

A vérlemezkék és fibrin kölcsönhatása a fibrinolízisben: ex vivo és in vitro vizsgálatok

Tézisfüzet

Dr. Farkas Veronika Judit

Semmelweis Egyetem
Elméleti orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Bodó Imre, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Bagoly Zsuzsa, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Domján Gyula, egyetemi tanár

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

Budapest
2021

BEVEZETÉS

A kardiovaszkuláris betegségek napjainkban is a vezető halálokok között szerepelnek. Hátterükben leggyakrabban artériás vérrögzépződés áll, mely a szerveket ellátó erek elzárásával szöveti hipoxiához vezet. Legfőbb megjelenési formái közé az akut miokardiális infarktus, az akut ischaemiás stroke és a perifériás artériák trombózisa tartozik. Az artériás trombusok kialakulásában döntő szerepük van a vérlemezkéknek, melyek aktivációja beindítja a folyamatot, és nagy mértékben meghatározza a kialakuló vérrög szerkezetét is. Munkánk első részében betegekből eltávolított artériás trombusok vérlemezke-tartalmát vizsgáltuk.

A vérlemezkék azonban egy heterogén sejtpopulációt alkotnak. Az őket stimuláló vérlemezke-aktivátorok erősségüktől függően eltérő sejtválaszt váltanak ki és legalább két jól elkülönült csoport jön létre; a *prokoaguláns* és a *diszkoid* vérlemezkék populációja. Az érfalsérülés helyszínére elsőként érkező vérlemezkék kapcsolatba kerülnek az érfali kollagénnel, ami granulum-szekréción, sejtnyúlványok képződését, és a vérlemezkék külső membránjába foszfatidil-szerin (PS) kihelyeződését okozza. Ez utóbbi folyamat hatására *prokoagulánssá*

válnak a sejtek; negatív felszínükön hatékonyan aktiválva a plazma véralvadási faktorait lehetővé teszik trombin keletkezését és fibrinháló kialakulását. Létrejön egy, az ér lumene irányában csökkenő trombin gradiens, amit követ a fibrin alvadékon belüli eloszlása. A *prokoaguláns* vérlemezkék kevésbé képesek aggregációra, mivel ehhez szükséges $\alpha_2\beta_3$ integrin receptoraik inaktiválódnak. A belőlük származó ADP, kis molekula révén könnyen diffundál a kialakuló alvadékban, és eléri a perifériás részeket is, ahol hatására egy *diszkoid* vérlemezkepopuláció jön létre. Ezek a vérlemezkék nem mutatnak granulum-szekréciót és PS-kihelyeződést, azonban aktivált $\alpha_2\beta_3$ integrin receptoraikkal képesek aggregációra, és szerepet játszanak az alvadék retrakciójában is.

A két populáció létrejöttében döntő az aktivátorok erőssége, és az általuk kiváltott intracelluláris változások. „Erős” agonisták (pl. trombin és kollagén, valamint reaktív oxigén gyökök, ROS) hatására az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedése elér egy küszöbértéket, ami lehetővé teszi a mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus (MPTP) nyitását. A *prokoaguláns* vérlemezkepopuláció kialakulásának feltétele az MPTP-n keresztüli

Ca²⁺-jel erősítés. „Gyenge” agonisták (pl. ADP) nem teszik lehetővé a pórus nyitását, és *diszkoid* vérlemezkék létrejöttéhez vezetnek. Az MPTP megnyílását egy peptidil-prolil *cisz-transz* izomeráz, a ciklofilin D (CypD) szabályozza, amely Ca²⁺-érzékenyítőként viselkedik.

Ennek megfelelően a CypD gén kísérletes kiütése, illetve gyógyszeres gátlása (legismertebb gátlószere az immunoszuppresszáns gyógyszer, a cyclosporin A, CsA) „erős” aktivátorok jelenlétében is gátolja a prokoaguláns vérlemezkék kialakulását. A CypD knock-out egereken, különböző trombózis modellekkel végzett *in vivo* kísérletekből ellentmondásos eredmények születtek, így munkánk során tovább vizsgáltuk a CypD vérlemezke-aktivációban betöltött szerepét.

