



**UNIwersytet Medyczny**  
**IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU**

**ANALIZA EKSPRESJI RECEPTORA PAR-1**  
**W PŁYTKACH KRWI ORAZ WYBRANYCH**  
**POLIMORFIZMÓW GENU PAR-1**  
**U PACJENTÓW Z MIAŻDŻYCĄ ZAROSTOWĄ**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor pracy: **dr hab. Katarzyna Madziarska, prof. UMW**

**mgr Urszula Jakobsche-Policht**

Wrocław 2024 r.

*Serdecznie dziękuję:*

***Promotorowi***

***Pani dr hab. n. med. Katarzynie Madziarskiej, prof. UMW***

*Składam serdeczne podziękowania za naukę i wsparcie, okazaną życzliwość i cenne wskazówki w przygotowaniu niniejszej pracy.*

***Kierownikowi Kliniki Angiologii, Diabetologii i Nadciśnienia Tętniczego UMW 1995-2019***

***Panu prof. dr hab. n.med. Rajmundowi Adamcowi***

*Serdecznie dziękuję za inspirację naukowo-badawczą, motywację i słowa zachęty.*

***Kierownikowi Grantu***

***Pani dr n.med. Dorocie Bednarskiej – Chabowskiej***

*Serdecznie dziękuję za stworzenie mi możliwości przeprowadzenia badań i ukończenie projektu badawczego oraz wsparcie w tworzenie bazy kliniczno-naukowej.*

***Pani dr n.med. Agnieszce Bronowickiej – Szydelko***

*Składam ogromne podziękowania za inspirację, okazaną życzliwość i cierpliwość oraz ogrom dobrego serca, olbrzymią i wszechstronną pomoc.*

***Rodzinie: Mężowi Jurkowi, córce Kasi i synowi Robertowi***

*Dziękuję za okazane wsparcie duchowe i podarowany czas.*

*Badania zostały sfinansowane ze środków:*

*GRANT UCZELNI NR 1634: Analiza ekspresji genu homologu białka PAR-5 (białko 14-3-3) u pacjentów z miażdżycą zarostową i makroangiopatią.*

# SPIS TREŚCI

<b>1. WSTĘP</b> .....	<b>1</b>
1.1. Miażdżycza zarostowa a makroangiopatia cukrzycowa .....	3
Czynniki ryzyka miażdżycy .....	3
Miażdżycza zarostowa .....	6
Makroangiopatia cukrzycowa .....	6
1.2. Hemostaza w miażdżycy, rola płytek i mikroplatek krwi.....	10
Płytki krwi (PLT).....	11
1.2.2. Mikroplateki (PMP).....	14
1.3. RECEPTORY AKTYWOWANE PROTEOLITYCZNIE (PAR) .....	18
Regulacja PAR-1 .....	21
Rola PAR-1 .....	22
Polimorfizmy PAR-1 .....	25
<b>2. CEL PRACY</b> .....	<b>27</b>
<b>3. MATERIAŁY I METODY</b> .....	<b>28</b>
3.1. Charakterystyka i ocena kliniczna grupy badanej i grupy kontrolnej .....	28
3.2. Określanie poziomu aktywacji receptora PAR-1 w cytometrii przepływowej .....	31
3.3. Badania polimorfizmów w obrębie genu PAR-1 .....	34
<b>Sekwencja starterów</b> .....	35
3.4. Określanie agregacji płytek krwi .....	39
3.5. Oceny ilościowe wybranych parametrów hemostazy i stanu zapalnego .....	41
3.6. Diagnostyczne parametry biochemiczne.....	44
3.7. Opracowanie statystyczne wyników .....	45
<b>4. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE</b> .....	<b>46</b>
4.1. Ocena antropometryczna, laboratoryjna i kliniczna miażdżycy zarostowej (MZ) w porównaniu i makroangiopatii cukrzycowej (MC) .....	46
4.2. Ocena poziomu aktywacji powierzchniowego PAR-1.....	51
4.3. Określenie polimorfizmów genu PAR-1 .....	55
4.4. Ocena agregacji mikroplatek (PMP) i płytek krwi (PLT).....	60
4.5. Analiza ilościowa wybranych czynników hemostazy i stanu zapalnego .....	64
4.6. Badanie różnic między miażdżycą zarostową (MZ), a makroangiopatią cukrzycową (MC) poprzez analizę związku zmiennych z szansą występowania miażdżycy – wśród chorych na jedną ze wspomnianych chorób.....	67
<b>5. DYSKUSJA</b> .....	<b>72</b>
5.1. Porównanie miażdżycy zarostowej i makroangiopatii cukrzycowej w kontekście oceny antropometrycznej, laboratoryjnej i klinicznej.....	73

5.2. Ocena poziomu aktywacji powierzchniowego PAR-1.....	76
5.3. Określenie polimorfizmów genu PAR-1.....	79
5.4. Ocena agregacji mikroplatek (PMP) i płytek krwi (PLT).....	83
5.5. Oceny ilościowe wybranych parametrów hemostazy i stanu zapalnego .....	85
5.6. Badanie różnic między miażdżycą zarostową i makroangiopatią cukrzycową .....	89
<b>6. WNIOSKI .....</b>	<b>90</b>
<b>7. STRESZCZENIE .....</b>	<b>91</b>
<b>8. ABSTRACT .....</b>	<b>93</b>
<b>9. LITERATURA .....</b>	<b>95</b>
<b>10. OZNACZENIE SKRÓTÓW .....</b>	<b>112</b>
<b>11. SPIS RYCIN I TABEL .....</b>	<b>116</b>
<b>12. DODATEK .....</b>	<b>120</b>
12.1. Budowa i regulacja funkcja śródbłonna.....	120
12.2. Czynniki wpływające na rozwój dysfunkcji śródbłonna .....	122
12.3. Niestabilność blaszki miażdżycowej .....	128
12.4. Osoczowy układ krzepnięcia krwi .....	129
12.5. Osoczowy układ fibrynolizy .....	132
12.6. Białka zaangażowane w proces miażdżycy .....	133
<b>13. OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE.....</b>	<b>138</b>

## 1. WSTĘP

Miażdżycą nazywany jest przewlekły i uogólniony stan zapalny tętnic, w wyniku którego pojawiają się zmiany zwyrodnieniowo-wytwórcze w błonie wewnętrznej i środkowej aorty, tętnic wieńcowych, mózgowych i kończyn, (tzw. makroangiopatie). Do najważniejszych powikłań narządowych miażdżycy zaliczamy chorobę wieńcową, udar niedokrwienny mózgu oraz przewlekłe niedokrwienie kończyn dolnych<sup>1</sup>. Najczęściej występuje jako miażdżycza zarostowa (MZ) lub miażdżycowe powikłania cukrzycy typu 2 (tzw. makroangiopatia cukrzycowa, MC; dotyczy zmian miażdżycowych rozsianych w różnych odcinkach tętnic). Oba te powikłania należą do chorób cywilizacyjnych XXI wieku i uważane są za zasadniczy, globalny i wciąż narastający problem zdrowotny. Przeprowadzona metaanaliza wykazała, że choroba niedokrwienna kończyn dolnych oraz choroba tętnic obwodowych (ang. *Peripheral Artery Disease*, PAD) manifestuje się jako przewlekły proces miażdżycowy we wszystkich populacjach<sup>2</sup>. Zwiększony wzrost zachorowalności obserwowany jest w krajach niskorozwiniętych, co wyraźnie wskazuje, że choroba ta dotyczy już nie tylko krajów wysokorozwiniętych, ale jest schorzeniem o zasięgu globalnym<sup>2</sup>. W 2000 roku szacowana liczba osób z PAD wynosiła około 164 mln, natomiast w roku 2010 wzrosła do ok. 202 mln na całym świecie<sup>1,3</sup>. Badania epidemiologiczne wykazują, że przewlekłe niedokrwienie kończyn dolnych stwierdza się u około 5% populacji powyżej 50 roku życia. Częstość zachorowań u mężczyzn jest prawie trzykrotnie większa niż u kobiet, ale po 70-tym roku życia staje się niemal identyczna u obu płci. W Polsce do lekarza tylko po pierwszą poradę zgłasza się corocznie 40 000 chorych z miażdżycą tętnic kończyn dolnych. U około 40% chorych z niedokrwieniem kończyn współistnieje nadciśnienie tętnicze, u 25% choroba niedokrwienna serca, a u 10 do 15% miażdżycza tętnic mózgowia.

Miażdżycza była dawniej postrzegana jako nieodwracalny i nieunikniony proces o charakterze zwyrodnieniowym, obecnie – przeciwnie – coraz bardziej dostrzegany jest jej zmienny przebieg. Badania i dane kliniczne wykazują, że blaszka miażdżycowa ewoluuje w wielu kierunkach – może ulegać progresji, regresji, a nawet zmieniać swoje właściwości, wpływając na przebieg choroby<sup>4</sup>. W przewlekłym niedokrwieniu tętniczym, zgodnie z klasyfikacją Fountaine'a, wyróżnia się 4 klasyczne okresy:

**Okres I** – skąpo objawowy lub bezobjawowy; dolegliwości słabo wyrażone i niespecyficzne (drętwienia i mrowienia kończyn, zwiększona wrażliwość na zimno i męczliwość kończyn), zazwyczaj są lekceważone przez pacjentów.

**Okres II** – bólów wysiłkowych czyli chromania przestankowego, specyficznego rodzaju bólu, który powstaje z powodu niedoboru tlenu w pracujących mięśniach. Charakteryzuje się on regularnością tzn. po wykonaniu określonej ilości kroków, zmusza chorego do przerywania wysiłku i odpoczynku, po którym chory kontynuuje marsz do wystąpienia kolejnego ataku bólu. Arbitralnie przyjęto okres II dzielić na dwa podokresy:

**II a** – chromanie przestankowe powyżej 200 m

**II b** – chromanie przestankowe poniżej 200 m

**Okres III** – bólów spoczynkowych, początkowo jedynie nocnych, z czasem (wraz z narastającym deficytem ukrwienia), rozciągających się na całą dobę; z największą intensywnością występują w obwodowych częściach kończyn, czyli w palcach i w stopach.

**Okres IV** – martwicy i/lub owrzodzeń niedokrwiennych, którym towarzyszą bóle spoczynkowe o dużym nasileniu<sup>5,6</sup>.

Dolegliwości subiektywne pacjenta zostają obiektywizowane przez badania fizykalne:

- oglądanie kończyn dolnych
- palpacje tętnic: rutynowe badanie obejmuje aortę brzuszną, tętnice udowe i podkolanowe oraz tętnice piszczelowe tylne i tętnice grzbietowe stopy
- osłuchiwanie: aorty, tętnic biodrowych, udowych wspólnych i powierzchniowych wzdłuż ich przebiegu
- próba czynnościowa Ratschowa – badanie pozwalające określić, poziom zamknięcia światła tętnicy w kończynie dolnej lub obręczy barkowej.

W kolejnym etapie diagnostyki wykonuje się:

- próbę marszową na bieżni ruchomej według dostosowanego do badania kończyn dolnych protokołu
- segmentarny pomiar ciśnień skurczowych na kończynach dolnych metodą Dopplera, z którego wylicza się wskaźnik kostka/ramię (K/R).

W warunkach prawidłowych współczynnik K/R jest równy lub większy od 1,0. Wartości współczynnika poniżej 1,0 świadczą o hemodynamicznie istotnych zwężeniach lub niedrożnościach w tętniczym układzie kończyn dolnych. U chorych w I okresie współczynnik K/R wynosi 0,89-0,7; u chorych z chromaniem przestankowym 0,69-0,41; u pacjentów z bólami spoczynkowymi 0,4-0,2; w kończynach z martwicą lub owrzodzeniami niedokrwiennymi poniżej 0,2<sup>7</sup>.

Obraz kliniczny MZ zależy od długości niedrożnego odcinka tętnicy, stopnia rozwoju krążenia obocznego oraz postaci niedrożności, np.: aortalno-biodrowa obejmuje końcowy

odcinek aorty brzusznej oraz tętnice biodrowe, udowo-podkolanowa umiejscowiona jest w kanale przywodzicieli tętnicy udowej powierzchownej, obwodowa pojawia się w tętnicach goleni poniżej tętnicy podkolanowej, w niedrożności wielopoziomowej zmiany miażdżycowe pojawiają się po tej samej stronie na różnych poziomach i są oddzielone wyraźnie drożnymi odcinkami tętnicy.

## 1.1. Miażdżycza zarostowa a makroangiopatia cukrzycowa

### Czynniki ryzyka miażdżycy

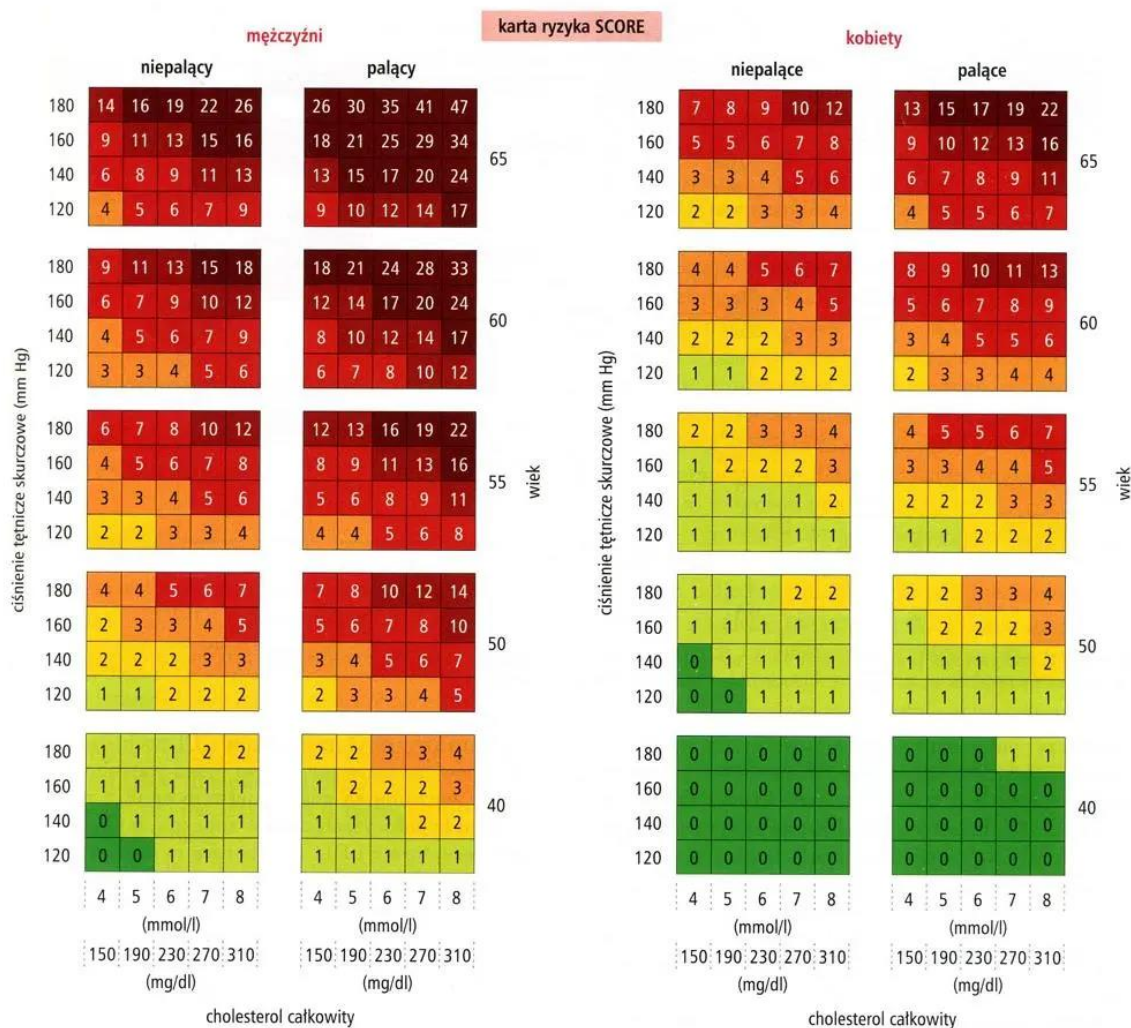
Główną przyczyną miażdżycy jest dysfunkcja śródbłonka naczyniowego spowodowana gromadzeniem się cząsteczek cholesterolu i lipidów w błonie środkowej i wewnętrznej tętnic, co indukuje reakcję zapalną, prowadzącą do powstawania tzw. blaszki miażdżycowej. Procesowi temu sprzyjają różne czynniki, które podzielono na modyfikowalne i niemodyfikowalne<sup>3,8</sup>. Do czynników modyfikowalnych zalicza się: nikotynizm, hiperlipidemię, nadciśnienie tętnicze, obniżone stężenie lipoprotein o wysokiej gęstości (ang. *High Density Lipoprotein*, HDL), otyłość brzuszna, cukrzycę, aktywację czynników stanu zapalnego i małą aktywność fizyczną, a także warunki socjoekonomiczne, stres i depresję<sup>9,10</sup>. Wiadomo, że dym tytoniowy uszkadza śródbłonek naczyniowy, prowadząc do zmniejszenia produkcji tlenku azotu (NO), a tym samym zmniejszenia elastyczności ścian naczyń. Składniki zawarte w dymie tytoniowym sprzyjają także zwiększeniu ekspresji cząsteczek adhezyjnych oraz agregacji i adhezji płytek krwi oraz powstawaniu wolnych rodników<sup>11</sup>. Istnieje wyraźny związek między paleniem papierosów a incydentami sercowo-naczyniowymi<sup>12</sup>. Nikotynizm jest głównym czynnikiem prowadzącym do uszkodzenia śródbłonka naczyniowego. W hiperlipidemii, czyli zwiększonej ilości cholesterolu całkowitego, trójglicerydów i lipoproteiny o niskiej gęstości (ang. *Low Density Lipoprotein*, LDL), znaczenie mają przede wszystkim cząsteczki LDL, które po przyłączeniu się do śródbłonka naczyń ulegają oksydacji (powstaje oxLDL). Powoduje to aktywację układu immunologicznego – monocyty/makrofagi pochłaniają oxLDL tworząc komórki piankowate, które wraz z płytkami krwi formują blaszkę miażdżycową. Powodem hiperlipidemii może być niewłaściwa dieta, jak również uwarunkowania genetyczne i zaburzenia metabolizmu wątroby<sup>13</sup>. Ponadto, dynamiczny i wzmożony przepływ krwi przez naczynie tętnicze (nadciśnienie tętnicze) powoduje uszkodzenie śródbłonka naczyniowego i inicjuje przyłączanie się LDL do śródbłonka. Wzrost ciśnienia skurczowego powyżej 140 mmHg zwiększa ryzyko występowania chorób sercowo-

naczyniowych<sup>14</sup>. Wiadomo również, że pacjenci z rozpoznaną cukrzycą są narażeni częściej na wystąpienie miażdżycy przed 50 r.ż.<sup>15</sup> – wskutek hiperglikemii intensywnie zachodzi zjawisko glikacji białek i wzrasta aktywność markerów stanu zapalnego m.in. czynnika martwicy nowotworu  $\alpha$  (ang. *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ), interleukiny 6 (ang. *Interleukin 6*, IL-6), D-dimerów i fibrynogenu, co doprowadza do powstania mikro – i makroangiopatii. Również otyłość, czyli przyrost wewnątrzbrzuszej tkanki tłuszczowej (wisceralnej), wzmaga syntezę markerów stanu zapalnego, tj.: IL-6 oraz TNF- $\alpha$ <sup>16</sup>. Ponadto z otyłością często współwystępują inne czynniki ryzyka, tj.: cukrzyca, nadciśnienie tętnicze i hiperlipidemia. Wykazano, że w przebiegu nadciśnienia tętniczego, cukrzyca, otyłości oraz ostrych stanów zapalnych obserwuje się zwiększoną aktywność białek ostrej fazy stanu zapalnego, szczególnie fibrynogenu i reaktywnego białka C (ang. *C-reactive protein*, CRP), które promują rozwój odpowiedzi zapalnej w ścianie naczyń tętniczych. Białka te przyczyniają się również do powstawania pęknięć w blaszce miażdżycowej, agregacji płytek krwi oraz tworzenia zakrzepów w ścianach naczyń<sup>17</sup>. Nadmierne spożywanie alkoholu etylowego sprzyja powstawaniu nadciśnienia tętniczego krwi oraz zwiększa aktywność układu immunologicznego, co bezpośrednio wpływa na kondycję śródbłonna naczyniowego. Niewielkie ilości etanolu mogą natomiast działać protekcyjnie na układ sercowo-naczyniowy, poprzez zwiększenie stężenia HDL oraz wrażliwości na insulinę<sup>18</sup>. Do czynników niemodyfikowalnych należą: wiek, płeć oraz czynniki genetyczne. Obecnie wiadomo, że rozwój miażdżycy dotyczy zarówno kobiet, jak i mężczyzn, przy czym u kobiet miażdżycy najczęściej rozwija się po okresie menopauzy, podczas gdy u mężczyzn pojawia się znacznie wcześniej<sup>19</sup>. Skłonność do hipercholesterolemii jest dziedziczona i wynika z mutacji genu kodującego receptor dla LDL (ang. *Low Density Lipoprotein Gene*, LDLG). Wysokie stężenia LDL prowadzą do występowania chorób sercowo-naczyniowych w bardzo młodym wieku<sup>20</sup>. Ponadto mutacje mogą pojawić się w genach kodujących białka układu immunologicznego, zaangażowanych w formowanie blaszki miażdżycowej wskutek nasilonego stanu zapalnego tętnic np. zmiana ekspresji genu DEGs (ang. *Differentially Expressed Genes*), powiązana z odpowiedzią immunologiczną i przewlekłym stanem zapalnym<sup>21</sup>, pojawia się wraz ze zmianą rozwoju blaszki miażdżycowej i pozwala na różnicowanie choroby. Rozwojowi miażdżycy sprzyjają również genetyczne zaburzenia czynników krzepnięcia krwi oraz czynników regulujących układ renina-angiotensyna-aldosteron, powodując nadciśnienie tętnicze<sup>22</sup>.

Podjęcie działań prewencyjnych, mających na celu eliminację (lub co najmniej maksymalną redukcję) wpływu poszczególnych czynników pozwala na zmniejszenie ryzyka



zdarzenia sercowo-naczyniowego. Ponadto opracowano system oceny ryzyka zgonu w ciągu 10 lat z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego dla populacji zdrowej (ang. *Systematic COronary Risk Evaluation*, SCORE), w którym uwzględniono pięć czynników: wiek, płeć, palenie papierosów, ciśnienie tętnicze skurczowe krwi [mmHg] oraz stężenie cholesterolu całkowitego [mmol/l] (Rycina 1.1).



**Rycina.1.1.** Tablica SCORE 10-letnie ryzyko incydentu sercowo-naczyniowego zakończonego zgonem w zależności od płci, wieku, ciśnienia tętniczego skurczowego, stężenia cholesterolu całkowitego i palenia papierosów (wg ESC 2003) [Źródło: Narodowy Instytut Kardiologii. Państwowy Instytut Badawczy. [www.ikard.pl/karta-ryzyka-score.html](http://www.ikard.pl/karta-ryzyka-score.html) ]

Wartość ryzyka  $\geq 5\%$  określane jest jako wysokie. Osoby z chorobą sercowo-naczyniową i/lub z cukrzycą mają duże ryzyko sercowo-naczyniowe niezależnie od innych czynników ryzyka.

## Miażdżyca zarostowa

Miażdżyca zarostowa kończyn dolnych (MZ) to przewlekła choroba o wieloczynnikowej etiologii, dotycząca tętnic elastycznych i dużych tętnic mięśniowych, cechująca się gromadzeniem blaszek miażdżycowych, a następnie ich erozją lub pękaniem, szczególnie tych o wysokim ryzyku, zwanych "wrażliwymi". Podstawą choroby jest złożony, wieloczynnikowy proces zapalny prowadzący do uszkodzenia ścian naczyń i powstawania blaszek miażdżycowych w wyniku dynamicznych czynników lokalnych i ogólnoustrojowych<sup>23</sup>. Mechanizmy zapalne odgrywają rolę nie tylko w początkowym etapie powstawania miażdżycy, ale także w jej postępie i w procesie pęknięcia blaszki miażdżycowej, co prowadzi do wystąpienia ostrych powikłań klinicznych<sup>24</sup>. W MZ występują niedrożności lub zwężenia naczyń tętniczych w obszarze od prenerkowego odcinka aorty do tętnic stóp i przewlekłego niedokrwienia kończyn dolnych. Miażdżyca jest przyczyną 98% przypadków niedokrwienia kończyn dolnych<sup>23,25</sup>.

Uszkodzenie śródbłonna w sferze czynnościowej, indukujące powstawanie zmiany miażdżycowej, mogą wywołać: toksyczne składniki dymu tytoniowego, stres oksydacyjny związany z nadmiernym powstaniem reaktywnych form tlenu, przeciwciała powstałe wskutek obecności patogenu np. *Chlamydia pneumoniae*, końcowe produkty zaawansowanej glikacji (ang. *Advanced Glycation End-Products*, AGEs) intensywnie formowane w zaburzeniach metabolizmu węglowodanów np. w przebiegu cukrzycy oraz zmodyfikowane LDL w hipercholesterolemii<sup>26</sup>.

## Makroangiopatia cukrzycowa

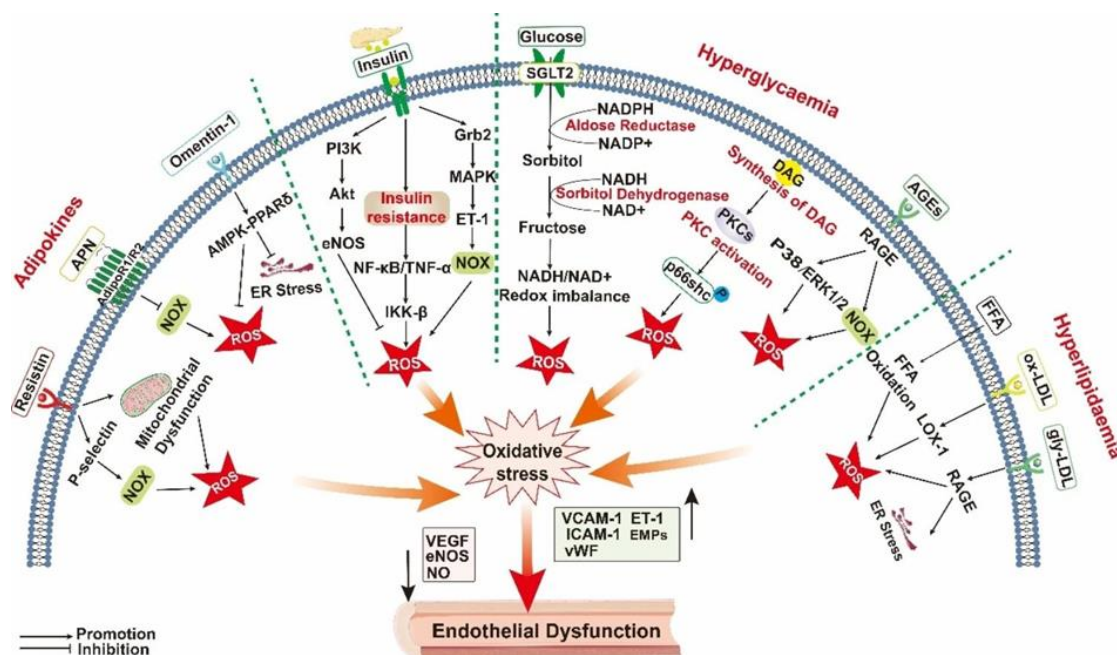
Makroangiopatia cukrzycowa (MC) uważana jest za miażdżycę wtórną do cukrzycy<sup>27</sup>, które obejmuje wieloaspektowe mechanizmy molekularne, prowadzące do dysfunkcji i uszkodzenia dużych naczyń krwionośnych<sup>28</sup>. Często przyczynia się do zaburzeń naczyń mózgowych, powoduje chorobę niedokrwioną serca, chorobę tętnic obwodowych lub inne choroby naczyniowe, które są głównymi przyczynami obniżania jakości życia pacjentów, a nawet ich zgonów<sup>27</sup>. Klinicznie MC ujawnia się jako choroba wieńcowa, udar mózgu lub przewlekłe niedokrwienie kończyn dolnych. U osób chorych na cukrzycę (ang. *Diabetes Mellitus*, DM) zmiany miażdżycowe charakteryzują się wczesnym i dynamicznym przebiegiem oraz zdecydowanie gorszym rokowaniem – u pacjentów z cukrzycą zapadalność i śmiertelność na chorobę niedokrwioną serca jest 3-6-krotnie wyższe niż u osób z MZ, a ryzyko amputacji kończyny jest nawet 13-krotnie wyższe. Nie bez znaczenia jest również fakt, iż leczenie

cukrzycy i jej powikłań naczyniowych jest kosztowne – w 2019 roku stanowiło ponad 10% poniesionych wydatków na opiekę zdrowotną w Polsce<sup>9,29</sup>. Zrozumienie skomplikowanych procesów inicjujących i przyczyniających się do rozwoju MC ma kluczowe znaczenie dla opracowania skutecznych narzędzi diagnostycznych i interwencji terapeutycznych<sup>28</sup>.

