

Elastomehanika fibrinskih vlaken in fibrinskih strdkov

Franci Bajd
seminar pri Fiziki mehke snovi
december 2009

Kazalo

1. Uvod.....	1
2. Zgradba fibrinogena in fibrinskega vlakna	1
3. Eksperimenti na posameznih fibrinskih vlaknih in molekulah fibrinogena.....	3
4. Mehanizem (ne)elastičnega odziva fibrinskih vlaken na zunanjo silo.....	5
5. Elastične lastnosti fibrinskega vlakna na različnih skalah	6
6. Model osmih vlaken.....	7
7. Zaključek.....	10

1. Uvod

V seminarju so opisane strukturne in elastične lastnosti beljakovine fibrin, ki ima bistveno vlogo pri uravnavanju hemodinamskega ravnovesja. V primeru poškodbe žilne stene fibrinska mreža služi kot elastično ogrodje za krvne celice, po drugi strani pa krvni strdki povzročajo trombozo, ki je v zahodni družbi predvsem zaradi načina življenja najpogostejši vzrok za umrljivost. Glede na položaj krvnih strdkov v telesu se lahko razvijejo srčna in možganska kap, arterijska tromboza, globoka venska tromboza in pljučna embolija. Fibrinska mreža mora biti dovolj elastična, da učinkovito regenerira poškodbe gibljive žilne stene, prav tako pa mora imeti prepustno strukturo, ki omogoča hitro prehajanje trombolitičnih sredstev pri razgradnji krvnih strdkov, kar velja še posebej v primeru zdravljenja povečane tromboze. Zaradi visoke klinične pojavnosti in zanimivih mehanskih lastnosti so fibrinske mreže in krvni strdki nasploh deležni intenzivnih raziskav tako s kliničnega kot tudi bazičnega stališča.

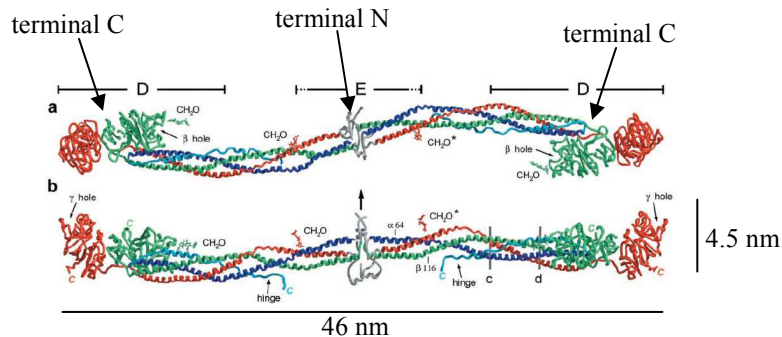
Biološki elastomeri se glede na elastične lastnosti delijo na težje in lažje raztegljive. Težje raztegljivi elastomeri, npr. filament aktina, mikrotubuli, kreatinska in kolagenska vlakna, imajo relativno pravilno parakristalinično obliko in zato velike module elastičnosti ($E > 100$ MPa), medtem ko imajo lažje raztegljivi elastomeri, npr. elastin, resilin, fibrilin, miofibril in fibronektin amorfnost strukturo in zato manjše module elastičnosti ($E \sim 10$ MPa). Med slednje spada tudi fibrin. Za primerjavo omenimo anorganske nanocevice in mikrocevice, ki imajo običajno precej večje module elastičnosti ($E > 10$ GPa) in so zato precej težje raztegljive.

V seminarju so prikazani nekateri zanimivejši eksperimenti, ki na različnih skalah osvetljujejo izvor izrednih elastičnih lastnosti tako posameznih fibrinskih vlaken kot tudi makroskopske fibrinske mreže (fibrinskega strdka). Poleg tega je prikazan tudi preprost *model osmih vlaken*, ki povezuje enačbi stanja posameznega vlakna in makroskopske tridimenzionalne mreže vlaken.

2. Zgradba fibrinogena in fibrinskega vlakna

Prekurzor molekule fibrina je beljakovina fibrinogen, ki je v krvni plazmi topen protein in je v krvnem obtoku zelo pogost (4% vseh krvnih proteinov). Fibrinogen (slika 1) je sestavljen iz šestih peptidnih α -vijačnic (dve A α vijačnici s 610 aminokislinskimi enotami, dve B β vijačnici s 461 enotami in dve γ vijačnici s 411 enotami pri človeškem fibrinogenu) in ima približno centrosimetrično trinodularno S obliko ter je 46 nm dolga in 4.5 nm široka. D vozla na obeh koncih molekule sta preko 17 nm dolgih verig povezana s centralnim vozлом E, ki se nahaja v sredini molekule in je sestavljen iz šestih dušikovih zaključkov (terminal N) in vsebuje tudi fibrinopeptida A (16 aminokislinski enot) in B (14 aminokislinskih enot). Peptidne vijačnice in vozli so stabilizirani z 29 disulfidnimi vezmi, in sicer se pet disulfidnih vezi nahaja v centralnem vozlu E in držijo skupaj obe polovici molekule. Na vsaki polovici molekule fibrinogena se nahajata tudi po dva disulfidna obroča, sestavljena iz treh disulfidnih vezi, ki prečno povezujeta vse tri peptidne verige (A α , B β in γ), zaradi česar so vse tri α -vijačnice tesno zložene v obliko vijačnih verig (*angl. coiled coils*). Ostale disulfidne vezi (12) so vezi znotraj

vijačnic v vozlih D, in sicer 3 vezi v C domeni vijačnice β (βC), 2 vezi v C domeni vijačnice γ (γC) in ena disulfidna vez v C domeni vijačnice α (αC). Fibrinopeptida A in B v beljakovinskem vozlu E zapirata aktivni mesti, preko katerih se molekule fibrinogena povežejo v polimerne verige. Preplet peptidnih vijačnic ter struktura centralnega in bočnih vozlov določajo strukturne in mehanske lastnosti molekule fibrinogena.



