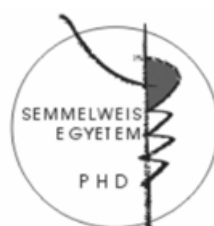


Vérplazma fehérjék és sejtkomponensek mint a fibrinolízis modulátorai

Doktori tézisek

Gombás Judit

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kolev Kraszimir egyetemi adjunktus, az
orvostudomány kandidátusa

Hivatalos bírálók: Dr. Blaskó György, Dr. Enyedi Péter

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Mandl József

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Csala Miklós, Dr. Tordai Attila

Budapest
2008

Bevezetés

A fibrinolízisről szóló általános elképzelés szerint plazminogén aktivátorok (pl. szöveti típusú plazminogén aktivátor, tPA) átalakítják a plazminogént plazminná és ez utóbbi peptid kötések hidrolízisével feloldja a fibrint. Ezek az enzimek viszonylag jól ismertek, azonban in vivo lefolyásuk gyakran nem követi a kémcsőben mért kinetikát. A trombusok komplex összetétele miatt számtalan módosító körülmény gátolhatja vagy éppen fokozhatja a fibrinolitikus rendszer hatékonyságát. Ezért az utóbbi években egyre jobban előtérbe kerül az a szemlélet, hogy a kutatásokban a trombusok valódi összetételét, a trombus kompartment valós koncentrációviszonyait, az áramlásos körülményeket is figyelembe vevő modelleket hozzanak létre, és ezekben tanulmányozzák a trombolízis részleteit. Kísérleteinkben olyan anyagok hatását vizsgáltuk a trombolízis folyamatára, amelyek a véráramban előforduló sejtes elemekből (trombocitákból, leukocitákból) származhatnak: szerkezeti fehérjék (miozin), foszfolipidek és enzimek (neutrofil leukocita elasztáz: NE). Továbbá vizsgáltuk a plazmában nagy koncentrációban előforduló immunoglobulin-G (IgG) antitestek, különösen az antifoszfolipid szindrómás (APS) betegekre jellemző APS-IgG-k hatását a trombolízisre, és esetleges interakcióikat foszfolipidekkel.

Módszerek

Kísérleteinkhez szükséges fehérjék egy részét: normál (N-) és APS-IgG-eket, valamint a plazminogént egészséges, illetve APS betegek plazmájából állítottuk elő. Az elasztáz és az α_1 -proteáz inhibitor (α_1 -PI) in vivo működését vizsgáló kísérletsorozatunkhoz tüdőembóliában szenvedő betegek plazmáját használtuk fel.

A plazmák IgG-tartalmát affinitás-kromatográfiával nyertük ki Protein A Sepharose oszlopon. Az IgG-k egy részét papainnal emésztettük, hogy előállítsuk az Fab és Fc fragmentumokat. Kísérleteinkhez foszfolipidkolin (PC) és foszfatidilszerin (PS) tartalmú vezikulákat alkalmaztunk, amelyeket ultrahang kezeléssel és polikarbonát membránfilteren extrudálva állítottunk elő.

A fibrinolízis és alvadás folyamatát turbidimetriával (a minták fényszórásának, illetve a fényszórás változásának mérésével) mértük 340 nm-en. A tPA fibrinélbe történő penetrációjának meghatározásához Eu^{3+} -jelölt tPA-t (Eu-tPA) használtunk. A plazminogén aktivációját a belőle képződő plazmin Spectrozyme-PL szubsztráton (SPPL, *H-D-norleucil-hexahidrotirosil-lizin-p-nitroanilid*) kifejtett amidolitikus aktivitásának mérésével követtük nyomon átlátszó fibrin felszínén, amely kísérlettől függetlenül modulátor molekulákat is tartalmazott. A fibrinogén és miozin kötődésének és disszociációjának kinetikáját immobilizált miozin és ^{125}I – valamint Eu^{3+} - jelölt fibrinogén felhasználásával mértük. A fibrin és a miozin kölcsönhatását BIA („biomolecular interaction analysis”) módszerrel is vizsgáltuk, amely felszínhez kötődő anyag „surface plasmon rezonancia” (SPR) szignálját detektálja. A vérplazma α_1 -proteáz inhibitor – elasztáz komplex koncentrációját ELISA módszerrel határoztuk meg.