Miażdżyca tętnic kończyn dolnych w cukrzycy najczęściej dotyczy tętnic poniżej kolana i małych tętnic stopy oraz tętnicy głębokiej uda. Ma ona charakter wieloodcinkowy, rozsiany, zwykle szybko postępuje i powoduje znaczne nasilone powikłania niedokrwienne i martwicze, prowadzące do zespołu stopy cukrzycowej<sup>9</sup>. U chorych na cukrzycę występuje również miażdżyca typu Mönckeberga, polegająca na zwyrodnieniowym zwapnieniu błony środkowej tętnic w następstwie zaniku mięśni gładkich i rozplemu włókien kolagenowych<sup>30</sup>.

Istnieją pewne różnice dotyczące obrazu klinicznego oraz naturalnego przebiegu miażdżycy tętnic kończyn dolnych u chorych z cukrzycą w porównaniu z osobami bez cukrzycy. W cukrzycy zmiany miażdżycowe rozwijają się wcześniej (u osób znacznie młodszych, przy czym wyrównane jest ryzyko u obu płci – brak ochronnego wpływu płci żeńskiej u kobiet w okresie przedmenopauzalnym)<sup>31</sup>. Zmiany w tętnicach o mniejszej średnicy mają charakter rozsiany, nierzadko są wieloodcinkowe. Wykazane jest: upośledzenie powstawania krążenia obocznego wskutek mikroangiopatii, zaburzenia reaktywności naczyń i adaptacji układu krążenia spowodowane neuropatią wegetatywną, bezbólowy przebieg zespołów miażdżycowych tj. choroby wieńcowej, PAD oraz częstsze współistnienie nadciśnienia tętniczego i otyłości<sup>32</sup>. MC jest zaburzeniem bardzo złożonym. Poszukiwane są wciąż nowe czynniki zaangażowane w patogenezę powikłań naczyniowych cukrzycy, będące celem diagnostycznym bądź terapeutycznym, umożliwiającym najlepiej jednoczesne podwójne działanie – przeciwcukrzycowe i przeciwmiażdżycowe.

W patomechanizmie wczesnych stadiów aterogenezy w cukrzycy obserwowana jest intensyfikacja produkcji wolnych form tlenu związana z nadmiernym formowaniem AGEs, aktywacja prozapalnego jądrowego czynnika transkrypcji łańcucha kappa B (ang. *Nuclear Factor kappa-light-chain*, NF-κB), wzrost przemian diacyloglicerolu, szlaku heksozaminowego oraz poliolowego (Rycina 1.2).



**Rycina 1.2.** Mechanizmy dysfunkcji śródbłonna wywołanej ROS w powikłaniach naczyńowych DM. Skróty: ROS – reaktywne formy tlenu; APN – adiponektyna; Nox – oksydaza fosforanowa dinukleotydu nikotynamidoadeninowego; ER – siateczka śródplazmatyczna; MAPK – kinaza białkowa aktywowana mitogenami; PPAR $\delta$  – receptor  $\delta$  aktywowany przez proliferatory peroksyosomów; PI3K – 3-kinaza fosfatydilinozytolu; Akt – kinaza białkowa B; PKC – kinaza białkowa C; NF- $\kappa$ B – czynnik jądrowy kappa B; TNF- $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$ ; IKK – hamowanie kinazy NF- $\kappa$ B (IkB); Grb – białko związane z receptorem czynnika wzrostu; SGLT2 – transporter sodu i glukozy2; DAG – diacyloglicerol; FFA – wolne kwasy tłuszczowe; ERK1 – kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym 1; AGE – końcowe produkty zaawansowanej glikacji; RAGE – receptor dla AGE; glyLDL – glikowane lipoproteiny o małej gęstości; ox-LDL – utlenione lipoproteiny o małej gęstości; LOX-1 – lektynopodobny receptor ox-LDL-1; ET-1 – endotelina-1; EMP – mikrocząstki śródbłonna; VCAM-1 – cząsteczka adhezyjna komórek naczyńowych-1; VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyńowego; VWF – czynnik von Willebranda; eNOS – śródbłonnkowa syntaza tlenu azotu; ICAM-1 – cząsteczka adhezji komórek międzykomórkowych-1<sup>33</sup>.

Efektom tych przemian jest dysfunkcja śródbłonna (dokładniej opisana w rozdziale „Dodatek”), ujawniająca się przewagą produkcji czynników naczyniokurczących nad wazodylatacyjnymi, a także zwiększoną aktywnością prozakrzepową endotelium naczyńowego. W kolejnych etapach, podobnie jak w przypadku przebiegu pierwotnej formy miażdżycy, pod wpływem utrzymującego się procesu zapalnego, w błonie wewnętrznej odkładają się ciała tłuszczowe, dochodzi do nadmiernej produkcji substancji pozakomórkowej, proliferacji i migracji komórek mięśni gładkich naczyń (ang. *Vascular Smooth Cells*, VSMCs)<sup>34</sup>. Dodatkowo intensywnie zachodząca synteza substancji zmniejszających stabilność blaszki, takich jak metaloproteinazy (ang. *Matrix Metalloproteinase*, MMP), powoduje pęknięcia blaszki miażdżycowej, przerwanie ciągłości śródbłonna, aktywację procesów zakrzepowych – co ostatecznie prowadzi do stopniowego zamykania światła naczynia<sup>35</sup>. Na podstawie wyników badań DCCT (ang. *Diabetes Control and Complications Trial*) oraz

Kumamoto Study stwierdzono, iż sama redukcja hiperglikemii nie powstrzymuje progresji makroangiopatii<sup>36</sup>. Ponadto, u chorych na cukrzycę typu 2 (T2DM), aterosenne procesy ulegają nasileniu przy współistnieniu zaburzeń tworzących zespół metaboliczny tj. otyłości, insulinooporności, nadciśnienia tętniczego, dyslipidemii czy hiperurykemii. Powyższe spostrzeżenia zostały uwzględnione w wytycznych towarzystw diabetologicznych – aktualnie wyrównanie metaboliczne cukrzycy to nie tylko stan normoglikemii, ale również normolipidemii, normotensji, a także utrzymywanie prawidłowej masy ciała<sup>9</sup>.

W cukrzycy stres oksydacyjny wywołany hiperglikemią, hiperlipidemią, zwiększoną rezystyną i insulinoopornością prowadzi do dysfunkcji komórek śródbłonna, co przyspiesza występowanie i rozwój powikłań naczyniowych cukrzycy różnymi mechanizmami, przedstawionymi w Tabeli 1.1.

**Tabela 1.1.** Mechanizmy sprzyjające rozwojowi miażdżycy u chorych na cukrzycę<sup>9</sup>

Czynnik ryzyka	Mechanizm oddziaływania
hiperglikemia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• glikacja</li> <li>• oksydacja</li> <li>• pobudzenie czynników wzrostowych</li> <li>• stres oksydacyjny</li> <li>• nasilanie procesu zapalnego</li> </ul>
hiperinsulinemia i insulinooporność	<ul style="list-style-type: none"> <li>• zgrubienie błony podstawnej naczyń</li> <li>• proliferacja miocytów</li> <li>• zwiększenie stężenia PAI-1</li> <li>• działanie aterogenne proinsuliny</li> <li>• małe, gęste LDL i LDL</li> </ul>
zaburzenia lipidowe	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hipertriglicerydemia</li> <li>• zmniejszenie HDL-C</li> <li>• zwiększenie stężenia LDL-C</li> <li>• modyfikacje cząsteczek LDL</li> <li>• modyfikacja HDL</li> </ul>
otyłość brzuszna	<ul style="list-style-type: none"> <li>• dyslipidemia</li> <li>• insulinooporność</li> </ul>
trombofilia cukrzycowa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• upośledzenie fibrynolizy (wzrost PAI-1)</li> <li>• trombogeneza (nasilenie agregacji i adhezji płytek, zwiększenie stężenia fibrynogenu)</li> </ul>
stres oksydacyjny	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nasilenie procesu zapalnego</li> <li>• uszkodzenie śródbłonna</li> <li>• oksydacja lipidów</li> </ul>
neuropatia autonomiczna	<ul style="list-style-type: none"> <li>• utrata adaptacji układu krążenia</li> <li>• sprzyjanie mikroangiopatii</li> </ul>

upośledzenie reaktywności naczyń	<ul style="list-style-type: none"> <li>• zwiększona reaktywność naczyń na bodźce skurczowe</li> <li>• nadciśnienie tętnicze</li> <li>• utrata regulacji naczynioruchowej</li> </ul>
upośledzenie czynności nerek	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nadciśnienie tętnicze</li> <li>• zaburzenia czynności śródbłonna</li> <li>• nasilona oksydacja</li> </ul>

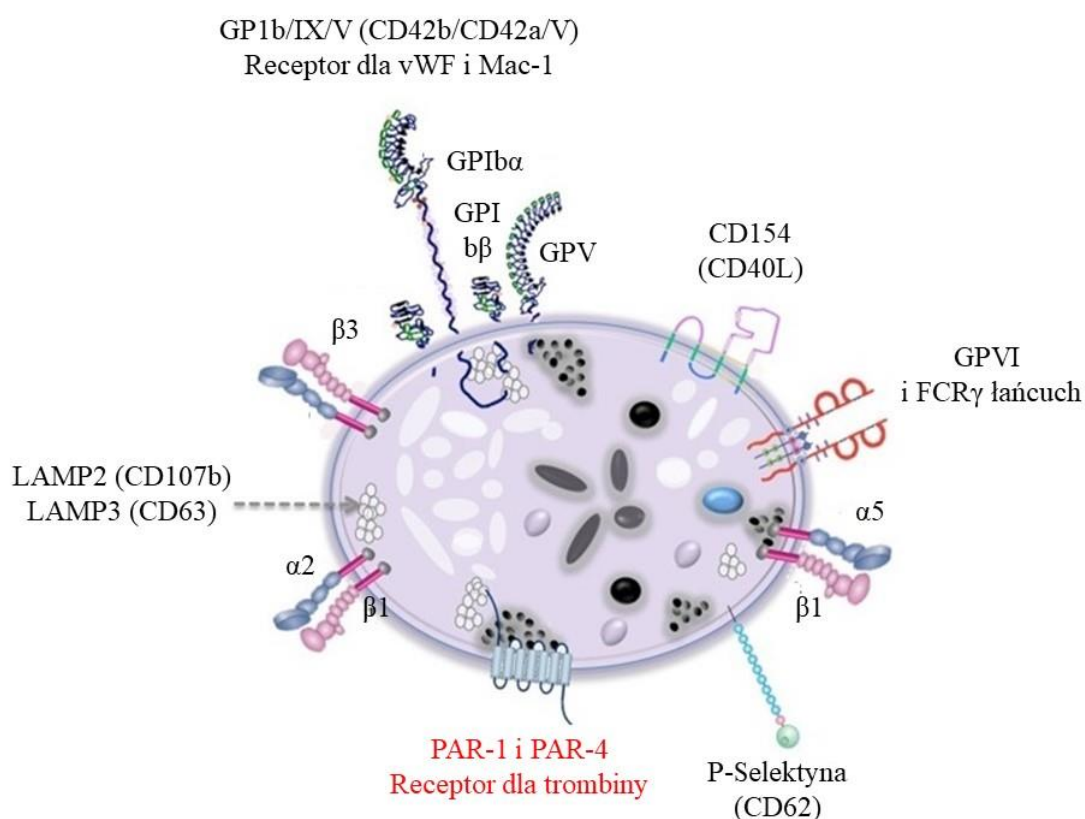
Wykazano, że w cukrzycy, oprócz klasycznych czynników ryzyka, inne, dodatkowe czynniki sprzyjają rozwojowi miażdżycy<sup>37</sup> np. homocysteina, trójglicerydy, nie-HDL, lipoproteina (a) (ang. *Lipoprotein (a)*, Lp(a)), małe gęste LDL, wysokowrażliwe białko C-reaktywne (ang. *High Sensitive Reactive C-protein*, hsCRP) oraz inne czynniki prozapalne i prozakrzepowe, tj.: fibrynogen, IL-1, IL-6, czynnik martwicy nowotworu (ang. *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ), cząsteczka adhezji międzykomórkowej (ang. *Intercellular Adhesion Molecule 1*, CD54 – ICAM-1), cząsteczka adhezyjna komórek naczyniowych 1 (ang. *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*, CD106 – VCAM-1), selektyny P i E oraz inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (ang. *Plasminogen Activator Inhibitor Type 1*, PAI-1). W przypadku cukrzycy synteza tych czynników jest wzmagana hiperglikemią, podwyższonym stężeniem hemoglobiny glikowanej (ang. *Hemoglobin A1c*, HbA1c), insulinoopornością tkanek obwodowych, hiperinsulinemią, mikroalbuminurią, białkomoczem oraz trombofilią<sup>9</sup>. Cukrzyca istotnie przyspiesza rozwój miażdżycy i stanowi niezależny czynnik ryzyka.

## 1.2. Hemostaza w miażdżycy, rola płytek i mikroplatełek krwi

Hemostaza jest zespołem procesów mających na celu utrzymywanie krwi w łożysku naczyniowym w stanie płynnym oraz zapobieganie jej wynaczynieniu wskutek uszkodzenia naczynia poprzez formowanie skrzepu płytkowego przekształcanego następnie w skrzep fibrynowy. W hemostazie kluczową rolę odgrywają: płytki krwi (ang. *Platelet*, PLT), ściana naczyń krwionośnych, osoczowy układ krzepnięcia, endogenne inhibitory krzepnięcia i układ fibrynolizy. Istotnym czynnikiem jest także strumień przepływającej krwi<sup>38</sup>. Hemostaza najczęściej przebiega procesami krzepnięcia i fibrynolizy, które zachodzą jednocześnie i pozostają ze sobą w równowadze. Dominacja któregoś z nich jest natomiast rezultatem przewagi aktywności enzymów tego procesu nad aktywnością enzymów drugiego procesu<sup>39</sup>. Dokładny opis procesów krzepnięcia i fibrynolizy znajduje się w rozdziale „Dodatek” niniejszej pracy.

## Płytki krwi (PLT)

Istotną rolę w hemostazie odgrywają PLT, czyli elementy morfotyczne zaangażowane przede wszystkim w formowanie pierwotnego czopu hemostatycznego. Z uwagi na obecność adhezyjnych glikoprotein (ang. *Glycoprotein*, GP) w błonach komórkowych tych krwinek, wykazujących działanie receptorowe, możliwe jest wiązanie się PLT do różnych molekuł np. glikoproteina Ia (GPIa) wiąże się do kolagenu – głównego składnika warstwy podśródbłonkowej, glikoproteina Ib (GPIb) oraz kompleks glikoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) uczestniczą w wiązaniu PLT z czynnikiem von Willebranda (ang. *von Willebrand Factor*, vWF), wydzielanego w ziarnistościach zarówno PLT jak i śródbłonka, niezbędnego do prawidłowej adhezji PLT do kolagenu (Rycina 1.3). Ponadto GPIIb/IIIa jest także receptorem dla fibrynogenu, którego jedna cząsteczka wiąże dwie PLT w procesie agregacji<sup>40</sup>. Glikoproteiny są receptorami dla licznych czynników aktywujących lub hamujących czynność PLT.



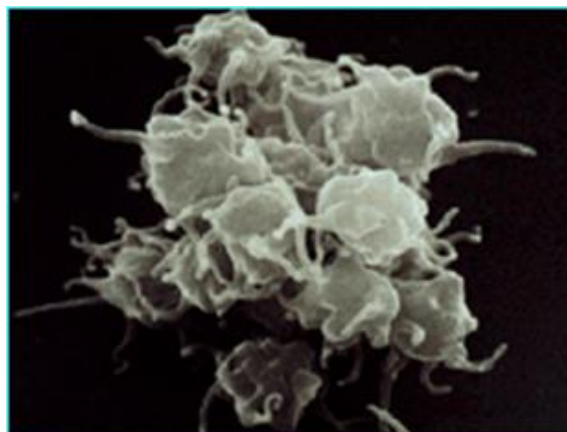
**Rycina 1.3.** Budowa płytki krwi<sup>41</sup>. Glikoproteiny błonowe płytek krwi obejmują GPIa, GPIIb/IIIa (aIIb $\beta$ 3) lub VLA-5 (receptor fibrynogenu); GPIb/IX/V (receptor vW i Mac-1); GPIc'-IIa lub VLA-6 (receptor lamininy); i  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 GPVI (receptor kolagenowy). Granulki alfa zawierają P-selektynę; współczynnik płytek krwi 4; czynnik transformujący-b1; chemokiny; proteoglikan; Płytkowy czynnik wzrostu; inhibitor  $\alpha$ 2-plazminy; witronektyna; laminina; CD63; TGF $\beta$ ; CLEC-2; trombospondyna; fibronektyna; B-tromboglobulina; vWF; fibrynogen; czynniki krzepnięcia V, XI i XIII; integryny;

trombocydyny; proteazy; trombina; protrombina; kininogeny; receptory rodziny immunoglobulin; receptory z rodziny powtórzeń bogatych w leucynę; oraz inne czynniki prozapalne i immunomodulujące. Gęste granulki zawierają ADP, ATP, wapń, serotoninę, histaminę, dopaminę, fosforany, eikozanoidy. Receptory dla głównego agonisty obejmują P2X, P2Y1 i P2Y12 (ADP); TPα-R i TPβ-R (TXA<sub>2</sub>); PAR-1 i PAR-4 (trombina); PAFR (czynnik aktywujący płytki krwi); 5-HT<sub>2A</sub> (serotonina); receptory epinefryny (katecholaminy); receptory Fc i dopełniacza C3a/C5a; oraz TLR, CD40, CD40L, ICAM-2, DC-SIGN, JAM-A i FcγRII. Metabolity między płytkami to TXA<sub>2</sub>, sfingozyno-1-fosforan, PAF, glikogen, czynnik płytkowy 4 (PF-4), RANTES, peptyd aktywujący tkankę łączną 3 (CTAP-3), zasadowe białko płytek krwi, tymozyna β-4 (Tβ-4), fibrynopeptyd B (FP-B) i fibrynopeptyd A (FP-A)<sup>41</sup>

Błona komórkowa PLT tworzy układ kanalików skierowanych ku cytoplazmie, przez które uwalniane są na zewnątrz składniki ziarnistości wewnątrzpłytkowych, takich jak: α, ziarnistości gęste, lizosomy, peroksosomy. Najliczniejsze ziarnistości α zawierają czynnik płytkowy (ang. *Platelet Factor 4*, PF4), płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. *Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF), β-trombomodulinę, fibrynogen, czynnik von Willebranda (ang. *von Willebrand Factor*, vWF), czynnik krzepnięcia V, wielkocząsteczkowy kininogen, fibronektynę, α1-antytrypsynę. W ziarnistościach gęstych magazynowane są ADP, ATP, serotonina, katecholaminy, jony wapnia i magnezu<sup>39,42</sup>. Elementy ziarnistości α i δ są uwalniane do otoczenia w wyniku aktywacji PLT, która następuje po ich przyłączeniu się do macierzy podśródbłonkowej. Aktywowane PLT prezentują na swojej powierzchni selektynę P oraz ujemnie naładowane fosfolipidy, które łączą się z czynnikami krzepnięcia<sup>42</sup>. Wewnątrz cytoplazmy, bezpośrednio pod błoną komórkową, znajdują się białka włóknikowe o właściwościach kurczliwych, takie jak miozyna, aktyna oraz tubulina α i β, które tworzą cytoszkielet płytki, który warunkuje dyskoidalny kształt płytki w stanie spoczynku oraz zmianę kształtu podczas ich aktywacji<sup>42</sup>, czyli przemieszczenia się glikoprotein między błoną zewnętrzną i wewnętrzną. Główną funkcją PLT jest wytworzenie mechanicznego czopu uniemożliwiającego swobodny wypływ krwi z uszkodzonego naczynia krwionośnego. W naczyniach, gdzie przepływ krwi generuje znaczną siłę ścinającą (ang. *High Shear*), np. w dużych tętnicach, płytki łączą się z macierzą podśródbłonkową poprzez czynnik vWF – za tę interakcję odpowiada kompleks Ib/IX/V. W naczyniach, gdzie przepływ krwi jest wolniejszy, płytki łączą się bezpośrednio z kolagenem poprzez swój receptor GP Ia/IIa. Silniejsze przytwierdzenie płytek do uszkodzonej ściany naczyniowej zachodzi dzięki dodatkowemu związaniu GPIIb/IIIa z vWF, a także GPVI i integryny α1/β2 z kolagenem oraz innymi elementami macierzy podśródbłonkowej. W wyniku tych interakcji płytki ulegają aktywacji. Aktywowane PLT zmieniają swoją morfologię, stając się nieregularnymi krwinkami z licznie występującymi wypustkami (Rycina 1.4). Jednocześnie dochodzi do uwolnienia na zewnątrz



przez system kanalików różnych substancji zgromadzonych w wewnętrznych ziarnistościach płytek. Efektem aktywacji płytek jest m.in. zmiana konformacji GPIIb/IIIa, receptora dla fibrynogenu, którego dimeryczna forma pozwala na połączenie dwóch płytek krwi.



**Rycina 1.4.** Obraz aktywowanej płytki krwi [<https://ouhsc.edu/platelets/index.html>]

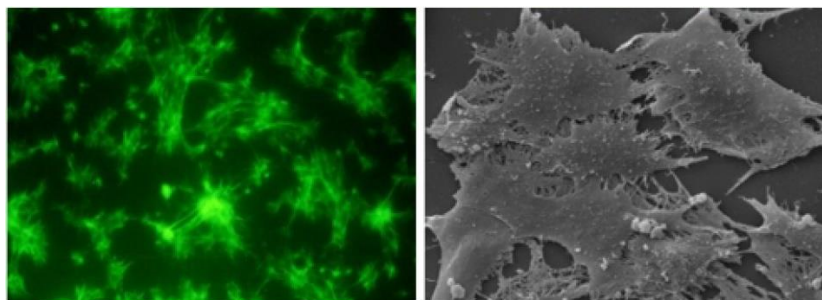
Aktywacja PLT jest procesem złożonym, w który zaangażowane są różne czynniki układu krzepnięcia i fibrynolizy. W wyniku uszkodzenia śródbłonka naczyniowego PLT zaczynają przylegać do białek adhezyjnych tj. kolagenu, fibronektyny i lamininy<sup>43</sup> (I etap procesu pierwotnej hemostazy), zapewniając przez to ochronę przed nadmierną utratą krwi<sup>44</sup>. Dodatkowo dochodzi do miejscowego zwężenia przepływu krwi, co ułatwia aktywację PLT i ogranicza utratę krwi<sup>45</sup>. W śródbłonku produkowane są czynniki, które biorą udział w procesach krzepnięcia i fibrynolizy np. czynnik tkankowy (TF), inicjuje proces krzepnięcia krwi<sup>38</sup>, przy czym prawidłowo funkcjonujący śródbłonek naczyniowy wykazuje także silne właściwości antykoagulacyjne, umożliwiające utrzymanie płynności krwi w obiegu. Komórki śródbłonka naczyniowego są także miejscem produkcji aktywatorów i inhibitorów plazminogenu, vWF oraz czynników regulujących napięcie naczyniowe oraz wpływających na adhezję, aktywację i agregację PLT, takich jak: prostacyklina, tlenek azotu (NO), endotelina i czynnik aktywujący płytki (ang. *Platelet Activity Factor*, PAF). Prostacyklina i NO rozszerzają naczynia krwionośne poprzez relaksację mięśni gładkich, prowadząc do obniżenia ciśnienia tętniczego krwi. Endotelina, z kolei, wykazuje działanie przeciwnie skurczowe na naczynia. Prostacyklina jest silnym inhibitorem aktywacji i agregacji płytek, a NO hamuje ich adhezję<sup>46</sup>. Endotelina nie ma wpływu na aktywność PLT. Komórki śródbłonka produkują i prezentują na swojej powierzchni trombomodulinę (ang. *Thrombomodulin*, TM) oraz receptor dla endotelialnego białka C (ang. *Endothelial Protein C Receptor*, EPCR), co współdziała w antykoagulacyjnym układzie białka C. Na powierzchni śródbłonka znajdują się również ektonukleotydazy, rozkładające ADP do adenozyiny, która hamuje agregację PLT.

PLT i mechanizmy krzepnięcia stanowią istotny czynnik wpływający na rozwój miażdżycy oraz powstawanie zakrzepów związanych z tą chorobą<sup>47</sup>. W destabilizacji blaszki miażdżycowej znaczącą rolę odgrywają mikropęknięcia i następująca po nich zakrzepica, które prowadzą do wzrostu i destabilizacji zmian miażdżycowych<sup>48</sup>. Modulacja procesu miażdżycowego zaangażowana jest zarówno w hemostatyczne, jak i niehemostatyczne (prozapalne) działania białek układu hemostazy. We wczesnych stadiach zmian zapalnych, lokalne tworzenie trombiny lub fibryny może być powiązane z naturalnym mechanizmem obronnym organizmu. Następnie zaobserwować można wieloaspektową rolę hemostazy w inicjacji i progresji rozwoju blaszki miażdżycowej. Białka tego układu odgrywają strategiczną rolę w utrzymaniu lub obniżaniu stabilności blaszki, co ostatecznie prowadzi do powikłań zakrzepowych.

PLT odgrywają istotną rolę w promowaniu procesów związanych z miażdżycą i stanowią połączenie między procesami hemostazy a miażdżycowym stanem zapalnym<sup>47</sup>. Głównym mechanizmem adhezji płytek do uszkodzonego śródbłonka naczyniowego jest wiązanie wydzielanego w ziarnistościach zarówno przez PLT jak i śródbłonek czynnika von Willebranda (ang. *von Willebrand factor*, vWF) z jego receptorem oraz GPI znajdującą się na PLT. Trwała adhezja jest osiągnięta poprzez integrynę  $\beta 3$ . Po przyłączeniu do powierzchni ściany naczynia, płytki uwalniają mediatory pro-aterogenne, tj. cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu, cząsteczki adhezyjne oraz czynniki krzepnięcia. Zwiększenie ekspresji selektyny P zarówno na powierzchni PLT, jak i na komórkach śródbłonka, prowadzi do wzmożonych interakcji z glikoproteinowym ligandem selektyny P typu 1, obecnym na powierzchni krążących LEU. Połączenie PLT z LEU (monocytami lub granulocytami obojętnochłonnymi), komórkami dendrytycznymi oraz komórkami progenitorowymi, prowadzi do formowania się agregatów komórkowych. Te agregaty wspierają dalszą aktywację, adhezję i transmigrację leukocytów – prowadząc do rozwoju i progresji blaszki miażdżycowej<sup>49</sup>.