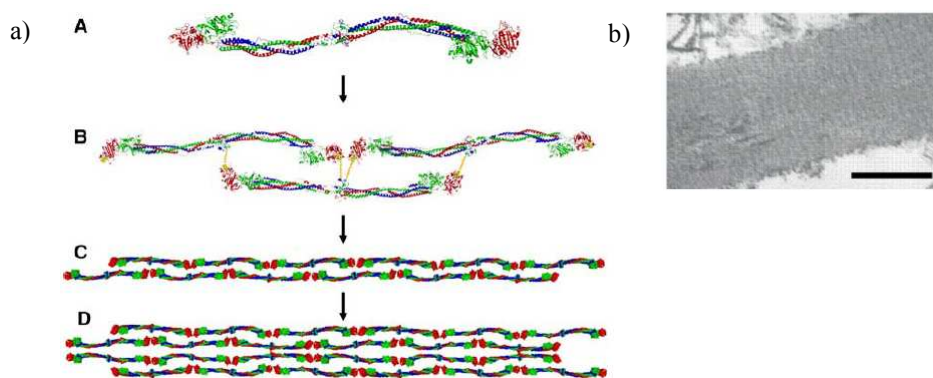
Slika 1: Molekula fibrinogena v dveh različnih položajih. Molekula je sestavljena iz centralnega vozla E in robnih vozlov D ter šestih α -vijačnic. Njena dolžina in premer sta 46 nm in 4.5 nm. Slika je iz [1].

Nastanek fibrina iz molekul fibrinogena poteka preko proteolitičnega cepljenja fibrinopeptidnih delov A in B s centralnega vozla E molekule fibrinogena. Proces katalizira beljakovina trombin. Na ta način se tvorijo pozitivno nabita vezavna mesta A (Gly-Pro-Arg-Val) in B (Gly-His-Arg-Pro), ki se povežejo z negativno nabitimi vezavnimi mesti *a* (C terminal na γ verigi: γ Gln329, γ Asp330, γ His340 in γ Asp364) in *b* (C terminal na β verigi: β Glu397, β Asp398 in β Asp432) preko t. i. A:*a* in B:*b* interakcij, ki so v bistvu elektrostatske interakcije. Proteoliza in nastanek fibrinskega protofibrila, ki ga sestavljata dva vzporedna in za 23 nm zamaknjena (*half-staggered*) niza fibrinskih molekul, potekata tako, da se najprej odcepi fibrinopeptid A in se poveže z dvema mestoma *a* na vozlih D na sosednji molekuli. Po odcepitevi fibrinopeptida A se odcepi še fibrinopeptid B, ki dodatno prispeva k trdnosti strukture v lateralni smeri.

Fibrinski protofibrili so niz dveh zamaknjenih (23 nm) verig fibrinskih molekul in se povezujejo v fibrinska vlakna. Njihova kompaktnost je močno odvisna od prečne prepletenosti fibrinskih protofibrilov. Ob prisotnosti transglutaminaze (faktor FXIIIa) se med nekaterimi glutaminskimi in lizinskimi aminokislinskimi enotami na α in γ vijačnicah v prečni smeri med protofibrili vzpostavijo kovalentne povezave (t.i. *crosslinking*). Prečno povezovanje in tvorba protofibrilov nista ločena ampak sočasna procesa. Prečne kovalentne povezave se vzpostavljajo tako, da se med protofibrili tvorijo oligomeri α -vijačnic (med aminokislinskimi enotami Lys 418, 448, 508, 539, 556, 580 in 601 ter Gln 221, 237, 328 in 366) ter γ - γ dimeri (med Lys406 in Gln 398/399). Manj pogosto se tvorijo tudi prečne povezave med α in γ vijačnicama znotraj iste molekule fibrina, ki pa ne prispevajo znatno k stabilnosti vlakna.

Molekulo fibrinogena v glavnem držijo skupaj močne znotraj-molekularne kovalentne peptidne (N-C) vezi med aminokislinskimi enotami ter elektrostatske in van der Waalsove interakcije med peptidnimi vijačnicami. Molekule fibrina se združujejo v polimerne verige, med-molekularne interakcije pa so odvisne od katalizne mediacije transglutaminaze FXIIIa. V odsotnosti FXIIIa se molekule fibrina povezujejo nekovalentno preko relativno velikih stikov med vozli D (D:D interakcije) ter preko A:*a* in B:*b* interakcij. Znano je, da med vozli D ni vodikovih vezi ali ionskih mostov. V prisotnosti FXIIIa pa se protofibrili kovalentno prečno prepletajo (*crosslinking*) preko fragmentov vijačnic γ in α . Te povezave vključujejo nekaj deset aminokislinskih enot dolge peptidne verige med sosednjimi fibrinskimi molekulami (γ - γ , γ - α , α - α).

Pri določevanju strukture fibrinskih vlaken pridejo v poštev mikroskopske tehnike, ki omogočajo direktno vizualizacijo, kot so npr. elektronska presečna (TEM) in vrstična (SEM) mikroskopija, konvencionalna in konfokalna optična mikroskopija ter mikroskopija na atomsko silo (AFM), in sipalne tehnike. Tako so na primer določili strukturo vozlov D iz sipanja rentgenskih žarkov na kristalu, sestavljenem izključno iz vozlov D [2].



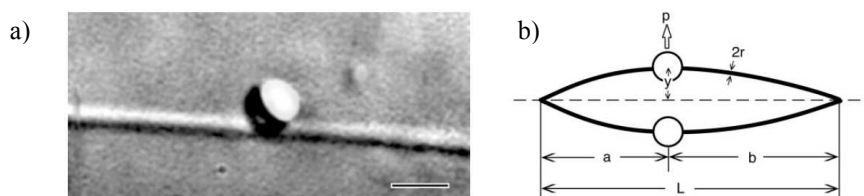
Slika 2: (a) Shematični prikaz formiranja fibrinskega vlakna. Po odstranitvi fibrinopeptidnih verig A in B z molekule fibrinogena se molekule fibrina uredijo v fibrinski protofibril, protofibrili pa v fibrinsko vlakno. (b) Fibrinsko vlakno na sliki TEM ima periodo 23 nm, kar je polovica dolžine molekule fibrinogena. Dolžina skale je 200 nm. Povzeto po [3].

