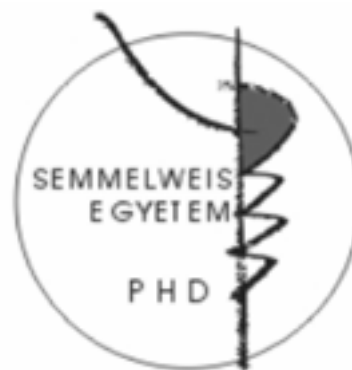


# A trombolitikus rezisztencia molekuláris alapjai

Doktori tézisek

**Váradi Balázs**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Kappelmayer János egyetemi docens, az orvostudomány  
kandidátusa

Dr. Benyó Zoltán egyetemi docens, az MTA doktora

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Monos Emil egyetemi tanár, az MTA  
doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kiss Róbert egyetemi docens, Ph.D.  
Dr. Csala Miklós egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest  
2007

## Bevezetés

Az érfal sérülésének hatására beindul a többlépcsős véralvadási folyamat, amely végeredménye a szilárd vérrög kialakulása. A vérrög vázát egymással összekapcsolódott fibrinmolekulák alkotják, amelyek trombin hatására fibrinogénből keletkeznek. A fibrinháló magába zár a vérben megtalálható molekuláris (immunoglobulinok és egyéb plazma fehérjék) és celluláris (vérlemezkék, leukociták) elemeket is. A keletkezett fibrinháló feloldását a plazmin végzi, amely meghatározott helyeken képes a fibrinmolekulák hasítására, vízdékony fibrin degradációs termékeket alakítva ki. A plazmin plazminogénből keletkezik plazminogén aktivátorok hatására, amelyek képesek a plazmin 561. és 562. aminosavjai közötti peptidkötést elhasítani, létrehozva így a kétláncú plazmin molekulát. A plazminogén aktivátorok lehetnek endogének (szöveti típusú plazminogén aktivátor tPA, urokináz), illetve exogének (streptokináz). Ischaemiás érbetegségekben (szívinfarktus, stroke) a rekanalizációt célzó terápia plazminogén aktivátorok alkalmazásán alapszik, amely azonban a betegek jelentős hányadában nem vezet a képződött trombus feloldódásához. Ez arra utal, hogy a fibrinolízis nem egyenértékű a trombolízissel és olyan kutatásokat hív életre, amelyek annak tisztázására irányulnak, hogy a trombus fibrintől eltérő komponensei hogyan befolyásolják a fibrinolízist. Kísérleteimben két fontos trombus összetevő, a foszfolipidek és a miozin fibrinolízisre kifejtett hatását vizsgáltam.

A szűkebb értelemben vett fibrinolízis az a folyamat, amikor az aktív plazmin a fibrinhálót meghatározott kötések mentén elhasítva vízdékony darabokká degradálja. A fibrinolízis a fibrinháló – vér érintkezésénél lévő határfelületen zajlik le, ezért nehéz pontosan meghatározni a folyamatban részt enzimek pontos koncentrációját. A trombus ugyanis az inaktív plazminogént tartalmaz, ahhoz hogy a fibrinolízis meginduljon a plazminogén

aktivátoroknak be kell jutniuk a trombus belsejébe. A tPA méreténél fogva szabadon diffundálhatna a fibrinháló csatornáiban, ezt azonban megakadályozza, hogy a tPA nagy affinitással képes a fibrinhez kötődni. A véráram felől közelítő tPA tehát megkötődik a trombus felszínén, és egy vékony rétegben feldúsul, itt a koncentrációja többszöröse is lehet vérbeli koncentrációjának. A fibrinolízis ebben a néhány mikrométer szélességű rétegben indul meg. Fibrin jelenlétében a tPA aktiválja a plazminogént, a plazmin megkezd a fibrin hasítását, kialakítva ezzel újabb plazminogénköti helyeket a fibrinen, ez a plazminogén molekulák felhalmozódásához vezet a fibrin felszínén. A plazmin a fibrinszálakat keresztirányban hasítja, a lehasított részek nagyobb átmérőjű fibrinkötegekké kapcsolódnak össze a végleges leszakadásuk előtt. Ilyen körülmények között a tényleges fibrinolízis a fibrinháló külső vékony rétegében játszódik le, a fibrinháló lebontása rétegről – rétegre történik. A fibrinolízis sebességét befolyásolja a fibrinháló szerkezete, a pórusok nagysága, illetve a trombusba zárt egyéb alkotórészek, amelyek képesek kölcsönhatásba lépni a fibrinolízis enzimjeivel. További befolyásoló tényező a trombussal érintkező vér áramlási sebessége: ez hatással van az enzimek trombusbéli diffúziójára, és a fibrinről lehasított fehérje darabok leszakadására.