### 1.2.2. Mikrocząstki (PMP)

Mikrocząsteczki błonowe (ang. *Microparticles*, MP) są to pęcherzyki błonowe o średnicy od 0,1 do 1,0  $\mu\text{m}$  wydzielane przez płytki krwi, erytrocyty, monocyty, limfocyty oraz komórki śródbłonka (Rycina 1.5).



**Rycina 1.5.** Zdjęcie z mikroskopu fluorescencyjnego oraz skaningowego przedstawiające aktywowane płytki krwi oraz komórki śródbłonna, które wydzielają pozakomórkowe mikropęcherzyki (ang. *Extracellular Vesicles - EVs*) [[https://chaos.if.uj.edu.pl/~kuba/KWK/files/Symposium\\_Kaminska.pdf](https://chaos.if.uj.edu.pl/~kuba/KWK/files/Symposium_Kaminska.pdf)]

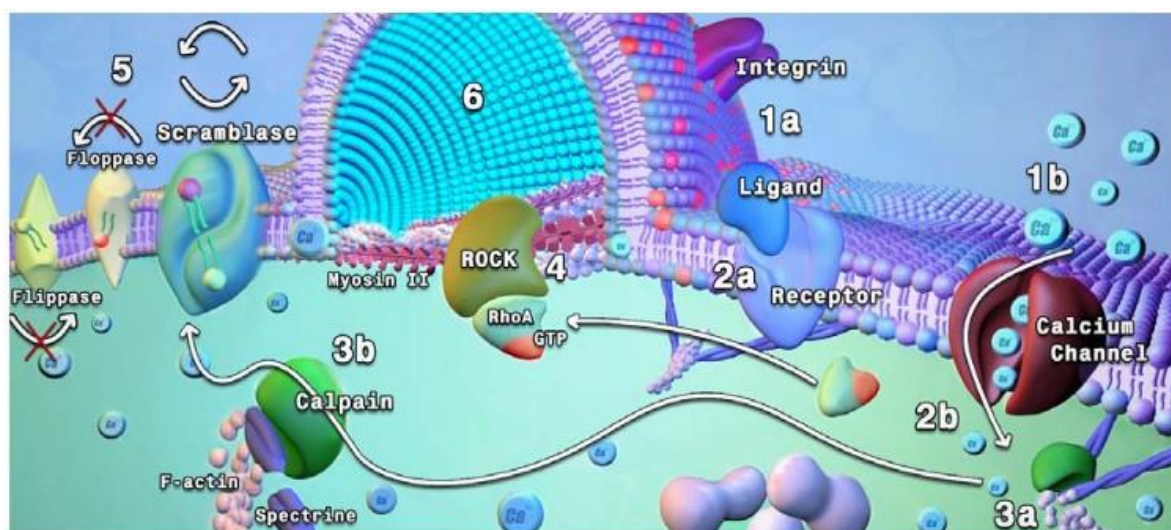
MP charakteryzują się brakiem jądra komórkowego oraz niezdolnością do syntezy własnych białek, ale mogą zawierać różnorodne biologicznie aktywne substancje, takie jak enzymy, białka błonowe, materiał genetyczny, białka adhezyjne, czynniki krzepnięcia oraz lipidy błonowe. Pochodzenie mikrocząsteczek ustalono na podstawie ekspresji antygenów powierzchniowych (ang. *Clusters of Differentiation, CD*) charakterystycznych dla komórek, z których powstały: MP pochodzenia erytrocytarnego – CD235+; PMP pochodzące z płytek krwi – CD42a+; MP z leukocytów – CD45+ oraz MP pochodzące z komórek śródbłonna naczyniowego – CD144+<sup>50</sup>. Proces uwalniania mikrocząsteczek z komórek eukariotycznych jest naturalnym, fizjologicznym zjawiskiem, które występuje podczas dojrzewania i starzenia się komórek<sup>51</sup>. MP regulują i koordynują wiele procesów: stan zapalny, neoangiogenezę, krzepnięcie i fibrylizację. Łączą również proces krzepnięcia z lokalnym stanem zapalnym. Ponadto, odgrywają istotną rolę w występowaniu nowotworów<sup>52</sup>. PMP są biomarkerami aktywacji PLT oraz nasilenia procesu zapalnego. PMP wykazują podobieństwo do egzosomów, które również są wydzielane przez różne komórki. Różnice między tymi dwoma grupami pęcherzyków przedstawiono w Tabeli 1.2.

**Tabela 1.2.** Porównanie egzosomów i MP<sup>39</sup>

	<b>Egzosomy</b>	<b>Mikrocząsteczki</b>
<b>Rozmiar</b>	30-100 nm	100nm - 1µm
<b>Skład lipidowy</b>	cholesterol sfingomielina ceramidy, ps triatwy lipidowe	sfingomielina ps, pa kwas arachidonowy
<b>Białka</b>	DNA, mRNA, microRNA, integryny, białka z rodziny tetraspanin (CD9, CD81, D63), białka szoku cieplnego (HSPs), GTPazy, aneksyna, flotilina	cell adhesion proteins (VE-cadherin, E-selectin, sialomucin), DNA, mRNA, miRNA

Mikrocząsteczki płytkowe (ang. *Platelet Microparticles, PMP*) powstają w procesie fizjologicznego krzepnięcia. Stanowią one od 70% do 90% wszystkich MP obecnych

we krwi<sup>53</sup>, zawierają dużą ilość fosfolipidów, istotnych dla procesu krzepnięcia. Podobnie jak PLT, PMP eksponują na swojej powierzchni miejsca wiążące kolagen i vWF, co umożliwia im adhezję do fibryny, a w konsekwencji przyspiesza tworzenie się skrzepu<sup>54</sup>. W warunkach prokoagulacyjnych lub podczas przewlekłych stanów zapalnych obserwuje się zwiększone uwalnianie PMP z aktywowanych lub apoptotycznych komórek<sup>55</sup>. Przed przebudową błony komórkowej i uwalnianiem PMP, w PLT następuje wewnątrzkomórkowy wzrost stężenia  $Ca^{2+}$ . Jest to reakcja na zwiększenie siły ścinającej, a także na obecność wolnych rodników tlenowych, adenosynodifosforanu (ang. *Adenosine Diphosphate*, ADP), uwalnianego przez aktywowane PLT, oraz ekspresję ligandu CD40 na powierzchni aktywowanych limfocytów T<sup>56</sup>. W efekcie następuje aktywacja enzymów zależnych od wapnia, zakłócających asymetryczny rozkład fosfolipidów w błonie komórkowej, co prowadzi do przeniesienia fosfatydyloseryny z wnętrza na zewnątrz komórki<sup>56</sup>. Jednocześnie dochodzi do destabilizacji cytoszkieletu, co umożliwia formowanie się i odłączanie pęcherzyków mikrocząsteczek z błony komórkowej<sup>56</sup> (Rycina 1.6).



**Rycina 1.6.** Regulacja i fizjologia pączkowania błony komórkowej i tworzenia mikrocząstek<sup>57</sup>

Przedstawiony na Rycinie 1.6 model obrazuje etapy prowadzące do uwalniania PMP. Na początku następuje stymulacja PLT poprzez wiązanie ligandu z receptorem (1a) lub aktywację kanału wapniowego (1b). Receptor przekazuje sygnał w kierunku komórki (2a) i/lub następuje napływ wapnia (2b). Zwiększony poziom wapnia aktywuje kalpainę, która hamuje F-aktynę i uwalnia spektrynę z przedziałów podbłonowych (3a, 3b) lub wywołuje fosforylację RhoA (4). Asymetria lipidów błonowych jest regulowana przez działania kooperacyjne trzech transporterów: (flippazy) zależnej od ATP translokazy specyficznej dla aminofosfolipidów,

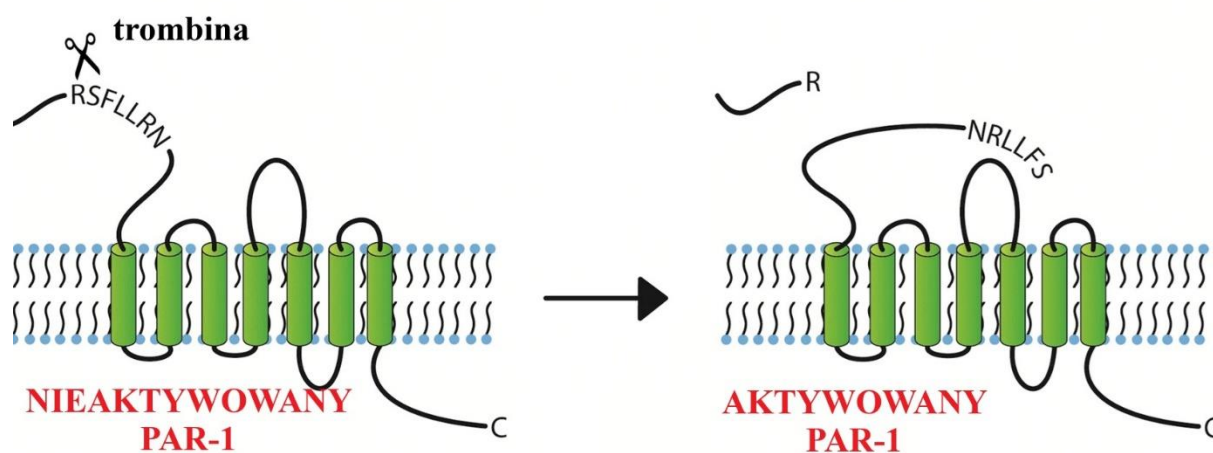
która szybko transportuje PS i PE z zewnątrz komórki do jej wnętrza, zależną od ATP nieswoistą flopazę lipidową, która powoli transportuje lipidy z wewnętrznej do zewnętrznej części komórki; i zależna od  $\text{Ca}^{2+}$  niespecyficzna skramblaza lipidowa, która umożliwia losowe przemieszczanie się lipidów pomiędzy obydwoma listkami (5). W ostatnim etapie następują skurcze miozyny II<sup>57</sup>.

Aminofosfolipidy obecne na powierzchni PMP oraz mikrocząsteczek pochodzących z komórek śródbłonna (ang. *Endothelial Microparticles*, EMP) posiadają liczne miejsca wiążące czynniki IXa, VIII, Va i IIa. W konsekwencji, aktywacja białek krzepnięcia krwi może więc zachodzić nie tylko na całych płytkach, lecz także na mikrocząsteczkach<sup>58</sup>. Czynniki Va, będący częścią kompleksu, wraz z czynnikiem Xa, tworzy kompleks protrombinazy, który w obecności jonów wapnia uczestniczy w przekształcaniu protrombiny do trombiny, kluczowego enzymu procesu krzepnięcia, który przekształca fibrynogen w fibrynę<sup>59</sup>. Podobnie vWF związany z EMP łatwiej łączy się z receptorami vWF na PLT niż sam vWF<sup>60</sup>. Na aktywność prokoagulacyjną PMP wpływa obecność na ich powierzchni selektyny P, TF, a na powierzchni mikrocząsteczek pochodzących z monocytów obecność glikoproteinowego ligandu-1 selektyny P (ang. *P-selectin glycoprotein ligand 1*, PSGL-1)<sup>51</sup>. W warunkach fizjologicznych krążące mikrocząsteczki pełnią również funkcję antykoagulacyjną. Mikrocząsteczki z wyeksponowaną na powierzchni fosfatydyloseryną biorą udział w tworzeniu trombiny, która aktywuje białko C, uczestniczące w degradacji czynników krzepnięcia Va i VIIIa<sup>61</sup>.

PMP częściej wiążą się z granulocytami niż z limfocytami, przy czym w obu przypadkach powodują zwiększoną ekspresję molekuly adhezyjnej CD11b oraz zwiększoną ich aktywność fagocytarną. Markery stanów zapalnych, uznawane za rozpuszczalne molekuly, są związane z mikrocząsteczkami, jak cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonna płytek krwi 1 (ang. *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*, CD31 – PECAM-1). Badania przeprowadzone z udziałem MP ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej (ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC) wykazały zwiększoną ekspresję molekuly adhezyjnej ICAM-1<sup>62</sup>. Badania *in vitro* udowodniły natomiast, że EMP po stymulacji TNF- $\alpha$  łączą się z ludzkimi monocytami poprzez ICAM-1, a także stymulują powstawanie TF<sup>63</sup>. Mikrocząstki uwalniane z komórek wielojądrzastych mogą indukować uwalnianie cytokin prozapalnych z komórek śródbłonna<sup>64</sup>. W procesie apoptozy istotny jest wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego  $\text{Ca}^{2+}$  oraz aktywność enzymów proteolitycznych, co prowadzi do degradacji DNA, białek oraz uwalniania mikrocząsteczek błonowych<sup>51</sup>.

### 1.3. RECEPTORY AKTYWOWANE PROTEOLITYCZNIE (PAR)

Receptory sprzężone z białkiem G (ang. *G protein-coupled receptors*, GPCR) są najliczniejszą nadrodziną receptorów powierzchniowych komórek, kluczowych dla transdukcji sygnału w organizmie<sup>65</sup>. Jednym z nich jest receptor aktywowany trombiną (ang. *Protease-Activated Receptor*, PAR-1), który odgrywa istotną rolę w szlaku sygnałowym trombiny<sup>66,67</sup>. Aktywowany trombiną PAR-1 ulega ekspresji na powierzchni różnorodnych typów komórek, głównie związanych ze ścianą naczynia krwionośnego (komórki śródbłonna, fibroblasty, mioocyty), we wszystkich rodzajach krwinek (płytki krwi, neutrofile, makrofagi)<sup>68</sup>, w nabłonku, neuronach, astrocytach, a także w komórkach układu odpornościowego<sup>69</sup> oraz w komórkach tłuszcznych i makrofagach, znajdujących się w mikrośrodowisku nowotworów<sup>68,70,71</sup>. PAR-1 wykazuje umiarkowane powinowactwo do trombiny (Kd ~10 nM) i występuje na powierzchni komórek w liczbie: 1500 – 2000 kopii<sup>72</sup>. Składa się z 415 aminokwasów, jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym zawierającym siedem domen transbłonowych o charakterze hydrofobowym, z których pięć to domeny funkcyjne: N-końcowa, zewnątrzkomórkowa, domena transbłonowa zbudowana z siedmiu  $\alpha$ -helis, domena wewnątrzkomórkowa oraz C-końcowa, która jest cytoplazmatyczną i umożliwia wiązanie białek G<sup>66</sup> (Rycina 1.7). Miejsce oddziaływania trombiny z receptorem PAR-1 zlokalizowane jest w domenie typu hirudynowego. Zewnątrzkomórkowy koniec aminowy PAR-1 zawiera potencjalne miejsca dla fosforylacji, palmitylacji oraz N-glikozytacji, a także istotne miejsce trawienia dla trombiny. W wyniku trawienia PAR-1 w pozycji Arg 41 i Ser 42 ujawnia się ukryty ligand, który ma charakterystyczną sekwencję SFLLRN, który rozpoczyna się od Ser 42 (miejsca trawienia np. trombiną).



Rycina 1.7. Budowa i aktywacja receptora dla trombiny PAR-1<sup>73</sup>

Aktywacja receptorów PAR prowadzi do inicjacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, które mogą podążać różnymi drogami, zależnie od rodzaju białka G zaangażowanego w ten proces. To zróżnicowanie reakcji komórkowej na działanie trombiny wynika z tej różnorodności sygnałów<sup>74</sup>. Aktywowane PAR inicjują procesy prowadzące do uwalniania czynników zapalnych, rekrutacji leukocytów, a także powstawania obrzęku.

Zidentyfikowano cztery typy receptorów PAR: PAR-1, PAR-2, PAR-3 i PAR-4, które wykazują między sobą około 30% homologii. Istnieją różnice w sekwencji N-końcowej (zewnętrzno-komórkowej), która zawiera miejsce wiązania proteaz i hydrolizy wiązania peptydowego, co decyduje o tym, jaka proteaza jest zdolna do aktywacji danego receptora. Trombina jest w stanie aktywować PAR-1, PAR-3 i PAR-4, podczas gdy głównym aktywatorem PAR-2 jest trypsyna<sup>74</sup>. PAR mogą być aktywowane przez różne proteazy, zależnie od środowiska i obecności kofaktorów<sup>75</sup>. Proteazy aktywujące poszczególne receptory PAR przedstawiono w Tabeli 1.3.

**Tabela 1.3.** Specyficzność proteaz względem receptorów PAR<sup>74</sup>

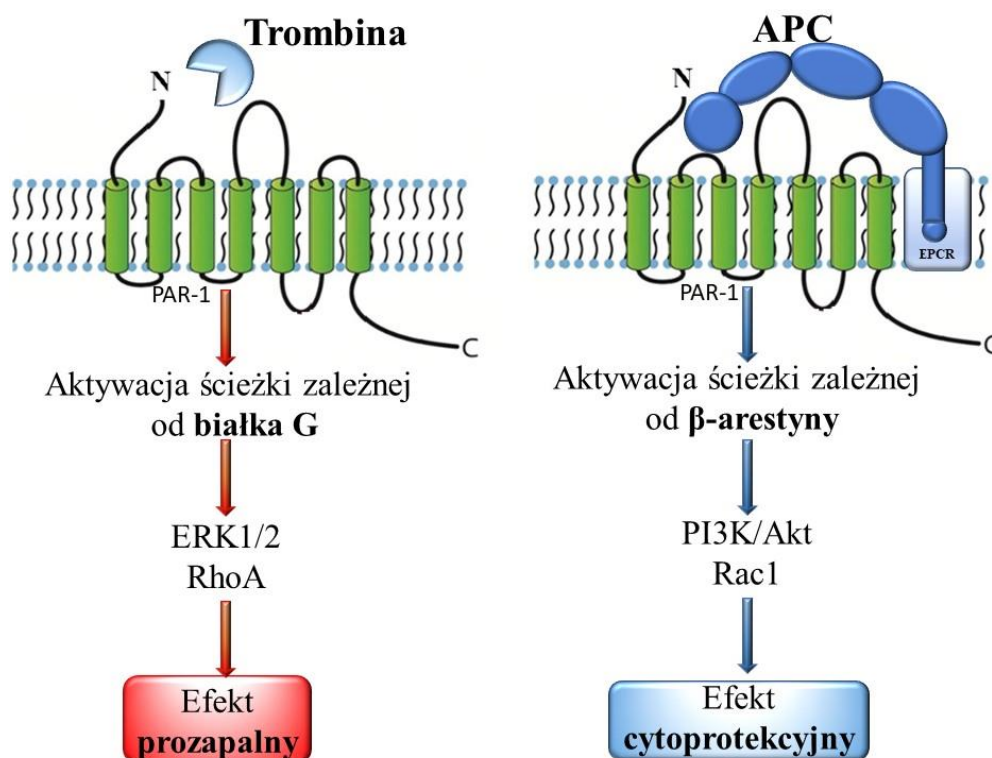
	<b>PAR-1</b>	<b>PAR-2</b>	<b>PAR-3</b>	<b>PAR-4</b>
Proteaza aktywująca	Trombina Czynnik XA APC Granzym A Gingipaina R Trypsyna MMP	Tryptaza Trypsyna Kalikreina 14 Czynnik Xa Gingipaina R MT-SP1 Proteinaza-3 Czynnik VIIa	Trombina	Trombina Trypsyna Kalikreina 14 Katepsyna G Gingipaina R

Trombina nie jest ligandem dla PAR, ale proteazą, która poprzez przecięcie zewnątrzkomórkowej, N-terminalnej domeny receptora, prowadzi do utworzenia nowego N-końca. Nowa, N-końcowa domena łączy się ze środkową pętlą zewnątrzkomórkową tego samego receptora, co skutkuje aktywacją receptora<sup>76</sup>. Być może uwolniony oligopeptyd pełni jakąś fizjologiczną rolę, ale brak na to jednoznacznych dowodów. Szczegółowy mechanizm aktywacji PAR został dokładnie poznany dla interakcji PAR-1 i trombiny. Wiązanie tego enzymu prowadzi do powstania naładowanej ujemnie części cząsteczki receptora (homologicznej do domeny hirudynowej) oraz konserwatywnego obszaru w cząsteczce  $\alpha$ -trombiny, znanego jako miejsce wiążące aniony (ang. *Anion-Binding Site*). W PAR-1, po aktywowaniu, wiązanie między Arg41 a Ser42 w sekwencji TLDPRSFLLR zostaje przerwane (Rycina 1.7). Powstała, odsłonięta sekwencja, staje się "związanym" ligandem, który wewnątrzkomórkowo wiąże się z resztą 42SFLLRN47 w konserwatywnym regionie drugiej pętli receptora, co prowadzi do aktywacji transbłonowej sygnalizacji

komórkowej<sup>77</sup>. PAR-3 ulega aktywacji poprzez przecięcie wiązania pomiędzy Lys a Thr w sekwencji TLPIKTFRGA. Natomiast aktywacja PAR-4 zachodzi dzięki przecięciu wiązania między Arg a Gly w sekwencji LPAPRGYGV<sup>78</sup>. PAR-1 ma dłuższy koniec N w porównaniu z PAR-4 (81 aminokwasów w porównaniu z 65 aminokwasami).

Rozszczepienie trombiny skracia domenę PAR-1 o 20 aminokwasów, odsłania sekwencję ligandu związanego SFLLRN. PAR-1 zawiera sekwencję podobną do hirudyny, która oddziałuje z miejscem zewnętrznym I trombiny i blokuje enzym w jego aktywnej konformacji. W rezultacie PAR-1 jest substratem, który może być aktywowany przez subnanomolowe stężenia trombiny<sup>75</sup>. Wiązanie trombiny z receptorem jest nieodwracalne i zawsze występuje w stosunku 1:1, co oznacza, że stopień aktywacji komórek zależy od miejscowego stężenia trombiny<sup>74</sup>.

Aktywacja PAR-1 może również być inicjowana przez aktywne białko C (ang. *Activated Protein C*, APC), przy czym w przypadku aktywacji przez trombinę efektem jest stan zapalny, a interakcja z APC włącza mechanizmy cytoprotekcyjne (przebiegające z niższą wydajnością katalityczną niż z udziałem trombiny)<sup>79</sup> APC trawi PAR-1 albo przy Arg41 albo przy Arg46 (preferowane)<sup>80</sup>. Porównanie aktywacji PAR-1 przez trombinę i przez APC przedstawiono na Rycinie 1.8.



**Rycina 1.8.** Porównanie mechanizmów aktywowania PAR-1 przez trombinę i przez APC [autorska ilustracja]



Trombina rozszczepia PAR-1 w miejscu R41-S42, co przede wszystkim inicjuje szlaki sygnałowe białka G, prowadząc do sygnalizacji prozapalnej, zakłóca bariery oraz zwiększa przepuszczalności komórek. Aktywowany przez trombinę związaną z trombomoduliną (TM) APC (związany z EPCR) rozszczepia natomiast PAR-1 w miejscu R46-N47. Związany ligand (wygenerowany w reakcji z udziałem APC) inicjuje szlaki  $\beta$ -arestyny i odpowiedź przeciwzapalną oraz zakłóca bariery śródbłonna (wzrost przepuszczalności)<sup>75</sup>. W warunkach fizjologicznych, endotelialny receptor białka C (EPCR) pełni istotną rolę jako kofaktor wspomagający cięcie PAR-1 przez APC<sup>81</sup>. Trombina, białko C, trombomodulina i GPCR współlokują się z PAR-1 na powierzchni komórek śródbłonna<sup>82</sup>.

Proces aktywacji PAR-1 może również być inicjowany przez metaloproteiny macierzy (MMP-1), przy czym przebiega on odmiennym mechanizmem niż z udziałem trombiny. PAR-1 jest rozszczepiany w miejscu D39-P40, generując ligand o długości łańcucha o 2 aminokwasy większej niż ten wytworzony przez trombinę (PR-SFLLRN). Aktywowany ligand aktywuje białko G12/13, Rho-GTP, prowadzi do fosforylacji p38 oraz uruchamia szlak sygnalizacji MAPK. Ten proces zmienia kształt płytek oraz ich ruchliwość, choć w mniejszym stopniu niż aktywacja PAR-1 za pośrednictwem trombiny<sup>68</sup>.

## Regulacja PAR-1

Sygnał transdukcji zaczyna się od połączenia białka G z aktywowanym receptorem PAR w domenie cytoplazmatycznej. PAR-1, PAR-2 i PAR-4 oddziałują zarówno z podjednostkami  $G_{\alpha i}$ , jak i  $G_{\alpha q}$ , co prowadzi do różnorodnych efektów w komórce.  $G_{\alpha q}$  pełni główną rolę jako ligand, aktywując szlak fosfolipazy C. To uruchamia uwalnianie 1,4,5-trifosforanu inozytolu (IP3), co zwiększa stężenie  $Ca^{2+}$  w cytozolu, oraz diacyloglicerolu (DAG), który w błonie komórkowej aktywuje kinazę białkową C (PKC). Jony wapnia i PKC aktywują następnie szereg szlaków komórkowych, w tym szlak białek aktywowanych mitogenami (ang. *Mitogen-Activated Protein*. MAPK), regulowany przez wapń i kinazę białkową C. Białko MAPK, takie jak ERK1/2, kontroluje aktywność wielu substratów i odgrywa kluczową rolę w procesach podziału i różnicowania komórek<sup>83</sup>. Podjednostka  $G_{\alpha i}$  z kolei działa jako inhibitor cykazy adenylowej, co prowadzi do zmniejszenia syntezy cAMP, powodując uwolnienie kwasu arachidonowego przez fosfolipazę A2, a w konsekwencji wzrost stężenia prostaglandyn E i F poprzez aktywację cyklooksygenazy. Podjednostki  $G_{\beta\gamma}$  kompleksów białek G natomiast łączą receptory PAR z białkami efektorowymi np. kanałami potasowymi, niereceptorowymi

kinazami tyrozynowymi oraz kinazą 3-fosfatydyloinozytolu, wpływając na reorganizację cytoszkieletu i mobilność komórek. Receptor PAR-1 jest zdolny do interakcji zarówno z podjednostkami  $G\alpha_{12}$ , jak i  $G\alpha_{13}$ . Obie te podjednostki oddziałują z czynnikiem wymiany guaninina-nukleotydy (ang. *Guaninie-Nucleotide Exchange Factor*, GEF), które aktywuje białko Rho, wpływając na morfologię komórki oraz jej migrację<sup>84</sup>.

PAR wiążą się z trombiną nieodwracalnie. Zakończenie przekazywania sygnału przez PAR zachodzi poprzez klasyczny mechanizm desensytyzacji receptorów. Do aktywnego receptora PAR-1 przyłączają się kinazy receptorów G (ang. *G protein-coupled receptor kinase*, GRK), z których największe znaczenie mają GRK2 i GRK3, będące kinazami serynowo-treoninowymi. Te kinazy powodują fosforylację wewnątrzkomórkowego C-końca receptora. W efekcie dochodzi do translokacji i przyłączenia się  $\beta$ -arestyny do fosforylowanego końca receptora, co blokuje interakcję receptora z białkiem G i tym samym hamuje przekazywanie sygnału<sup>83,85</sup>. Wiązanie  $\beta$ -arestyny zapobiega tworzeniu dodatkowych kompleksów białkowych między PAR a białkiem G, co prowadzi do ich szybkiego rozłączenia w ciągu kilku sekund<sup>86</sup>. Uwolnione receptory są internalizowane w ciągu kilku minut za pośrednictwem  $\beta$ -arestyny oraz innych białek adaptorowych, takich jak klatryna i białka adaptorowe 2 (ang. *Andaptor Protein 2*, AP2). Proces pączkowania pęcherzyka pokrytego klatryną z błony komórkowej oraz fuzję pęcherzyka z wczesnym endosomem koordynuje GTPaza dynaminy<sup>87</sup>. Następnie zostają one zdegradowane lizosomalnie wewnątrz komórki. Uszkodzone receptory są zastępowane przez nowe, pochodzące z systemu błon wewnątrzkomórkowych<sup>74</sup>. W przypadku braku bodźca, receptory PAR krążą ciągle między błoną komórkową a wewnętrznym przedziałem komórki, co utrzymuje stabilną pulę receptorów na powierzchni.