3. Eksperimenti na posameznih fibrinskih vlaknih in molekulah fibrinogena.

Collen in sodelavci so raziskovali elastični odziv prečno povezanih (*angl. crosslinked*) in prečno nepovezanih (*angl. non-crosslinked*) fibrinskih vlaken s premerom 280 nm in dolžine 10 μm z uporabo konfokalne optične mikroskopije, opremljene z lasersko pinceto [4]. Ker se premer vlakna približuje meji ločljivosti, so vlakna obarvali z zlatimi nanodelci, in nanje prilepili koloidne kroglice iz lateksa s premerom 1 μm, ki so služile kot prijemališče za laserski žarek optične pincete (slika 3). Na robu rahlo divergentnega laserskega žarka obstaja električni gradient, zato na dielektrično koloidno kroglico deluje dielektroforezna sila, ki je sorazmerna relativni razliki dielektričnosti kroglice in medija (Clausius - Mossotijev faktor), $(\epsilon_{\text{lateks}} - \epsilon_{\text{H}_2\text{O}})/(\epsilon_{\text{lateks}} + \epsilon_{\text{H}_2\text{O}})$, in je precej večja kot odbojni fotonski tlak, zaradi česar koloidna kroglica ostane ujeta v snopu laserskega žarka. Tako ujeta kroglica in nanjo prilepljeno fibrinsko vlakno sta v eksperimentu sledila kontroliranemu sinusno moduliranemu nihanju laserskega žarka v prečni smeri glede na vlakno. Iz izmerjene amplitude prečnega nihanja vlakna y so določili modul elastičnosti (Youngov modul) po enačbi

$$E = \frac{Fab}{6yLI} (L^2 - a^2 - b^2),$$

kjer so F sila, a in b razdalji koloidne kroglice od obeh krajišč fibrinskega vlakna, L dolžina vlakna in $I = \pi r^4/4$ vztrajnostni moment krožne površine z radijem r . Ugotovili so, da je modul elastičnosti prečno povezanega vlakna (14.5 MPa) desetkrat večji od modula elastičnosti prečno nepovezanega vlakna (1.7 MPa). S tem so eksperimentalno potrdili, da imajo prečne kovalentne povezave med molekulami fibrina pomemben vpliv na kompaktnost vlakna.



Slika 3: (a) Upognjeno fibrinsko vlakno s koloidno kroglico iz lateksa. Skala je 1 μm. (b) Shema upogibanja fibrinskega vlakna z optično pinceto. Sliki sta iz [4].

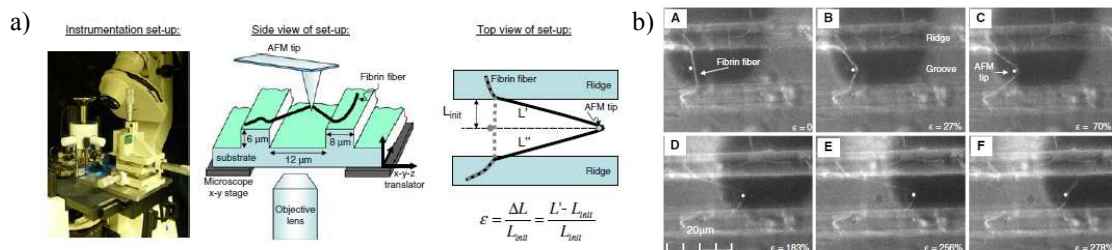
Meritev modulov elastičnosti so ponovili tudi v alternativnem eksperimentu, v katerem so ujeli en konec fibrinskega vlakna v optično past, medtem ko je bil drug konec prost in se je brownovo gibal zaradi termičnih fluktuacij. Elastičnost so določili po ekvipartijskem teoremu, po katerem je povprečni kvadrat odmika sorazmeren trdoti nihajoče vzmeti oz. vlakna. Tudi v tem primeru so izmerili približno desetkratni faktor med elastičnim modulom prečno povezanega (23.1 MPa) in prečno nepovezanega vlakna (2.6 MPa). V obeh omenjenih eksperimentih so bila fibrinska vlakna v puferskem mediju.

Poleg ukrivljanja so z AFM tehniko določili modul elastičnosti tudi z raztezanjem posameznih vlaken. Na enem koncu je bilo vlakno pritrjeno na podlago in na drugem izpostavljeno konici mikroskopa AFM. Pri majhnih elastičnih deformacijah so bili raztezki sorazmerni sili (Hookeov zakon),

$$F = E \pi r^2 \frac{\Delta L}{L}$$

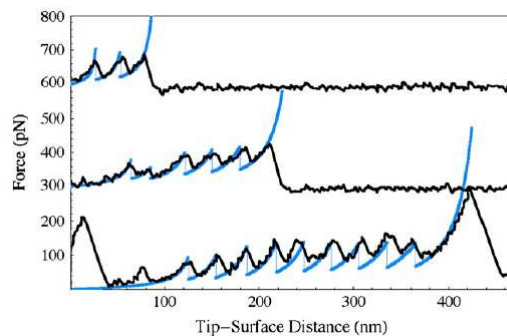
Pri meritvah na trših bioloških vlaknih so dobili večje module elastičnosti (npr. mikrotubuli in aktin imata elastična modula 1.2 GPa in 2.6 GPa).