A vénás vérrögök halálloki szerepe is kiemelkedő, melyért elsősorban a mélyvénás trombózis szövődményeként kialakuló tüdőembólia a felelős. A trombus kialakulásának mechanizmusa itt eltér, a legfontosabb kiváltó okok a vénás stasis, érfali sérülés és a hiperkoagulabilitás. Utóbbi gyakran malignus tumorok következtében lép fel. Munkánk legutolsó részében humán pancreas tumort hordozó egerekben létrejött vénás trombusok szerkezetét vizsgáltuk.

CÉLKITŰZÉS

Artériás trombusok vérlemezketartalma

1. Különböző lokalizációban kialakult artériás trombusok vérlemezketartalmának meghatározása
2. A vérlemezketartalmat befolyásoló klinikai tényezők azonosítása

CypD és CsA hatása a vérlemezkek morfológiájára és működésére

1. 'Erős' agonisták által kiváltott morfológiai változások követése vérlemezkekben
2. A CypD szerepének vizsgálata 'gyenge' aktivátorok által indukált vérlemezke-aktivációban
3. A CsA által aktivált, MPTP-függő és -független jelátviteli utak aggregációra kifejtett hatásának jobb megértése
4. A CypD vérlemezket tartalmazó fibrinalvadékok lítikus érzékenységre kifejtett hatásának tanulmányozása

Tumor jelenlétében kialakult vénás trombusok szerkezeti tulajdonságai

1. Humán pancreas tumort hordozó egerekben kialakult vénás trombusok vörösvértesttartalmának meghatározása
2. Ugyanezen trombusok fibrinszerkezetének vizsgálata

MÓDSZEREK

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.

Vérlemezke-preparálás állati és humán vérmintákból

Egészséges egyénektől vett, illetve vad típusú és CypD^{-/-} C57Bl/6J egerek alkalmazásával vena cava inferiorból terminális vérgyűjtéssel nyert citrátos vérmintákból centrifugálással készült vérlemezke-preparátum.

A CypD-gátlás vizsgálata céljából a humán vérlemezkéket cyclosporin A-val (CsA) kezeltük elő. Bongkreksavat (Bk), egy adenin nukleotid transzlokáz-gátlót, és FK-506-ot, egy szelektív calcineurin-gátlót használtunk a CypD-függő és -független CsA-hatások elkülönítésére.

„Erős” vérlemezke-aktivátorként trombint és kollagént (ill. ennek vízdékony peptidanalógját, konvulxint), valamint egyes kísérletekben ROS-t (CuSO₄,

homocisztein és H₂O₂ keverékét) alkalmaztunk, míg „gyenge” aktivátorként ADP-t használtunk.

Tumor- és vénás trombózis-modell egerekben

Prof. Nigel Mackman laborjában luciferáz-expresszáló BxPc-3 humán pancreas tumorsejteket injektáltak Crl:NU-*Foxn1*^{tm1} hím egerek hasnyálmirigyébe, ahol a tumorok 7-10 hétig növekedtek. Ezután vena cava inferior stasis modellt alkalmaztak vénás trombusok nyerése céljából. Ezek szerkezetét vizsgáltuk.

Scanning elektronmikroszkópos vizsgálatok (SEM)

Az artériás vagy vénás trombusmintákat, vérlemezkéket tartalmazó fibrinalvadékokat, illetve kollagén-borítású fedőlemezen aktivált vérlemezkemintákat glutáraldehiddel fixáltuk, dehidratáltuk, majd CO₂-kritikus-pont szárítás történt. A minták arannyal történő bevonása után véletlenszerűen kiválasztott régiókról készültek képek EVO40 scanning elektronmikroszkóp segítségével. A sejtes elemek (pl. sPlt, relatív vérlemezketartalom) és fibrinháló felszíni területét a teljes kép területének százalékos arányaként határoztuk meg 864 régió morfológiai osztályozásával. A fibrinalvadékok esetén 300 fibrinszál átmérőjének manuális lemérésével

határoztuk meg azok eloszlását Matlab R2015a Image Processing Toolbox alkalmazásával.

Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok (TEM)

Az aktivált vérlemezkék centrifugálását követően a pelletet glutáraldehiddel, és OsO₄-dal kezeltük. Mosást követően a sejteket alacsony olvadáspontú agarózban szuszpendáltuk, majd a megszilárdult darabokat dehidratáltuk és Durcupan ACM epoxi gyantába ágyaztuk. 80 nm-es metszetek készültek egy Leica UC7 ultramikrotóm segítségével, majd Formvar-borítású nikkellémezekre kerültek. A képek 100 kV-os gyorsítófeszültségen készültek Philips Morgagni 268D elektronmikroszkóppal. A normalizált organelumterületet a vérlemezke ImageJ szoftverrel mért teljes keresztmetszeti területéből és az összes membránnal rendelkező organelum együttes területéből számoltuk.