#### A trombus szerkezet és a vérlemezke membrán

Az *in vitro* keletkezett trombus nagy mennyiségű vérlemezket tartalmaz: 400  $\mu$ l térfogatú trombusban lévő vérlemezkek száma megfelel 10 ml vérben lévő vérlemezkek számának. Ezzel szemben a plazminogén és a tPA koncentrációja a trombusban kisebb, mint a vérben, míg a fibrinogén mennyisége nem változik a vérhez viszonyítva. A trombusba került vérlemezkek kb 6 óra után elhalnak, sejtalkotó fehérjéik, és foszfolipid membránjuk a trombusba zártan marad. Ebből kifolyólag a trombusban nagy mennyiségű foszfolipid van, ennek koncentrációja meghaladja a trombus alkotó fibrin koncentrációját is. A vérlemezkek

membránja 83 mol % - ban ikerionos foszfolipideket tartalmaz (foszfatidilkolin (PC), szfingomielin, etanolamin), a maradék 17 mol % egyszeres negatív töltésű foszfolipidekből áll (foszfatidilszerin (PS), foszfatidilinozitol). A foszfolipid membránok fontos jellemzője a membrán fázisállapota: ez lehet egy rendezettebb szerkezetű gél állapot, vagy magasabb hőmérsékleten fluidabb állagú folyadék kristályos állapot. A membrán olvadáspontját (átmeneti hőmérséklet tartomány a két fázis között) a membrán foszfolipidjeit alkotó telített és telítetlen zsírsavak aránya határozza meg. Minél több a telítetlen zsírsav a membrán foszfolipidjeiben, annál nagyobb a membrán fluiditása és alacsonyabb az olvadáspontja. A vérlemezke sejtmembrán 40 % - ban tartalmaz telítetlen zsírsavakat, ezért a trombocita membrán testhőmérsékleten folyadékkristályos állapotban van, de egyes fehérjék jelenléte vagy vérlemezke aktiválás hatására a membrán bizonyos részei gél állapotba is kerülhetnek.

#### Célkitűzések

Mivel a hatékony trombolízis eléréséhez figyelembe kell venni a trombusban lévő celluláris és molekuláris komponensek trombus szerkezetet és fibrinolízist befolyásoló hatásait is, olyan kísérleti modellek kialakítását tűztük ki célul, amelyek a lehető legjobban megközelítik a trombus valós szerkezetét, illetve figyelembe veszik a véráramlásból eredő nyíró erők trombus lebontásra gyakorolt hatását is. Miután lehetetlen a trombusnak valamennyi összetevőjét a megfelelő koncentrációban fibrinbe juttatni, kísérleti modellrendszerünkben olyan komponenseket alkalmaztunk, amelyeknek fibrinolízist befolyásoló hatásait lehetett feltételezni, vagy azért mert nagy mennyiségben van jelen a trombusban, vagy azért mert már leírták kölcsönhatásaikat a fibrinolízis enzimjeivel. Ezek közül kísérleteinkben vérlemezke eredetű sejtmembránoknak illetve az egyik intracelluláris fehérjének, a miozinnak a fibrinolízisre gyakorolt hatásait vizsgáltuk.