Liu in sodelavci so pri določevanju elastičnih lastnosti fibrinskega vlakna domiselno kombinirali AFM s konfokalno optično mikroskopijo [5]. Suspenzijo fibrinskih vlaken so razpršili po umetni masi z režami širine 12 μm , tako da se je znaten delež vlaken postavil prečno na vdolbene kanale v podlagi. S fluorescentnimi barvili obarvana vlakna so nato raztezali s konico tipala AFM in sočasno opazovali njihov raztezek z optičnim mikroskopom (slika 4). Posebnost njihove meritve je, da se pri raztezanju niso zadrževali v linearnem območju, kjer je raztezek vlakna sorazmeren sili raztezanja, ampak so določevali *mejo natezne trdnosti*, pri kateri se je vlakno pretrgalo. Ugotovili so, da se prečno nepovezana vlakna raztegnejo lahko za $226 \pm 52 \%$ in prečno povezana za $332 \pm 71 \%$, kar je v primerjavi z ostalimi biološkimi in tudi nebiološkimi materiali ogromno. V eksperimentih so se vlakna običajno pretrgala na mestu vpetja na podlago in ne neposredno pod konico AFM. Presenetljivo je tudi, da so prečno povezana vlakna bolj raztegljiva od prečno nepovezanih, kar je ravno nasprotno kot pri kolagenskih in kreatinskih vlaknih, ki so zaradi prečnega povezovanja med protofibrilu trša in zato manj raztegljiva. Kot možno razlago avtorji navajajo, da so γ - γ povezave med raztezanjem v povprečju usmerjene vzdolž vlakna in znatno prispevajo k povečani meji natezne trdnosti. Po pretrganju sta bila oba dela vlakna skupno le nekoliko daljša kot začetna dolžina vlakna, kar pomeni, da so bile deformacije pretežno elastične.



Slika 4: (a) Postavitev eksperimenta za določevanje meje natezne trdnosti fibrinskega vlakna. (b) Fibrinsko vlakno se je pod konico AFM raztegnilo za 2-3 prvotne dolžine, dokler se ni pretrgalo na mestu pritrditve v podlago. Povzeto po [3].

Da bi pojasnili izvor izredne elastičnosti fibrinskega vlakna, so Brown in sodelavci določili odziv posameznih oligomerov fibrinskih molekul s prečnimi γ - γ povezavami na zunanjo silo konice AFM [6]. Dobili so zanimiv rezultat: pri raztezanju kratkih oligomerjev z velikimi silami so v opazili tipičen žagast vzorec s periodo 23 nm (slika 5), kar pomeni, da so se pri raztezanju s konico AFM α -vijačnice med vozloza D in E fibrinskega monomera s prvotno dolžino 17 nm deformirale v 40 nm dolg raztegnjen β trak (*angl. force-induced fibrinogen unfolding*). Ker ima posamezna molekula fibrina oz. fibrinogena dve α -vijačnici, se pri tej deformaciji molekula raztegne za 100%.



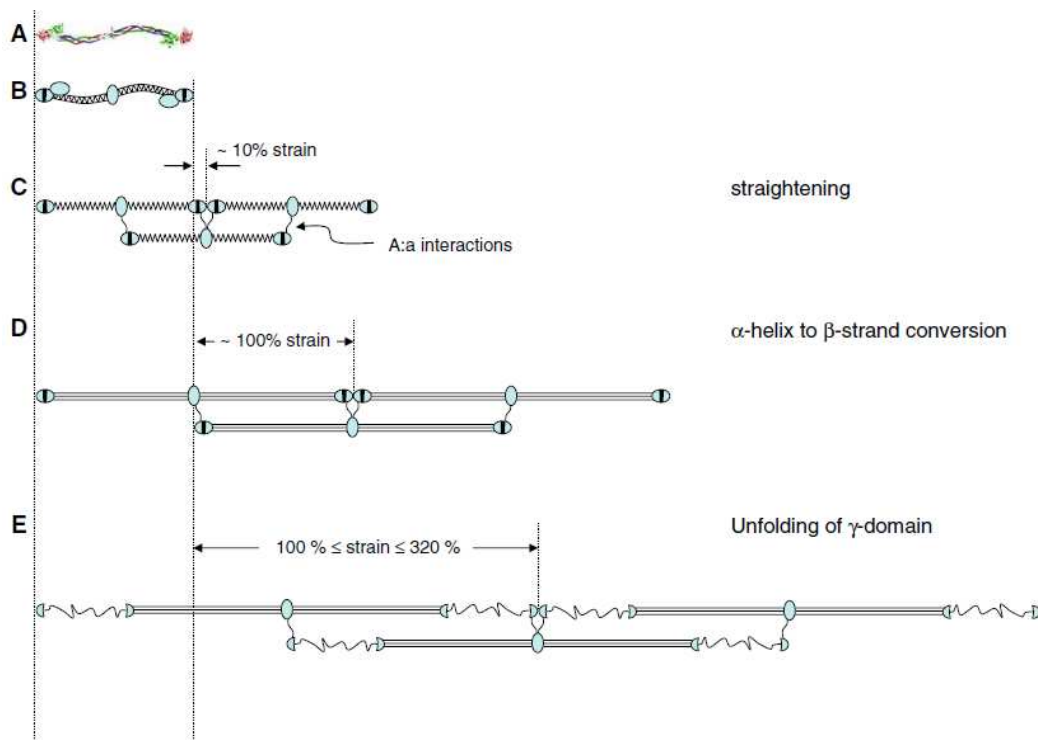
Slika 5: Odvisnost sile od raztezka za fibrinske oligomere kaže žagast vzorec [6].

4. Mehanizem (ne)elastičnega odziva fibrinskih vlaken na zunanjo silo

Mehanizmi razvijanja proteinskih vlaken so zapleteni in zato v splošnem niso poznani, kljub temu pa obstajajo nekateri predlogi, ki pojasnjujejo ta pojav. Proteinska vlakna se tako razvijajo zaradi (a) podaljšanja amorfnih nestrukturiranih β spiralnih regij ob terminalih C in N verige β , (b) transformacij α -vijačnice v β -trak, (c) razvitja medmolekularnih plasti, (d) razvitja proteinskih domen (vozlov), (e) elastične deformacije ukrivljenih molekul in (f) drsenja prečno nepovezanih protofibrilov drug ob drugem.

Collen in Brown s sodelavci so pokazali, da se fibrinska vlakna razvijajo zaradi raztezanja α -vijačnic in kasneje transformacije α -vijačnic v β -trakove, vendar omenjena procesa prispevata le k 100% raztežku fibrinskega vlakna, kar je še vedno precej manj, kot so eksperimentalno ugotovili Liu in sodelavci. Očitno obstajajo v fibrinskem vlaknu še druge strukturne transformacije, ki skupno prispevajo k 330% raztegljivosti prečno povezanih fibrinskih vlaken. Guthold in sodelavci v pojasnitev izredne raztegljivosti fibrinskega protofibrila ponujajo naslednjo shemo, ki se zdi smiselna in je tudi eksperimentalno podprta [3]. Predlagani mehanizem dodatno upošteva razvijanje (*angl. unfolding*) ostalih komponent fibrinske molekule.