Eredmények

IgG-k hatása a fibrinolízis folyamatára foszfolipid mentes környezetben

Az N-IgG tartalmú fibrinalvadékok lízisideje 25-100%-kal, az APS-IgG tartalmú alvadékok lízisideje 60-600%-kal nyúlik meg az IgG-mentes kontrollhoz viszonyítva. Ugyanígy, az APS betegek megalvasztott vérplazmái lassabban oldódnak fel, mint az egészséges személyek alvadat plazmái. Ha normál plazmához adtunk APS IgG-t, a lízisidő szintén megnyúlt. Mindez azt bizonyítja, hogy a plazmában nagy koncentrációban jelen lévő IgG antitestek fokozzák az alvadékok fibrinolitikus ellenálló képességét, és APS-IgG-k jelenlétében ez az antifibrinolitikus hatás még sokkal erősebb. A hatás specifikus, az IgG-k variábilis Fab fragmensei is előidézik a lízisidők megnyúlását, míg az IgG molekulák konstans Fc töredéke nem.

Az IgG-k antifibrinolitikus tulajdonságának hátterében álló mechanizmusokat kutatva kizártuk, hogy az antitestek a plazmin amidolitikus aktivitásának direkt gátlásával hatnának. Sem az APS- sem az N-IgG-k nem befolyásolták a plazmin működését SPPL szubsztráton. A fibrin és az SPPL együttes jelenlétében az N-IgG nem befolyásolta, míg az APS-IgG-k felfüggesztették a szubsztrátok közti kompetíciót. Ez alapján arra következtethetünk, hogy az APS-IgG-k a fibrinnel vagy a fibrin-plazmin komplexszel lépnek interakcióba, ezzel meggátolhatják a proteáz hozzáférését a fibrinhez, vagy megváltoztatják a fibrinhez kötődött plazmin működésének kinetikáját.

Áramlásos körülmények között mind az N-, mind az APS-IgG-k stabilizálják a fibrinhálót, az IgG-mentes rendszerhez képest később esik szét az IgG-tartalmú alvadék. Azonban az APS-IgG tartalmú fibrin szolubilis degradációs termékei nagyobb méretűek. Mindebből arra

következtethetünk, hogy mind az N-, mind az APS-IgG-k stabilizálják a fibrin-degradációs termékeket a fibrinstruktúrában, de eltérő mértékben.

Az IgG-k hatása a fibrinolízisre foszfolipid környezetben

A trombusban lévő, elsősorban vérlemezke-eredetű foszfolipidek antifibrinolitikus hatást gyakorolnak. Vizsgáltuk, hogyan változik a normál valamint APS-IgG antitestek a fibrinolízis egyes lépéseire (tPA diffúziója a fibrinszerkezetbe; a fibrinhálóba zárt plazminogén aktivációja tPA-val; a fibrin emésztése plazminnal) kifejtett hatása foszfolipid környezetben.

A fibrinszerkezet pórusait kitöltve a foszfolipidek gátolják az aktivátor vagy más, kívülről érkező molekulák diffúzióját. Eredményeinkből kitűnik, hogy az IgG-k is hasonló hatással vannak: az N- és APS-IgG-k is gátolhatják a tPA diffúzióját a fibringélbe. Ennek háttérében az állhat, hogy az IgG-k is módosíthatják a fibrinszerkezetet, jelenlétükben vékonyabb rostok és szűkebb pórusok jöhetnek létre. Együtt, közel fiziológiás koncentrációban alkalmazva foszfolipideket és IgG-ket, felerősítik egymás diffúziót-gátló hatását. Ugyanakkor létezik olyan patológiás APS-IgG is, amely nem befolyásolja a tPA diffúzióját a fibrinszerkezetbe, és nem erősíti a foszfolipid barrier működését. Az APS IgG antitesteknek ez a lehetséges funkcióvesztése hozzájárulhat az APS betegek körében megfigyelhető fibrinolitikus sajátosságok variabilitásához.