## Anyagok és módszerek

A kísérletekhez használt plazma fehérjéket (plazminogén, immunoglobulin G) vérplazmából izoláltuk. Szintetikus foszfolipidekből szonikálással és 50 nm pórusátmérőjű membránon történő extrudálással állítottunk elő egyrétegű vezikulákat. Vérlemezke membránt vérlemezkék szonikálásával nyertünk, majd a vérlemezke homogenátumból kloroformmal izoláltuk a lipideket. A trombusban található foszfolipidek kimutatására fagyasztott metszetet differenciáló Nílus kék festéssel kezeltünk. A fibrinolízis folyamatát turbidimetriával - a fibrinháló fényszórási képességének változásán alapuló spektrofotometriás méréssel – követtük. Plazminogén aktivációt fibrin felszínén a plazmin szintetikus szubsztrátjának a segítségével mértük. A felületi fibrinoldáskor kialakuló rétegvastagságot, amelyben a fibrinolitikus enzimek felhamozódnak konfokális mikroszkóppal, fluoreszcein izotiocianiddal jelölt tPA alkalmazásával mértük. A fibrinbe diffundált fehérjék mennyiségének a meghatározásához  $\text{Eu}^{3+}$  - mal jelölt fehérjéket használtunk, a fibrinben lévő  $\text{Eu}^{3+}$  mennyiségét késleltett fluoreszcencia méréssel határoztuk meg. A fibrinolízisben részt vevő fehérjék és a foszfolipidek közötti kötődést SPR (surface plazmon resonance) módszerrel és mikrokaloriméterben izotermiás titrálással jellemeztük. A miozin fibrinpolimerizációra és fibrinolízisre kifejtett hatását áramlási rendszerben vizsgáltuk.

## Eredmények

Artériás trombusokból készült metszetek foszfolipidre specifikus (differenciált Nílus-kék) festése alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a trombus mg/ml – es nagyságrendben tartalmaz foszfolipidet, amely feltehetőleg a trombusba zárt vérlemezkékből származik.

Ennek ismeretében modelleztük a trombocita membrán hatásait a fibrin oldására. A fibrinbe kevert vérlemeze homogenátum a fibrinolízist jelentősen gátolja (a fibrinolízis sebességére jellemző kvantitatív paraméter, a lízisidő a háromszorosára nőtt), ami csak részben tulajdonítható a vérlemezkék plazminogén aktivátor inhibitor – 1 tartalmának. Ugyanis a trombocitákból izolált membránlipidek szintén gátolják a fibrinolízist, bár a vérlemezke homogenátumnál kisebb mértékben (kétszeres lízisidő növekedés). Ezt a gátlást reprodukálni tudjuk szintetikus foszfolipidból készült vezikulák fibrinbe keverésével is. Lényeges jellemzője e gátlásnak, hogy erősen függ a membránszerkezettől. A membrán fázis-átalakulási (olvadási) hőmérséklete fölött, amikor mind a vérlemezke membránfoszfolipidból, mind a szintetikus foszfolipidból készült vezikulák folyadékkristályos állapotban vannak, egyedül a vérlemezke homogenátum őrizte meg fibrinolízist gátló hatását. Vízoldékony foszfolipidek, amelyek nem képeznek membránt, nem képesek befolyásolni a fibrinolízist. A szintetikus foszfolipid vezikulák által kifejtett fibrinolízisgátló hatás ekvivalens 440 nM koncentrációban fibrinbe kevert  $\alpha_2$  – plazmin inhibitor fibrinolízisgátló hatásával. A fibrinbe kevert foszfolipidek antifibrinolitikus hatását részben a fibrinfelszínen történő plazminogén aktiváció gátlásával lehet magyarázni. A gátlás mértéke a foszfolipid vezikulákban lévő negatív töltésű foszfolipid frakció mennyiségével arányosan emelkedik és e hatás eléréséhez szükséges a membránszerkezet (a rövid szénláncú zsírsavakat tartalmazó, vízoldékony foszfolipidek hatástalanok). A trombusban található foszfolipidek antifibrinolitikus hatásának másik eleme a fibrinbe történő diffúzió befolyásolása. Fibrinolitikus enzimek fibrinfelszínen történő inkubálása után a fehérjék által kialakított aktív réteg vastagsága szignifikánsan lecsökkent, ha a fibrinbe negatív töltéssel rendelkező foszfolipid vezikulákat kevertünk. Ez a hatás plazmin esetében volt a legnagyobb mértékű, itt az eredeti  $74 \pm 9$   $\mu\text{m}$  vastag réteg PCPS 1:1 és PCPS 3:1 arányú foszfolipid keverék jelenlétében  $34 \pm 6$ , illetve  $39 \pm 4$   $\mu\text{m}$ -re csökkent. A tPA diffúzióját csak a PCPS 1:1 arányú keverék gátolta szignifikánsan, mintegy