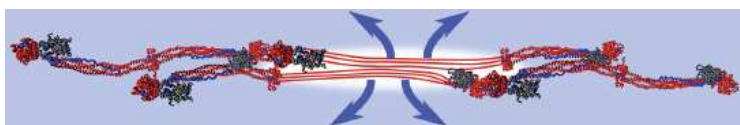
1. Majhne strukturne preureditve in linearizacija molekule. Majhni raztezki (do 10%) so povezani z majhnimi reverzibilnimi strukturnimi spremembami v fibrinskem monomeru ter preureditvijo znotraj protofibrilov v vlaknu. Valovita S oblika fibrinske molekule se raztegne v linearno obliko. Poleg tega se vzdolžno raztegnejo tudi prečne povezovalne verige A:a.
2. Konverzija α -vijačnic v β -trakove. Pri večjih obremenitvah obe α -vijačnici dolžine 17 nm spremenita konformacijo v 40 nm dolg β -trak. To pomeni, da se ena proteinska podenota, t.j. aminokislinska enota, raztegne z 0.15 nm na 0.34 nm. Pri popolni spremembi α -vijačnice v β -trak se 46 nm dolga molekula fibrina podaljša za 43 nm. Ta mehanizem podpirajo eksperimenti sipanja rentgenske svetlobe ter eksperimenti Browna in sodelavcev. Zmotna je predstava o tem, da se v molekuli fibrina α -vijačnice obnašajo kot vijačne vzmeti. Protiprimer za to je kolagen, ki ima desnosučno navitje iz treh levosučnih vijačnic, ki niso α -vijačnice, in je izredno slabo raztegljiv.
3. Razvitje kroglastih proteinskih domen. Pri ekstremnih raztezkih se predvidoma več kroglastih domen (*angl. globular domains*). Možni kandidati so terminali C verig γ v vozlih D (γ C). V vijačnicah α in β obstajajo stabilizacijske sulfidne vezi, v verigi γ oziroma vsaj v njenem terminal C pa teh vezi ni, zaradi česar se lahko popolnoma razvije, kar prispeva k dodatnemu raztežku 50 nm na eno domeno γ C. Ta deformacija k raztegljivosti molekule fibrina prispeva dodatnih 120 %.
4. Vzdolžno drsenje. Drsenje monomerov fibrina in fibrinskih protofibrilov vzdolž drug drugega je ireverzibilen proces in prispeva k dodatni raztegljivosti.



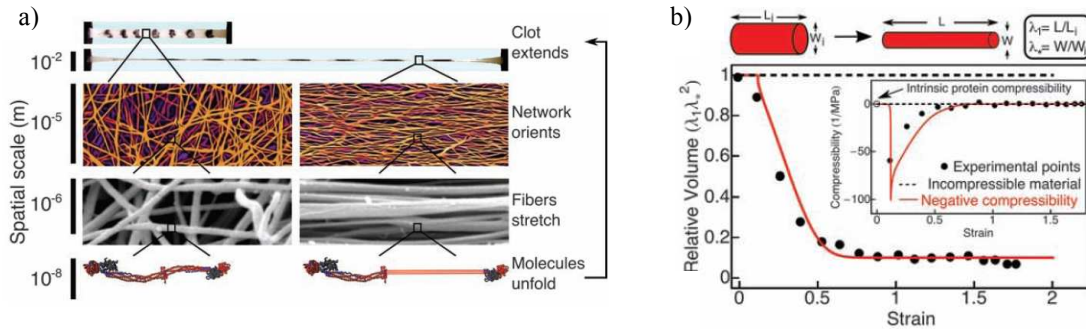
Slika 6: Mehanizem (ne)elastičnega raztezanja fibrinskega protofibrila po [3]. Vsi trije procesi, ki prispevajo k elastičnosti fibrinskega vlakna (izravnava ukrivljenih molekul, konverzija proteinske vijačnice v trak in razvitje domen γ C), so reverzibilni, kar so pokazali Liu in sodelavci [5].

5. Elastične lastnosti fibrinskega vlakna na različnih skalah

Ker je fibrin bistveni krvni protein in zavzema pomembno vlogo pri celjenju ran v hemostazi (vsi procesi, ki uravnavajo strjevanje in raztapljanje krvnih strdkov in zagotavljajo, da je kri v krvnem obtoku v glavnem tekoča), so poleg študij, ki vključujejo eksperimente s posameznimi molekulami ali vlakni fibrina, tudi makroskopske fibrinske mreže predmet številnih raziskav. Pred kratkim sta Brown in Litvinov s sodelavci poročala o elastičnih lastnostih fibrinskega gela na skali šestih velikostnih redov, od posameznih molekul fibrina preko fibrinskih vlaken do makroskopskih fibrinskih strdkov s premerom nekaj milimetrov (slika 7), kakršni se skupaj z vključenimi krvnimi celicami pogosto pojavljajo pri celjenju ran ali v patoloških hemodinamskih procesih [7]. Ugotovili so, da so fibrinski strdki izredno elastični in se lahko raztegnejo za več lastnih dolžin, kar se ujema z ostalimi študijami. Poleg tega so opazili, da se volumen fibrinskih strdkov pri raztezanju drastično zmanjša in imajo torej fibrinski strdki negativno stisljivost. Možni mehanizem, ki pojasnjuje negativno stisljivost fibrinskih strdkov, je obstoj hidrofobne interakcije med razvitimi proteinskimi β -trakovi (slika 7). Hidrofobna interakcija se pojavi, ko so β -trakovi dovolj blizu skupaj in je neto interakcija enaka privlaku med proteinskimi trakovi, ki povzroči izrivanje vodnih molekul. Zanimivo je, da se raztezanje fibrinskih strdkov v zraku in v vodi ni bistveno raziskovalo, kar pomeni, da je v fibrinskem strdku okrog fibrinskih molekul v obeh primerih precej vode (80%). Med raztezanjem so se fibrinska vlakna usmerjala vzdolž smeri zunanje sile (slika 8).