A tPA diffúziója a fibringél felső, reaktív rétegébe alapvetően befolyásolja az alvadékba zárt plazminogén aktivációjának sebességét. A foszfolipidek felszínükön kötik a fibrinolitikus rendszer tagjait, ezzel is gátolva a plazmin keletkezését. Az IgG-k ezt a gátlást a diffúzióra kifejtett hatásuk által módosítják: fokozzák vagy felfüggesztik. Ugyanakkor létezik olyan APS-IgG, amely nem csak a diffúzióra kifejtett hatásával befolyásolta a plazminogén aktivációt, hanem valószínűleg a tPA-fibrin-plazminogén hármas komplex keletkezéséhez biztosított kedvező feltételeket, és fokozta a

plazmin keletkezésének sebességét.

A foszfolipidek ellenállóvá teszik a fibrinalvadékat a plazmával szemben. Eredményeink szerint az APS-IgG-k módosítják ezt a rezisztenciát, míg a normál IgG-k nem. Az APS-IgG-k a fibrinolízis kezdeti szakaszában fokozzák a foszfolipidek antifibrinolitikus hatását. Azonban létezik olyan APS-IgG, amely mellett a fibrinolízis késői szakaszában az alvadék plazmával szembeni kezdeti rezisztenciája lecsökken, és végül a legrövidebb lízisidő alatt oldódik fel. Ennek a kettősségnek az lehet az oka, hogy míg a fibrinolízis kezdeti szakaszában az érintetlen fibrinstruktúrában erős fibrinolitikus rezisztenciát okozva összeadódik a foszfolipidek és az APS-IgG-k antifibrinolitikus hatása, a folyamat előrehaladtával a fellazult fibrinszerkezetben némelyik APS-IgG képes leválasztani a foszfolipidekhez kötődött plazmint. Ez a jelenség adalék lehet annak megértéséhez, hogy a különböző korú trombusok eltérő fibrinolitikus sajátosságai mögött milyen mechanizmusok állhatnak.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy kísérleteinkben az APS-IgG-k a fibrinolízis egyes lépéseinél antifibrinolitikus tulajdonságokkal rendelkeznek, míg más stádiumokban ugyanezek az APS-IgG-k elősegítik a fibrinolízis folyamatát. Az IgG-k globális hatása a fibrinolízis teljes folyamatára ezen ellentétes hatások eredőjének tekinthető, amit azonban rendkívül nehéz előre kikövetkeztetni. Kísérleteinkben az általunk vizsgált APS-IgG-k hatásai nem konzisztens módon térnek el a normál IgG hatásainak mintázatától. Ez arra utal, hogy az APS betegek körében nagyfokú heterogenitást várhatunk a további, a fibrinolízis elemi lépéseire irányuló vizsgálatok eredményeiben.

A miozin, mint a fibrinszerkezet stabilizálója

Az IgG-k és a foszfolipidek önmagukban is és egymással interakcióban is gátolják a fibrinolitikus folyamatokat. Az artériás

trombusok emellett számos más anyagot is tartalmaznak, pl. becslések szerint a vérelemek eredetű miozin koncentrációja a trombusban megközelítheti a fibrin-monomerek koncentrációját (0,5-5 μM). A fibrint és fibrinogént nem csak passzívan körülveszik ezek a makromolekulák, hanem kötődhetnek is hozzájuk, ezzel befolyásolhatják az alvadási és fibrinolitikus folyamatot.

A miozint tartalmazó alvadékok lízisideje megnyúlik a miozinmentes mintákhoz képest. A miozin egyben a tPA kofaktora is, és eredményeink szerint csak a szabad, fibrinhez nem kötött miozin képes ezt a szerepet ellátni. Alacsony miozinkoncentrációk mellett a miozin kötődhet a fibrinhez, és gátolja az alvadék lízisét. Magasabb ($> 1 \mu\text{M}$) miozinkoncentrációk mellett ez a gátlás megszűnik, de csak ha a plazminogént tPA-val aktiváljuk: ebben a koncentrációtartományban a miozin kofaktorként is viselkedik, kompenzálva a fibrinhez kötődött miozin antifibrinolitikus hatását. Mindezt nem tudjuk megfigyelni, ha a fibrinbe zárt plazminogént uPA-val aktiváljuk: az uPA működéséhez nincs szükség kofaktorra, így növekvő miozinkoncentrációk mellett egyre gátoltabb fibrinolízist tudunk megfigyelni.

