

ABSTRACT:

Introduction:

Atherosclerosis is a chronic inflammation of the arteries, leading to the formation of characteristic lesions in the endothelium (hemostatic plugs which later transform into atherosclerotic plaques). This process is degenerative variable in its development over time. It is caused by the endothelial dysfunction of various, complex etiology, resulting from various factors involved in lipid metabolism disorders, monocyte transmigration and transformation into macrophages, immune response, neovascularization, and increased induction of coagulation processes, where platelets (PLT) play a key role.

The expression of protease-activated receptors (PAR) on the surface of PLT enable the interaction between thrombin and PLT, initiating intracellular signaling pathways. This leads to: the release of inflammatory factors, leukocyte recruitment, PLT adhesion to the endothelium (where the von Willebrand factor, vWF, also plays a significant role), and the formation of edema. Since the activation of PAR receptors is the first step in the interaction of PLT with the endothelium, controlling this step is considered a key therapeutic and diagnostic target.

Objectives:

- Analyze surface PAR-1 expression in PLT and blood microparticles (PMP) activated by the synthetic thrombin analog (TRAP) in the course of obliterative atherosclerosis (AO), diabetic macroangiopathy in type 2 diabetes (MD), and in the control group (without diagnosed atherosclerosis).
- Evaluate the impact of selected PAR-1 genetic polymorphisms on the development and prognosis of AO and MD.
- Determine the relationship between PAR-1 levels and selected anthropometric, metabolic, clinical, and hemostatic and inflammatory parameters.
- Assess the significance of PMP activation in the pathogenesis of AO and MD.
- Test the usefulness of cytometric PMP imaging.

Materials: The study group consisted of:

- Patients with MD (n=34; age: 60.88±7.51)
- Patients with AO (n=43; age: 56.69±5.72)
- Control group - volunteers without atherosclerosis (n=18; age: 57.50±2.12).

Methods:

- Flow cytometry with appropriate antibodies was used to determine PAR-1 activation in PLT and PMP. Platelet-rich plasma, pre-treated or not with TRAP solution, was analyzed.
- PAR-1 expression was measured at the transcription level using RT-PCR.
- Three types of PAR-1 polymorphisms were identified [506 I/D (dbSNP: rs35900074), 1426 C/T (dbSNP: rs32934), IVSn-14 (dbSNP: rs168753)].
- The aggregation ability of PLT and PMP was assessed using aggregometry.
- PMP imaging was performed by flow cytometry.
- Quantitative evaluation of selected hemostasis and inflammatory factors was conducted using ELISA tests.
- Laboratory and clinical data archived in the hospital's electronic system (KS-MEDIS) were used.

Statistical analysis was performed using Statistica 13.3 under the license of the Wroclaw Medical University. Differences between MD and AO were studied by modeling the likelihood of atherosclerosis among participants with AO or MD.

The project received the Bioethics Committee approval No. KB-174/2011.

The study was of a pilot nature.

Results:

- A significant increase in PAR-1 expression activated by TRAP in the MD group compared to the AO and control groups (25.31 ± 10.18 vs. 18.63 ± 12.98 vs. $17.14 \pm 8.72\%$; $p=0.030$, $p=0.011$ – respectively).
- Homozygotes -506 D/D predominated in all study groups.
- Mutations in the PAR-1 gene (-506 D/D; IVS-14 A/A) promoting PLT activation and aggregation were significantly more common in the MD group, while in the AO group, despite the frequent occurrence of IVS-14 A/A homozygotes, PAR-1 expression was lower.
- Significantly lower levels of activated PMP in the AO group compared to the MD group (15.56 ± 13.82 vs. $23.25 \pm 15.95\%$; $p=0.045$) and a significant increase in both non-activated (19.21 ± 14.33 , vs. $9.59 \pm 5.80\%$; $p=0.007$) and activated PMP (23.25 ± 15.95 vs. $11.51 \pm 10.70\%$; $p=0.003$) in MD patients compared to the control group.
- Significantly lower vWF levels in the AO group compared to the MD group (153.45 ± 28.12 vs. $174.36 \pm 33.24\%$; $p=0.013$).
- Interaction analysis showed that in a patient with a relative PMP count of 10.90%, an increase in PAR-1+TRAP1 by 1 percentage point reduced the likelihood of AO by 5.93%, while an increase in BMI by 1 reduced the likelihood of AO by 24.84%.