Vérlemezke-adhézió és szétterülés vizsgálata

Az adhéziót és felszíni szétterülést E-platekben követtük xCELLigence rendszer segítségével. A műszer wellék

aljában lévő elektródokra kitapadó és azokon szétterülő vérlemezkék által okozott impedancia-változást érzékel, melyet a sejttindex (cell index, CI) jellemez. Az impedancia mérése 10 kHz-en 24 órán keresztül történt, és a kapott görbéket a Matlab Curve fitting toolbox segítségével elemeztük. A kezdeti görbemeredekségeket, illetve az elért maximális impedanciát hasonlítottuk össze.

Vérlemezke-aggregáció vizsgálata

Az aggregációt ADP-vel indukáltuk fibrinogén jelenlétében és Carat-TX4 optikai aggregométer segítségével követtük. Az aggregációt a PBS pufferral mért maximális transzparencia százalékos arányaként fejezzük ki. A kapott görbéket a műszer saját szoftverének segítségével elemeztük, és a kezdeti meredekséget, valamint a maximális aggregáció értékét hasonlítottuk össze.

Vérlemezkék jelenlétében mért szöveti faktor-indukálta alvadási idő

ADP-vel előaktivált vérlemezkéket kevertünk 12,5 mM CaCl_2 -mal kiegészített citrátos humán plazmához. Az alvadást rekombináns tromboplasztinnal (Dia-PT R)

indítottuk és 37°C-on két különböző módon követtük. (i) Az alvadási időt KC-1A elektromechanikus koagulométerrel mértük. (ii) Az alvadék kialakulását az abszorbancia mérésével 340 nm-es hullámhosszon követtük turbidimetriás vizsgálat során CLARIOstar mikroplate olvasó segítségével. Az alvadási időt a fél-maximális abszorbancia eléréséhez szükséges idővel jellemeztük.

Vérlemezke jelenlétében zajló fibrinolízis turbidimetriás vizsgálata

Fibrinogént, plazminogént, 2.5 mM CaCl₂-ot, illetve ADP-vel aktivált humán vagy egér vérlemezkéket tartalmazó alvadékokat készítettünk trombin segítségével. A lízist tPA alvadékfelszínre történő juttatásával indítottuk. Az alvadék kialakulását és oldódását az abszorbancia követésével 340 nm-es hullámhosszon, 37°C-on Zenyth 200rt mikroplate spektrofotométerrel mértük. A görbéket saját fejlesztésű Matlab szoftverrel értékeltük, és az alvadék turbiditásának 50%- (t₅₀), illetve 90%-os (t₁₀) csökkenéséig eltelt időt elemeztük.

Statisztikai próbák

A trombusösszetevők vizsgálatánál a különböző csoportok adatainak eloszlását Kuiper-tesztel, mediánjait pedig egyoldalú Bootstrap-statisztikai tesztekkel hasonlítottuk össze.

A mért fibrinszálatmérő empirikus adataira teoretikus eloszlásgörbét illesztettünk és Kuiper tesztel hasonlítottuk össze a csoportok eredményeinek eloszlását. A kisebb mintaszámú ($n < 9$) adatoknál az eloszlásokat Kolmogorov-Smirnov, míg a három vagy több adathalmazzal rendelkező kísérletek elemzésénél Kruskal-Wallis tesztekkel elemeztük. A statisztikai próbákat a GraphPad Prism 6.00 szoftver, illetve a Matlab 7.3 statisztikai eszköztárának segítségével végeztük. Az eredményeket átlag \pm standard error of mean (SE) értéként jelöltük, kivéve a fibrinszálatmérőt, ahol a medián és az alsó-felső kvartilis értékek kerültek feltüntetésre, illetve minden esetben $p < 0.05$ értékeket tekintettünk szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

Artériás trombusok vérlemezketartalma

AIS trombusok esetén 1,8-szor magasabb a vérlemezketartalom medián értéke, mint PAD trombusok esetén, míg a különbségek CAD trombusok esetén csak férfiakból származó mintáknál mutatkoznak.