A miozin emellett a plazmin szubsztrátja is. A miozin-tartalmú fibrinalvadékok lassabb fibrinolízisét plazmin hatására a két alternatív szubsztrát versengése is okozhatja. Az is elképzelhető, hogy a fibrinhez kötődött miozin gátolja a plazmin hozzáférését a fibrinhez, ezzel a mechanizmussal gátolva annak oldódását.

Az immobilizált miozin és ^{125}I -fibrinogén vagy Eu-fibrinogén kötődési és disszociációs folyamatának időfüggése rávilágított, hogy a fibrinogén és a miozin közti kötődési és disszociációs folyamat is egyaránt lassú, kb. 2 óra szükséges az egyensúly eléréséhez. A kötődés reverzibilis, gyenge, nem kovalens. A kötődési és a disszociációs sebességi állandók

értékei $180,6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ illetve $3,07 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. A miozin-fibrinogén kötődési sebességi állandója értéke 4 nagyságrenddel kisebb, mint a fibrinmonomerek kapcsolódására jellemző érték, így a miozin nem játszik számottevő szerepet a fibrin polimerizációjában, nem befolyásolja a fibrinstruktúra kialakulását, szerkezetét.

Ugyanezt megerősítettük BIA módszerrel is, melynek segítségével vizsgáltuk a fibrin és a miozin lehetséges interakcióit. Immobilizált miozin felett változó koncentrációjú fibrinoldatokat áramoltattunk. Az SPR szignál lefolyása a tipikus gyenge kölcsönhatás képét mutatja: a miozin-fibrin kölcsönhatás egyensúlyi disszociációs konstans értéke számításaink szerint $K_d = 0,94 \text{ }\mu\text{M}$. Ugyanez az érték a fibrinmonomerek disszociációjára $K_d = 0,156 \text{ }\mu\text{M}$, ami azt sugallja, hogy miozin jelenlétében is a fibrin-fibrin kölcsönhatás dominál, a miozin-fibrin kapcsolat gyengébb, így szerepe is másodlagos a fibrinháló kialakításában.

Ha immobilizált fibrin felett áramoltattunk miozinoldatot, az SPR válasz képe inkább miozin-aggregációra utal, mint egyszerű fibrin-miozin kötődésre. Az oldatban lévő miozin is képes aggregátumokat létrehozni, a folyamat mértéke függ az ionerősségtől és a pH-tól. A miozinmonomerek aggregációja fiziológias körülmények között is végbemegy. A fibrin felszíne a miozinmolekulák rendezésével ideálisan elősegítheti kisebb miozin-dimerek, aggregátumok keletkezését, amelyek köré a nagyobb aggregátumok szerveződhetnek.

Egy peptid, a GPRP a fibrinmonomerekhez kötődve megakadályozza egy másik fibrinmolekula kötődését ugyanoda. Mivel a GPRP jelenléte nem befolyásolta a fibrin-miozin kölcsönhatást, kizártuk e fibrin-polimerizációs hely szerepét a miozin-fibrin kölcsönhatásban. A miozin és a fibrin is a FXIIIa szubsztrátja, így megvizsgáltuk, képes-e az enzim a miozint a fibrinnel keresztkötni fiziológias körülmények között. Eredményeink szerint

a miozin nem kötődik kovalensen a fibrinhez, és annak keresztkötődésére sincs semmilyen hatással.

Az α_1 -proteínáz inhibitor szerepe a fibrinolitikus potenciál kialakításában in vivo

Az alvadékok oldhatóságát nemcsak a plazmából vagy a vérlemezkékből származó molekulák befolyásolhatják, hanem a különleges, a trombus kompartmentre speciálisan jellemző enzimátikus viszonyok is. Ez utóbbira szolgáltatnak példát a neutrofil leukociták által termelt elasztáz (NE) és inhibitora (α_1 -PI) közti kölcsönhatással kapcsolatos kísérleteink.

