

A fibrin - neutrofil extracelluláris csapda - von Willebrand-faktor tengely artériás trombózisban

Doktori téziszfüzet

**Maróthyne dr. Tóth Erzsébet**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Kolev Kraszimir, MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Gadó Klára, PhD, főiskolai tanár

Dr. Gindele Réka, PhD, egyetemi tanársegéd

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Domján Gyula, PhD, professor emeritus

Tagok: Dr. Blaskó György, MTA doktora, egyetemi tanár

Dr. Bőgel Gábor, PhD, egyetemi adjunktus

Budapest  
2023

## BEVEZETÉS

A szívinfarktus és a stroke a vezető halálokok a földön. A thrombosis keletkezésének rizikóját fokozó tényezők: az atherosclerosis, hypertonia, dyslipidaemia, diabetes, tumor és dohányzás befolyásolják a thrombus összetételét is, nehezebben lizálhatóvá teszik.

Az endothelsejtekből konstitutívan és stimulus hatására felszabaduló von Willebrand-faktor (vWF) részt vesz a vérlemezkék adhéziójában, kollagénhez és endothelsejthez való kötésében, valamint aggregációjában, vagyis másik vérlemezkéhez, fehérvérsejtekhez, fibrinhez, DNS-hez és egyéb molekulákhoz való kötésében.

A thrombusok kialakulását gyulladásra jellemző jelenségek kísérik, többek között neutrofil granulocita infiltráció. A gyulladás helyszínén először megjelenő neutrofil granulocita vagy fagocitálja a mikrobákat és a sejtörmelékét, vagy citoplazmatikus, magi és granuláris fehérjék társaságában kilöki a fragmentálatlan DNS-tartalmát az extracelluláris csapda (NET) képződése során. NETosist provokálnak a mikrobák, citokinek, antitestek, reaktív oxigénszármazékok, vWF, C-reaktív protein (CRP), vérlemezkéből felszabaduló ágensek. A NETosis során a neutrofil elasztáz fehérjét hasít, a mileoperoxidáz oxidál, a peptidil-arginin-dezimináz (PAD) citrullinál. Ezek az enzimek a DNS-sel és a citrullinált hisztonnal együtt a NET-markerek, és kimutathatók az

erodálódó vagy rupturálódó atherosclerotikus plakkokban is. Az atherosclerosis rizikótényezői krónikus gyulladást tartanak fenn, aktiválják az endothelsejteket, makrofágokat, neutrofil granulocitákat, valamint emelkedett vér akutfázis-fehérje, úm. vWF-, CRP-, fibrinogénszintet okoznak.

A PAD4 izoenzim működése szükséges a NETosis beindításához. Mind a PAD4, mind a PAD2 felszabadul a folyamatban és egy sor extracelluláris fehérjét citrullinál: fibrint és fibrinogént, kollagént, ADAMTS13-t, vimentint, filaggrint stb. A citrullináció során a fehérjék arginin oldallánca deziminálódik, ammónia szabadul fel és citrullin marad vissza a fehérjében. A fehérje a töltésvesztés miatt lazább térszerkezetűvé válik, új epitópok jelennek meg a felszínén, funkcióját veszítheti, a különböző enzimek hasítási helye eltűnik. Ennek következtében a szervezet idegenként ismerheti fel a citrullinált fehérjét vagy annak fragmensét, ellenanyag keletkezhet.

## CÉLKITŰZÉSEK

Von Willebrand-faktor, extracelluláris DNS és fibrin kölcsönhatásának mennyiségi immunhisztokémiai jellemzése eltérő lokalizációjú (koszorúér, agyi és perifériás) thrombusokban.

Artériás thrombusok összetétele (fibrin, vWF, DNS) és a betegek klinikai, valamint laboratóriumi jellemzői közötti összefüggések vizsgálata.

A thrombusok fibrinszerkezetének jellemzése a thrombusösszetétel (vWF, DNS, sejtes elemek) függvényében.

A fibrinogén citrullinációjának hatása a belőle keletkező fibrin szerkezetére.