### **Rola PAR-1**

PAR-1 ma działanie prozapalne. Jego oddziaływanie z trombiną w warunkach *in vivo* indukuje ekspresję na powierzchni komórek śródbłonna takich cząsteczek jak P-selektyna i E-selektyna, oraz białek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1. Dochodzi także do produkcji prozapalnych cytokin, takich jak IL-6 i IL-8 oraz czynników aktywujących płytki (np. PAF), białek chemotaktycznych dla monocytów (MCP-1) oraz aktywacji cyklooksygenazy 2 (ang. *Cyclooxygenase 2*, COX-2)<sup>88</sup>. Czynniki chemotaktyczne stymulują migrację PLT i leukocytów do miejsca ich uwalniania. Z kolei E-selektyna, ICAM-1 i VCAM-1 umożliwiają przemieszczanie się („toczenie”) granulocytów, limfocytów, makrofagów i płytek krwi

po powierzchni komórek śródbłonka<sup>89-91</sup>. Stymulacja PAR-1 w monocytach prowadzi z kolei do wzmożonego uwalniania cytokin prozapalnych (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 i MCP-1), jednocześnie zmniejszając wydzielanie IL-12. Podobnie na limfocytach T aktywowany PAR-1 pobudza proliferację tych krwinek oraz produkcję cytokin o charakterze prozapalnym.

Głównym mechanizmem odpowiedzi zapalnej wywołanej przez trombinę jest aktywacja jądrowego czynnika transkrypcyjnego  $\kappa$ B (ang. *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B cells*, NF- $\kappa$ B), przez degradację fosforylowanego I $\kappa$ B za pośrednictwem proteasomów. Zdezaktywowana I $\kappa$ B prowadzi do ekspresji czynników prozapalnych, takich jak ICAM-1, VCAM-1, IL-1, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , MCP-1 i PAF<sup>92</sup>. Ponadto, trombina stymuluje ekspresję czynnika przyspieszającego rozkład (ang. *Decay accelerating factor*, DAF) w komórkach śródbłonka, co zwiększa szybkość rozkładu składowych C3 i C5 układu dopełniacza<sup>88</sup>. Ponadto (jak wspomniano wcześniej) trombina, poprzez aktywację białka C, wywiera również działanie przeciwzapalne. Aktywne białko C (APC) tworzy kompleks z receptorami dla białka C (EPCR) na komórkach śródbłonka, co prowadzi do zmniejszenia produkcji cytokin prozapalnych przez te komórki. Dodatkowo, APC oddziałuje z monocytami, hamując wzrost stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego oraz blokując szlak NF $\kappa$ B<sup>93</sup>. PAR-1 pełni również istotne role w procesach naprawczych. Aktywna trombina wytworzona w reakcji na uszkodzenie naczynia pobudza proliferację oraz migrację komórek śródbłonka, nabłonka, fibroblastów oraz komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Ponadto, trombina stymuluje ruchliwość komórek oraz produkcję macierzy zewnątrzkomórkowej, co sprzyja procesom remodelowania tkanek<sup>94</sup>. Aktywacja receptorów PAR pobudza fibroblasty do wydzielania czynnika wzrostu tkanki łącznej (ang. *Connective Tissue Growth Factor*, CTGF), który jest czynnikiem stymulującym ich wzrost oraz produkcję kolagenu i fibronektyny<sup>95</sup>. Podobnie, komórki mięśni gładkich pod wpływem tego samego mechanizmu ulegają proliferacji oraz produkują czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), główny stymulator wzrostu komórek śródbłonka<sup>96</sup>. Ponadto także PLT aktywowane przez trombinę wydzielają VEGF. W komórkach śródbłonka natomiast, trombina stymuluje ekspresję receptora dla czynnika wzrostu śródbłonka (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*, VEGFR), co skutkuje zwiększoną reakcją tych komórek na czynniki wzrostu i promuje naprawę uszkodzonego naczynia<sup>97</sup>.

PAR-1 wpływa także na proces krzepnięcia krwi i regulację przepływu strumienia krwi. Receptor ten występuje na powierzchni PLT<sup>98</sup>, a jego oddziaływanie z trombiną prowadzi

do aktywacji PLT (nawet przy bardzo niskich stężeniach trombiny) tj. zmiany kształtu PLT, uwalniania zawartości ziarnistości płytkowych oraz agregacji płytek<sup>99</sup>. Wynika to z tego, że PAR-1 wiąże się z trzema rodzajami białek G: G12, Gq i Gi. Poprzez białko G12 aktywuje się szlak kinazy Rho, który wywołuje zmiany w kształcie płytek<sup>99</sup>. Białko Gq stymuluje aktywność fosfolipazy C $\beta$  (PLC $\beta$ ), co prowadzi do hydrolizy fosfatydyloinozytolu-4,5-difosforanu do diacyloglicerolu (DAG) i inozytolo-1,4,5-trifosforanu (IP3). IP3 powoduje wzrost stężenia jonów wapnia w komórce, podczas gdy DAG aktywuje kinazę białkową typu C (PKC), która przy wzroście stężenia wapnia inicjuje procesy zmieniające kształt PLT, ich agregację i uwalnianie zawartości ziarnistości wewnątrzkomórkowych<sup>100</sup>. Zmiana kształtu płytek wynika z przemodelowania cytoszkieletu, co jest kontrolowane przez kinazę łańcucha lekkiego miozyny (MLCK), działającą pod wpływem jonów wapnia. Proces sekrecji zachodzi w wyniku fosforylacji plekstryny przez PKC w obecności jonów wapnia, co prowadzi do uwolnienia zawartości ziarnistości płytkowych oraz ekspozycji selektyny P. Integryna  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 ulega aktywacji przez PKC i jony wapnia, co umożliwia trwałe wiązanie fibrynogenu i prowadzi do tworzenia agregatów. Ponadto, trombina oddziałuje z płytkami poprzez receptory zlokalizowane w kompleksie GPIb-IX-V. Połączenie z GPIb $\alpha$ , obecnym w tym kompleksie, ułatwia trombinie efektywną aktywację receptorów PAR-1 i PAR-4<sup>101</sup>.

Regulacja przepływu krwi poprzez receptory PAR zachodzi w warunkach patologicznych, np. w stanach zapalnych lub w obecności toksyn. Obserwuje się wtedy zwiększoną aktywność proteaz we krwi oraz wzmożoną ekspresję genów kodujących receptory PAR. Trombina, działając poprzez receptory PAR-1 obecne na komórkach śródbłonna oraz komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych, może wpływać na regulację napięcia ściany naczyń krwionośnych<sup>94</sup>. Redukcja napięcia naczyń krwionośnych przez śródbłonek jest rezultatem działania tlenu azotu (NO) oraz prostacykliny (PGI<sub>2</sub>). NO odpowiada za wczesną odpowiedź, podczas gdy prostacyklina jest kluczowa dla późnej relaksacji śródbłonna<sup>102</sup>. Aktywacja PAR-1 prowadzi do wzrostu stężenia Ca<sup>2+</sup>, co stymuluje aktywność śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) i skutkuje zwiększoną produkcją NO z argininy.

PAR-1 może również brać udział w procesach nowotworowych. Zauważono, że w wielu zmienionych nowotworowo typach komórek zwiększona jest ekspresja PAR-1, która ściśle koreluje z agresywnością guza<sup>103</sup>. Obserwacja ta wynika z tego, że interakcja PAR-1 z trombiną wywołuje aktywację szlaków Ras, PKC i MAPK, prowadząc do wzrostu komórek nowotworowych i zwiększenia ich zdolności do progresji choroby<sup>104</sup>. Istotnym aspektem związanym z trombiną w procesie nowotworzenia jest powstawanie nowych naczyń krwionośnych wokół guza. Receptory PAR, po ich aktywacji, stymulują ekspresję genów

kodujących czynniki wzrostu takie jak VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ , podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF*) oraz receptora VEGFR. Wzrost ekspresji VEGFR-2 w komórkach śródbłonna jest kluczowy dla procesu angiogenezy, podczas gdy wzrost ekspresji  $\alpha\beta 3$  w komórkach nowotworowych służy jako wskaźnik angiogenezy. Ponadto, trombina indukuje aktywację metaloproteinaz wydzielanych przez śródbłonek, przede wszystkim MMP-1 i MMP-2, które degradują kolagen IV. Ten proces związany z lokalną degradacją błony podstawnej ułatwia migrację komórek nowotworowych<sup>105</sup>.

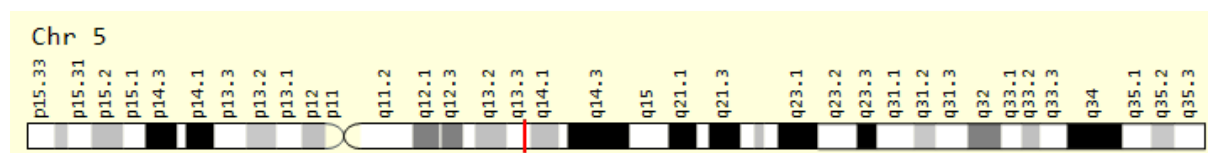
Ponadto PAR obecne w komórkach układu nerwowego: neuronach, astrocytach i oligodendrocytach, pełnią istotną rolę w ich normalnym funkcjonowaniu oraz w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych. W przypadku wyższych stężeń trombiny dochodzi do uszkodzenia i śmierci komórek układu nerwowego. W chorobie Alzheimera zaobserwowano obniżony poziom endogennych inhibitorów trombiny, takich jak antytrombiny. Aktywacja szlaku RhoA przez hydrolizę PAR-1 prowadzi do indukcji apoptozy w komórkach neuronalnych<sup>106</sup>. Zwiększenie stężenia  $Ca^{2+}$  wewnątrzkomórkowego wywołane aktywacją PAR-1 prowadzi do uwalniania glutaminianu z astrocytów<sup>107</sup>. Ten proces aktywuje szlaki ERK 1/2 i NF $\kappa$ B, co skutkuje aktywacją mikrogleju<sup>106</sup>. Trombina stymuluje również szlak prozapalnych cytokin, takich jak IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  oraz arachidonian. W przypadku chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera i Parkinsona, obserwuje się indukcję syntezy tlenku azotu (NO). Aktywacja szlaku ERK 1/2 powoduje proliferację astrocytów, co potwierdza rolę aktywacji PAR-1 w uszkodzeniu mózgu i jego neurodegeneracji<sup>108</sup>. Trombina dodatkowo aktywuje metaloproteinazę 2, która może osłabiać bariery krew-mózg, a nawet prowadzić do ich przerwania. Niskie stężenia trombiny mogą mieć działanie ochronne, chroniąc przed uszkodzeniami wywołanymi przez glutaminian,  $\beta$ -amyloid, reaktywne formy tlenu oraz hipoglikemię.

### **Polimorfizmy PAR-1**

Polimorfizmem pojedynczego nukleotydu (ang. *Single Nucleotide Polymorphisms, SNP*) jest mutacja genetyczna, powstała przez zmianę pojedynczego nukleotydu w sekwencji DNA poprzez usunięcie lub zamianę na inny. Chociaż tego rodzaju mutacje są kluczowe, to rzadko kiedy przeprowadzane są badania genetyczne, gdyż ich wykrywanie wymaga zastosowania precyzyjnych technik detekcji o wysokiej wydajności i dokładności<sup>109</sup>.

Większość genów kodujących receptory płytkowe została zsekwencjonowana, co umożliwia identyfikację polimorfizmów w ich rejonach kodujących i regulatorowych.

Odkryto także konsekwencje tych polimorfizmów dla funkcji PLT oraz ich roli w predyspozycjach do nadmiernego krwawienia lub tworzenia zakrzepów – trombina aktywuje zarówno komórki śródbłonna, jak i PLT za pośrednictwem PAR-1, a gęstość tego receptora na powierzchni komórki może mieć istotne konsekwencje dla hemostazy lub ryzyka nadmiernego krwawienia. Ludzki PAR-1 jest kodowany przez gen F2R (Rycina 1.9).



**Rycina 1.9.** Lokalizacja genomowa genu PAR-1 - 15q11.2 [<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=F2R>]

Gen PAR-1 ma długość około 27 kb i składa się z 2 egzonów rozdzielonych dużym intronem (~22 kb). Znajduje się na chromosomie 5q11.2-q13.3<sup>110,111</sup>. Pierwszy egzon koduje sekwencję peptydu sygnałowego oraz N-końcową sekwencję receptora, podczas gdy drugi, większy egzon koduje pozostałą część receptora<sup>111</sup> (Rycina 1.9.). Badania sekwencji regionu regulacyjnego nie wykazały obecności charakterystycznych sekwencji TATA i CAAT, które często są typowe dla genów kodujących receptory sprzężone z białkiem G<sup>112</sup>. Znalezione natomiast wiele potencjalnych motywów regulatorowych, takich jak SP1, Ets, TEF-1 (czynnik wzmacniający transkrypcję-1) i GATA. Analiza funkcjonalna promotora wykazała, że dwie sekwencje, SP-1 i AP-1 (białko aktywatora 1), odgrywają istotną rolę w jego podstawowej aktywności<sup>113</sup>. Analiza zmian genetycznych w genie PAR-1 oraz ich rola w kontrolowaniu zarówno podstawowej, jak i indukowanej transkrypcji, może mieć istotny wpływ na ryzyko wystąpienia zakrzepicy. W ramach obszernego badania klinicznego PATHROS (Paris Thrombosis Study) przeprowadzono poszukiwania polimorfizmów w obszarach regulatorowych genu PAR-1, w tym w jego promotorze oraz obszarze granicznym między egzonem a intronem, które mogą mieć wpływ na ekspresję tego genu<sup>114</sup>. W obszarze regulatorowym 5' zidentyfikowano dwa polimorfizmy. Pierwszy z nich to zamiana C/T, która zlokalizowana jest w 1426 pz powyżej miejsca startu transkrypcji (-1426 C/T). Drugi polimorfizm to insercja 13 par zasad przed sekwencją w pozycji -506: 5'-CGGCCGCGGAAG-3' (-506 I/D; gdzie I oznacza insercję, a D delecję)<sup>114,115</sup>. Polimorfizm może również wystąpić w sekwencji intronowej (IVS), gdzie zidentyfikowano transwersję A/T, znajdującą się 14 nukleotydów powyżej miejsca startu egzonu 2 (IVSn-14 A/T)<sup>114</sup>.

## 2. CEL PRACY

Cukrzyca, miażdżyca i ich powikłania należą do globalnych chorób, gdyż dotyczą społeczeństw wszystkich krajów. Są one postrzegane jako współczesne choroby cywilizacyjne, związane ze zmianą trybu życia – ograniczoną aktywnością fizyczną i stosowaniem wysokokalorycznej diety. Obecnie prowadzone są liczne badania nad procesami przewlekłych powikłań cukrzycy typu 2 (T2DM) i miażdżycy oraz podejmowane są próby zahamowania ich postępu. Zwraca się szczególną uwagę na:

- Poszukiwanie znaczenia białek zaangażowanych w molekularne mechanizmy charakterystyczne dla przebiegu chorób o charakterze zapalno-zakrzepowym.
- Ocenę aktywacji komórek prozapalnych, m.in. płytek krwi i mikrocytek.
- Analizę intensyfikacji syntezy i wydzielania cytokin, chemokin, adheryn, wolnych rodników, wzmagających napływ prozapalnych komórek, aktywację procesu adhezji oraz stymulację i agregację płytek krwi, uszkodzenie śródbłonna naczyń i uwalnianie substancji trombogennych.
- Aktywację lub represję genów odpowiedzialnych za reakcje komórkowe i międzykomórkowe.

W oparciu o przedstawione założenia przyjęto następujące cele badawcze:

1. Dokonanie oceny ekspresji powierzchniowego białka PAR-1 w płytkach krwi.
2. Wykazanie wpływu polimorfizmów genetycznych PAR-1 na rozwój i rokowania w przebiegu w/w chorób.
3. Analiza korelacji poziomu białka PAR-1 z metabolicznymi parametrami miażdżycy zarostowej oraz makroangiopatii cukrzycowej w grupach chorych.
4. Ustalenie roli PAR-1 w procesie chorobowym.
5. Ustalenie roli mikrocytek w patogenezie procesu miażdżycowego.
6. Ustalenie przydatności cytometrycznego badania mikrocytek w diagnostyce chorób zakrzepowych.

### 3. MATERIAŁY I METODY

#### 3.1. Charakterystyka i ocena kliniczna grupy badanej i grupy kontrolnej

Grupę badaną stanowiły surowice krwi/osocza pobrane od 95 pacjentów Kliniki Angiologii, Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu: 34 chorych z MC w przebiegu T2DM (średnia wieku  $60,88 \pm 7,51$  lat), 43 chorych z MZ (średnia wieku  $56,69 \pm 5,72$  lat) oraz 18 osób bez cukrzycy i miażdżycy – grupa kontrolna (średnia wieku  $57,50 \pm 2,12$  lat). Do badań zakwalifikowano możliwie najmłodszą grupę chorych z obwodową niewydolnością tętniczą (PAOD) w stadium IIB wg Fontaine'a (ABI<0,5). Chorzy na T2DM przyjmowali insulinoterapię w skojarzeniu z doustnymi lekami hipoglikemizującymi. U wszystkich badanych wykluczono obecność ostrego lub przewlekłego stanu zapalnego, a przede wszystkim martwicy tkankowej oraz rozpoznanej choroby nowotworowej. Wszyscy pacjenci wyrazili świadomą zgodę na udział w badaniu, a badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (Nr KB – 174/2011). Ogólną charakterystykę badanych grup przedstawiono w Tabeli 3.1.

**Tabela 3.1.** Charakterystyka badanych grup

	<b>Chorzy z MC (n=34)</b>	<b>Chorzy z MZ (n=43)</b>	<b>Grupa kontrolna (n=18)</b>
<b>Wiek [średnia <math>\pm</math> SD/ lat]</b>	60,88 $\pm$ 7,51	56,69 $\pm$ 5,72	57,50 $\pm$ 2,12
<b>Kobiety/Mężczyźni [n]</b>	15/19	12/31	14/4
<b>Osoby palące papierosy</b>	24% (8/34)	51% (22/43)	33% (6/18)
<b>Czas trwania cukrzycy [średnia <math>\pm</math> SD/ lat]</b>	6,9 $\pm$ 6,4	---	---
<b>Miażdżycy t. wieńcowych</b>	62% (21/34)	59% (25/43)	
<b>Miażdżycy t. mózgowych</b>	3% (1/34)	11% (5/43)	
<b>Miażdżycy t. obwodowych (kończyn dolnych)</b>	21% (7/34)	100% (43/43)	
<b>Nefropatia</b>	24% (8/34)	---	
<b>Retinopatia</b>	8% (3/34)	---	
<b>Polineuropatia</b>	11% (4/34)	---	

*n* - liczba pacjentów



Podstawowymi kryteriami włączenia do badań chorych z makroangiopatią cukrzycową były:

- 1) wiek 45 – 65 lat
- 2) terapia doustnymi lekami przeciwcukrzycowymi i/ lub insuliną
- 3) podwyższone stężenie hemoglobiny glikowanej (HbA<sub>1c</sub>) > 6,1%.
- 4) czas trwania choroby powyżej 5 lat
- 5) klasyfikacja zaburzeń glikemii zaproponowana przez Polskie Towarzystwo Diabetologiczne (PTD) w 2023 r. przedstawiona w Tabeli 3.2.
- 6) klasyfikacja zaburzeń metabolicznych, kryteriów rozpoznania zespołu metabolicznego, w oparciu o wytyczne Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) oraz Narodowego Programu Edukacji Cholesterolowej Panelu III Leczenia Dorosłych (ang. *National Cholesterol Education Program*, NCEP; *Adult Treatment Panel III*, ATP III); przedstawiona w Tabeli 3.3.

Inne przewlekłe powikłania cukrzycy:

- nefropatię cukrzycową rozpoznawano na podstawie utrzymującego się (dwukrotny pomiar) wydalania albumin z moczem (dobowa zbiórka moczu) w ilości przekraczającej 30mg/dobę przy nieobecności innych chorób nerek
- retinopatia cukrzycowa była stwierdzana na podstawie dokumentacji okulistycznej pacjentów
- polineuropatię cukrzycową ustalono w oparciu o badanie neurologiczne chorych

Podstawowymi kryteriami włączenia do badań chorych z miażdżycą zarostową były:

- 1) wiek 40 – 65 lat
- 2) czas trwania choroby powyżej 5 lat
- 3) kliniczne i biochemiczne cechy zespołu metabolicznego według NCEP i ATP III
- 4) wskaźnik kostka – ramię < 0,9 (stopień II B niewydolności tętniczej wg. Fontaine'a - dystans chromania przestankowego poniżej 200 m); segmentarny pomiar ciśnień metodą Dopplera aparatem Sonodop 4000 typ DSM2P firmy Sonoteknik GMBH
- 5) dystans chromania ustalony próbą marszową na bieżni ruchomej Tackmaster przy prędkości 3,2 km/h i kącie nachylenia bieżni 12 %.

Grupę kontrolną stanowiło 18 zdrowych osób, w wieku od 44 do 65 r.ż. (średnia wieku 57,50 ± 2,12 lat), nie podające w wywiadzie występowania cukrzycy u krewnych

pierwszego stopnia. Były to osoby wolne od chorób ogólnoustrojowych, a przede wszystkim: nadciśnienia tętniczego, chorób sercowo-naczyniowych, chorób płuc, nerek i procesu nowotworowego (Tabela 3.1).

**Tabela 3.2.** Klasyfikacja zaburzeń glikemii według Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (PTD), 2023

Oznaczenie	Stężenie glukozy w osoczu	Interpretacja
<b>Glikemia przygodna</b> – oznaczona w próbce krwi chorego pobranej o dowolnej porze dnia, niezależnie od pory ostatnio spożytego posiłku	$\geq 200$ mg/dl ( $\geq 11,1$ mmol/l)	Rozpoznanie cukrzycy jeżeli u chorego występują typowe objawy choroby (wzmoczone pragnienie, wielomocz, osłabienie, spadek masy ciała)
<b>Glikemia na czczo</b> – oznaczona w próbce krwi pobranej 8-14 godzin od ostatniego posiłku	70 – 99 mg/dl (3,9 – 5,5 mmol/l)	Prawidłowa glikemia na czczo
	100 – 125 mg/dl (5,6 – 6,9 mmol/l)	Nieprawidłowa glikemia na czczo (IFG)
	$\geq 126$ mg/dl ( $\geq 7,0$ mmol/l)	Cukrzyca
<b>Glikemia w 120 min.</b> doustnego testu obciążenia glukozą (OGTT)	$< 140$ mg/dl ( $< 7,8$ mmol/l)	Prawidłowa tolerancja glukozy
	140-199 mg/dl (7,8 – 11,0 mmol/l)	Nieprawidłowa tolerancja glukozy (IGT)
	$\geq 200$ mg/dl ( $\geq 11,1$ mmol/l)	Cukrzyca

**Tabela 3.3.** Kryteria rozpoznania zespołu metabolicznego według WHO oraz NCEP i ATP III

Kryteria zespołu metabolicznego	Według zmodyfikowanego stanowiska WHO (1999)	Według NCEP ATP III (2001)
<b>Glikemia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>cukrzyca typu 2</li> <li>nieprawidłowa glikemia na czczo</li> <li>nieprawidłowa tolerancja glukozy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>glikemia na czczo <math>\geq 110</math> mg/dl</li> </ul>
<b>Otyłość</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>BMI <math>&gt; 30</math> kg/m<sup>2</sup></li> <li>WHR mężczyźni <math>&gt; 0,93</math></li> <li>WHR kobiety <math>&gt; 0,85</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>talia mężczyźni <math>&gt; 102</math> cm</li> <li>talia kobiety <math>&gt; 88</math> cm</li> </ul>
<b>Nadciśnienie tętnicze</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li><math>&gt; 140/90</math> mmHg lub</li> <li>stosowanie leków</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><math>\geq 130/85</math> mmHg lub</li> <li>stosowanie leków hypotensyjnych</li> </ul>

	hypotensyjnych	
<b>Dyslipidemia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TG <math>\geq</math> 150 mg/dl</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TG <math>\geq</math> 150 mg/dl</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HDL mężczyźni &lt; 40 mg/dl</li> <li>• HDL kobiety &lt; 35 mg/dl</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HDL mężczyźni <math>\leq</math> 40 mg/dl</li> <li>• HDL kobiety <math>\leq</math> 50 mg/dl</li> </ul>
<b>Mikroalbuminuria</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mikroalbuminuria <math>\geq</math> 20 <math>\mu</math>g/min.</li> <li>• albuminuria/kreatynia <math>\geq</math> 30 mg/d</li> </ul>	-----
<b>Rozpoznawany, gdy</b>	Hiperglikemia + minimum 2 inne kryteria	Minimum 3 kryteria

Pacjentom wykonano standardowe badania laboratoryjne obejmujące:

1) badania biochemiczne: gospodarka lipidowa, stężenie kwasu moczowego, białko całkowite, glukoza

2) ocenę parametrów hemostazy: kompleks trombina-antytrombina (ang. *Thrombin-Antithrombin Complex* – TAT), czynnik von Willebrand’a (ang. *von Willebrand factor* – vWF), płytkowy czynnik wzrostu (ang. *Platelet-Derived Growth Factor* – PDGF), białko chemotaktyczne dla monocytów (ang. *Monocyte Chemoattractant Protein-1* – MCP-1), rozpuszczalna forma płytkowo-śródbłonkowego czynnika adhezyjnego (ang. *Soluble Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* – sPECAM-1), aktywowany trombiną inhibitor fibrylizacji (ang. *Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor* – TAFI)

3) ocenę stanu zapalnego: interleukina 6 (ang. *Interleukin-6* – IL-6), fibrynogen, wysoce czułe białko C reaktywne (ang. *high-sensitive C-Reactive Protein* – hsCRP).

### 3.2. Określanie poziomu aktywacji receptora PAR-1 w cytometrii przepływowej

#### Izolacja i określenie liczby płytek krwi (PLT)

Celem otrzymania osocza bogatopłytkowego (ang. *Platelet-Rich Plasma* – PRP) do próbowki z 3.2% cytrynianem sodu (BDVacutainer 9NC 0.105M Buff. Na<sub>3</sub>Citrate; UK) pobierano 5 mL krwi żyłnej. Próbę wirowano (MPW-360 z rotorem horyzontalnym, IKA, Polska) w temperaturze pokojowej, przez 5 minut przy 1000 RPM a następnie oddzielano powstałe osocze od warstwy krwinek czerwonych. Celem określenia liczby PLT, z pobranej

próby pobierano do menżera z białym koralikiem określoną objętość osocza bogatopłytkowego, próbę dopełniano taką samą objętością prokainy, mieszano i inkubowano przez 10 min. w temperaturze pokojowej. Następnie określoną objętość próby nanoszono na komorę Thoma, inkubowano w wilgotnej kamerze przez 10 minut i liczono widoczne PLT w pięciu krzyżach siatki. Oceny ilościowej dokonywano za pomocą mikroskopu świetlnego Jenomed (Carl Zeiss, Niemcy).

Celem otrzymania osocza ubogopłytkowego (ang. *Platelet-Poor Plasma*, PPP), próbę PRP dodatkowo wirowano (MPW-310, IKA, Polska) w temperaturze pokojowej przez 15 minut przy 3000 x g. Następnie osocze delikatnie przenoszono do plastikowej probówki, a w następnej kolejności określoną objętość próby nanoszono na komorę Thoma, i inkubowano w wilgotnej kamerze przez 10 minut; widoczne PLT liczono w pięciu krzyżach siatki. Oceny ilościowej dokonywano za pomocą mikroskopu świetlnego Jenomed (Carl Zeiss, Niemcy).