Általában a neutrofil elasztáz (NE) és az α_1 -proteáz inhibitor (α_1 -PI) reakciója pszeudo-elsőrendű *in vivo*. Eredményeink szerint a plazma α_1 -PI és a NE- α_1 -PI komplex koncentrációja között gyenge, de szignifikáns korreláció mutatható ki, tehát a NE - α_1 -PI komplex koncentrációja nemcsak az enzim mennyiségétől függ, hanem az inhibitor koncentrációjától is. Figyelembe kell vennünk, hogy a komplex elsősorban a trombus kompartmentben keletkezik, ahol nagy mennyiségű, az inhibitorral összemérhető koncentrációjú NE szabadulhat fel a PMN-leukocitákból. Emiatt, lokálisan a trombus környezetében a $NE + \alpha_1\text{-PI} \rightarrow NE - \alpha_1\text{-PI}$ reakció eredményeink szerint másodrendűnek tekinthető.

Bármennyi NE keletkezett és fejtette is ki hatását a trombus kompartmentben, arra csak közvetve tudunk következtetni, mivel a későbbiekben a vérkeringésbe kikerülő elasztázt az inhibitora azonnal hatástalanítja, komplexet képez vele. Azonban az előbbiekből alapján feltételezhetjük, hogy ha a trombus kompartmentben a felszabaduló nagy mennyiségű elasztáz a plazma alacsonyabb α_1 -PI-szintjével társult, az nagyobb elasztáz-hatást, azaz nagyobb fibrinolitikus potenciált eredményezett. Ez utóbbi azzal függ össze, hogy a NE direkt fibrin-bontó aktivitással rendelkezik és ugyanakkor a plazminogént a könnyebben

aktiválható miniplazminogénné alakítja át. Ugyanakkor a plazma magasabb α_1 -PI szintjénél egy gyengébb elasztáz-hatást, azaz kisebb fibrinolitikus potenciált lehet feltételezni lokálisan, a trombus kompartmentben.

Erre az elgondolásra szolgált bizonyítékot a NE - α_1 -PI komplex koncentrációja és a plazma tPA-val indukált fibrinolízisének lízisidejei közt kimutatott szignifikáns korreláció, míg ugyanez a korreláció a plazmával indukált oldás lízisidejével nem volt kimutatható. Az alacsonyabb α_1 -PI – szint mellett a komplex-koncentráció is alacsonyabb, ami egy fokozottabb elasztáz-hatást tehetett lehetővé a trombus környezetében. Ez az elasztáz fokozta a plazminogén \rightarrow miniplazminogén átalakulást, a keletkező nagyobb mennyiségű miniplazminogént a tPA hatékonyan aktiválta, a keletkező miniplazmin pedig a plazminhoz hasonló hatékonysággal oldja a fibrint.

Mivel kísérleteinkben humán plazmákat alvasztottunk és oldottunk, azok fibrinszerkezetét a bennük lévő FXIIIa stabilizálhatta. A miniplazmin a kovalensen kereszt kötött fibrint hatékonyabban oldja, mint a plazmin, valamint a plazmin-inhibitorok is nehezebben képesek inaktíválni. A nagyobb elasztáz-hatás és a tPA-val történő miniplazminogén-aktiváció miatt bekövetkező fokozott miniplazmin-keletkezés mellett kísérletünkben végül így tapasztaltunk rövidebb lízisidőket. Ugyanígy a magasabb NE - α_1 -PI komplex-koncentráció alacsonyabb elasztáz-hatással járhatott együtt. A csekélyebb mennyiségű elasztáz kevesebb miniplazminogén keletkezését segíthette elő, ami lassabb fibrinolízist eredményezett a későbbi tPA indukció során.

Az enzim-inhibitor komplex koncentrációja és a plazmin által indukált fibrinolízis lízisidejei közt nem tudtuk megfigyelni ugyanezt a korrelációt, ami arra utal, hogy az előzőekben tárgyalt NE - α_1 -PI komplex és lízisidő közti összefüggéseket a tPA-függő fibrinolízis zimogén aktivációs fázisában zajló interakciók alakítják.