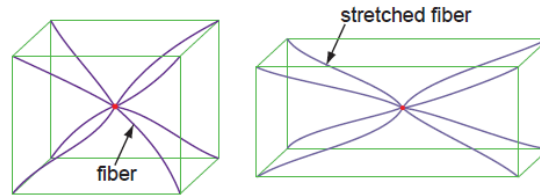
Slika 7: Hidrofobna interakcija med fibrinskimi β -trakovi, ki se pojavi pri raztezanju fibrinskega strdka, drastično prispeva k zmanjšanju volumna strdka [7].



Slika 8: (a) Študij elastičnih lastnosti fibrinskega strdka od milimetske do nanometrijske skale. Na vsaki skali se pod vplivom zunanje sile pojavlja ustrezna deformacija: strdek se razpotegne, mreža orientira, vlakna raztegnejo in molekule razvijajo. (b) Pri raztezanju se volumen fibrinskega strdka zmanjša. Povzeto po [7].

6. Model osmih vlaken

Za opis elastomehanike proteinske mreže obstaja več prikladnih teoretičnih modelov, ki povezujejo elastične lastnosti posameznega fibrinskega vlakna in makroskopskega fibrinskega strdka. Primer takega modela, ki sta ga uporabila tudi Brown in Litvinov s sodelavci [7], je *model osmih vlaken*, ki ga je predlagal Qi [8]. V tem modelu je osnovna celica tridimenzionalne proteinske mreže sestavljena iz štirih vlaken, ki so pripeti v ogliščih kocke z dolžino stranice a in se sekajo v sredini kocke (slika 9).



Slika 9: Shematični prikaz deformacije v *modelu osmih vlaken*. Osnovna celica pred deformacijo in po njej [7].

Posamezno vlakno, od oglišča do središča kocke, je tako pred deformacijo dolgo $L = \sqrt{3}a/2$. Po deformaciji, ki raztegne vsako izmed osi kocke za ustrezen faktor λ (λ_1 , λ_2 ali λ_3), je dolžina deformiranega vlakna enaka $\lambda_c L$, kjer je

$$3\lambda_c^2 = \lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2.$$

Če vpeljemo $G(\lambda_c)$ kot gostoto elastične energije in $G(\lambda_c)L$ kot elastično energijo posameznega vlakna, potem je relacija sila-raztezek enaka

$$F(\lambda_c) = \frac{dG(\lambda_c)}{d\lambda_c}.$$

Celotna elastična energija fibrinske mreže je vsota elastične energije vlaken in energijskega prispevka zaradi sprememb volumna

$$U = vLG(\lambda_c) + g(\lambda_1\lambda_2\lambda_3),$$

kjer je $v = 3\sqrt{3}/L^3$ številska gostota vlaken. Vpeljemo *tenzor gradienta deformacije*, $\underline{\underline{F}} = \frac{\partial \underline{y}}{\partial \underline{x}}$, kjer sta \underline{y}

deformirana pozicija in \underline{x} referenčna nedeformirana pozicija, in *Cauchy-Greenov napetostni tenzor* $\underline{\underline{C}} = \underline{\underline{F}}^T \underline{\underline{F}}$. V lastnem koordinatnem sistemu je ta enak

$$C_{11} = \lambda_1^2, C_{22} = \lambda_2^2, C_{33} = \lambda_3^2; \quad C_{ij} = 0, i \neq j.$$

Konjugiran tenzor k Cauchy-Greenovemu napetostnemu tenzorju je *drugi Piola-Kirchoffov napetostni tenzor* $S_{ii} = \frac{\partial U}{\partial C_{ii}}$, ki je razpisan po komponentah enak

$$\begin{aligned} S_{11} &= \frac{vLF(\lambda_C)}{6\lambda_C} + \frac{\lambda_1\lambda_2\lambda_3}{2\lambda_1^2} f(\lambda_1\lambda_2\lambda_3), \\ S_{22} &= \frac{vLF(\lambda_C)}{6\lambda_C} + \frac{\lambda_1\lambda_2\lambda_3}{2\lambda_2^2} f(\lambda_1\lambda_2\lambda_3), \\ S_{33} &= \frac{vLF(\lambda_C)}{6\lambda_C} + \frac{\lambda_1\lambda_2\lambda_3}{2\lambda_3^2} f(\lambda_1\lambda_2\lambda_3), \end{aligned}$$

kjer je z $f(p) = g'(p)$ označen odvod. *Cauchyjev tenzor napetosti*, $\underline{\underline{\sigma}} = \frac{1}{\det(\underline{\underline{F}})} \underline{\underline{F}} \underline{\underline{S}} \underline{\underline{F}}^T$, je tedaj enak

$$\begin{aligned} \sigma_{11} &= \frac{\lambda_1^2}{\lambda_1\lambda_2\lambda_3} S_{11} = \frac{\lambda_1^2}{\lambda_1\lambda_2\lambda_3} \frac{vLF(\lambda_C)}{6\lambda_C} + \frac{1}{2} f(\lambda_1\lambda_2\lambda_3), \\ \sigma_{22} &= \frac{\lambda_2^2}{\lambda_1\lambda_2\lambda_3} S_{22} = \frac{\lambda_2^2}{\lambda_1\lambda_2\lambda_3} \frac{vLF(\lambda_C)}{6\lambda_C} + \frac{1}{2} f(\lambda_1\lambda_2\lambda_3), \\ \sigma_{33} &= \frac{\lambda_3^2}{\lambda_1\lambda_2\lambda_3} S_{33} = \frac{\lambda_3^2}{\lambda_1\lambda_2\lambda_3} \frac{vLF(\lambda_C)}{6\lambda_C} + \frac{1}{2} f(\lambda_1\lambda_2\lambda_3). \end{aligned}$$