#### **Aktywacja płytek krwi za pomocą peptydu aktywującego receptor trombinowy (TRAP)**

500  $\mu$ l bogatopłytkowego osocza rozpipetowano po 200  $\mu$ l i do każdej próby dodano po 2  $\mu$ l eptyfibatydu o stężeniu 4  $\mu$ g/ml. Otrzymane próby inkubowano przez 3 minuty celem ograniczenia powstawania agregatów płytkowych. Następnie do każdej z nich dodano po 25  $\mu$ l roztworu peptydu aktywującego receptor trombinowy TRAP 80  $\mu$ M (Thrombin Receptor Activator Peptid 6, Sigma-Aldrich, nr T1573, St. Louis, MO, USA) oraz inkubowano bez dostępu światła przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Zaktywowany materiał poddawano procedurze oznaczeń cytometrycznych.

#### **Wyznakowania PLT przeciwciałami PAR-1-APC**

Do plastikowych probówek rozpipetowano po 5  $\mu$ l: I) izolowanych PLT; II) izolowanych PLT, aktywowanych za pomocą TRAP. Próby inkubowano przez 40 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Następnie:

- I) do próby badanej PAR-1 bez aktywacji PLT dodano 5  $\mu$ l przeciwciał PAR-1-APC w stężeniu 5  $\mu$ g / $5 \times 10^5$  komórek (Allophycocyanin (APC)-conjugated mouse monoclonal anti-human PAR-1; clone# 731115; mouse isotype: IgG1, R&D Systems, Minneapolis, Kanada) oraz 5  $\mu$ l przeciwciał CD61-FITC (Monoclonal Mouse Anti-Human CD61, Platelet Glycoprotein IIIa/FITC, Clone Y2/51, code:F0803, DakoCytomation, Glostrup, Dania)
- II) do próby badanej PAR-1 po aktywacji PLT za pomocą TRAP dodano 5  $\mu$ l przeciwciał PAR-1-APC w stężeniu 5  $\mu$ g / $5 \times 10^5$  komórek (Allophycocyanin

- (APC)-conjugated mouse monoclonal anti-human PAR-1; clone# 731115; mouse isotype: IgG1, R&D Systems, Minneapolis, Kanada) oraz 5  $\mu$ l przeciwciał CD61-FITC (Monoclonal Mouse Anti-Human CD61, Platelet Glycoprotein IIIa/FITC, Clone Y2/51, code:F0803, DakoCytomation, Glostrup, Dania)
- III) do próby badanej PAR-1 po aktywacji PLT za pomocą TRAP, będącej negatywną kontrolą izotypową, dodano 5  $\mu$ l przeciwciał IgG1 gotowych do użycia (Negative Control Mouse IgG1, code:X0931, DakoCytomation, Glostrup, Dania)
- IV) do próby wybiórczego markera płytek dodano 5  $\mu$ l przeciwciał CD61 – FITC (Monoclonal Mouse Anti-Human CD61, Platelet Glycoprotein IIIa/FITC, Clone Y2/51, code:F0803, DakoCytomation, Glostrup, Dania)

Sporządzone próby zadano roztworem zawierającym: 1) 1 ml buforu fosforanowego bez  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$ , PBS pH 7.4 (Sigma-Aldrich, nr T1573, St. Louis, MO,USA); 2) 0,5% roztwór albuminy wołowej BSA (Albumin Bovin Serum Minimum 98% no.cat.A-7030-10G, Sigma-Aldrich, nr T1573, St. Louis, MO,USA); 3) 2 mM kwas wersenianowy EDTA (Sigma-Aldrich, nr T1573, St. Louis, MO,USA), a następnie wirowano ((MPW-360 z rotorem horyzontalnym, IKA, Polska) w temperaturze pokojowej przez 5 minut przy 1500xg, a potem usunięto z nich nadsącz. Powstałe osady wybarwionych komórek zawieszano w 1 ml PBS bez  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$ , pH 7,4, a potem przenoszono do probówek do systemu sortowania komórek aktywowanych fluorescencją (ang. *Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS), czyli cytometrii przepływowej. Odczyt i analizę próbek przeprowadzano za pomocą cytometru przepływowego (BD FACSCanto™ Clinical Flow Cytometry System, BD Biosciences, San Jose, Kanada).

### **Określanie ekspresji PAR-1 na poziomie transkrypcji**

W celu określenia poziomu ekspresji genów PAR-1 oraz kontrolnego  $\beta$ -aktyny wyizolowane z ludzkich limfocytów mRNA (przechowywane w  $-80^{\circ}\text{C}$ ) poddano reakcji odwrotnej transkrypcji łańcuchowej reakcji polimeryzacji (ang. *Reverse Transcriptase PCR*, *RT-PCR*). Doświadczenie to przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez producenta testu (TaqMan®Reverse Transcription Reagents no.cat. N808234, Applera, Warszawa, Polska). Każda z mieszanin reakcyjnych (25  $\mu$ l) zawierała: matrycę będącą wyizolowanym mRNA z próby krwi pacjenta (1 – 3  $\mu$ l w zależności od stężenia mRNA); 0,5  $\mu$ M dNTP: dATP, dGTP, dCTP i dTTP (5  $\mu$ l); 5,5 mM  $\text{MgCl}_2$  (5  $\mu$ l); 50 U odwrotną transkryptazę (0,63  $\mu$ l); bufor dla reakcji PCR (2,5  $\mu$ l); 2,5  $\mu$ M roztwór losowych heksametrów (1,25); 20U/l inhibitor RNazy

(0,5  $\mu$ l) oraz  $H_2O_{RNase\ free}$  (11,5 – 13,5  $\mu$ l). Reakcję prowadzono w 30 cyklach, składających się z inkubacji prowadzonej przez 10 minut w 25°C, 30 minutowej prolongacji prowadzonej w 48 °C oraz 5 minutowej dezaktywacji w 95°C. Równoległe, w tych samych warunkach czasu i temperatury prowadzono reakcję RT-PCR dla genu referencyjnego  $\beta$ -aktin . Uzyskane cDNA poddawano następnie reakcji PCR zgodnie z procedurą opisaną przez producenta zestawu (TaqMan®Fast Universal PCR Master Mix, No AmpErase®UNG nr.cat. 4352042, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, GA, USA).

### 3.3. Badania polimorfizmów w obrębie genu PAR-1

#### Izolacja DNA z krwi pełnej

W celu określenia polimorfizmów genetycznych w obrębie genu PAR-1 [tj. 506 I/D (dbSNP: rs35900074), 1426 C/T (dbSNP: rs32934), IVSn-14 (dbSNP: rs168753)] w grupie badanej i kontrolnej konieczne było wyizolowanie DNA z prób krwi wszystkich pacjentów. Próby te (uprzednio pobrane do probówek z EDTA (BD, Vacutainer K3E 7,2mg, Wokingham, UK) w objętości 100  $\mu$ l i mrożone w temp. - 80°C) poddawano procedurze opisanej przez producenta (Blood Mini no.cat. 022-50, firma A&A BIOTECHNOLOGY, Gdańsk, Polska). Po przeprowadzonym eksperymencie dokonano spektrofotometrycznej oceny ilościowej i jakościowej DNA w każdej z nich za pomocą spektrofotometru UV-VIS (Semco S91E, Warszawa, Polska) zgodnie z zasadą:

#### Ocena ilościowa:

$1A_{260}$  Unit of dsDNA = 50  $\mu$ g/ml  $H_2O$

$1A_{260}$  Unit of ssDNA = 33  $\mu$ g/ml  $H_2O$

Stężenie DNA w badanych próbkach o objętości = 50  $\mu$ l  $\pm$ 2 $\mu$ l, wahało się od 350 do 980  $\mu$ g/ml

#### Ocena jakościowa:

Ocenę jakości czystości próbki dokonano przez wyliczenie stosunku  $A_{260} / A_{280}$  (wartość oczekiwana: 1.8 – 2,05). Wszystkie odczyty badanych próbek mieściły się w granicach wartości 1.8 – 2.0

#### Synteza primerów do PCR

Syntezy par praimerów forward/reverse dla polimorfizmów genu PAR-1, tj: -506 I/D (mieszanka alleli I i D), -1426 C/T, - IVSn-14 A/T oraz genu referencyjnego  $\beta$ -aktin (o stałym, znanym poziomie ekspresji, pozwalającego na kontrolę łańcuchowej reakcji polimerazy PCR)

przeprowadzono w Pracowni Sekwencjonowania DNA IBB PAN; Oligo.PL. Dla polimorfizmów -506 I/D oraz -1426 C/T planowano przeprowadzenie tylko klasycznego PCR (z użyciem tylko jednej parów primerów), natomiast dla polimorfizmu - IVSn-14 A/T, z uwagi na specyfikę sekwencji DNA genu (tj. bliskości miejsca startu transkrypcji a lokalizacją szukanego miejsca transwersji), konieczne było przeprowadzenie podwójnego PCR, z użyciem dwóch par primerów. W pierwszej reakcji PCR amplifikacji poddawano dłuższy fragment, a w drugiej – otrzymany produkt (który dodatkowo oczyszczano przed kolejnym PCR). Sekwencje primerów, temperatury przyłączania ich do matryc oraz wielkości otrzymywanych produktów przedstawiono w Tabeli 3.4.

**Tabela 3.4.** Sekwencje zaprojektowanych starterów reakcji PCR

Sekwencja starterów	temperatura przyłączania	wielkość produktu
<b>506 I/D</b>	61 °C	123 pz (allel I)
	55 °C	110 pz (allel D)
<i>forward</i>		
5`- CTGTCGACGTCTCCACATCCCAGGA -3`		
<i>reverse</i>		
5`- CGAAGCTGTCAGTGACTCACACTGG -3`		
<b>1426 C/T</b>	53 °C	430 pz
<i>forward</i>		
5`- AACTGGGTACTTCCGCAATTT -3`		
<i>reverse</i>		
5`-TGCTAAGGGCCCCCAGGGGCGTCGCGGCTGGGGGTGGCC-3`		
<b>IVSn-14 A/T</b>	57 °C	
<i>forward</i>		
IVSF 5`- TTGTCGCTTTTGCCTTGTTG -3`		
<i>reverse</i>		
IVSR 5`- GGGAGCACAGACACAAACAG -3`		
	67 °C	270 pz
<i>forward</i>		
IVSF/SNP 5`- GCGTTCACTTTTTACATTTAAAATTTTTTT -3`		

---

*reverse*

IVSF/SNP 5`- GCTTTTGATTCTGAAAAATAAAAAT-3`

-  $\beta$ -aktin - gen referencyjny

66 °C

587 pz

*forward*

$\beta$ -aktinaF: 5' CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC 3'

*reverse*

$\beta$ -aktinaR: 5' AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC 3'

---

### Polimorfizm 506 I/D

(Insercja w pozycji 506, 13 pz, dwa allele: I i D)

W celu wykazania insercji w genie *PAR-1* w pozycji –506 (13 pz) fragment genu *PAR-1* amplifikowano z użyciem specyficznych starterów flankujących miejsce polimorficzne (sekwencję primerów przedstawiono w Tabeli 3.4). Mieszanina reakcyjna (25  $\mu$ l) zawierała: 0,2  $\mu$ M primera forward (1  $\mu$ l); 0,2  $\mu$ M primera reverse (1  $\mu$ l); matrycę będącą wyizolowanym DNA z próby krwi pacjenta (1,5  $\mu$ l); 0,2 mM dNTP: dATP, dGTP, dCTP i dTTP (1  $\mu$ l) (Sigma-Aldrich, nr T1573, St. Louis, MO, USA); 1,25 mM MgCl<sub>2</sub> (1  $\mu$ l); 0,5U polimerazy *Taq* (0,5  $\mu$ l) (BioLabs, MA, UK); bufor dla reakcji PCR (2,5  $\mu$ l) oraz H<sub>2</sub>O<sub>miliQ</sub> (16,5  $\mu$ l). Reakcję PCR prowadzono w 30 cyklach w następujących warunkach czasu i temperatury: wstępna denaturacja (94°C, 3 min.), denaturacja właściwa (94°C, 30 s.), hybrydyzacja matrycy z primerami (56°C, 30 s.), polimeryzacja (72°C, 1,15 min.), prolongacja (72°C, 2 min.). Po zakończeniu reakcji PCR próby trzymano w temperaturze 4 °C. Równolegle, w tych samych warunkach czasu i temperatury prowadzono reakcję PCR dla genu referencyjnego  $\beta$ -aktin.

Produkt PCR rozdzielano metodą elektroforezy w 3% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny (0,5  $\mu$ g/ml). Prowadzono ją pod napięciem 80 V przez 1 godzinę 20 minut w temperaturze pokojowej. Detekcję produktów prowadzono w świetle UV (Gel Logic 100 system, Kodak, NY, USA). Spodziewano się obecności produktów o następującej liczbie par zasad: 103 pz i 90 pz (I/D), 169 pz i 123 pz (II), 169 pz i 110 pz (DD), 568 pz ( $\beta$ -Aktin).

### Polimorfizm 1426 C/T

(Tranzycja C  $\rightarrow$ T, 1426 nukleotyd, w górę startu translacji, w regionie regulatorowym – zmiana generuje miejsce restrykcyjne dla enzymu *MvaI* – enzym trawi amplifikowaną



sekwencję na dwa fragmenty: 391 pz i 39 pz., natomiast allel typu dzikiego pozostaje niestrawiony)

Analizę polimorfizmu –1426 C/T przeprowadzono metodą PCR-RFLP. Fragment genu PAR-1, w którym mógł potencjalnie występować polimorfizm typu SNP, powielano z użyciem starterów forward i reverse, których sekwencję przedstawiono w Tabeli 3.4. Mieszaninę reakcyjną (25  $\mu$ l) sporządzono poprzez połączenie ze sobą: 0,5  $\mu$ l polimerazy (BIOTOOLS B&M Labs, S.A.10.036, Madryt, Hiszpania); 50 mM  $MgCl_2$  (1  $\mu$ l); mieszaniny d-NTPs Mix 5U/ $\mu$ l (1  $\mu$ l); buforu dla reakcji PCR (2,5  $\mu$ l);  $H_2O_{miliQ}$  (16,5  $\mu$ l) oraz 1,5  $\mu$ l matrycy otrzymanej po uprzednim trawieniu 4  $\mu$ l wyizolowanego DNA (z krwi pacjenta) enzymem restrykcyjnym *MvaI* (1U, Fermentas, no.cat.ER0551, Multiscan FC Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, GA, USA) w objętości 2  $\mu$ l buforu Tango i 12  $\mu$ l  $H_2O_{miliQ}$  w temperaturze 37°C przez 2 godziny. Reakcję PCR prowadzono w 30 cyklach w następujących warunkach czasu i temperatury: wstępna denaturacja (94°C, 3 min.), denaturacja właściwa (94°C, 30 s.), hybrydyzacja matrycy z primerami (56°C, 30 s.), polimeryzacja (72°C, 1,15 min.), prolongacja (72°C, 2 min.). Po zakończeniu reakcji PCR próby trzymano w temperaturze 4°C. Równolegle, w tych samych warunkach czasu i temperatury prowadzono reakcję PCR dla genu referencyjnego  $\beta$ -aktin.

Produkt PCR rozdzielano metodą elektroforezy w 3% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny (0,5  $\mu$ g/ml). Prowadzono ją pod napięciem 75 V przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Detekcję produktów prowadzono w świetle UV (Gel Logic 100 system, Kodak, NY, USA). Spodziewano się obecności produktów o następującej liczbie par zasad: 430 pz (CC), 430 pz i 391 pz (CT), 391 pz i 39 pz (TT), 567 pz ( $\beta$ -Aktin).

### **Polimorfizm IVSn-14 A/T**

*(Transwersja A  $\rightarrow$  T w sekwencji pośredniej (IVS), która znajduje się 14 nukleotydów w górę od miejsca startu eksonu 2)*

Polimorficzne IVSn-14 A/T w genie PAR-1 oznaczano techniką SNaPshot (reakcja wydłużania o 1 nukleotyd). W pierwszym etapie amplifikacji poddawano dłuższy fragment genu, który był hybrydyzowany z parą starterów IVSF i IVSR (Tabela 3.4.). Mieszanina reakcyjna (25  $\mu$ l) zawierała: 0,2  $\mu$ M primera forward (1  $\mu$ l), 0,2  $\mu$ M primera reverse (1  $\mu$ l); matrycę będącą wyizolowanym DNA z próby krwi pacjenta (1,5  $\mu$ l); 0,2 mM dNTP: dATP, dGTP, dCTP i dTTP (1  $\mu$ l) (Sigma-Aldrich, nr T1573, St. Louis, MO, USA); 1,25 mM  $MgCl_2$

(1  $\mu\text{l}$ ); 0,5U polimerazy *Taq* (0,3  $\mu\text{l}$ ) (BioLabs, MA, UK); bufor dla reakcji PCR (2,5  $\mu\text{l}$ ) oraz  $\text{H}_2\text{O}_{\text{miliQ}}$  (16,7  $\mu\text{l}$ ). Wstępną reakcję PCR prowadzono w 35 cyklach programu w następujących warunkach czasu i temperatury: denaturacja właściwa (96°C, 10 s.), hybrydyzacja matrycy z primerami (53°C, 30 s.), polimeryzacja (60°C, 30 s.), pauza (4°C, 2 min.). Sprawdzenia składu otrzymanej mieszaniny produktów reakcji PCR dokonano za pomocą poziomej elektroforezy w 1% żelu agarozowym w następujących warunkach napięcia, czasu i temperatury: 75 V, 1 godzina, temperatura pokojowa. Celem kolejnego etapu było usunięcie pojedynczych nukleotydów i nadmiaru primerów z mieszaniny reakcyjnej (4  $\mu\text{l}$ ), którego dokonano z użyciem mieszaniny (1,1  $\mu\text{l}$ ) enzymów restrykcyjnych: fostatazy alkalicznej (1  $\mu\text{l}$ ), eliminującej niezużyte dNTP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, SAP Fermentas, Wilno, Litwa) i egzonukleazy (0,1  $\mu\text{l}$ ) usuwającej nadmiar praimerów z mieszaniny produktów (*ExoI*, *Exonuclease I*, Fermentas, Wilno, Litwa). Reakcję trawienia prowadzono przez 30 min w temp. 37°C, a inaktywacji enzymów dokonano poprzez 15 minutową denaturację w temperaturze 80°C. Próby przechowywano w 4°C. Kolejnym etapem było przeprowadzenie reakcji PCR z użyciem drugiej pary starterów IVSF/SNP i IVSR/SNP (Tabela 3.4.), komplementarnych do sekwencji sąsiadującej z zmianą SNP w tzw. reakcji minisekwencjonowania, którą przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu *SNaPshot Multiplex Kit* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, GA, USA). Mieszanina reakcyjna (5  $\mu\text{l}$ ) zawierała: 1  $\mu\text{l}$  trawionego produktu PCR; 0,1  $\mu\text{M}$  starteru forward i reverse (1  $\mu\text{l}$ ), miks reakcyjne; (1,5  $\mu\text{l}$ ) i  $\text{H}_2\text{O}_{\text{miliQ}}$  (2,5  $\mu\text{l}$ ). Reakcja przeprowadzana była w 25 cyklach, w następujących warunkach: denaturacja: 96°C, 10 s.; hybrydyzacja ze starterami: 57°C, 30 s. i elongacja: 60°C, 30 s. Nieprzereagowane dideoksynukleotydy (ddNTPs) trawiono po zakończeniu PCR za pomocą 1U SAP poprzez inkubację w temperaturze 37°C w czasie 30 min., a inaktywację enzymów poprzez 15 minutową denaturację w temperaturze 80°C. Po zakończeniu reakcji próby przygotowano do naniesienia na kapilary: do 10  $\mu\text{l}$  mieszaniny formamidu, zawierającej standard masy LIZ 120 (Applied Biosystems, no. cat. 4324287, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, GA, USA) dodano 1  $\mu\text{l}$  produktu otrzymanego w PCR *SNaPshot* (poddanego działaniu enzymów restrykcyjnych) i denaturowano ją przez 5 min. w 95°C. Rozdział i detekcję produktów przeprowadzano za pomocą elektroforezy kapilarnej w analizatorze genetycznym (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, GA, USA). Wyniki analizowano wobec tzw. wewnętrznego standardu wielkości (GeneScan 120LIZ-Size Standard 800Loads, Applera Polska, no.cat.4324287, Warszawa, Polska) z użyciem odpowiedniego programu (GeneMapperID v3.2 software, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, GA, USA).

### 3.4. Określanie agregacji płytek krwi

Agregometria optyczna oparta na pomiarze światła widzialnego (ang. *Light Transmission Aggregometry*, LTA) uważana jest za złoty standard diagnostyki zaburzeń funkcji PLT. Do próbki osocza bogatopłytkowego (PRP) dodawany jest w odpowiednim stężeniu agonista agregacji PLT, czynnik inicjujący tworzenie się agregatów płytkowych tj. TRAP, ADP lub kolagen. Wskutek interakcji PLT z agonistą dochodzi do aktywacji i następnie do agregacji PLT. Powstaniu agregatów płytkowych towarzyszy proporcjonalny wzrost przepuszczalności światła przechodzącego przez kuwety pomiarowe.

W celu określenia zdolności PLT do agregacji w każdej z próbek osocza (zawierającej wyizolowane PLT) zastosowano metodę pomiaru mętności roztworu osocza. Agregacja PLT w tych próbkach była wywołana czynnikiem inicjującym tj. TRAP, ADP lub kolagenem – wskutek dodania czynnika dochodziło do tworzenia się skupisk PLT (agregatów), co zwiększało przepuszczalność światła przez osocze. Stały pomiar ilości światła przechodzącego przez osocze pozwalał na sporządzanie krzywej agregacyjnej, przedstawiającej podatność PLT na działanie aktywatorów. Wysokie wartości procentowe progów agregacyjnych na dany czynnik świadczyły o podwyższonej podatności PLT na agregację, czyli wskazywały na aktywację PLT u danego pacjenta. Obniżenie poziomu agregacji mogło być natomiast spowodowane zażywaniem przez pacjenta niesteroidowych leków przeciwzapalnych lub dysfunkcją (wrodzoną bądź nabytą) PLT.

W pierwszym etapie stężenie PLT w osoczu (pobranym uprzednio do próbek z cytrynianem sodu) doprowadzano do wartości 250 000 PLT w 250  $\mu$ l poprzez rozcieńczanie osocza bogatopłytkowego (PRP) autologicznym ubogopłytkowym (PPP). Kontrolę stanowiło 250  $\mu$ l PPP. Następnie do ustabilizowanego układu eksperymentalnego wprowadzano 25  $\mu$ l czynnika agregacyjnego, w ustalonym wcześniej stężeniu (ADP, TRAP lub kolagenu). Pomiar agregacji prowadzono przez 7 min. Procedury wirowań przeprowadzano na wirówce MPW-360 z rotorem horyzontalnym (IKA, Polska). Oceny ilościowe dokonywano w mikroskopie świetlnym Jenomed (Carl Zeiss, Niemcy). Ocena agregacji PLT odbywała się za pomocą agregometru APACT (Labor, Hamburg, Niemcy).

Określenie typu agregacji PLT *in vitro* jest próbą scharakteryzowania zdolności płytek do tworzenia głównego czopu hemostatycznego *in vivo*. Agregację pod wpływem kolagenu (Cat.385. Chrono-Log, Havertown, PA, USA) w stężeniu 5  $\mu$ g/ml stosuje się dla oceny ogólnej zdolności agregacji PLT. Występowanie fazy opóźnienia do 1 min. jest typowym zjawiskiem w przypadku tego agonisty i skutkuje uprzednim wydzielaniem ATP w stosunku do procesu

agregacji płytek. Kolagen aktywuje proces agregacji płytek poprzez aktywację głównych receptorów płytkowych – glikoproteiny VI (GP VI) na powierzchni płytek krwi (wartości referencyjne agregacji: 70-100%).

Adenozynodifosforan jest naturalnym agonistą agregacji PLT i aktywuje je poprzez oddziaływanie ze swoistymi receptorami purynergicznymi – P2Y<sub>1</sub> oraz P2Y<sub>12</sub>. Stymulacja PLT za pomocą ADP (Cat.384. Chrono-Log, Havertown,PA,USA) w stężeniu 5 – 20 μM, początkowo prowadzi do wzrostu stężenia wapnia (Ca<sup>2+</sup>) w cytoplazmie, czemu towarzyszy zahamowanie czynności cyklazy adenyłowej (AC). W efekcie nie dochodzi do syntezy inhibitora procesu agregacji – cyklicznego monofosforanu adenozy (cAMP). Za wewnątrzkomórkowy wzrost Ca<sup>2+</sup> wywołany stymulacją ADP odpowiada aktywacja błonowych kanałów wapiennych (ich rolę pełni purynergiczny receptor P2X<sub>1</sub>) i napływ jonów wapnia ze środowiska zewnętrznego do cytoplazmy PLT. Ze względu na fakt, że ADP jest magazynowany w ziarnistościach gęstych PLT, w wyniku ich aktywacji dochodzi do uwolnienia zawartości ziarnistości (w tym ADP), które wzmacniają agregację i powodują powstanie drugiej fazy krzywej agregacji. Zaburzenie szlaku aktywacji PLT przez ADP powoduje nieprawidłową odpowiedź na pozostałych agonistów (norma agregacji: 70-90%).

Agregacja płytek krwi obserwowana po dodaniu peptydu aktywującego receptor trombinowy TRAP (Thrombin Receptor Activator Peptid 6, Sigma-Aldrich, nr T1573, St. Louis, MO,USA) w stężeniu 10 μM/200 μl materiału badanego (PLT 250000/200μl osocza PRP) wywołującego to zjawisko, mierzona jest metodą procentowej zmiany mętności próbki oraz czasu tej reakcji. TRAP, wywołuje aktywację, następnie adhezję oraz agregację PLT poprzez receptor płytkowy – tromboksan - TXA<sub>2</sub> (Norma agregacji: 80-100%).

### **Obrazowanie mikroplatek w cytometrii przepływowej**

Obraz mikroplatek w preparacie był oceniany za pomocą cytometru przepływowego. Materiał komórkowy odpowiednio wybarwiano celem wizualizacji adhezyjnego receptora integryny GP3A i β<sub>3</sub> (CD61). Odczyt procentowy poszukiwanych jednostek prowadzono po uprzednim ustawieniu odpowiedniej „bramki gęstości i wielkości komórek”, zgodnej z danymi literaturowymi, określającymi położenie badanych mikroplatek w preparacie. Wartości wyrażono w ilości barwionych struktur ocenianych w 10 000 wczytów.

### **3.5. Oceny ilościowe wybranych parametrów hemostazy i stanu zapalnego**

#### **Czynnik von Willebranda vWF**

Oceny ilościowej czynnika von Willebranda (vWF) w próbkach osocza pacjentów dokonywano za pomocą testu immunoenzymatycznego EIA (Asserachrom vWF, no.cat.11875396, Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, Francja) do badań diagnostycznych (zakres normy: 50-160%). W celu przygotowania próby do eksperymentu mieszano 1 część osocza krwi pacjenta pobranej do probówki z 3.2% cytrynianem sodu z 9 częściami krwi żyłnej pacjenta, natychmiast wirowano (MPW-310, IKA, Polska) przy 2500 x g w temperaturze pokojowej przez 15 min. i przechowywano w -40°C. Przed eksperymentem próby rozmrażano poprzez 10 minutową inkubację w 37°C oraz rozcieńczano 51 razy. Test EIA przeprowadzano zgodnie z wytycznymi producenta, przestrzegając warunków inkubacji i płukania (no.cat.11875396). Wartości absorbancji oznaczono fotometrycznie (Multiscan FC Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, GA, USA), przy długości fali 492 nm.

#### **Kompleks trombina-antytrombina III (TAT)**

Oceny ilościowej czynnika kompleksu trombina-antytrombina III (TAT) w próbkach osocza pacjentów dokonywano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA (Enzygnost TAT micro, no.cat. OWMG G15E4141 S/CS, Dade Behring, Frankfurt, Niemcy). W celu przygotowania próby do eksperymentu mieszano 1 część osocza krwi pacjenta pobranej do probówki z 3.2% cytrynianem sodu z 9 częściami krwi żyłnej pacjenta, natychmiast wirowano (MPW-310, IKA, Polska) przy 1500 x g w temperaturze pokojowej przez 15 min. i przechowywano w -40°C. Test ELISA przeprowadzano zgodnie z wytycznymi producenta, przestrzegając warunków inkubacji i płukania (OWMG G15E4141 S/CS). Wartości absorbancji oznaczono fotometrycznie (Multiscan FC Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, GA, USA), przy długości fali 492 nm.