30 % -os csökkenést eredményezve. A trombus foszfolipid tartalma az aktív rétegben kialakuló enzimkoncentrációt is befolyásolja. A fibrinbe kevert PCPS 1:1 és 3:1 összetételű vezikulák a fibrinbe diffundált tPA mennyiségét foszfolipid mentes fibrinhez viszonyítva negyedére csökkentették, plazmin esetében a csökkenés mértéke 50 % - os volt. A töltés nélküli PC vezikuláknak ilyen hatásuk nem volt. A kapott eredmények felvetették a fibrinolitikus fehérjék és a foszfolipidek közötti kötődés lehetőségét, ezt két módszerrel is próbáltuk jellemezni. A két módszerrel kapott eredmények részben egybevágók: a kémiai kötődés erőssége arányos a vezikulákban lévő negatív töltésű foszfolipid mennyiségével, és az egyrétegű foszfolipid erősebben kötődik plazminogénhez és tPA – hoz mint a vezikuláris formában lévő. A kaloriméterben végzett mérések nagyobb érzékenysége miatt olyan esetekben is meg lehet a kötődés paramétereit határozni, ahol a SPR módszer már nem jelez egyértelmű kölcsönhatást. Legerősebb kötődést plazmin és az egyrétegű PCPS 1:1 összetételű keverék között tapasztaltunk, itt a  $K_d$  értéke nanomoláris tartományba esik. Ugyanilyen nagyságrendben van az egyrétegű PCPS 3:1 és plazmin közötti kötés  $K_d$  értéke is, SPR módszerrel vizsgálva. A mikrokakoriméterrel végzett mérések ezzel összhangban vannak, itt azonban a  $K_d$  értéke valamivel magasabb. Az egyrétegű forma vizsgálata az SPR chipen csak a PCPS 1:1 összetételű keverék esetében jár mérhető erősségű kötődéssel. Hasonló hatások mérhetőek tPA és foszfolipidek között is, itt azonban a kötődés gyengébb, ezért érdemi eredményeket csak a kaloriméteres mérés szolgáltatott.

Indirekt immunfluoreszcens vizsgálattal artériás trombusban jelentős mennyiségű miozint lehet kimutatni. A miozin a trombusban egyenletesen oszlik el, és a miozin hálószerűen veszi körül a fibrinszálakat. A fibrinbe kevert miozin koncentráció-függő módon gátolja a fibrin tPA által indukált lebontását, a maximális gátló hatás (a lízisidő 60 % - al történő meghosszabbodása) 0,6 – 1  $\mu\text{M}$  miozin mellett érvényesül, e fölötti miozinkoncentrációnál a

fibrinolízis gátlása mérséklődik. Azonos körülmények között, ha a plazminogént urokinázzal aktiváljuk, akkor a miozin koncentrációjával arányosan nő a lízisidő.

Miozin tartalmú fibrin oldását áramlási rendszerben vizsgálva kettős miozin hatást tapasztaltunk: a miozin 50 % - al nyújtotta meg a lízisidőt, ami a fibrinolízis gátlására utal, a fibrinalvadék szétesése viszont hamarabb, alacsonyabb szolubilizációs fokon kezdődött, ami a fibrinpolimerizáció miozin által okozott módosulásának lehet a következménye.

Az eredmények összefoglalása és a levonható következtetések:

1. Az artériás thrombusok jelentős mennyiségű (5 g/L körül) foszfolipidet és miozint tartalmaznak.
2. A vérlemezke eredetű valamint a szintetikus foszfolipidek lelassítják a tPA-indukálta fibrinoldást és hatásuk additív az  $\alpha_2$ -plazmin inhibitorral a plazmin gátlás tekintetében.
3. A foszfolipidek gátolják a fibrin felszínén történő plazminogén aktivációt.
4. A foszfolipidek gátolják a tPA, plazminogén és plazmin penetrációját fibrinbe feltehetőleg a fibrinpórusok kitöltésével.
5. A foszfolipidek megkötik a fibrinolitikus ágenseket (különösen a plazmint) ezzel is védve a fibrint.
6. A miozin koncentráció-függő mértékben gátolja a tPA által indukált fibrinolízist, ugyanakkor a miozin jelenléte fibrin-destabilizáló hatást gyakorol.