Pri eliminiranju neznanih količin upoštevamo eksperimentalno postavitev Browna in Litvinova. Uporabili so cilindrične fibrinske strdke in njih natezno obremenili v vzdolžni smeri, tako da je $\sigma_{22} = \sigma_{33} = 0$ in $\lambda_2 = \lambda_3 = \lambda_*$. Edina neničelna komponenta Cauchyjevega tenzorja napetosti je tako

$$\sigma_{11} = \left(\frac{\lambda_1}{\lambda_*^2} - \frac{1}{\lambda_1} \right) \frac{vLF(\lambda_C)}{6\lambda_C}.$$

Po definiciji je natezna sila enaka produktu napetostnega tenzorja in površine,

$$f_{ap} = \pi(\lambda_* R_0)^2 \sigma_{11} = \left(\lambda_1 - \frac{\lambda_*^2}{\lambda_1} \right) \frac{\pi R_0^2 vLF(\lambda_C)}{6\lambda_C}, \quad \lambda_C = \sqrt{\frac{\lambda_1^2 + 2\lambda_*^2}{3}},$$

kjer je f_{ap} zunanja sila, ki nateza fibrinski strdek. Iz zadnje enačbe je razvidno, da je odziv makroskopskega fibrinskega strdka sorazmeren z relacijo sila-raztezek posameznega vlakna $F(\lambda_C)$. Dokončen izračun odziva fibrinskega strdka na zunanjo silo torej zahteva poznavanje relacije sila-raztezek za posamezno vlakno. Za toga vlakna, kot npr. pri kolagenu, velja linearna zveza med silo in raztezkom

$$F(\lambda_C) = EA(\lambda_C - 1).$$

Približek linearnega raztezka deluje dobro pri raztezanju kolagena do 135%. Pri večjih raztezkih pa se posamezna vlakna začnejo trgati, zaradi česar model odstopa od eksperimentalnih vrednosti. Zanimivo je, da so pri kolagenu odkrili, da gre večina energije za prerazporeditev vlaken v smeri zunanje sile in da se vlakna le malo raztezajo, kar pomeni, da je uporaba linearnega raztezka posameznega vlakna povsem upravičena. Popolnoma drugačna situacija pa je pri raztezanju fibrinskega vlakna, ki se lahko raztegne za več kot 330%, in je zato treba upoštevati tudi nelinearno raztezanje vlaken. V območju majhnih sil je vlakno skoraj nedeformirano in je zato raztezek sorazmeren sili (*f-folded*, nerazvito)

$$x_f = \lambda_f L_f = L_f \left(1 + \frac{F}{EA} \right).$$

Ko pa sila raztezanja vlakna naraste, se molekule fibrina začnejo razvijati. Privzamemo, da se fibrin po razvitju obnaša kot »črvom podobna veriga« (*angl. WLC – worm-like chain*) in je zato raztezek enak (n – *unfolded*, razvito)

$$x_u = \lambda_u L_u = L_u \left(1 - \sqrt{\frac{k_B T N}{4 \xi_p F}} \right),$$

pri tem je ξ_p persistentna dolžina. V ravnovesju razmerje med razvitimi in nerazvitimi molekulami fibrina določa Boltzmannova porazdelitev

$$\frac{n_u}{n_f} = \exp\left(-\frac{\Delta\Pi - F\Delta z / N}{k_B T}\right),$$

kjer je $\Delta\Pi$ razlika prostih energij med nizkoenergijskim nerazvitim in visokoenergijskim razvitim stanjem. Δz ustreza energijskemu razmiku med obema stanjema (*angl. separation between the energy wells*), in N število protofibrilov v vlaknu. Deleža nerazvitih in razvitih vlaken sta torej

$$n_f = \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{\Delta\Pi - F\Delta z / N}{k_B T}\right)}, \quad n_u = 1 - n_f.$$

K raztezk makroskopskega fibrinskega strdka prispevajo tako razvita in kot nerazvita vlakna, zato velja

$$x = x_f + x_u = n_f(F) L_f \left(1 + \frac{F}{EA} \right) + n_u(F) L_u \left(1 - \sqrt{\frac{k_B T N}{4 \xi_p F}} \right),$$

$$\lambda = \frac{x}{L_f} = n_f(F) L_f \left(1 + \frac{F}{EA} \right) + n_u(F) \frac{L_u}{L_f} \left(1 - \sqrt{\frac{k_B T N}{4 \xi_p F}} \right).$$

Sprememba volumna med raztezanjem do sedaj ni bila upoštevana. Delež topila v raztegnjenem volumnu upoštevamo z enačbo

$$\lambda_1 \lambda_*^2 = n_f + C_3 n_u,$$

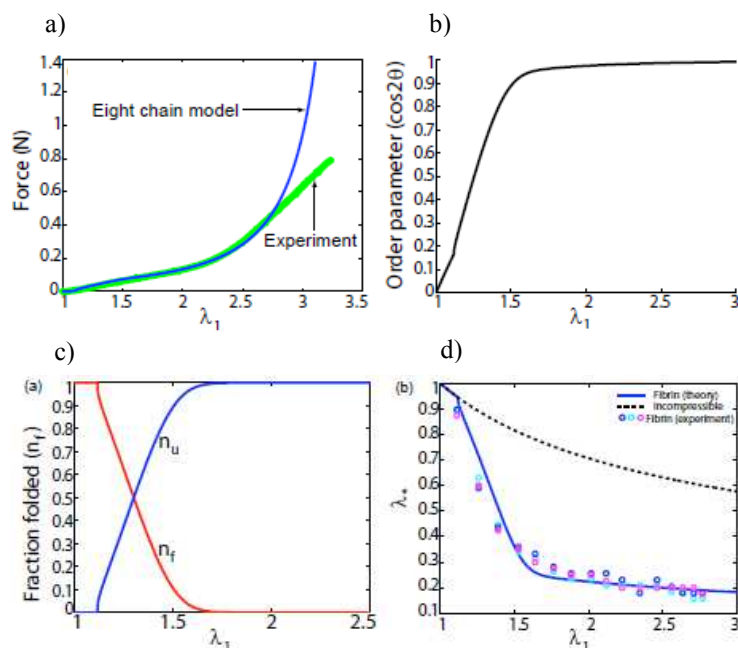
ki nam skupaj z znano relacijo $3\lambda_c^2 = \lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2$ da enačbo