#### **Płytkowy czynnik wzrostu PDGF**

Oceny ilościowej izoformy AB płytkowego czynnika wzrostu (PDGF) w próbkach osocza pacjentów dokonywano na płytkach ELISA (Quantikine® Human PDGF-AB, no.cat.DHD00B, R&D Systems, Minneapolis, Kanada) do badań diagnostycznych (zakres normy: 1,0 – 4,1 µg/l), opłaszczonych monoklonalnymi przeciwciałami anty-PDGF-AB.

Do eksperymentu używano próbek krwi żyłnej pobranych do probówek z EDTA, umieszczonych na lodzie, które natychmiast wirowano (MPW-310, IKA, Polska) w temperaturze 2 – 8°C przy 1000 x g w przez 15 min. i przechowywano w -40°C. Przed eksperymentem próby rozmrażano oraz rozcieńczano 50 razy za pomocą buforu Calibrator Diluent RD6-11, dołączonego do zestawu ELISA.

Test ELISA przeprowadzano zgodnie z wytycznymi producenta, przestrzegając warunków inkubacji i płukania (no.cat.DHD00B). Wartości absorbancji oznaczono fotometrycznie (Multiscan FC Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, GA, USA), przy długości fali 450 nm.

### **Monocytna proteina 1 (MCP-1)**

Oceny ilościowej monocytarnej proteiny 1 (MCP-1) w próbkach surowicy krwi pacjentów dokonywano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA (Human MCP-1, no.cat.BMS281CE, Bender MedSystems, Wiedeń, Austria), przeznaczonego do badań naukowych (zakres normy: brak). Do eksperymentu używano krwi żyłnej pobranych do probówek „na skrzep”, które po wykrzepieniu wirowano (MPW-310, IKA, Polska) w temperaturze pokojowej przy 700 x g w przez 10 min. i przechowywano w -40°C. Przed eksperymentem próby rozmrażano oraz rozcieńczano 5 razy za pomocą buforu testowego (assay buffer), dołączonego do zestawu ELISA.

Test ELISA przeprowadzano zgodnie z wytycznymi producenta, na płytkach opłaszczonych przeciwciałami monoklonalnymi anti-MCP-1, przestrzegając warunków inkubacji i płukania (no.cat.BMS281CE). Wartości absorbancji oznaczono fotometrycznie (Multiscan FC Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, GA, USA), przy długości fali 450 nm.

### **Interleukina 6 (IL-6)**

Oceny ilościowej interleukiny 6 (IL-6) w próbkach surowicy krwi pacjentów dokonywano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA, (Human Il-6, no.cat.BMS213/2CE, Bender MedSystems, Wiedeń, Austria), przeznaczonego do badań naukowych (zakres normy: brak). Do eksperymentu używano próbek krwi żyłnej pobranych do probówek „na skrzep”, które po wykrzepieniu wirowano (MPW-310, IKA, Polska) w temperaturze pokojowej przy 700 x g w przez 10 min. i przechowywano w -40°C. Przed eksperymentem próby rozmrażano oraz rozcieńczano 2 razy za pomocą buforu testowego

(assay buffer), dołączonego do zestawu ELISA. Test ELISA przeprowadzano zgodnie z wytycznymi producenta, na płytkach opłaszczonych przeciwciałami monoklonalnymi anti-IL-6, przestrzegając warunków inkubacji i płukania (no.cat.BMS213/2CE). Wartości absorbancji oznaczono fotometrycznie (Multiscan FC Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, GA, USA), przy długości fali 450 nm.

### **Rozpuszczalne cząsteczki adhezji komórkowej płytkowo-śródbłonkowej typ 1 (sPECAM-1)**

Oceny ilościowej rozpuszczalnych cząsteczek adhezji komórkowej płytkowo-śródbłonkowej typ 1 (sPECAM-1) w próbkach surowicy krwi pacjentów dokonywano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA, (Human sPECAM-1, no.cat.BMS229, Bender MedSystems, Wiedeń, Austria) przeznaczonego do badań naukowych (zakres normy: brak). Do eksperymentu używano próbek krwi żyłnej pobranych do probówek „na skrzep”, które po wykrzepieniu wirowano (MPW-310, IKA, Polska) w temperaturze pokojowej przy 700 x g w przez 10 min. i przechowywano w -40°C. Przed eksperymentem próby rozmrażano oraz rozcieńczano 10 razy za pomocą buforu próbkowego (sample diluent), dołączonego do zestawu ELISA. Test ELISA przeprowadzano zgodnie z wytycznymi producenta, na płytkach opłaszczonych przeciwciałami monoklonalnymi anti-sPECAM-1, przestrzegając warunków inkubacji i płukania (no.cat.BMS229). Wartości absorbancji oznaczono fotometrycznie (Multiscan FC Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, GA, USA), przy długości fali 450 nm.

### **Czynnik aktywujący płytki (PAF-AH)**

Oceny poziomu aktywności czynnika aktywującego płytki (PAF-AH) w próbkach surowicy krwi pacjentów dokonywano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA, (PAF Acetylhydrolase Assay Kit, no.cat. 760901, Cayman Chemical Company, Michigan, USA) przeznaczonego do badań naukowych (zakres normy: brak). W celu przygotowania próby do eksperymentu mieszano 1 część osocza krwi pacjenta pobranej do probówki z 3.2% cytrynianem sodu z 9 częściami krwi żyłnej pacjenta, natychmiast wirowano (MPW-310, IKA, Polska) przy 1500 x g w temperaturze pokojowej przez 15 min. i przechowywano w -40°C. Przed eksperymentem próby rozmrażano i poddawano sączeniu molekularnemu przy użyciu kolumn cut-off 30 kDa (Amicon® Ultra Centrifugal Filter, 30 kDa MWCO Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) celem kondensacji badanego enzymu w próbce. W celu określenia aktywności enzymatycznej zewnątrzkomórkowej PAF-AH na płytkę ELISA наносono po 10

μl: próby kontroli nieenzymatycznej, kontroli pozytywnej oraz próbki materiału biologicznego, które następnie zadawano 10 μl kwasu 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowego (DTNB) oraz 5 μl buforu do oznaczeń. Reakcję inicjowano poprzez podanie 200 μl roztworu substratu i mieszano. Absorbancje mierzono przy długości fali 405 – 414 nm w 5 punktach pomiaru co 60 sekund.

### **Inhibitor fibrynolizy aktywowany trombiną (TAFI)**

Oceny ilościowej inhibitora fibrynolizy aktywowanego trombiną (TAFI) w próbkach osocza pacjentów dokonywano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA (IMUCLONE ®TAFI ELISA, no.cat.873, American Diagnostica inc., NY, USA) do badań naukowych (zakres normy: brak). W celu przygotowania próby do eksperymentu mieszano 1 część osocza krwi pacjenta pobranej do probówki z 3.2% cytrynianem sodu z 9 częściami krwi żyłnej pacjenta, natychmiast wirowano (MPW-310, IKA, Polska) przy 1500 x g w temperaturze pokojowej przez 15 min. i przechowywano w -40°C. Przed eksperymentem próby rozmrażano poprzez 10 minutową inkubację w 37°C oraz rozcieńczano 50 razy za pomocą roztworu Sample Diluent-F, dołączonego do zestawu. Test ELIA przeprowadzono zgodnie z wytycznymi producenta, przestrzegając warunków inkubacji i płukania (no.cat.873). Wartości absorbancji oznaczono fotometrycznie (Multiscan FC Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, GA, USA), przy długości fali 450 nm.

### **3.6. Diagnostyczne parametry biochemiczne**

Podczas hospitalizacji pacjentom standardowo oznaczano następujące parametry diagnostyki laboratoryjnej: morfologia 5-diff (16-parametrowy analizator hematologicznego ABX MICROS OT, Horiba Medical, Japonia odczytnikami firmy ABX ROCHE Diagnostic Systems, Szwajcaria), metabolity azotowe (mocznik, kreatynina), parametry gospodarki lipidowej (cholesterol całkowity, frakcje LDL i HDL, triglicerydy) wykładniki stanu zapalnego (hsCRP, OB.), fibrynogen, kwas moczowy, białko całkowite, glukoza, parametry krzepnięcia (czas APTT, czas protrombinowy, INR). Określano także dystans chromania oraz wskaźnik kostka – ramię. Badania diagnostyczne były wykonane w Laboratorium Diagnostycznym Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu.



### 3.7. Opracowanie statystyczne wyników

Statystykami opisowymi w pracy były: średnia, odchylenie standardowe, mediana, maksimum, minimum. Dla wszystkich testów przyjęto poziom istotności  $\alpha=0,05$ . Do weryfikacji normalności rozkładu cech wykorzystywano test W Shapiro-Wilk. Do oceny różnic rozkładu cech pomiędzy analizowanymi grupami wykorzystywano test Wilcoxon dla sumy rang oraz t-test Welch'a dla zmiennych niepowiązanych. Niezależność cech jakościowych weryfikowano testem Chi-kwadrat.

Ponadto, różnice między MC oraz MZ badano za pomocą modelowania szansy występowania miażdżycy wśród uczestników badania chorujących na jedną ze wspomnianych chorób. W tym celu posłużono się regresją logistyczną: jednowymiarową, wielowymiarową opartą na efektach (zmiennych) oraz wielowymiarową opartą na efektach oraz interakcjach (2. stopnia) między nimi. Do tej analizy wykorzystano program Statistica 13.3 na licencji Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Przed wykonaniem analizy dokonano czyszczenia danych z wartości ekstremalnych (poprzez usunięcie danego rekordu z bazy przeznaczonej do dalszej analizy). Ponadto, sprawdzono spełnienie założeń o liniowości względem logarytmu analizowanej szansy (test Boxa-Tidwella). Wszystkie zmienne ilościowe zostały scentrowane na medianę w celu lepszego dopasowania funkcji logitowej do danych. Budowa modelu wielowymiarowego opartego na efektach była oparta na wyłonieniu najbardziej wielowymiarowo-istotnych zmiennych za pomocą iteracji (metoda krokowa wsteczna, kryterium włączania/wyłączania:  $p = 0,05$ ; Tabela 4.4.). Decyzja o włączeniu zmiennych do modelu była oparta na statystyce Walda. W przypadku usuwania zmiennych z modelu posłużono się statystyką S Lagrange'a (tzw. „Score test”). Modele wielowymiarowe przedstawiające wybrane interakcje 2. stopnia stworzono poprzez wstępną ocenę istotności wszystkich możliwych interakcji względem modelu naiwnego (test LR typu 1), a następnie – wybraniu tych interakcji, które pozostawały istotne w modelu czynnikowym (tj. jeśli efektami są A oraz B, to model zawiera: A, B oraz interakcję A\*B). Wizualizacje danych zostały wykonane w Pythonie 3.10.7 (pakiety: pandas 1.4.4, numpy 1.21.4, matplotlib 3.5.3, seaborn 0.11.2).

## 4. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

### 4.1. Ocena antropometryczna, laboratoryjna i kliniczna miażdżycy zarostowej (MZ) w porównaniu i makroangiopatii cukrzycowej (MC)

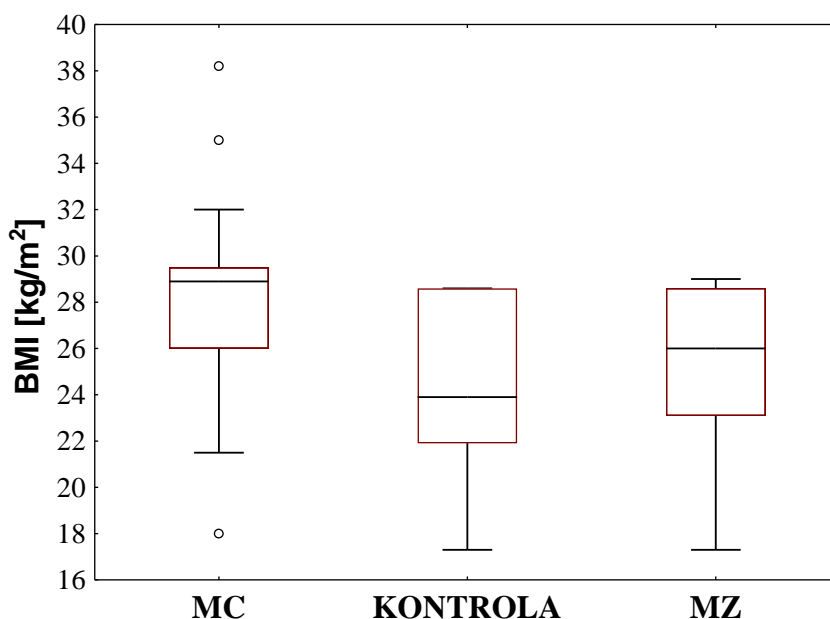
Badaniem objęto 95 pacjentów, których ogólną charakterystykę przedstawiono w punkcie 3.1. niniejszej pracy. Grupę badaną stanowił materiał biologiczny (krew, moczu) pobrany od 43 pacjentów z miażdżycą zarostową (MZ) oraz od 34 pacjentów z makroangiopatią cukrzycową (MC), natomiast grupę kontrolną – materiał pobrany od 18 ochotników (Kontrola). W celu dokonania wstępnej oceny klinicznej pacjentów określono podstawowe parametry antropometryczne: wiek, stosunek obwodu talii do obwodu bioder (*ang. Waist-Hip Ratio, WHR*), wskaźnik masy ciała (*ang. Body Mass Index, BMI*) oraz skurczowe i rozkurczowe ciśnienie tętnicze krwi. Dokonano również analizy porównawczej między badanymi grupami, by sprawdzić występowanie różnic istotnych statystycznie dla każdego z określanych parametrów. Szczegółowe wyniki analizy przedstawiono w Tabeli 4.1.

**Tabela 4.1.** Porównanie wartości wybranych parametrów antropometrycznych oraz biochemicznych wykładników progresji makroangiopatii cukrzycowej i miażdżycy zarostowej w grupie badanej i kontrolnej

Wybrane parametry antropometryczne oraz wartości ciśnienia tętniczego krwi						
Badane parametry	1. Pacjenci z MC (n=34)	2. Pacjenci z MZ (n=43)	3. Grupa kontrolna (n=18)	P	P	P
	średnia ± SD	Średnia ± SD	Średnia ± SD	1 v 2	1 v 3	2 v 3
Ciśnienie skurczowe[mmHg]	132,32 ± 8,54	131,16 ± 9,31	128,22 ± 4,40	<b>0,831</b>	<b>0,245</b>	<b>0,456</b>
Ciśnienie rozkurczowe[mmHg]	80,44 ± 6,20	79,63 ± 8,03	78,33 ± 5,94	<b>0,881</b>	<b>0,593</b>	<b>0,808</b>
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	32,59 ± 6,72	27,56 ± 4,02	25,94 ± 7,92	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,368</b>
WHR	0,96 ± 0,07	0,85 ± 0,05	0,80 ± 0,09	<b>0,193</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,570</b>
Wiek [lata]	60,88 ± 7,51	56,69 ± 5,72	57,50 ± 2,12	<b>0,388</b>	<b>0,304</b>	<b>0,640</b>
Biochemiczne wykładniki progresji makroangiopatii cukrzycowej i miażdżycy zarostowej						
PT [%]	105,47 ± 8,56	103,16 ± 7,57	102,22 ± 7,67	<b>0,282</b>	<b>0,154</b>	<b>0,660</b>
Fibrynogen [g/l]	4,13 ± 0,54	4,41 ± 1,09	4,37 ± 1,21	<b>0,305</b>	<b>0,349</b>	<b>0,875</b>

Cholesterol całkowity [mg/dl]	194,74 ± 58,09	195,93 ± 55,71	189,94 ± 51,09	<b>0,936</b>	<b>0,749</b>	<b>0,709</b>
Cholesterol HDL [mg/dl]	42,94 ± 10,75	44,31 ± 9,73	64,31 ± 8,53	<b>0,609</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
Cholesterol LDL [mg/dl]	110,03 ± 40,88	124,56 ± 45,12	111,46 ± 25,36	<b>0,214</b>	<b>0,895</b>	<b>0,234</b>
Triglicerydy [mg/dl]	220,44 ± 250,65	141,28 ± 62,07	86,79 ± 7,25	<b>0,061</b>	<b>0,002</b>	<b>0,196</b>
Glukoza [mg/dl]	134,94 ± 41,24	93,40 ± 10,27	94,00 ± 3,46	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,930</b>
Kwas moczowy [mg/dl]	5,91 ± 1,65	5,43 ± 1,29	5,30 ± 0,71	<b>0,188</b>	<b>0,118</b>	<b>0,733</b>
ALAT [U/l]	28,62 ± 29,31	26,35 ± 15,41	22,33 ± 13,40	<b>0,691</b>	<b>0,303</b>	<b>0,482</b>
AspAT [U/l]	26,98 ± 13,69	25,80 ± 15,92	23,42 ± 7,61	<b>0,752</b>	<b>0,374</b>	<b>0,526</b>
GGTP [U/l]	45,67 ± 65,23	43,57 ± 54,58	29,94 ± 22,23	<b>0,886</b>	<b>0,316</b>	<b>0,354</b>
Mocznik [mg/dl]	34,74 ± 11,42	22,80 ± 12,65	30,20 ± 9,90	<b>0,001</b>	<b>0,260</b>	<b>0,024</b>
Kreatynina [mg/dl]	1,01 ± 0,21	1,44 ± 1,42	1,29 ± 1,16	<b>0,179</b>	<b>0,356</b>	<b>0,611</b>
Białko całkowite [g/dl]	6,74 ± 1,21	6,86 ± 0,49	6,90 ± 0,54	<b>0,624</b>	<b>0,505</b>	<b>0,824</b>
OB [mm]	14,91 ± 15,10	12,58 ± 10,68	10,22 ± 6,04	<b>0,467</b>	<b>0,169</b>	<b>0,461</b>
<b>Średnie wartości biochemicznych wykładników oceny układu homeostazy organizmu</b>						
vWF [%]	174,36 ± 33,24	153,45 ± 28,12	125,89 ± 31,80	<b>0,013</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,001</b>
PDGF [pg/ml]	20914,02 ± 8505,66	22806,36 ± 6494,29	16416,94 ± <sup>7442,</sup> <sub>15</sub>	<b>0,346</b>	<b>0,027</b>	<b>0,002</b>
TAT [ug/l]	3,62 ± 1,18	3,34 ± 1,54	1,77 ± 0,44	<b>0,415</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
IL-6 [pg/ml]	3,17 ± 1,53	2,80 ± 1,59	1,81 ± 0,81	<b>0,340</b>	<b>0,001</b>	<b>0,013</b>
MCP-1 [pg/ml]	344,45 ± 28,70	377,50 ± 152,37	282,21 ± 68,00	<b>0,259</b>	<b>0,035</b>	<b>0,002</b>
sPECAM-1 [ng/ml]	44,43 ± 13,72	43,19 ± 6,89	46,50 ± 4,26	<b>0,855</b>	<b>0,761</b>	<b>0,475</b>
TAFI [%]	108,70 ± 33,68	98,62 ± 32,15	76,59 ± 8,09	<b>0,168</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,009</b>
PAF-AH μmol/min/ml	0,14 ± 0,04	0,15 ± 0,04	0,14 ± 0,02	<b>0,339</b>	<b>0,360</b>	<b>0,078</b>

Porównanie wartości dla losowo wybranego parametru (BMI) pacjentów z MC, MZ lub z grupy kontrolnej przedstawiono na Rycinie 4.1.



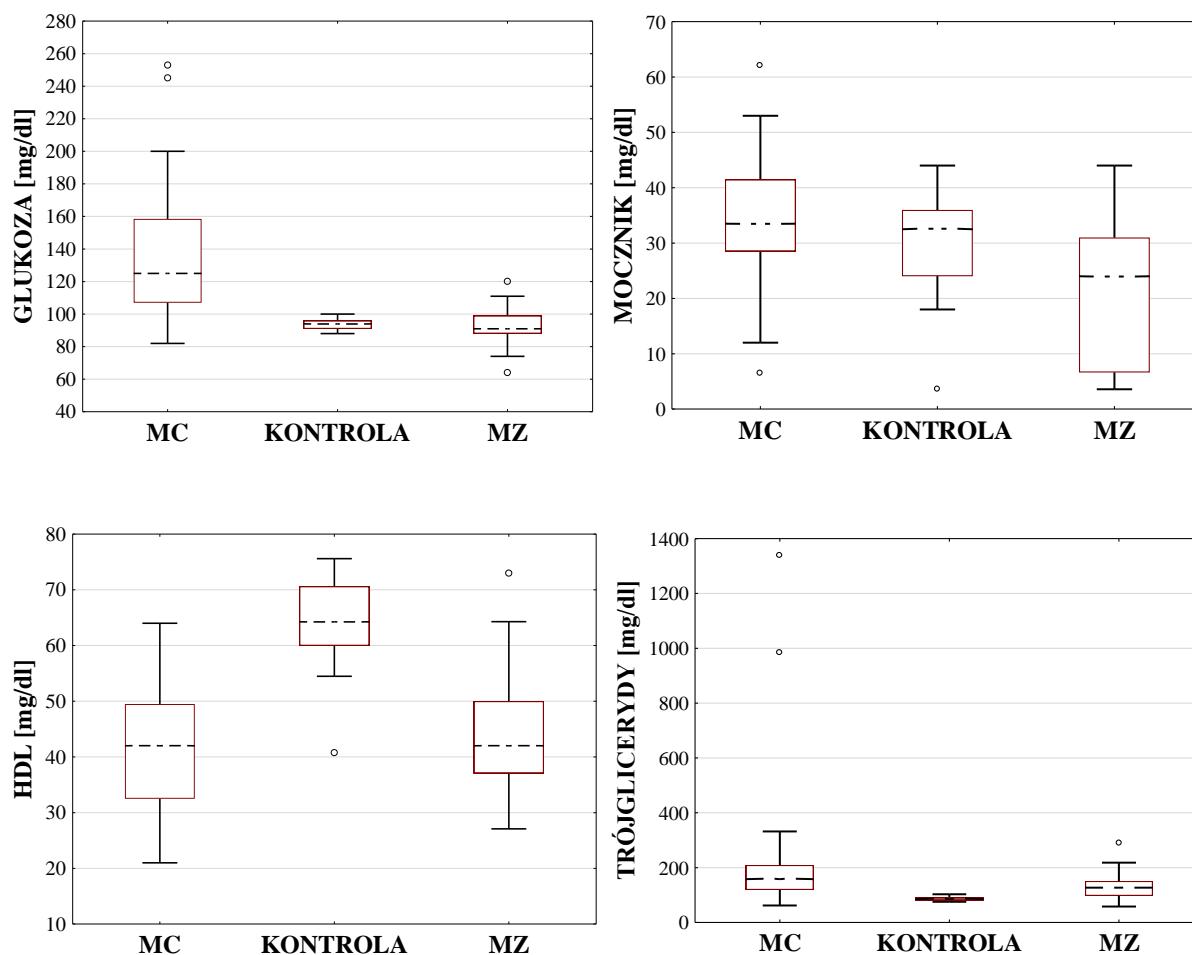
**Rycina 4.1.** Wartości BMI pacjentów z makroangiopatią cukrzycową (MC), grupy kontrolnej (KONTROLA) oraz z miażdżycą zarostową (MZ)

Zestawienie wybranych parametrów antropometrycznych badanych grup chorych i grupy kontrolnej, wykazało:

- znacząco niższe wartości BMI ( $27,56 \pm 4,02$  vs.  $32,59 \pm 6,72$   $\text{kg/m}^2$ ;  $p < 0,001$ ) u chorych z MZ w porównaniu do chorych z MC,
- istotnie wyższe wartości BMI ( $32,59 \pm 6,72$  vs.  $25,94 \pm 7,92$   $\text{kg/m}^2$ ;  $p < 0,001$ ) i WHR ( $0,96 \pm 0,07$  vs.  $0,80 \pm 0,09$ ;  $p < 0,001$ ) u chorych z MC w porównaniu do grupy kontrolnej,
- ponadto nie zaobserwowano żadnych istotnych różnic dla pozostałych parametrów wyznaczonych w analizie porównującej badane grupy i grupę kontrolną, przy czym tylko u 6 z 95 uczestników rozpoznano nadciśnienie tętnicze (wartości  $\geq 140/90$  mmHg), którego zakres referencyjny został opisany w zaleceniach 7 Raportu Join National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7).

Podobną analizę porównawczą między pacjentami z MZ, MC i z grupy kontrolnej przeprowadzono dla następujących biochemicznych czynników progresji miażdżycy: stężenia fibrynogenu, cholesterolu całkowitego, cholesterolu HDL, cholesterolu LDL, trójglicerydów, glukozy, kwasu moczowego, mocznika, kreatyniny, białka całkowitego, a także aktywności

aminotransferazy alaninowej (ALAT), aminotransferazy asparaginowej (AspAT) oraz gammaglutamylotransferazy (GGTP), współczynnik protrombinowy oraz dla odczynu Biernackiego (OB). Wyniki przedstawiono na Rycinie 4.2.



**Rycina 4.2.** Wartości stężenia glukozy, mocznika, HDL i trójglicerydów w próbach krwi pacjentów z makroangiopatią cukrzycową (MC) grupy kontrolnej (KONTROLA) oraz z miażdżycą zarostową (MZ)

Analiza statystyczna wykazała:

- istotnie wyższe stężenie mocznika ( $34,74 \pm 11,42$  vs.  $22,80 \pm 12,65$  mg/dl;  $p < 0,001$ ) w grupie z MC w porównaniu z MZ, co wskazuje na częstsze występowanie zaburzeń czynności nerek,
- istotnie niższą glikemię ( $93,40 \pm 10,27$  vs.  $134,94 \pm 41,24$  mg/dl;  $p < 0,001$ ) w grupie z MZ w porównaniu z MC, co jest oczywiste z uwagi na etiologię zaburzenia,
- znaczącą redukcję frakcji HDL ( $44,31 \pm 9,73$  vs.  $64,31 \pm 8,53$  mg/dl;  $p < 0,001$ ) oraz istotnie niższe stężenie mocznika ( $22,80 \pm 12,65$  mg/dl vs.  $30,20 \pm 9,90$  mg/dl;  $p = 0,024$ ) u chorych z MZ w porównaniu z grupą kontrolną,

- istotnie wyższe stężenie glikemii na czczo ( $134,94 \pm 41,24$  vs.  $94,00 \pm 3,46$  mg/dl;  $p < 0,001$ ) oraz wzrost stężenia trójglicerydów ( $220,44 \pm 250,65$  vs.  $86,79 \pm 7,25$  mg/dl;  $p < 0,001$ ) u chorych z MC w porównaniu z grupą osób zdrowych,
- znaczącą redukcję frakcji HDL cholesterolu ( $42,94 \pm 10,75$  vs.  $64,31 \pm 8,53$  mg/dl;  $p < 0,001$ ) u chorych z MC w porównaniu z grupą osób zdrowych.

Poziom zaawansowania niedrożności tętnic obwodowych został opisany dystansem chromania przestankowego oraz wartością współczynnika kostka-ramię (Tabela 4.2.).