Az α_1 -PI a fibrinszerkezet közvetett módosításával is befolyásolja annak fibrinolitikus sajátosságait. Alacsonyabb trombinaktivitás mellett vastagabb rostok képződnek. Az ilyen szerkezetű fibrin a tPA-nak jó kofaktora, viszont a plazmin lassabban emésztí. Az α_1 -PI egyik lehetséges alternatív célpontja maga a trombin, gátolva az aktív trombin mennyiségét. Kimutattuk, hogy a megemelkedett α_1 -PI koncentráció a trombinhatás gátlásán keresztül oly módon hat a fibrinszerkezetre, hogy az ellenállóbbá válik a fibrinolitikus enzimek (tPA, plazmin) hatásának.

Következtetések

1. Mind az egészséges személyekből származó normál-, mind az APS betegekből származó APS-IgG-k gátolják a fibrinolízis folyamatait, de az APS-IgG-k mellett ez a gátlás jelentősen erősebb. Az antitestek variábilis Fab régiói felelősek az antifibrinolitikus hatásért.
2. Az IgG-k nem gátolják a plazmin direkt amidolitikus aktivitását, az APS-IgG-k inkább a fibrin-plazmin kölcsönhatást módosítják.
3. A normál és az APS-IgG-k gátolják a tPA diffúzióját a fibrinalvadékba, és ez a hatás felerősödik foszfolipidek jelenlétében. Ugyanakkor létezik olyan patológiás APS-IgG, amely nem rendelkezik ezzel a tulajdonsággal.
4. Az IgG-k tPA-diffúzióra kifejtett hatása meghatározza a plazminogén aktivációjának sebességét a fibrinháló felszíni reaktív rétegében.
5. Az APS betegekből származó IgG antitestek tovább fokozzák a foszfolipidtartalmú fibrinalvadékok kezdeti rezisztenciáját plazminnal szemben, de hatásaik eltérhetnek a fibrinoldás későbbi stádiumaiban.

6. A miozin stabilizálja a fibrinalvadékokat, ellenállóbbá teszi a fibrinolitikus hatásokkal szemben.
7. A fibrinogén és a miozin kötődése és disszociációja is lassú folyamat ($k_a=180,6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_d=3,07 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), a miozin gyengén, reverzibilisen kötődik a fibrinogénhez ($K_d=1,35\text{-}1,70 \text{ }\mu\text{M}$).
8. Az alacsony α_1 -PI-szint mellett magasabb a vérplazma tPA-függő fibrinolitikus potenciálja, ami összefüggésben állhat a PMN-elasztáz hatására keletkező miniplazminogén jobb aktiválhatóságával valamint az eltérő inhibitor-szint mellett kialakuló fibrin szerkezeti különbségeivel.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Kolev, K., **Gombás, J.**, Váradi, B., Skopál, J., Mede, K., Pitlik, E., Nagy, Z., Machovich, R. Immunoglobulin G from patients with antiphospholipid syndrome impairs the fibrin dissolution with plasmin. *Thromb Haemost* 2002; 87: 502-508
IF4.357
2. Kolev, K., Tenekedjiev, K., Ajtai, K., Kovalszky, I., **Gombás, J.**, Váradi, B., Machovich, R. Myosin: a non-covalent stabilizer of fibrin in the process of clot dissolution. *Blood* 2003; 101: 4380-4386
IF10.120
3. **Gombás, J.**, Kolev, K., Tarján, E., Machovich, R. Impaired fibrinolytic potential related to elevated α_1 -proteinase inhibitor levels in patients with pulmonary thromboembolism. *Ann Hematol* 2004; 83: 759-763
IF1.292
4. **Gombás, J.**, Tanka-Salamon, A., Skopál, J., Nagy, Z., Machovich, R., Kolev, K. Modulation of fibrinolysis by the combined action of phospholipids and immunoglobulins. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008; 19: 82-88
IF1.370

Egyéb saját közlemények

1. Léránt, I., Kolev, K., **Gombás, J.**, Machovich, R. Modulation of plasminogen activation and plasmin activity by methylglyoxal modification of the zymogen. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1480: 311-320
IF1.399