Diabeteses betegek mintáiban alacsonyabb sPlt-értékeket mértünk. Ateroszklerotikus etiológia esetén AIS betegek mintáiban a medián sPlt az egyéb etiológiájú AIS trombusokénak a fele volt, míg hasonló különbséget nem észleltünk PAD trombusok esetén. Malignus tumor jelenlétében is csökkent sPlt-értékeket mértünk AIS trombusokban. A dohányzás ugyancsak feleakkora sPlt-értékekkel járt a nem-dohányzók mintáihoz képest a meghatározáshoz elegendő méretű csoportok (CAD, PAD) esetén.

A CypD és a CsA hatása a vérlemezkék morfológiájára és funkciójára

Morfológiai változások „erős” stimulus-aktiválta vérlemezkékben

A vérlemezkék a kollagén-felszínhez rögzültek, majd a vérlemezke dugó belső részére jellemző szolúbilis aktivátorokkal (trombin és ROS) stimuláltuk őket. Az így aktivált humán vérlemezkék ellapulást és szétterülést mutattak, mely kiegészült a membrán hólyagosodásával és fragmentációjával. CsA jelenlétében a membránok jobban megőrizték integritásukat. ROS hozzáadásakor a vérlemezkék erőteljes alakváltozáson mentek keresztül, kifejezett volt a membrán részecskék leválása (shedding), mely hatás CsA jelenlétében csökkent. Trombin és kollagén által aktivált CypD^{+/+} egér vérlemezkék is szétterültek, membránjuk szétesett, míg a CypD^{-/-} egerekből származó sejtek megőrizték integritásukat. Kevésbé kifejezetten, de hasonló változásokat láttunk a két különböző genotípus esetén ROS jelenlétében is.

A TEM képek készítésével a sejtek szubcelluláris változásait követtük. A ROS erőteljes organellduzzadást okozott a trombin és konvulxin-kezelt humán

vérelemezkekben, amit a normalizált orgellum-terület ötszörös emelkedése is mutatott, és amely hatást a CsA visszafordította. A CypD genetikai kiütése ROS-tól függetlenül nem okozott szignifikáns különbséget a mért paraméterben. Ugyanakkor a membránok szétesése, melyet a ROS-kezelt egér minták esetében fokozottan észleltünk, jelentősen csökkent CypD^{-/-} vérelemezkekben.

„Erősen” aktivált vérelemezkek jelenlétében kialakult fibrinháló szerkezete

A vérelemezke-fibrin tartalmú alvadékok SEM vizsgálata alapján a trombin+konvulxin fragmentált vérelemezkek megjelenését okozta, melyeket vastagabb szálú fibrinkötegek vesznek körül. Humán CsA-kezelt, illetve CypD^{-/-} egér vérelemezkek ezzel szemben kevésbé estek szét, és a körülvevő fibrinháló heterogenitása is csökkent. Aktivált egér vérelemezkek jelenlétében vastagabb szálátmérőket mértünk, mely hatás CypD gén hiányában elmaradt. Aktivált humán vérelemezkek (CsA jelenlététől függetlenül) csak kismértékben befolyásolták a fibrin szerkezetét.

Vérlemezke-funkciók „gyenge” aktivátor jelenlétében

Mivel a „gyenge” aktivátorok, mint ADP a perifériás zónákban határozzák meg a vérlemezkek aktivációját, a vérlemezke-adhézióban, szétterülésben és aggregációban bekövetkező változásokat vizsgáltuk ADP jelenlétében.

Az impedancia-alapú méréseink esetén a sejtindex kezdeti emelkedése az adhéziót mutatja, míg annak maximális értéke a szétterülésről ad információt. A CypD genetikai hiánya mindkét értéket emelte a vad típusú vérlemezkekkel szemben. Hasonló változásokat okozott a humán vérlemezkek CsA-kezelése is.

A vérlemezke-vérlemezke kölcsönhatásokat ADP-indukálta aggregometriával vizsgáltuk. CsA jelenlétében az aggregációs görbék kezdeti meredeksége csaknem megkétszereződött, és a maximális aggregáció értéke is nőtt. Ezzel szemben a CypD-hiányos egér vérlemezkek csökkent aggregációt mutattak. A CsA esetleges CypD-független hatásainak tisztázására a mitokondriális energetikát befolyásoló, valamint szelektív calcineurin gátlószerek hatását is vizsgáltuk. A bongkreksav a kezdeti meredekséget, míg az FK-506 a maximális aggregáció mértékét fokozta.