Conclusions:

1. Significantly lower BMI, glucose levels, and urea levels, as well as a significantly lower claudication distance coefficient, were demonstrated in the AO group compared to the MD group.
2. PLTs from MD patients showed a higher predisposition to initiating and developing atherosclerotic disorders with PAR-1 activation than PLTs from AO patients, with significantly more intense PAR-1 expression on activated PLTs in AO men compared to AO women.
3. The MD group had significantly more frequent PAR-1 gene mutations (-506 D/D; IVS-14 A/A) promoting PLT activation and aggregation. In contrast, the AO group, despite the frequent occurrence of IVS-14 A/A homozygotes, had lower PAR-1 expression, possibly due to the more frequent occurrence of -506 I/D heterozygotes, indicating the protective properties of the I allele.
4. PMP activation by TRAP proved useful in differentiating the AO group from the MD group. However, this observation needs to be confirmed by studies on a much larger patient population.
5. Significantly lower vWF levels were found in the AO group compared to the MD group, which contributes to slower atherogenic and inflammatory processes. Lower vWF levels reduce both PLT adhesion to the endothelium and the number of factor VIII molecules (an acute phase protein) transported by vWF.
6. Interaction analysis showed that while the percentage of PMP did not affect the likelihood of AO (among patients with AO or MD), at high PMP percentages (above 23%), the intensity of PAR-1 activation by TRAP (thrombin substitute) became a factor increasing the likelihood of AO.
7. The studies suggest that PAR-1, present on both PLT and PMP, may become a potential diagnostic-therapeutic parameter in AO and MD, although this requires confirmation in further research.

STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Wstęp:

Miażdżyca to przewlekłe zapalenie tętnic, w wyniku którego w śródbłonku naczyń formowane są charakterystyczne zmiany (najpierw tzw. pierwotne czopy hemostatyczne, które przekształcane są następnie w blaszki miażdżycowe). Proces ten ma charakter zwyrodnieniowy, przy czym może ulegać zarówno progresji jak i regresji. Jest to spowodowane złożoną etiologią dysfunkcji śródbłonka naczyń, wynikającą z działania różnych czynników, zaangażowanych w: zaburzenia metabolizmu lipidów, transmigrację monocytów i ich przekształcanie w makrofagi, reakcje immunologiczne, neowaskularyzację oraz zwiększoną indukcję procesów krzepnięcia krwi, w której kluczową rolę odgrywają płytki krwi (PLT).

Receptory aktywowane proteazami (PAR) obecne na powierzchni PLT umożliwiają interakcję trombiny z PLT, w wyniku której dochodzi do inicjowania wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Prowadzi to do uwalniania czynników zapalnych, rekrutacji leukocytów, adhezji PLT do śródbłonka (w której istotną rolę odgrywa również czynnik von Willebranda, vWF) oraz powstawania obrzęku. Ponieważ aktywacja receptorów PAR jest pierwszym etapem w interakcji PLT ze śródbłonkiem, etap ten uważany jest za kluczowy cel terapeutyczny i diagnostyczny.

Cele pracy:

- analiza ekspresji powierzchniowego PAR-1 w PLT i w mikropłytkach krwi (PMP) aktywowanych syntetycznym analogiem trombiny (TRAP) w przebiegu miażdżycy zarostowej (MZ), makroangiopatii cukrzycowej w cukrzycy typu 2 (MC) i w grupie kontrolnej (bez rozpoznanej miażdżycy)
- ocena wpływu wybranych polimorfizmów genetycznych PAR-1 na rozwój i rokowania w MZ i MC
- określenie zależności pomiędzy stężeniem PAR-1, a wartościami wybranych parametrów antropometrycznych, metabolicznych, klinicznych oraz hemostazy i stanu zapalnego
- próba ustalenia znaczenia aktywacji PMP w patogenezie MZ i MC
- sprawdzenie przydatności cytometrycznego obrazowania PMP

Material:

Badaną grupę stanowili:

- pacjenci z MC (n=34; wiek: 60,88±7,51)
- pacjenci z MZ (n=43; wiek: 56,69±5,72)
- grupa kontrolna, wolontariusze bez miażdżycy (n=18; wiek: 57,50±2,12)

Metody:

- W celu określenia aktywacji PAR-1 w PLT i PMP przeprowadzono cytometrię przepływową z udziałem odpowiednich przeciwciał; badaniu poddawano osocza bogatopłytkowe potraktowane uprzednio (bądź nie) roztworem TRAP
- Ekspresji PAR-1 dokonywano na poziomie transkrypcji techniką RT-PCR
- w badaniach określono 3 typy polimorfizmów PAR-1 [506 I/D (dbSNP: rs35900074), 1426 C/T (dbSNP: rs32934), IVSn-14 (dbSNP: rs168753)]
- Określono zdolności PLT i PMP do agregacji techniką agregometrii
- Przeprowadzono obrazowanie PMP za pomocą cytometrii przepływowej
- Dokonano oceny ilościowej wybranych czynników hemostazy i stanu zapalnego za pomocą testów ELISA
- Korzystano z danych laboratoryjnych i klinicznych zarchiwizowanych w elektronicznym systemie szpitalnym (KS-MEDIS)

Analizę statystyczną przeprowadzono w programie Statistica 13.3 na licencji Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Różnice między MC oraz MZ badano za pomocą modelowania szansy występowania miażdżycy wśród uczestników badania chorujących na MZ lub MC.