Ezek alapján a következő megállapításokra jutottunk:

1. Az artériás thrombusokban levő foszfolipidek koncentrációja elegendő ahhoz, hogy jelentősen gátolja a tPA-indukálta fibrinolízist.
2. Ez a hatás határozottan elkülönül a trombociták fehérje komponenseitől, tehát kiegészíti az trombocita eredetű plazminogén aktivátor inhibitor 1 (PAI-1), XIIIa faktor,  $\alpha_2$ -plazmin inhibitor ismert fibrin stabilizáló hatásait.
3. A leírt foszfolipid hatások bizonyos szerkezeti feltételekhez kötődnek: anionos poláros fej és kis fluiditású membránrendeződés szükséges a maximális fibrinolízis-gátláshoz. Mivel ez utóbbi tulajdonság szorosan összefügg a foszfolipidek telített zsírsav tartalmával, a most leírt jelenség új tényezője lehet a telítetlen zsírsavak régóta ismert kedvező hatásának az atherothrombózis visszaszorításában.



4. A trombolitikus ágensek hatékonyságát olyan rendszerekben és módszerekkel kell vizsgálni, amelyek maximálisan megközelítik a thrombus összetételét, illetve körülményeit.

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., Gombás, J., **Váradi, B.**, Ajtai, K., Kovalszky, I., Machovich, R. Myosin: a non-covalent stabilizer of fibrin in the process of clot dissolution. *Blood* 2003; 101: 4380-4386 **IF10.120**
3. **Váradi, B.**, Kolev, K., Tenekedjiev, K., Mészáros, G., Kovalszky, I., Longstaff, C., Machovich, R. Phospholipid-barrier to fibrinolysis: role for the anionic polar head charge and the gel-phase crystalline structure. *J Biol Chem* 2004; 279: 39863-39871 **IF6.355**
4. **Váradi, B.**, Kolev, K. Foszfolipid-fehérje kölcsönhatások az artériás trombusok fibrinolitikus rezisztenciájának hátterében. *Biokémia* 2005; 29: 26-31

Egyéb saját közlemények

1. Tenekedjiev, K., **Váradi, B.**, Kolev, K. Identification of the kinetic parameters of a protease in the dissolution of fibrin-myosin clots. *C R Acad Bulgare Sci* 2006; 59: 1067-1074
2. Rábai, G., **Váradi, B.**, Longstaff, C., Sótonyi, P., Kristóf, V., Timár, F., Machovich, R., Kolev, K. Fibrinolysis in a lipid environment: modulation through release of free fatty acids. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1265-1273 **IF5.262**

## Kongresszusi előadás kivonatok

1. **Váradi, B.**, Kolev, K., Machovich, R. A foszfolipidek hatása a fibrinolysisre. A Magyar Thrombosis és Haemostasis társaság VII. Kongresszusa, 2003. szeptember 11-13., Alsópáhok, *Magyar Belorvosi Archivum* 2003; 3(Suppl.): 46
2. Kolev, K., **Váradi, B.**, Tenekedjiev, K., Machovich, R., Longstaff, C. Phospholipids retard fibrinolysis. 18th International Congress on Thrombosis, June 20-24, 2004, Ljubljana, Slovenia, *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33(Suppl 2): 30
3. Kolev, K., **Váradi, B.**, Tenekedjiev, K., Longstaff, C., Machovich R. Fibrinolysis in phospholipid environment: modulation through release of fatty acids. 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, 2 – 7 July 2005, Budapest, *FEBS J* 2005; 272(Suppl. 1): 404-405
4. **Váradi, B.**, Kolev, K., Machovich, R. Fibrinolysis foszfolipid környezetben: zsírsavak modulátor szerepe. A Magyar Thrombosis és Haemostasis társaság VIII. Kongresszusa, 2005. október 6-8., Alsópáhok, *Magyar Belorvosi Archivum* 2005; 18 (2/Suppl.): 30