## MÓDSZEREK

### **A betegek jellemzői, a thrombusmintákról pásztázó elektronmikroszkópos felvételek készítése és statisztikai értékelése**

A coronaria artériás betegségben (18 CAD), perifériás artéria betegségben (19 PAD) és agyi isémiás stroke (17 AIS) betegségben szenvedő betegekből származó artériás thrombusmintákat a betegekből való eltávolítás után azonnal feldaraboltuk, glutáraldehiddel fixáltuk, majd etanol és aceton keverékével dehidratáltuk, széndioxid kritikus pont szárítási módszerrel kiszárítottuk. A mintákat szénkorongon arannyal bevontuk, thrombusonként 10 felvételt készítettünk pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM). Photoshop segítségével a képeket 864 egyenlő méretű négyzetre osztottuk és az egyes régiókat osztályoztuk: fibrin, vérlemezke, egyéb vérsajt vagy ezek kombinációja volt látható. Kiszámítottuk, az egyes komponensek a kép teljes területének hány %-át foglalják el.

## **Fibrinalvadék pásztázó elektronmikroszkópos felvételeinek készítése és statisztikai értékelése**

Az in vitro készített fibrinalvadékat a thrombusmintával azonos módon készítettük elő a SEM felvételekhez. A szálátmérőket a képre illesztett segédvonalakat metsző fibrinszálaikon határoztuk meg. A szálátmérő empirikus adatsorokra elméleti eloszlásokat illesztettünk és Kuiper-teszttel értékeltük eltéréseiket.

## **Immunfluoreszcens felvételek készítése**

Immunhisztokémiai von Willebrand-faktort (vWF), DNS-t és fibrint detektáltunk a thrombusokból kriometszeteken. Az extracelluláris DNS-t TOTO-3 nukleinsavfestékkel, a vWF-t és fibrint ellenanyaggal, és az ellene termeltetett másodlagos antitesthez kötött fluoreszcens festékkel tettük láthatóvá konfokális lézer pásztázó mikroszkóp segítségével. A különböző fluoreszcens jelek területének számszerűsítésére Image J szoftvert használtunk. Kiválasztottuk az érdeklődésre számot tartó régiókat, kiszámítottuk a felületét pixelben, és beállítottuk a vWF, DNS és fibrin intenzitásának küszöbértékeit a lefedett területek azonosításához. A másodlagos antitestek keresztabszorpciója miatt a két fluoreszcens jel közötti enyhe térbeli átfedés ellensúlyozására a két százalékos lefedettségi érték arányát kiszámítottuk, és ezt követően fibrin/vWF és fibrin/DNS arányként használtuk, majd meghatároztuk a fibrin/DNS (FN50) és a fibrin/vWF (FW50) arány eloszlásának medián értékét.

Kuiper statisztikai tesztet használtunk az eloszlás egyenlőségére és Bootstrap egyoldali statisztikai tesztet a medián egyenlőségre.

### **Fibrinogén citrullinalása**

Fibrinogént PAD4 enzim hozzáadásával FXIIIa gátlószer jelenlétében 37°C-n citrullináltunk. A reakciót pán-PAD-gátlószer klóramidinnal állítottuk le. Az így készült mintákat használtuk a SEM és turbidimetriás vizsgálathoz.

### **Fibrin alvadásának turbidimetriás mérése**

Citrullinált és nem citrullinált fibrint különböző arányban összekevertünk és trombin hozzáadásával spektrofotométerben mikrotiterlemezben alvasztottunk. Az abszorbanciát 340 nm-en mértük.

## **EREDMÉNYEK**

### **Az artériás thrombus DNS- és von Willebrand-faktor tartalmának aránya**

A CAD és PAD-betegek közül azoknak változott szignifikánsan egyszerre a FN50 és FW50 értéke (a konfokális mikroszkópos felvételen a fibrin és DNS, valamint a fibrin és von Willebrand-faktor által elfoglalt terület arányának mediánja), akik dyslipidaemiások, de azoké nem, akiknek normális a plazma

lipidprofiljuk. Az olyan artériás thrombózisban, amelyben oki tényező a vér kóros lipidprofilja miatt kialakuló atherosclerosis, nagyobb szerepe van a vWF helyi aktivációja és a NETosis között leírt összefüggésnek: a vWF képes NETosist provokálni, a NET komponensek pedig a Weibel-Palade-testek exocitózisát, a vWF felszabadulását okozzák, valamint mind a vWF, mind a NET-komponensek képesek aktiválni a vérlemezkét, vérfalendothelsejtet, neutrofil granulocitát, ezzel beindítani a vérárvadást és akadályozni a fibrinolízist.