Projekt uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej nr KB-174/2011.

Badania miały charakter pilotażowy.

Wyniki:

- Istotny wzrost ekspresji PAR-1 aktywowanych TRAP w grupie z MC w porównaniu do grupy z MZ i grupy kontrolnej ($25,31 \pm 10,18$ vs. $18,63 \pm 12,98$ vs. $17,14 \pm 8,72\%$; $p=0,030$, $p=0,011$ – odpowiednio)
- W każdej z badanych grup dominowały homozygoty -506 D/D
- W grupie z MC znacząco częściej występowały mutacje genu PAR-1 (-506 D/D; IVS-14 A/A) sprzyjające aktywacji i agregacji PLT, natomiast w grupie z MZ, mimo częstego występowania homozygoty IVS-14 A/A, ekspresja PAR-1 była niższa
- Wykazano znacząco niższy poziom aktywowanych PMP w grupie z MZ w porównaniu do grupy z MC ($15,56 \pm 13,82$ vs. $23,25 \pm 15,95\%$; $p=0,045$) oraz istotny wzrost poziomu zarówno nieaktywowanych ($19,21 \pm 14,33$ vs. $9,59 \pm 5,80\%$; $p=0,007$) jak i aktywowanych PMP ($23,25 \pm 15,95$ vs. $11,51 \pm 10,70\%$; $p=0,003$) u pacjentów z MC w porównaniu do grupy kontrolnej
- Wykazano istotnie niższe stężenie vWF w grupie z MZ w porównaniu do grupy z MC ($153,45 \pm 28,12$ vs. $174,36 \pm 33,24\%$; $p=0,013$)
- Analiza interakcji wykazała, że u pacjenta ze względną liczbą PMP równą 10,90%, wzrost PAR-1+TRAP1 o 1 punkt procentowy powodował zmniejszenie szansy na występowanie MZ o 5,93% natomiast wzrost BMI o 1 powodował zmniejszenie szansy na występowanie MZ o 24,84%

Wnioski:

1. Wykazano istotnie niższe wartości BMI, stężenia glukozy i stężenia mocznika oraz istotnie niższe wartości współczynnika dystansu chromania w grupie z MZ w porównaniu do grupy z MC.
2. PLT osób z MC wykazały wyższą predyspozycję do inicjacji i rozwoju zaburzeń miażdżycowych przebiegających z aktywacją PAR-1 niż PLT osób z MZ, przy czym ekspresja PAR-1 na aktywowanych PLT mężczyzn z MZ zachodziła znacząco intensywniej niż na aktywowanych PLT kobiet z MZ.
3. Wykazano, że w grupie z MC znacząco częściej występowały mutacje w genu PAR-1 (-506 **D/D**; IVS-14 **A/A**) sprzyjające aktywacji i agregacji PLT, natomiast w grupie z MZ, mimo częstego występowania homozygoty IVS-14 **A/A**, ekspresja PAR-1 była niższa, co mogło być spowodowane tym, że w grupie tej częściej występowała heterozygota -506 **I/D**; wskazuje to na protekcyjne właściwości allelu I.
4. Aktywowanie PMP za pomocą TRAP okazało się użyteczną metodą w różnicowaniu grupy z MZ od grupy z MC. Obserwację tę należy jednak potwierdzić poprzez przeprowadzenie badań na znacznie większej populacji pacjentów.
5. Wykazano istotnie niższe stężenia vWF w grupie z MZ w porównaniu do grupy z MC, co w konsekwencji przyczynia się do wolniejszego przebiegu procesów miażdżycogennych i zapalnych – niższy poziom vWF zmniejsza zarówno adhezję PLT do śródbłonnka oraz liczbę cząsteczek czynnika VIII (białka ostrej fazy) przenoszonego przez vWF.
6. Analiza interakcji wykazała, że choć odsetek PMP nie wpływał na szansę na MZ (wśród chorych na MZ lub MC), to przy wysokich wartościach odsetka mikroplatek (powyżej 23%) nasilenie aktywacji PAR-1 przez TRAP (substytut trombiny) stawało się czynnikiem zwiększającym szansę na MZ.
7. Badania sugerują, że PAR-1 obecny zarówno na PLT jak i PMP może okazać się potencjalnym parametrem diagnostyczno-terapeutycznym w MZ i MC, co jednak wymaga potwierdzenia w kolejnych badaniach.