Fibrinszerkezet változása „gyenge” stimulus-aktiválta vérlemezkék jelenlétében

Különböző gátlószerekkel kezelt vérlemezkéket ADP-vel aktiváltunk, majd fibrin-vérlemezske alvadékokat hoztunk létre. CsA-val vagy Bk-val előkezelt humán, illetve vad típusú egér vérlemezkék környezetében vékonyabb szálú fibrinrostok alakultak ki, míg CypD^{-/-} vérlemezkék esetén a Bk-kezelés csökkentette a szálátmérőt, a CsA viszont nem okozott változást. FK-506-tal kezelt humán vérlemezkék csökkentették a háló rostjainak átmérőjét, míg vad típusú egér vérlemezkék növelték azt. ROS alkalmazása nem változtatott ezeken a tendenciákon, de általában növelte a fibrinszálak vastagságát.

Vérlemezkék hatása a plazma szöveti faktor-indukálta alvadására

A vérlemezkék jelenléte mindkét vizsgálatban fokozta az alvadék kialakulásának sebességét, azonban a különböző gátlószerek nem változtattak ezen a hatáson.

A vérlemezkék fibrinolízisre gyakorolt hatása

Különböző aktivátorok jelenlétében kevertünk vérlemezkéket fibrinmátrixba, majd a felszínükre juttatott tPA-val oldottuk fel a létrejött alvadékokat. Vad típusú

vérlemezkek jelenléte minden kísérleti összeállításban elnyújtott fibrinolízist eredményezett. A CypD hiánya azonban visszafordította ezt a hatást: a mért t10 és t50 értékek CypD^{-/-} vérlemezkéket tartalmazó alvadékok esetén a vérlemezke-mentes fibrinalvadékokban mért értékekhez közelítettek. Ez a hatás kifejezettebb volt magasabb vérlemezkeszám esetén, illetve ROS jelenlétében. A CsA-kezelésnek nem volt hatása a humán vérlemezkéket tartalmazó alvadékok oldódására.

Humán pancreastumort hordozó egerekben kialakuló vénás trombusok szerkezete

A vénás trombusok szerkezeti elemzése csökkent vörösvértesttartalmat mutatott a tumort hordozó egerek esetén. Ezen túlmenően, emelkedett fibrinsűrűséget és csökkent fibrinszálmérőt mértünk ebben a csoportban.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. Akut ischaemiás stroke trombusok vérlemezzetartalma a legmagasabb az artériás vérrögök közül.
2. Érelmeszesedés, malignus tumorok, diabetes mellitus, illetve dohányzás esetén a trombusokban kompaktabb vérlemezke-aggregátumok jönnek létre, feltételezhetően a fokozott vérlemezke-reaktivitás miatt.
3. Humán vérlemezkék CsA-kezelése fokozza az ADP-kiváltotta adhéziót és aggregációt.
4. CypD-hiányos egér vérlemezkék esetén az ADP-indukálta adhézió fokozódik, az aggregáció azonban nem.
5. A CsA-kezelés és a CypD-génhiány okozta eltérő hatások valószínűsítik a CypD-hiányos vérlemezkék hosszútávú metabolikus adaptációját. Ezen túlmenően a CsA aggregációt fokozó hatását calcineurin-gátláson keresztül fejt ki.
6. A CypD hiánya lehetővé teszi a vérlemezkék szubcelluláris integritásának megőrzését fibrinhálóban, és fokozza a fibrinszálak vastagságát.
7. A vérlemezkék antifibrinolitikus hatásai elvesznek CypD hiányában.

8. Humán pancreas tumort hordozó egerekben létrejött vénás trombusok relatív vörösvértesttartalma csökkent, és vékonyabb szálú fibrinháló jön létre.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

[1] 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.

Impact factor: 4.011

[2] 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

[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: 7.116

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] 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.

[3] Kolonics F, Kajdacs E, Farkas VJ, Veres DS, Khamari D, Kittel A, Merchant ML, McLeish KR, Lorincz AM and Ligeti E. (2021) Neutrophils produce proinflammatory or anti-inflammatory extracellular vesicles depending on the environmental conditions. *J Leukoc Biol*, 109: 793-806.

[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*, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.319061.