### **Az artériás thrombusok fibrinszálmérőjének alakulása a thrombus vWF- és DNS-tartalmának függvényében**

Amikor a thrombus DNS- és vWF-tartalma is nőtt a fibrinhez képest, a fibrinszál átmérője kisebb. Ismert, hogy a vékonyabb szálakból álló tömör, DNS-sel és vWF-ral összeszövődő alvadékot nehéz lizálni. Az acetilszalícilsav férfiakban vastagabb fibrinszál képződését okozza a nem kezeltékhez képest, márpedig minden CAD beteget, és a többieknek is kb. felét kezelték a COX-gátlóval. Betegeink közül a dohányosok fibrinszála vékonyabb a nem dohányzókéénál, és PAD betegeink többsége dohányos volt. A dohányosok vérlemezkéje, endothelsejtje stb. aktiváltabb állapotban van, plazmájuk hajlamosabb alvadásra, vékonyabb fibrinszál keletkezik. Betegeinkben a fibrinszál vastagságát több tényező befolyásolta.

### **A vér, valamint a thrombus fehérvérsejt-tartalmának és a thrombus vWF-tartalmának korrelációja**

A hypertoniás koszorúér- és agyértrombózisos betegek vérében minél magasabb volt a fehérvérsejtek száma, annál magasabb volt a thrombusukban a vWF aránya a fibrinhez képest. A hypertoniások endothelsejtje diszfunkciós, aktivált állapotban van, sok vWF tud felszabadulni, az atherosclerotikus plakknál a nagy nyíróerő aktív konformációba tudja hozni a vWF-t, ami elősegíti a kötődését vérfehérjékhez, vérsejtekhez, beindulhat a véralvadás. A SEM felvételeken látható fehérvérsejtek és a thrombus FW50 értéke közötti összefüggés nem olyan erős, de hasonló. Feltételezzük, hogy a leukocitáknak nagyobb szerepük volt a thrombus képződésének kezdetén a thrombogén felszín és a hiperdinamiás körülmények között áramló vér között, mint a széles perifériás artériákban, a thrombus öregedése során pedig számuk csökkent. A neutrofil granulociták NETosissal is válaszolnak a stimulálásra, a felszabadult proteázok pedig destabilizálják a plakkot.

### **A thrombus von Willebrand-faktor és DNS tartalma a vér fibrinogén, valamint C-reaktív protein szintjének függvényében**

Ha azt nézzük, hogy a vér fibrinogén és a thrombus FN50 értéknek együttesen milyen hatása van az összes betegben a thrombus FW50 értékére, akkor a mérési pontok aszimmetrikus völgy alakú felszínén helyezkednek el, a magasabb Fg-szintek együtt fordulnak elő a magas thrombus DNS/fibrin és vWF/fibrin aránnyal. Az összes betegben nem, de az atherosclerotikus betegekben a vér C-reaktív protein (CRP) és a thrombus FN50-értéke hasonlóan korrelál az FW50-értékkel: magas CRP-szint együtt jár magas DNS/fibrin és



vWF/fibrin aránnyal. A CRP nem csak gyulladási marker, melynek szintézise fokozódik IL-6 által, hanem gyulladási mediátor is, aktivált formái leukocitákat vonzanak és aktiválnak, NET-ot provokálnak. A fibrinogén szintézise szintén fokozódik gyulladási állapotokban. Nem csak a fő hálóképző alvadékfehérje, hanem növeli a vér viszkozitását is. A PAD betegekben több gyulladási marker szintje is emelkedett volt, több társbetegség és a dohányzás is hozzájárult a thrombus keletkezéséhez, szemben a másik két csoporttal, amelyben csak 1-1 inflammatorikus marker emelkedett és akár egy rizikófaktor is elég lehetett, bár jellemzően több volt.

### **Citrullinált fibrinogénből képződő alvadék szerkezete**

A neutrofil extracelluláris csapdák jelenlétét a betegekben származó thrombusokban rendre ki tudtuk mutatni. A NET-osis során a DNS mellett rengeteg citoplazmatikus és magi fehérje is felszabadul, amelyek közül többnek hatása van az alvadékképződés kinetikájára, a keletkezett alvadék tulajdonságaira. A PAD2 és PAD4 citrullinálja a fibrinogént, ezzel megváltoztatja az alvadék szerkezetét, vékonyítja a fibrinszálakat. Korábbi vizsgálatunkban a citrullinált fibrinnek (cFn) plazmin hozzáadásával mért lízisideje megnyúlt a nem citrullinálthoz képest, aminek oka lehet, hogy a plazmin nehezebben penetrál a tömör hálóba, in vivo pedig a NET-tel összefonódó és cFn-t tartalmazó fibrinhálót nehezebb emészteni. Korábbi méréseink során (nem saját mérésben) a fibrin(ogén) citrullinációja PAD enzimek által megváltoztatja az alvadék reológiai tulajdonságait, csökkenti a mechanikai stabilitását és rugalmasságát, kisebb nyíróerő

képes a gél-szol átmenetet előidézni a reométerben. A cFn felszínére rétegzett tPA lassabban penetrál, a fibrinolízis lassúbb. A citrullinált fibrint is tartalmazó alvadék mechanikailag kevésbé stabil, könnyebben képződhet az ilyen alvadékból embólia, de ugyanakkor a lízisre, a farmakológiai kezelésre rezisztenssé válik.