**Tabela 4.2.** Parametry niedokrwienia kończyn dolnych

Badane parametry surowicy krwi	1. Pacjenci z MC (n=34)	2. Pacjenci z MZ (n=43)	3. Grupa kontrolna (n=18)	p 1 v 2	p 1 v 3	p 2 v 3
Dystans chromania [m]	98,52 ± 73,83	147,89 ± 94,92	-----	<b>0,014</b>	----	----
Wspól. kostka - ramię prawe	0,73 ± 0,28	0,68 ± 0,23	0,75 ± 0,21	<b>0,413</b>	<b>0,755</b>	<b>0,290</b>
Wspól. kostka - ramię lewe	0,75 ± 0,25	0,61 ± 0,29	0,69 ± 0,23	<b>0,070</b>	<b>0,345</b>	<b>0,327</b>

Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono:

- znacząco wyższe wartości dystansu chromania u chorych z MZ w stosunku do pacjentów z MC ( $147,89 \pm 94,92$  vs.  $98,52 \pm 73,83$  m;  $p = 0,014$ ), przy czym w grupie kontrolnej nie przeprowadzono tego badania,
- brak istotnych różnic między wartościami współczynnika kostka-ramię prawej jak i lewej strony.

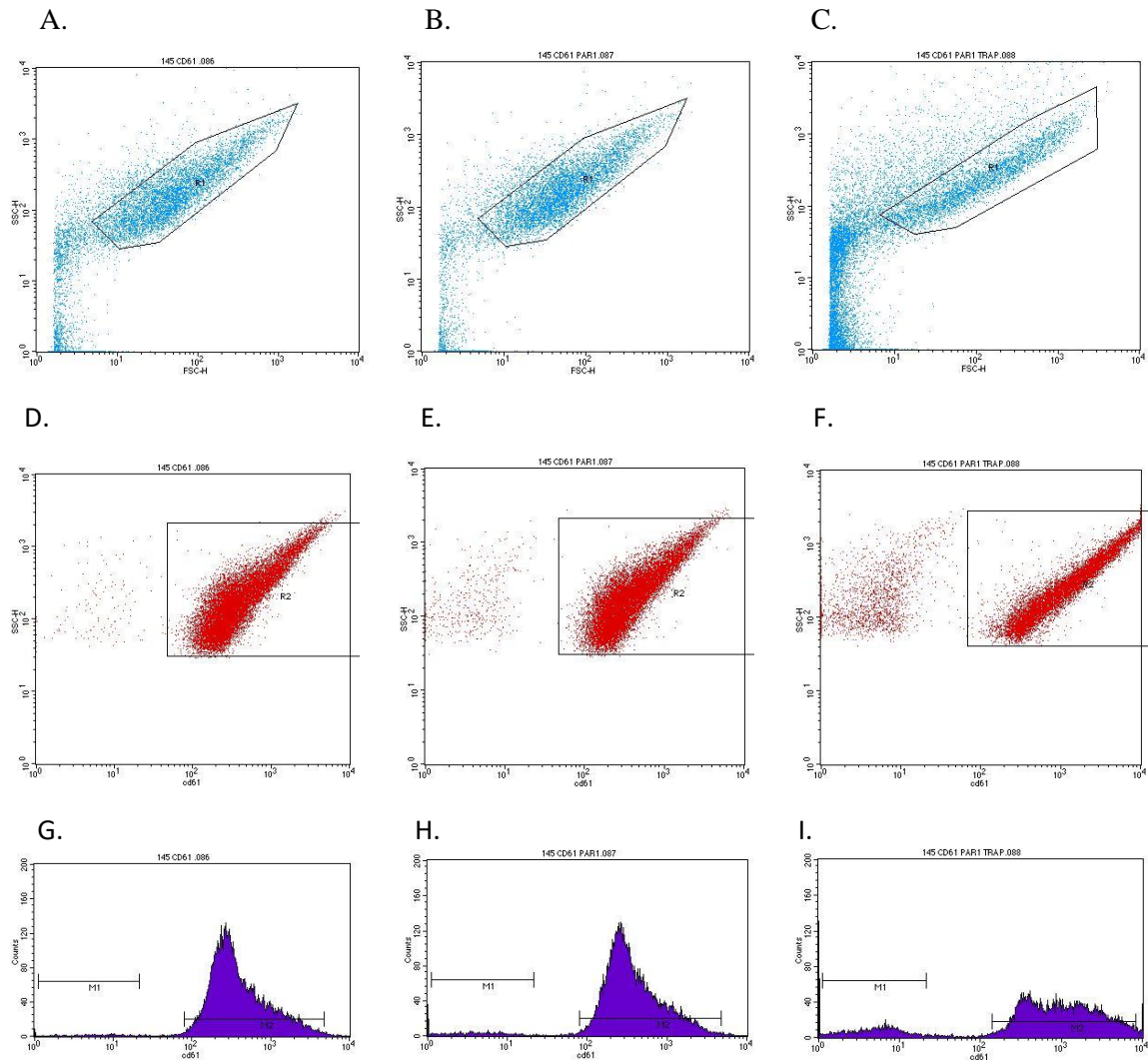
Analogiczne analizy przeprowadzono w grupach kobiet i w grupach mężczyzn. Analiza z uwzględnieniem płci wykazała:

- znacząco niższe stężenie HDL ( $50,07 \pm 10,72$  vs.  $62,58 \pm 8,59$  mg/dl;  $p < 0,001$ ) w grupie pacjentek z MC w porównaniu do pacjentek z MZ,
- znacząco niższe stężenie HDL ( $40,56 \pm 9,07$  vs.  $50,07 \pm 10,72$  mg/dl;  $p = 0,012$ ) w grupie kobiet z MZ w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej,
- znacząco niższe stężenie HDL ( $70,35 \pm 5,47$  vs.  $42,08 \pm 8,49$  mg/dl;  $p < 0,001$ ) w grupie mężczyzn z MC w porównaniu do mężczyzn z grupy kontrolnej,

- znacząco niższe stężenie HDL ( $70,35 \pm 5,47$  vs.  $44,83 \pm 11,80$  mg/dl;  $p < 0,001$ ) w grupie mężczyzn z MZ w porównaniu do mężczyzn z grupy kontrolnej,
- znacząco wyższe stężenie LDL ( $119,20 \pm 17,37$  vs.  $131,58 \pm 44,44$ , mg/dl;  $p = 0,013$ ) u kobiet z MZ w porównaniu do kobiet z MC, co wynikało ze stosowanej przez kobiety z cukrzycą terapii hipolipemizującej,
- znacząco niższe stężenie kwasu moczowego ( $4,88 \pm 1,09$  vs.  $5,76 \pm 1,20$  mg/dl;  $p = 0,034$ ) w grupie kobiet z MZ w porównaniu do kobiet z MC,
- znacząco niższe stężenie glukozy ( $96,25 \pm 10,64$  vs.  $140,53 \pm 53,16$ , mg/dl;  $p < 0,001$ ) w grupie kobiet z MZ w porównaniu do kobiet z MC,
- istotnie niższe stężenia glukozy ( $92,29 \pm 10,08$  vs.  $130,53 \pm 29,54$  mg/dl;  $p < 0,001$ ) w grupie mężczyzn z MZ w porównaniu z grupą mężczyzn z MC,
- znacząco niższe stężenie HDL ( $40,56 \pm 9,07$  vs.  $62,58 \pm 8,59$  mg/dl;  $p < 0,001$ ) w grupie kobiet z MC w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej,
- znacząco wyższe stężenie glukozy ( $140,53 \pm 53,16$  vs.  $94,07 \pm 3,05$  mg/dl;  $p < 0,001$ ) w grupie pacjentek z MC w porównaniu do pacjentek grupy kontrolnej,
- istotnie wyższe stężenia glukozy ( $130,53 \pm 29,54$  vs.  $93,75 \pm 3,86$ , mg/dl;  $p < 0,001$ ) w grupie mężczyzn z MC w porównaniu z grupą kontrolną.

#### 4.2. Ocena poziomu aktywacji powierzchniowego PAR-1

W celu określenia poziomu aktywacji PAR-1 (znajdujących się na powierzchni PLT) przez TRAP przeprowadzono badanie laboratoryjne polegające na określaniu stężenia PAR-1 za pomocą wyznakowanych przeciwciał PAR-1-APC w próbach osocza zarówno z aktywowanymi jak i nieaktywowanymi PLT. Eksperymentowi równolegle poddawano próby kontrolne celem detekcji ewentualnych reakcji krzyżowych mogących zachodzić między składnikami próbek materiału biologicznego z przeciwciałami PAR-1-APC. Oceny poziomu aktywowanych i nieaktywowanych PAR-1 dokonywano za pomocą cytometrii przepływową (Rycina 4.3.).



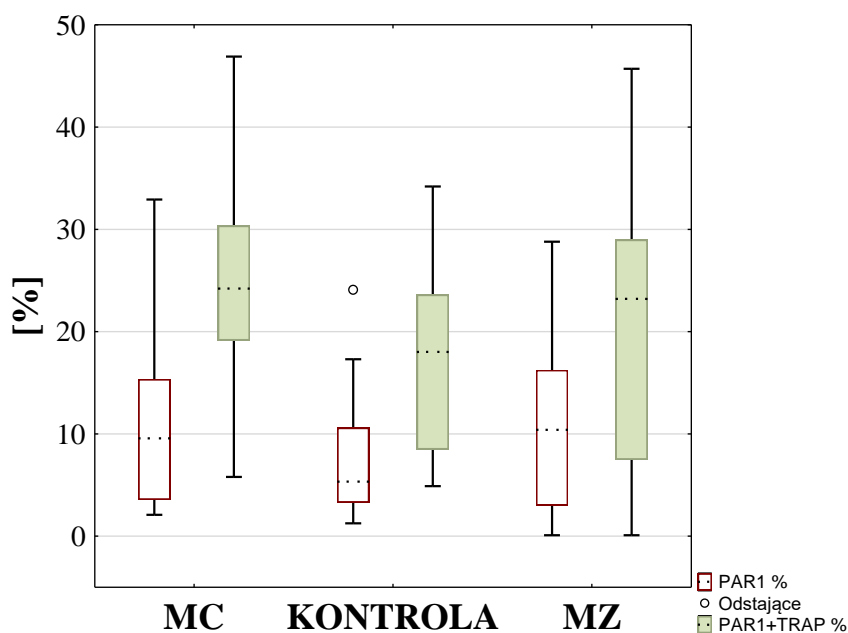
**Rycina 4.3.** Analiza cytometryczna (SSC i FCS) izolowanych preparatów ludzkich płytek krwi spoczynkowych (A i D), wybramkowanych i wyznakowanych PAR-1 bez aktywacji (B i E) oraz wybramkowanych i wyznakowanych na PAR-1 i aktywowanych 10  $\mu$ M TRAP (C i F); wyznakowanych przeciwciałami anty CD61-FITC oraz PAR-1-APC. Poziomą ekspresję PAR-1 odczytano z bramek P1. Markerami M1 i M2 oznaczono bramki dla mikroplatek i normoplatek, analizie PAR-1 poddawano zsumowaną populację. Przykładowy obraz analizy pacjenta obciążonego makroangiopatią cukrzycową

Analiza cytometryczna obejmowała wstępną identyfikację i lokalizację płytek krwi według wartości FSC (rozzrzt przedni, *ang. Forward Scatter*, FSC), różnicując struktury pod względem wielkości oraz wartości SSC (rozzrzt bocznym, *ang. Side Scatter*, SSC), różnicując struktury pod względem gęstości wewnętrznych ziarnistości. W tym celu ustawiono bramkę R2 w statystycznych analizach programu cytometru FACS Canto BD; automatycznie została zliczona ilość zarejestrowanych zdarzeń w przepływie 10 000 obiektów komórkowych. Następnie analizowano poziom świecenia PAR-1 znakowanego APC na powierzchni płytek krwi, znakowanych CD61-FITC; w tym celu ustawiono bramkę P1. Dla ustalenia właściwej/żądaney populacji płytek krwi analizowano markery M1 i M2 dla badanych struktur. Analizy danych dokonywano dla poszczególnych pacjentów w dwóch modelach badawczych:



w izolowanych płytkach krwi przed i po aktywacji TRAP. Przedstawione obrazy sugerują znaczny wzrost ilości wyznakowanych receptorów PAR-1 na powierzchni płytek krwi po ich stymulacji TRAP. Obserwowany wzrost poziomu aktywacji receptora PAR-1 szczególnie widoczny był w przypadku pacjentów z makroangiopatią cukrzycową.

Analizie porównawczej poddano wyniki przedstawiające poziom ekspresji PAR-1 przed i po dodaniu TRAP w próbkach osocza krwi pochodzących od pacjentów z MC, MZ i grupą kontrolną. Wiadomym było, że osocza tych pacjentów nie różniły się znacząco zarówno liczbą PLT ( $248,59 \pm 66,72$ ;  $271,56 \pm 74,02$ ;  $252,94 \pm 97,92$ , odpowiednio) jak i średnią objętością płytek krwi, MPV ( $10,56 \pm 1,24$ ;  $10,10 \pm 1,15$ ;  $9,63 \pm 1,09$ , odpowiednio). Analizę porównawczą, opisującą poziom ekspresji PAR-1 na płytkach aktywowanych jak i nieaktywowanych za pomocą TRAP w osoczach pacjentów MC, MZ i grupy kontrolnej przedstawiono na Rycinie 4.4.



**Rycina 4.4.** Odsetkowy udział receptora PAR-1 przed i po dodaniu peptydu aktywującego receptor trombinowy (TRAP) w próbkach krwi pacjentów z makroangiopatią cukrzycową (MC), grupy kontrolnej (KONTROLA) oraz z miażdżycą zarostową (MZ)

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała:

- poziom ekspresji PAR-1 bez aktywacji za pomocą TRAP nie różnił się istotnie w osoczach grupy pacjentów z MC, MZ i grupy kontrolnej
- istotny wzrost poziomu ekspresji PAR-1 aktywowanych TRAP w grupie pacjentów MC w porównaniu do 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).

Wyniki te wskazują na istotną rolę patomechanizmu z udziałem PAR-1 i trombiny w inicjacji i rozwoju miażdżycy na tle makroangiopatii cukrzycowej.

Analogiczną analizę przeprowadzono w tych samych grupach pacjentów tj. z MC, MZ i grupy kontrolnej, z uwzględnieniem płci.

W analizie statystycznej wykazano:

- w grupie kobiet nie zaobserwowano znaczącej różnicy poziomu ekspresji PAR-1 w grupach zarówno przed ( $8,85 \pm 8,96$  vs.  $4,61 \pm 4,41$  vs.  $7,74 \pm 6,30$  %;  $p=0,100$ ,  $p=0,682$ , odpowiednio) jak i po aktywacji PLT za pomocą TRAP ( $21,69 \pm 10,08$  vs.  $21,85 \pm 11,96$  vs.  $15,54 \pm 8,56$  %;  $p=0,925$ ,  $p=0,157$ , odpowiednio),
- wśród mężczyzn wykazano natomiast znaczący wzrost poziomu PAR-1 bez aktywacji TRAP w grupie z MC porównaniu do grupy kontrolnej ( $12,42 \pm 8,82$  vs.  $5,27 \pm 4,01$ %;  $p=0,043$ ) oraz w grupie z MZ w porównaniu do grupy kontrolnej ( $11,56 \pm 7,12$  vs.  $5,27 \pm 4,01$ %;  $p=0,046$ ),
- ponadto wykazano znaczący wzrost ekspresji PAR-1 po aktywacji TRAP w grupie mężczyzn z MC w porównaniu do grupy mężczyzn z MZ ( $27,48 \pm 10,03$  vs.  $18,18 \pm 13,16$ %;  $p=0,046$ ).

Dodatkowo przeprowadzono analizę porównawczą poziomu ekspresji PAR-1 przed i po aktywacji TRAP w poszczególnych grupach schorzeń (MC, MZ i grupie kontrolnej), z uwzględnieniem płci. W analizie statystycznej:

- wykazano, że poziom ekspresji PAR-1 przed aktywacją TRAP w grupie kobiet z MZ był znacząco niższy niż w grupie mężczyzn z MZ ( $4,11 \pm 4,18$  vs.  $11,85 \pm 7,05$ %;  $p < 0,001$ ) jak i wszystkich pacjentów z MZ ( $4,11 \pm 4,18$  vs.  $9,69 \pm 7,24$ %;  $p=0,008$ ),
- w pozostałych grupach nie zachodziły zmiany poziomów ekspresji PAR-1 istotne statystycznie (zarówno przed jak i po aktywacji za pomocą TRAP), choć w grupie kobiet z MC zaobserwowano nieznaczne obniżenie poziomu ekspresji białka PAR-1 w porównaniu do grupy mężczyzn z MC i do grupy wszystkich pacjentów z MC; zależność taka nie zachodziła w grupie kontrolnej.

### **Określenie ekspresji PAR-1 na poziomie transkrypcji**

Ekspresja PAR-1 może być regulowana na poziomie transkrypcji. W celu dokonania ilościowej oceny ekspresji genów na poziomie mRNA przeprowadzono RT-PCR w czasie

rzeczywistym. Eksperymentowi poddano materiał pochodzący od 85 pacjentów – tylko z tylu próbek możliwe było pozyskanie wystarczającej ilości materiału do dokonania wiarygodnej oceny ilościowej NPAR-1 (wartość  $\Delta C_T$  poniżej 30). Wyniki przedstawiono w Tabeli 4.3.

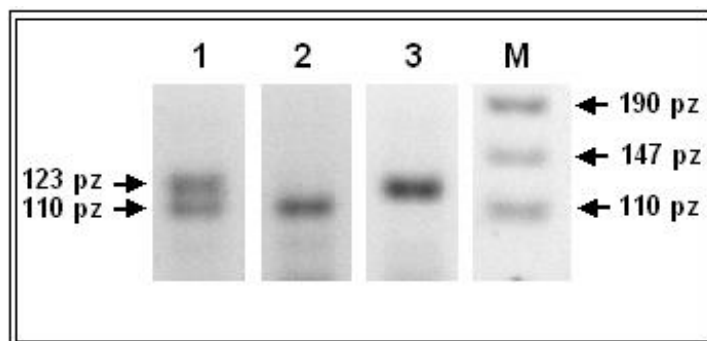
**Tabela 4.3.** Poziom ekspresji genów PAR-1, i genu referencyjnego  $\beta$ -aktyny [ $\Delta C_T$ ] w krwi pełnej

Badane parametry	Pacjenci MC (n=30)	Pacjenci MZ (n=38)	Grupa kontrolna (n=17)	p= 1 v 2	p= 1 v 3	p= 2 v 3
	1	2	3			
PAR1 [ $\Delta C_T$ ]	1,12 $\pm$ 0,41	1,72 $\pm$ 1,67	0,67 $\pm$ 0,03	<b>0,667</b>	<b>0,888</b>	<b>0,479</b>
$\beta$ -aktyna [ $\Delta C_T$ ]	0,07 $\pm$ 0,13	0,06 $\pm$ 0,07	0,07 $\pm$ 0,05	<b>0,993</b>	<b>0,999</b>	<b>0,992</b>

Wartości NPAR-1 wahały się od 0,03 do 1,72. Nie wykazano jednak żadnej różnicy istotnej statystycznie. Otrzymane wartości nie korelowały również ani z liczbą receptorów PAR-1 ani z polimorfizmami.

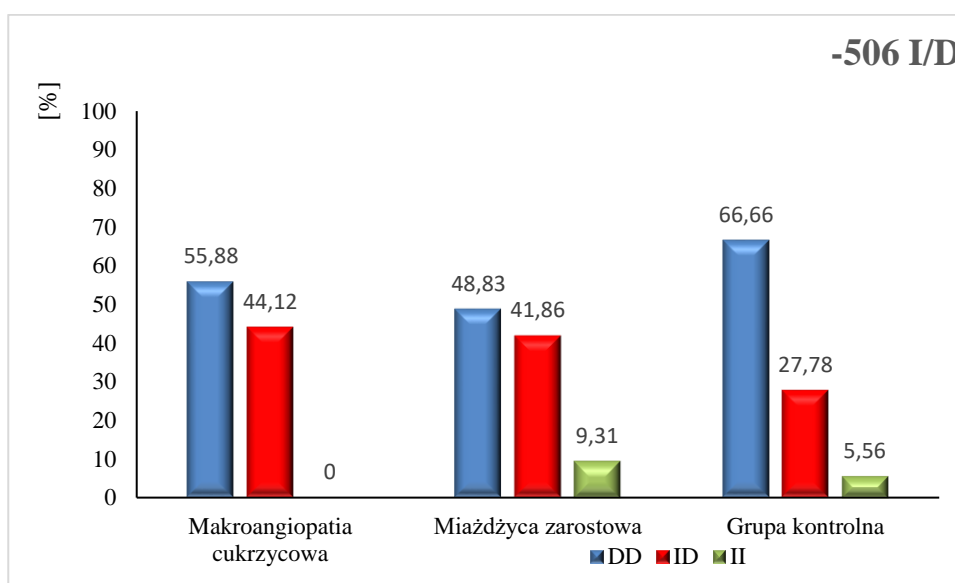
#### 4.3. Określenie polimorfizmów genu PAR-1

Predyspozycje płytkowego receptora PAR-1 do wzmożonej ekspresji w wyniku aktywacji substytutem trombiny tj. TRAP mogły wynikać z mutacji mogących pojawiać się w genie kodującym PAR-1, np.: 506 I/D (insercji w pozycji 506, 13 pz, dotycząca dwóch alleli: I oraz D), 1426 C/T (tranzycji C  $\rightarrow$  T), IVSn-14 (transwersji A  $\rightarrow$  T w sekwencji pośredniej IVS). W celu sprawdzenia obecności mutacji w genie kodującym PAR-1 reakjom PCR poddano (uprzednio oczyszczone i wyizolowane z prób osocza pacjentów) cząsteczki DNA zawierające odpowiedni fragment genu PAR-1 (jako tzw. matrycy). Reakcje PCR były prowadzone w warunkach odpowiednich dla amplifikacji danego fragmentu genu PAR-1 (tj. obejmującego miejsce potencjalnej mutacji charakteryzującej dany polimorfizm). Otrzymane produkty poddawano albo elektroforezie w żelu agarozowym (506 I/D, 1426 C/T) albo elektroforezie kapilarnej w analizatorze genetycznym (IVSn-14) celem potwierdzenia lub wykluczenia występowania danej mutacji – czyli określenia wariantu polimorfizmu genu. Zdjęcie przykładowych trzech możliwych wariantów polimorfizmu 506 I/D genu PAR-1 przedstawiono na Rycinie 4.5A.



**Rycina 4.5A.** Rozdział w 3 % żelu agarozowym produktów amplifikacji genu PAR-1 z polimorfizmem -506 I/D. Ścieżki: 1 – homozygota I/I, 2 – heterozygota I/D, 3 – homozygota D/D, M – marker wielkości GeneRuler™ 50bp DNA.Ladder (Fermentas)

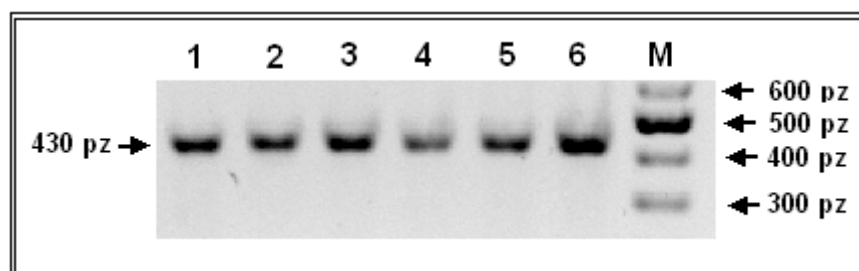
Analiza przedstawionych żeli potwierdziła możliwość występowania w materiale pochodzącym od pacjentów grupy objętych niniejszym badaniem trzech wariantów polimorfizmu 506 I/D w genie kodującym PAR-1 tj. homozygoty I/I (ścieżka nr 1), heterozygoty I/D (ścieżka nr 2) oraz homozygoty D/D (ścieżka nr 3). Odsetkowy udział poszczególnych polimorfizmów w grupach pacjentów z MC, MZ i w grupie kontrolnej przedstawiono na Rycinie 4.5B.



**Rycina 4.5B.** Odsetkowy udział wariantów polimorfizmu -506 I/D genu PAR-1: homozygota D/D (kolor niebieski), heterozygota I/D (kolor czerwony), homozygota I/I (kolor zielony)

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że największy procentowy udział heterozygoty -506 I/D w relacji do homozygoty -506D/D był w grupie z MZ. Odsetek wariantu II występował rzadko w każdej z badanych grup (< 10,0%). W każdej z grup dominowały homozygoty 506 D/D.

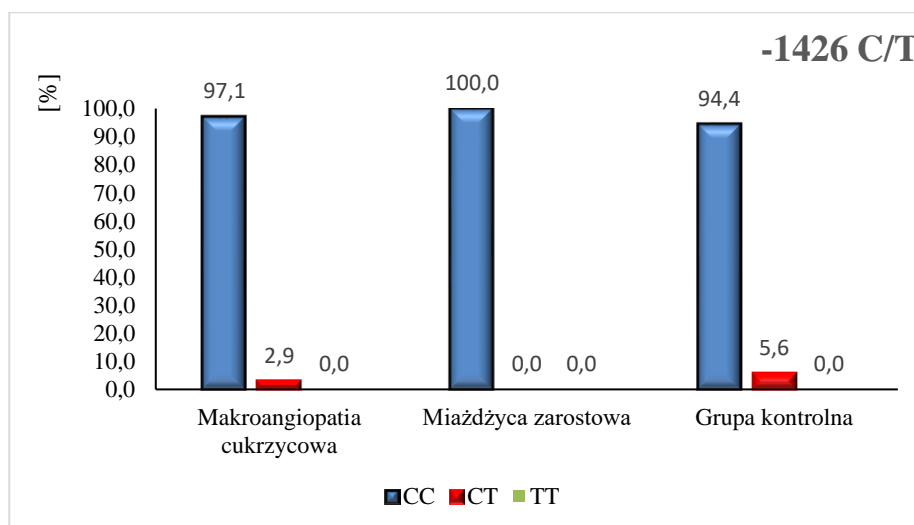
W zaprojektowanym eksperymencie, którego celem było sprawdzenie obecności możliwych wariantów polimorfizmu -1426 C/T w genach PAR-1 (wyizolowanych z materiału pochodzącego od pacjentów objętych niniejszym badaniem), wykorzystano właściwość molekularną fragmentu PAR-1, wynikającą z mutacji -1426 C/T – zmiana cytozyny na tyminę w pozycji -1426 generuje miejsce restrykcyjne dla enzymu *MvaI*. Zmutowana sekwencja może więc być rozcinana przez ten enzym na dwa fragmenty (o długości 391 pz i 39 pz). Allel typu dzikiego nie ulega natomiast restrykcji (430 pz). Przykładowe produkty otrzymane w wyniku amplifikacji matrycy DNA, poddawanej następnie działaniu *MvaI*, przedstawiono na Rycinie 4.6A.



**Rycina 4.6A.** Wynik trawienia restrykcyjnym enzymem *MvaI* produktów PCR celem sprawdzenia występowania polimorfizmu -1426 C/T genu PAR-1. Ścieżki: 1 – 6 homozygoty C/C, M – marker wielkości GeneRuler™ 100bp DNA.Ladder (Fermentas)

Analiza sześciu losowo przedstawionych produktów otrzymanych w wyniku reakcji PCR i trawieniu enzymem restrykcyjnym *MvaI* matrycy DNA wyizolowanych i oczyszczonych z materiału biologicznego pacjentów objętych niniejszym badaniem, wykazała obecność jedynie homozygoty C/C – w żadnej z prób nie stwierdzono polimorfizmu -1426 C/T.

