTETÉSEK

1. A stafilokoaguláz nem csak a protrombinra van hatással, hanem megváltoztatja a trombin indukálta fibrin polimerizációt is.
2. Az SCG hatására általában vastagabb szálakból álló fibrinmátrix jön létre megtartott interfibrilláris denzitással, fokozott porozitással.
3. Az SCG jelenlétében kialakult fibrinalvadékok kevésbé elasztikusak és viszkózusak, míg plazmaalvadékokban ezzel ellentétes hatások láthatók.
4. Az SCG jelenléte jelentősen csökkenti az alvadékok nyíróerővel szembeni ellenállását.
5. A fibrin- és plazmaalvadékok lízise fokozott az SCG (főként SCG-PT) hatására létrejött alvadékokban.
6. A NETek jelen vannak, és mennyiségük eltér a különböző lokalizációjú artériás vérrögökben (agyi, koronáira, perifériás artéria).
7. A vérrögök DNS és citrullinált hiszton tartalma korrelál a betegek életkorával, szisztémás gyulladással paraméterekkel (vér fibrinogén szint, C-reaktív protein, abszolút neutrofil szám).



8. A koronáriákból származó vérrögökben vastagabb fibrinszálak találhatóak, mint az agyi, vagy perifériás artériás trombusokban.
9. A NET markerek magasabb arányban találhatóak meg tumort hordozó egerekből eltávolított vérrögökben.
10. A citrullinált fibrinogén jelenléte vékonyabb szálú fibrinmátrix létrejöttéhez vezet, melyhez nagyobb fibrinszál denzitás, csökkent porozitás társul.
11. A citrullinált fibrinogént tartalmazó vérrögök kevésbé elasztikusak és viszkózusak, kevésbé ellenállóak mechanikai erővel szemben, és lítikus érzékenységük csökkent.

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### **A disszertációhoz kapcsolódó közlemények**

[1] Farkas AZ\*, Farkas VJ\*, Gubucz I, Szabo L, Balint K, Tenekedjiev K, Nagy AI, Sotonyi P, Hidi L, Nagy Z, Szikora I, Merkely B and Kolev K. (2019) Neutrophil extracellular traps in thrombi retrieved during interventional treatment of ischemic arterial diseases. *Thromb Res*, 175: 46-52.

Impact factor: 2.869

[2] Farkas AZ, Farkas VJ, Szabo L, Wacha A, Bota A, Csehi L, Kolev K and Thelwell C. (2019) Structure, Mechanical, and Lytic Stability of Fibrin and Plasma Coagulum Generated by Staphylocoagulase From *Staphylococcus aureus*. *Front Immunol*, 10: 2967.

Impact factor: 5.085

[3] Hisada Y, Grover SP, Maqsood A, Houston R, Ay C, Noubouossie DF, Cooley BC, Wallen H, Key NS, Thalin C, Farkas AZ, Farkas VJ, Tenekedjiev K, Kolev K and Mackman N. (2020) Neutrophils and neutrophil extracellular traps enhance venous thrombosis in mice

bearing human pancreatic tumors. *Haematologica*, 105: 218-225.

Impact factor: 9.941

[4] Varjú I, Sorvillo N, Cherpokova D, Farkas ÁZ, Farkas VJ, Komorowicz E, Feller T, Kiss B, Kellermayer M, Szabó L, Wacha A, Bóta A, Longstaff C, Wagner DD, Kolev K. (2021) Citrullinated fibrinogen renders clots mechanically less stable, but lysis-resistant. *Circ Res*, 129:342-344

Impact factor: 17.367

### **Egyéb közlemények**

[1] Varju I, Longstaff C, Szabo L, Farkas AZ, Varga-Szabo VJ, Tanka-Salamon A, Machovich R and Kolev K. (2015) DNA, histones and neutrophil extracellular traps exert anti-fibrinolytic effects in a plasma environment. *Thromb Haemost*, 113: 1289-98.

[2] Varju I\*, Farkas VJ\*, Kohidai L, Szabo L, Farkas AZ, Polgar L, Chinopoulos C and Kolev K. (2018) Functional cyclophilin D moderates platelet adhesion, but enhances the lytic resistance of fibrin. *Sci Rep*, 8: 5366.

[3] Farkas ÁZ, Török S, Kovács JB, Piros L, Végső G, Kiss G, Korda D, Bibok A, Hartmann E, Deák ÁP, Doros A. (2019) Diagnosis and Management of a De Novo Urothelial Carcinoma in a Kidney Allograft: A Case Report. *Transplant Proc.* 51(4):1281-1285.