$$\lambda_1^3 - \lambda_1 \lambda_c^2 + 2(n_f + C_3 n_u) = 0.$$

C_3 je razmerje prostornin fibrinskih mrež (vlakna in topilo skupaj) med popolnoma razvito in popolnoma nerazvito konfiguracijo. Prileganje teoretične napovedi *modela osmih vlaken* meritvam je prikazano na sliki 10. Uporabljeni so bili naslednji podatki: povprečni premer vlakna $D = 185$ nm, povprečna dolžina vlakna do razvejišča $L = 20$ μm , Youngov modul razvite faze $E = 14.5$ MPa, persistentna dolžina $\xi_p = 0.8$ nm, razmerje dolžin kontura $L_u/L_f \sim 2.1$, gostota vlaken $\nu = 0.5$ μm^{-3} , začetni radij vzorca $R_0 = 1$ mm ($\pi R_0^2 \nu L / 6 \sim 10^5$). Ker je volumen razvitega strdka zanašal le okrog 10%, se upošteva $C_3 \sim 0.1$. Pri oceni števila N fibrinskih protofibrilov v enem vlaknu privzamemo, da so protofibrili tesno zloženi v vlakno in tvorijo heksagonalno mrežo. Polnilno razmerje heksagonalne celice v preseku je tedaj $\pi/2\sqrt{3}$, tako da je smiselna ocena števila protofibrilov v vlaknu $N = \frac{\pi}{2\sqrt{3}} \frac{D^2}{d^2}$, kjer je d premer protofibrila. Ker je realno v fibrinskem vlaknu le 20% proteinov, je

število protofibrilov $N \approx 0.2 \frac{D^2}{d^2}$. Volumen (410 nm³) in premer ($d \sim 5$ nm) molekule fibrina določajo molska masa in gostota molekul fibrina ($M = 340$ kg/kmol, $\rho = 1.37$ g/cm³) ter njena višina 2×22.5 nm. Iz tega sledi, da je fibrinsko vlakno snopič $N = 1200$ fibrinskih protofibrilov. Razlika prostih

energij med razvito in nerazvito fazo ΔH in razmik Δz sta prosta parametra, ki po prilaganju modela eksperimentalnim vrednostim dobiva vrednosti $\Delta H = 16.5 kT$ in $\Delta z = 19.2$ nm.



Slika 10: (a) Model osmih vlaken se dobro prilega izmerjeni relaciji $f-\lambda_1$ (sila - raztezek). (b) Med natezanjem se vlakna urejajo vzdolž smeri zunanje sile, zato se ureditveni parameter $\cos 2\theta = (\lambda_1^2 - \lambda_*^2) / (\lambda_1^2 + \lambda_*^2)$ približa vrednosti 1. (c) Deleža nerazvitih in razvitih molekul se med raztezanjem spreminjata. (d) Pri deformaciji se volumen fibrinskega strdka drastično zmanjša. Povzeto po [7].

Model osmih vlaken z dvema prostima parametroma se lepo ujema z eksperimentalnimi vrednostmi, ki so jih izmerili Brown in Litvinov s sodelavci, čeprav je model zelo grob približek in ne opisuje dejanske ureditve vlaken v strdku.

7. Zaključek

V seminarju smo predstavili strukturo proteina fibrin, ki ima pomembno vlogo pri uravnavanju hemodinamskega ravnovesja v krvnem obtoku, in njegove izredne elastomehanske lastnosti. Fibrin nastane iz fibrinogena v koagulacijski kaskadi in je osnovni gradnik fibrinskih vlaken. Zaradi narave molekule fibrina in načina polimerizacije so fibrinska vlakna izredno raztegljiva in lahko skoraj reverzibilno prenesejo nekajkratne raztezke. V prihodnje se bodo najverjetneje študije strukture in funkcije fibrina nadaljevale zaradi njegove pomembne fiziološke vloge. Konkretni interes se nanaša in se bo verjetno tudi v prihodnje predvsem na optimizacijo trombolitičnega zdravljenja, prav tako pa ne gre izključiti povsem bazičnih raziskav, ki so usmerjene v elastomehanske lastnosti fibrinske mreže in njene možne aplikacije izven konteksta hemostaze [10].

Literatura

- [1] J. H. Brown, N. Volkmann, G. Jun, A. H. Henschen-Edman, C. Cohen, The crystal structure of modified bovine fibrinogen, *PNAS*, **97**, 85-90 (2000)
- [2] S. J. Everse, H. Pelletier, R. F. Doolittle, Crystallization of fragment D from human fibrinogen, *Protein Science*, **4**, 1013-1016 (1995)
- [3] M. Guthold, W. Liu, E. A. Sparks, L. M. Jawereth, L. Peng, M. Falvo, R. Superfine, R. R. Hantgan, S. T. lord, A comparison of the mechanical and structural properties of fibrin fibers with other protein fibers, *Cell Biochem Biophys*, **49**, 65-181 (2007)
- [4] J. P. Collen, H. Shuman, R. E Ledger et al., The elasticity of an individual fibrin fiber in a clot, *PNAS*, **102**, 9133-9137 (2005)
- [5] W. Liu, L.M. Jawereth et al, Fibrin fibers have extraordinary extensibility and elasticity, *Science*, **313**, 634 (2006)
- [6] A. E. X. Brown, R. I. Litvinov, D.E. Discher, J. W. Weisel, Forced unfolding of coiled-coils in fibrinogen by single-molecule AFM, *Biophys. J. L.*, **92**, L39-L41
- [7] A. E. X. Brown, R. I. Litvinov et al, Multiscale mechanics of fibrin polymer: gel stretching with protein unfolding and loss of water, *Science*, **325**, 741-744 (2009)
- [8] H. J. Qi, C. Oritz, M. C. Boyce, Mechanics of biomacromolecular networks containing folded domains, *J. Eng. Mat. Tech.*, **128**, 509-518 (2006)
- [9] J. W. Weisel, Enigmas of blood lot elasticity, *Science*, **320**, 456-457 (2008)
- [10] P. A. Janmey, J. P. Winner, J. W. Weisel, Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications, *J. R. Soc. Interface*, **6**, 1-10 (2009)