### **Citrullinált fibrinalvadék képződésének kinetikája**

A fibrinogén előzetes citrullinációja PAD4 enzim által csökkenti a fehérje pozitív töltését, megváltoztatja a fehérje szerkezetét, emiatt a belőle keletkező fibrinháló vékonyabb szálakból áll, abszorbanciája kisebb a turbidimetriás vizsgálatban, mint a nem citrullinált fibrinogéné. A turbidimetriás vizsgálat során minél több citrullinált fibrinogén van jelen a keverékben, annál később indul az alvadás a trombin hozzáadása után. A PAD2 és PAD4 enzim azt a két arginint is képes deziminálni, ami mellett a trombin lehasítaná a fibrinopeptid A-t és B-t, vagyis a citrullináció miatt elvész a trombin hasítóhelye a fibrinogén  $A\alpha$  és  $B\beta$  láncában, sőt a cFg akadályozza a polimerizációt is.

### **KÖVETKEZTETÉSEK**

A thrombusok magas DNS-tartalma a dyslipidaemiás betegekben magas vWF-tartalommal párosult, ami arra utal, hogy ebben az összefüggésben a thrombusok atheroscleroticus etiológiájának szerepe van.

Amikor a feltehetően NET eredetű DNS együtt lokalizált a vérrögök emelkedett vWF-tartalmával, a fibrinrostok vékonyabbak voltak. A plakkban a prothrombotikus körülmények között nem érvényesült a DNS és hiszton szálvastagító hatása.

A hypertóniás betegek kisebb átmérőjű agyi artériáiban és koszorúereiben (de nem a perifériás artériákban) keletkezett thrombusok vWF tartalma korrelált a vér fehérvérsejtszámával, ami arra utal, hogy a hidrodinamikus környezet szerepet játszik a keringő leukociták és a kialakuló fibrinrögök kölcsönhatásában.

A thrombus vWF és a szisztémás CRP összefüggése specifikus volt az atheroscleroticus etiológiájú thrombusokra.

A citrullinált fibrinogénből keletkező fibrinháló vékonyabb szálú, kisebb pórusú a citrullinált fibrint nem tartalmazónál. Ez magyarázatul szolgálhat a korábbi megfigyelésre, miszerint a tömör fibrinháló kevésbé permeabilis, a tPA és plazmin nehezebben jut a háló belsejébe, ezért lízise jelentősen tovább tart.

A citrullinált fibrinogén lassabban kezd alvadni trombin hozzáadására, mert a trombin elveszíti hasítóhelyeit, hiszen az ott levő argininek is átalakulnak citrullinná.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Erzsébet Tóth, László Beinrohr, István Gurbucz, László Szabó, Kiril Tenekejdjev, Natalia Nikolova, Anikó I. Nagy, László Hidi, Péter Sótonyi, István Szikora, Béla Merkely, Krasimir Kolev:  
Fibrin to von Willebrand factor ratio in arterial thrombi is associated with plasma levels of inflammatory biomarkers and local abundance of extracellular DNA  
Thrombosis Research 209 (2022) 8-15

Imre Varjú, Erzsébet Tóth, Ádám Z. Farkas, Veronika J. Farkas, Erzsébet Komorowicz, Tímea Fellner, Balázs Kiss, Miklós Z. Kellermayer, László Szabó, András Wacha, Attila Bóta, Colin Longstaff, Krasimir Kolev:  
Citrullinated fibrinogen forms densely packed clots with decreased permeability  
J Thromb Haemost 2022;20:2862-2872

László Beinrohr, Eszter Kail, Péter Piros, Erzsébet Tóth, Rita Fleiner, Krasimir Kolev:  
Anatomy of a data science software toolkit that uses machine-learning to aid bench-to-bedside medical research - with essential concepts explained  
Appl. Sci. 2021, 11

Bence György, Erzsébet Tóth, Edit Tarcsa, András Falus, Edit I.

Buzás:

Citrullination: a posttranslational modification in health and disease

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 38 (2006)

1662-1677