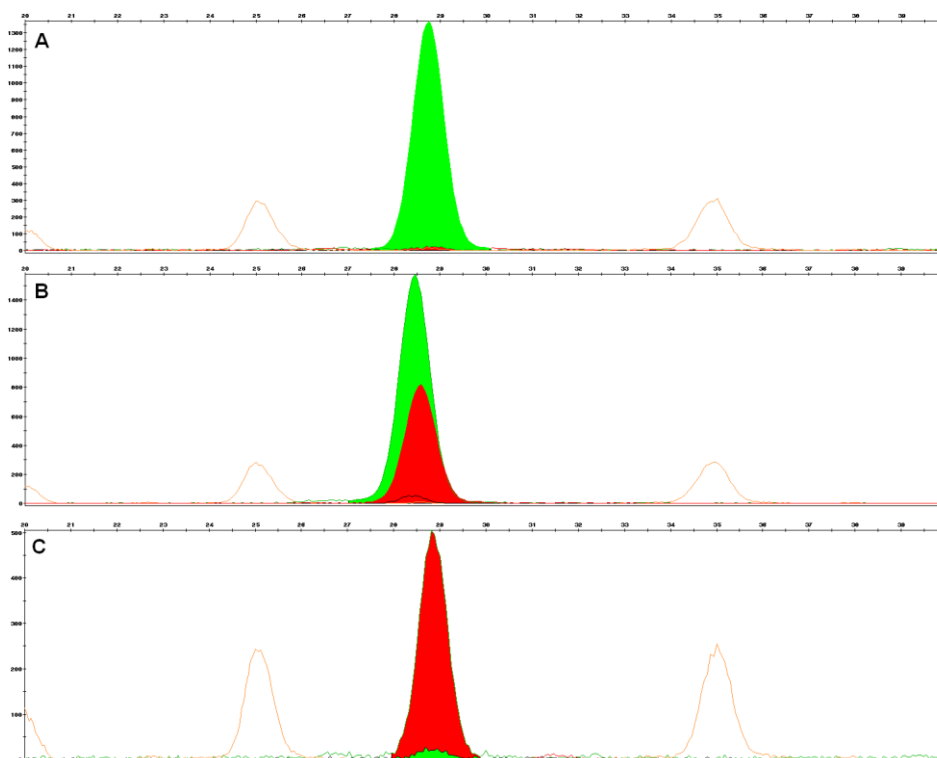
Procentowy udział poszczególnych wariantów polimorfizmu -1426 C/T genu PAR-1 przedstawiono na Rycinie 4.6B.



**Rycina 4.6B.** Odsetkowy udział wariantów polimorfizmu -1426 C/T genu PAR-1: homozygota C/C (kolor niebieski), heterozygota C/T (kolor czerwony), homozygota T/T (kolor zielony)

Analiza produktów PCR genu *PAR-1* z potencjalną mutacją -1426 C/T (pozyskanych z prób materiału biologicznego wszystkich pacjentów poddanych niniejszemu eksperymentowi) potwierdziła, że w każdej z badanych grup najwyższy udział procentowy stanowiły homozygoty CC, heterozygoty CT występowały bardzo rzadko, a homozygoty TT nie występowały natomiast wcale.

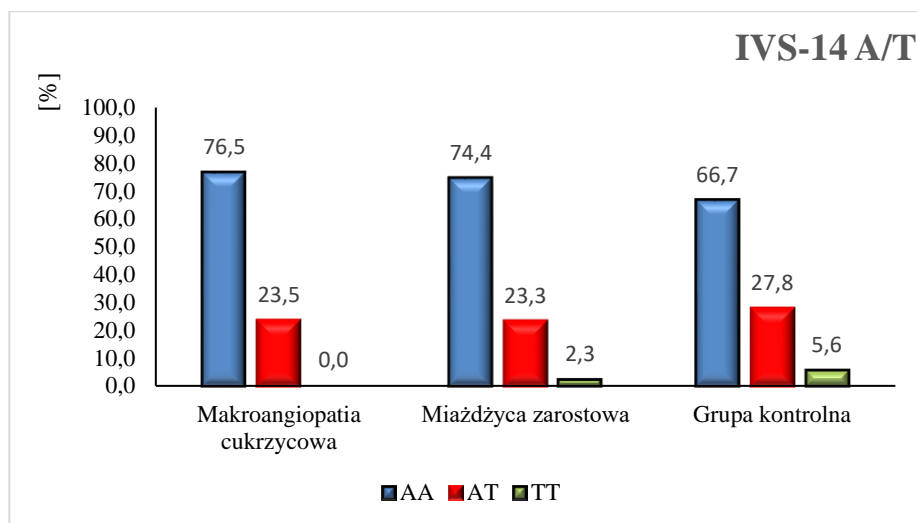
Genotypowanie polimorfizmów IVSn-14 A/T genu *PAR-1* przeprowadzono metodą SNaPshot, polegającej na rozdzieleniu i detekcji produktów za pomocą elektroforezy kapilarnej wobec wewnętrznego standardu wielkości, wykazało, że możliwymi wariantami tego polimorfizmu są: homozygota typu dzikiego (AA), B – heterozygota (AT), C – homozygota zmutowana (TT). Przykładowe warianty rozdzielenia produktów polimorfizmu IVSn-14 A/T genu *PAR-1* przedstawiono na Rys 4.7A.



**Rycina 4.7A.** Przykładowe rozdziały produktów amplifikacji fragmentu DNA obejmującego miejsce polimorfizmu IVSn-14 A/T genu *PAR-1* metodą SNaPshot. Allele określano na podstawie wielkości starterów i kolorów znakowanych fluorescencyjnie ddNTPs (terminatorów) włączanych podczas reakcji wydłużania starterów. A – czerwony pik, homozygota typu dzikiego (AA); B – zielony i czerwony pik, heterozygota (AT); C – zielony pik, homozygota zmutowana (TT)

Analiza otrzymanych wyników metodą SNaPshot wykazała możliwość istnienia trzech wariantów polimorfizmu IVSn-14 A/T genu *PAR-1* tj. homozygoty typu dzikiego (AA), heterozygoty (AT) oraz homozygoty (TT).

Procentowy udział poszczególnych wariantów polimorfizmu IVS-14 A/T genu PAR-1 przedstawiono na Rycinie 4.7B.



**Rycina 4.7B.** Odsetkowy udział wariantów polimorfizmu IVS-14 A/T genu PAR-1: homozygota A/A (kolor niebieski), heterozygota A/T (kolor czerwony), homozygota T/T (kolor zielony)

Analiza wyników pokazała, że procentowy udział homozygoty AA był największy w każdej z badanych grup, heterozygota AT występowała rzadziej i z porównywalną częstością w każdej z grup, natomiast homozygota TT bardzo rzadko występowała w polimorfizmie IVS 14 A/T genu PAR-1.

W przeprowadzonej analizie:

- wykazano, że częstości alleliczne 1426 T, 506 I i IVSn-14 T wynosiły odpowiednio: 0,028, 0,27 i 0,194 i były analogiczne do częstości allelicznej uzyskanej w badaniu przeprowadzonym z udziałem znacznie większej grupy pacjentów (n=1214), w którym wynosiły odpowiednio: 0,041, 0,256 i 0,185<sup>114</sup>,
- nie zanotowano istotnego odchylenia od równowagi Hardy'ego – Weinberga dla badanych polimorfizmów w badanej populacji,
- nie stwierdzono również statystycznie istotnej różnicy występowania genotypów - 1426 C/T między grupą MZ i grupą kontrolną oraz między MC i grupą kontrolną,
- wykazano natomiast statystycznie istotną różnicę między występowaniem genotypu IVS-14 A/T (p=0,015) w grupach MZ i MC w porównaniu do grupy kontrolnej ze względu na zwiększoną częstość występowania genotypu AA (p=0,001),
- wykazano istotną różnicę częstości występowania genotypu -506 I/D (p=0,001) między pacjentami z MC i grupą kontrolną, a pacjentami z MZ.

Przeprowadzono również analizę, której celem było określenie dominujących genotypów w grupie pacjentów z MC, MZ i grupą kontrolną. Zestawienie odsetkowego udziału genotypów (-506, -1426, IVSn-14) w badanych schorzeniach i w grupie kontrolnej przedstawiono na Rycinie 4.8.

<b>MC</b>	<b>AACDD</b>	AACID	ATCCDD	AACII	ATCCID	TTCCDD
	<b>14 (41%)</b>	12 (35%)	4 (11%)	0 (0%)	2 (6%)	2 (6%)
<b>MZ</b>	AACDD	<b>AACID</b>	ATCCDD	AACII	ATCCID	TTCCDD
	13 (30%)	<b>15 (34%)</b>	8 (21%)	4 (10%)	2 (4%)	0 (0%)
<b>Kontrola</b>	<b>AACDD</b>	AACID	ATCCDD	AACII	ATCCID	TTCCDD
	<b>7 (40%)</b>	4 (22%)	3 (17%)	0 (0%)	2 (12%)	1 (6%)

**Rycina 4.8.** Zestawienie wyników badań w makroangiopatii cukrzycowej (MC), miażdżycy zastoinowej (MZ) i w grupie kontrolnej (Kontrola)

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że w obrębie trzech polimorfizmów genu PAR-1 w MC dominuje genotyp AACDD (41%), podobnie jak w kontroli (40%), natomiast w MZ: AACID (34%).

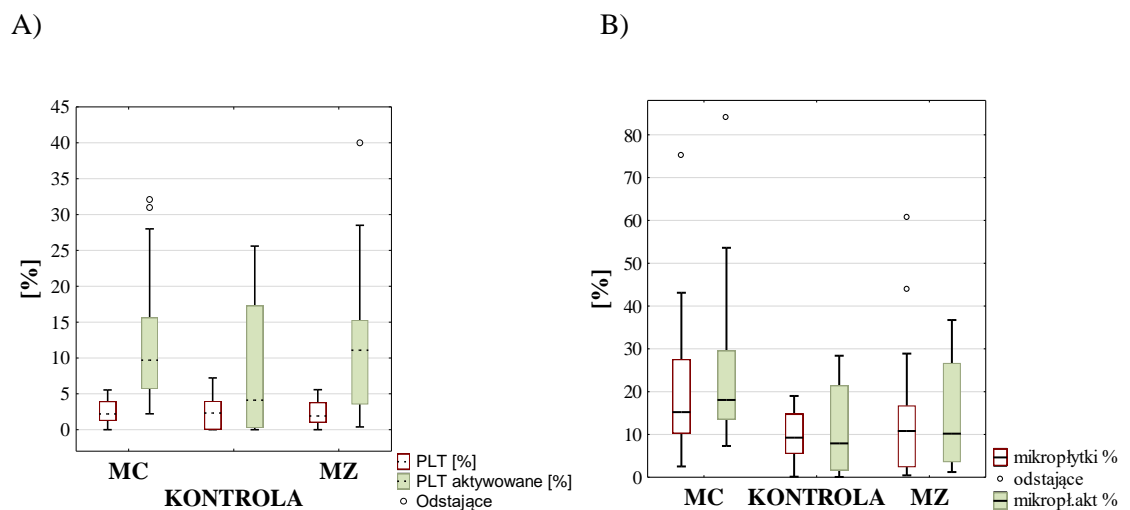
#### 4.4. Ocena agregacji mikroplatek (PMP) i płytek krwi (PLT)

Mikroplatek (PMP) są uważane za biomarkery aktywacji PLT i nasilenia stanu zapalnego. Na ich powierzchni, podobnie jak na powierzchni PLT, znajdują się miejsca wiążące kolagen i vWF (który może być wydzielany w postaci ziarnistości zarówno przez PLT jak i śródbłonek),



co umożliwia im adhezję do fibryny oraz agregację z innymi PLT i PMP. Ponadto aktywowane PLT i PMP odgrywają istotną rolę w tworzeniu się skrzepu.

Określenie typu agregacji PLT w materiale biologicznym umożliwia określenie predyspozycji PLT do tworzenia głównego czopu hemostatycznego formowanego *in vivo*. PLT mogą być aktywowane za pomocą różnych elementów hemostazy m.in. kolagenu (aktywuje proces agregacji PLT poprzez aktywację głównych receptorów płytkowych – glikoproteiny VI (GP VI) na powierzchni PLT), adenozynodifosforanu, ADP (aktywuje PLT poprzez oddziaływanie z receptorami purynergicznymi – P2Y<sub>1</sub> oraz P2Y<sub>12</sub>) oraz trombiny (aktywacja PLT poprzez receptor płytkowy – tromboksan, TXA<sub>2</sub>). W przedstawionej pracy podjęto próbę określenia poziomu nie tylko nieaktywnych i aktywowanych PLT w osoczu pacjentów z MZ w porównaniu do osocza pacjentów z MC oraz pobranego od grupy kontrolnej, ale również podjęto próbę sprawdzenia znaczenia aktywowanych PMP w badanych grupach (autorski pomysł). Aktywację PLT prowadzono za pomocą kolagenu, ADP oraz peptydu aktywującego receptor trombinowy, TRAP (analogu trombiny), natomiast PMP tylko za pomocą TRAP. Uzyskane wyniki przedstawiono na Rycinie 4.9.



**Rycina 4.9.** Udział procentowy: A) płytek krwi; B) mikroplatek przed i po aktywacji TRAP w grupach pacjentów z makroangiopatią cukrzycową (MC), kontroli (KONTROLA) i z miażdżycą zarostową (MZ)

Na podstawie otrzymanych wyników wykazano istnienie istotnych różnic w udziałach procentowych PMP aktywowanych za pomocą TRAP w grupach pacjentów z MZ, MC i grupy kontrolnej. Wykazano:

- znacząco niższy poziom aktywowanych PMP u pacjentów z MZ w porównaniu do pacjentów z MC ( $15,56 \pm 13,82$  vs.  $23,25 \pm 15,95\%$ ;  $p=0,045$ ),

- istotny wzrost poziomu zarówno nieaktywowanych ( $19,21 \pm 14,33$ , vs.  $9,59 \pm 5,80\%$ ;  $p=0,007$ ) jak i aktywowanych mikroplatek ( $23,25 \pm 15,95$  vs.  $11,51 \pm 10,70\%$ ;  $p=0,003$ ) u pacjentów z MC w porównaniu do grupy kontrolnej.

Nie wykazano natomiast różnicy istotnej statystycznie pomiędzy:

- poziomem aktywowanych PMP w grupie z MZ i w grupie kontrolnej,
- poziomem PLT w badanych grupach (tj. z MZ, MC i kontrolą) przed i po aktywacji kolagenem, ADP lub TRAP.

Dodatkowo przeprowadzono analizę z uwzględnieniem płci, która wykazała:

- znaczący wzrost poziomów nieaktywowanych ( $19,5 \pm 10,15$  vs.  $9,01 \pm 6,01\%$ ;  $p=0,021$ ) jak i aktywowanych mikroplatek ( $25,57 \pm 11,13$  vs.  $11,11 \pm 10,40\%$ ;  $p=0,002$ ) w grupie kobiet z MC w porównaniu do kobiet grupy kontrolnej,
- istotny wzrost poziomu nieaktywowanych ( $16,00 \pm 7,82$ , vs.  $9,01 \pm 6,01\%$ ;  $p=0,022$ ), aktywowanych mikroplatek ( $22,82 \pm 10,55$  vs.  $11,11 \pm 10,40\%$ ;  $p=0,012$ ) oraz aktywowanych agregatów płytkowych ( $15,90 \pm 8,44$  vs.  $8,42 \pm 8,97\%$ ;  $p=0,038$ ) w grupie kobiet z MZ w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej,
- znaczący wzrost poziomu aktywowanych agregatów płytkowych ( $2,79 \pm 1,29$  vs.  $1,04 \pm 1,98\%$ ;  $p=0,038$ ) u mężczyzn z MC w porównaniu do mężczyzn z grupy kontrolnej,

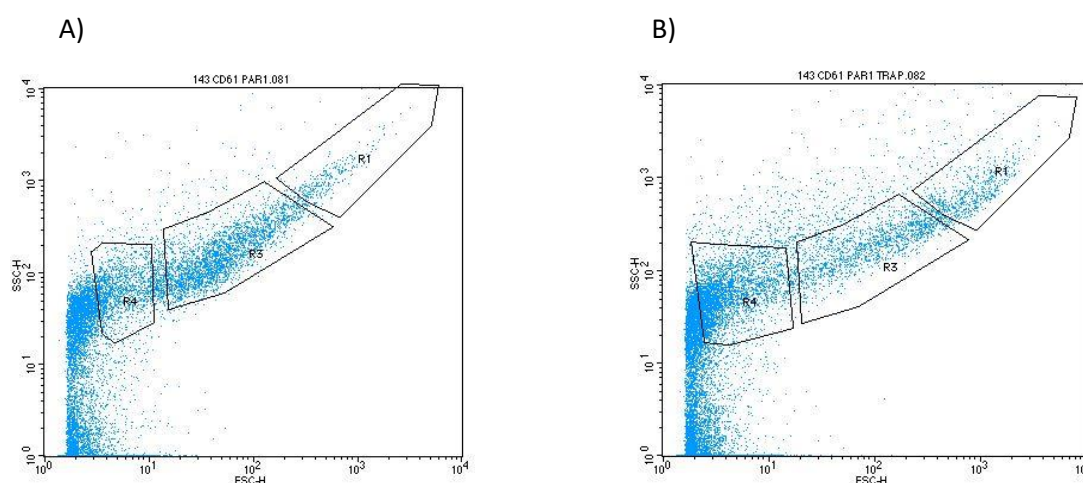
Nie wykazano żadnej znaczącej różnicy pomiędzy poziomami: aktywowanych PMP, nieaktywowanych PMP, aktywowanych agregatów PLT, nieaktywowanych agregatów PLT ani w grupie kobiet z MZ w porównaniu do kobiet z MC, ani w grupie mężczyzn z MZ w porównaniu do mężczyzn z MC.

W analizie statystycznej przeprowadzonej z uwzględnieniem płci w danym schorzeniu wykazano istotne różnice w poziomach aktywowanych i nieaktywowanych PLT i PMP jedynie wśród pacjentów z MZ. Wykazano:

- znacząco wyższy poziom aktywowanych PMP ( $22,22 \pm 11,38$  vs.  $12,98 \pm 13,98\%$ ;  $p=0,036$ ) oraz aktywowanych agregatów PLT ( $16,74 \pm 11,32$  vs.  $8,89 \pm 6,13\%$ ;  $p=0,003$ ) w grupie kobiet z MZ w porównaniu do grupy mężczyzn z MZ,
- znacząco wyższy poziom aktywowanych agregatów PLT w grupie kobiet z MZ w porównaniu do grupy wszystkich pacjentów z MZ ( $16,74 \pm 11,32$  vs.  $11,13 \pm 8,59\%$ ;  $p=0,029$ ).

Nie zaobserwowano żadnych istotnych różnic w poziomach aktywowanych i nieaktywowanych PLT i PMP w analizach z uwzględnieniem płci i schorzeń w zależności od zastosowanego czynnika aktywującego tj. kolagenu, ADP, czy TRAP.

Dodatkowo dokonano obrazowania adhezyjnego receptora – integryny GP3A i  $\beta 3$  (CD61) na powierzchni aktywowanych i nieaktywowanych PLT, który wraz z CD41 tworzy kompleks glikoproteinowy IIb – IIIa – istotny mediator agregacji płytek krwi. Ocenę ilościową PMP w populacji PLT przedstawiono na Rycinie 4.10.



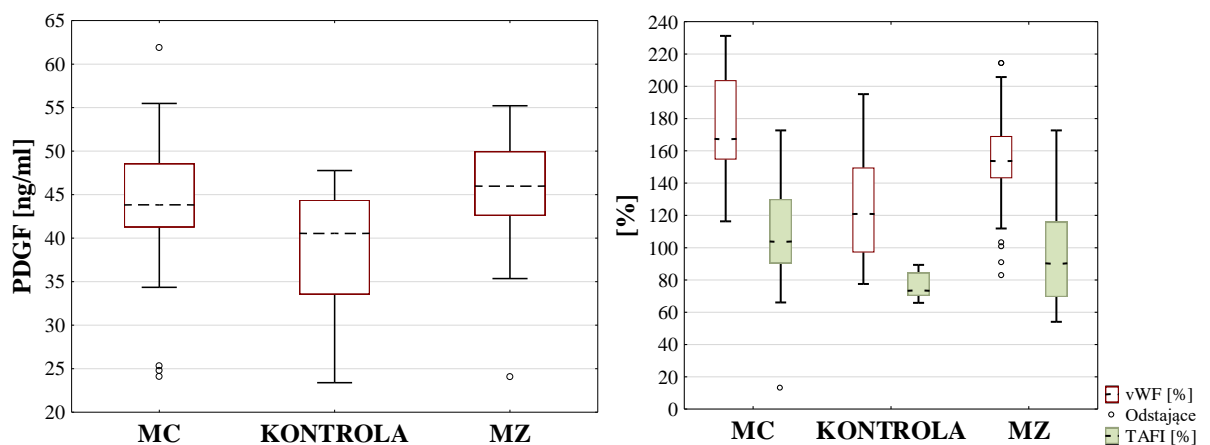
**Rycina 4.10.** Analiza cytometryczna ekspresji PAR-1 w ludzkich płytkach spoczynkowych (A) oraz płytkach aktywowanych 10 $\mu$ M TRAP (B). Płytki krwi wybramkowano na obecność antygeny CD61-FITC i wyznakowano przeciwciałami skierowanymi przeciw antygenowi PAR-1-APC. Umownie zaznaczone regiony P4, P3, P1 odnoszą się odpowiednio do mikropłytek, normopłytek i agregatów płytkowych. Obraz pacjenta z MC

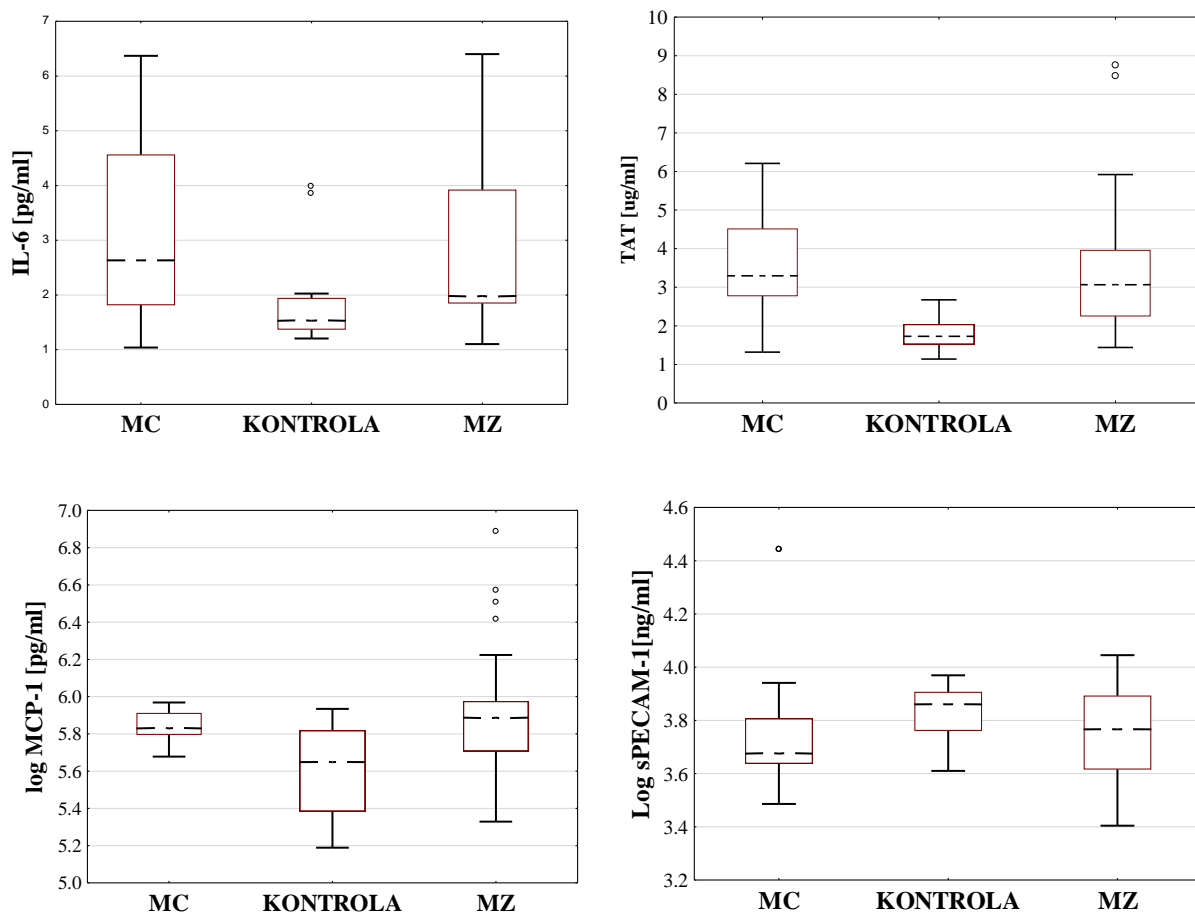
Analiza cytometryczna obejmowała wstępną identyfikację i lokalizację płytek krwi według wartości FSC (rozrzut przedni, *ang. Forward Scatter*, FSC), różnicując struktury pod względem wielkości oraz wartości SSC (rozrzut bocznym, *ang. Side Scatter*, SSC), różnicując struktury pod względem gęstości wewnętrznych ziarnistości. W tym celu ustawiano bramkę R2 w statystycznych analizach programu cytometru FACS Canto BD, ilość zarejestrowanych zdarzeń została zliczona automatycznie w przepływie 10 000 obiektów komórkowych. Następnie analizowano poziom świecenia PAR-1 znakowanego APC na powierzchni płytek krwi, znakowanych CD61-FITC, w tym celu ustawiono bramkę P1. Dla ustalenia właściwej/żądaney populacji płytek krwi analizowano markery M1 i M2 dla badanych struktur. Analizy danych dokonywano dla poszczególnych pacjentów w dwóch modelach badawczych, w izolowanych płytkach krwi przed i po aktywacji TRAP. Przedstawione obrazy sugerują znaczny wzrost ilości wyznakowanych receptorów PAR-1 na powierzchni płytek krwi

po ich stymulacji TRAP. Obserwowany wzrost poziomu aktywacji receptora PAR-1 szczególnie widoczny był w przypadku pacjentów z MC.

#### 4.5. Analiza ilościowa wybranych czynników hemostazy i stanu zapalnego

W przedstawionej pracy podjęto również próbę określenia związku pomiędzy poziomem zaktywowanych PAR-1 a stężeniami czynników hemostazy i stanu zapalnego, których wzmożone działanie może być wynikiem toczących się patomechanizmów aterogennych. W tym celu, w pierwszym etapie badań dokonano oceny ilościowej następujących parametrów: czynnika von Willebranda (vWF), kompleksu trombina-antytrombina III (TAT), interleukiny 6 (IL-6), płytkowego czynnika wzrostu (PDGF), monocytarnej proteiny 1 (MCP-1), rozpuszczalnej cząsteczki adhezji komórkowej płytkowo-śródbłonkowej typ 1 (sPECAM-1), czynnika aktywującego płytki (PAF-AH) oraz inhibitora fibrynolizy aktywowanego trombiną (TAFI). Czynniki wybrano tak, by było możliwe wskazanie zmian pojawiających się w różnych etapach patomechanizmu miażdżycy tj. aktywacji płytek (TAT, TAFI), adhezji PLT do śródbłonka (vWF), rozwijanie stanu zapalnego (IL-6), indukowanie wytwarzania komórek piankowatych (chemokina MCP-1) oraz procesu pęknięcia blaszki miażdżycowej, związanego z neowaskularyzacją (PDGF). Wyniki analizy ilościowej przykładowych czynników przedstawiono na Rycinie 4.11., natomiast szczegółową analizę w Tabeli 4.1.





**Rycina 4.11.** Ocena ilościowa zawartości czynników hemostazy i stanu zapalnego: stężenia kompleksu trombina-antytrombina III (TAT), stężenia interleukiny 6 (IL-6), procentowego udziału czynnika von Willebranda (vWF), procentowego udziału inhibitora fibrylizacji aktywowanego trombiną (TAFI), stężenia płytkowego czynnika wzrostu (PDGF), stężenia monocytarnej proteiny 1 (MCP-1) oraz stężenia rozpuszczalnej cząsteczki adhezji komórkowo-śródłonkowej typ 1 (sPECAM-1) w próbach krwi pacjentów z makroangiopatią cukrzycową (MC), grupy kontrolnej (KONTROLA) oraz z miazdżycą zarostową (MZ)

Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej stwierdzono:

- istotnie niższe stężenie vWF w grupie pacjentów z MZ w porównaniu do grupy pacjentów z MC ( $153,45 \pm 28,12$  vs.  $174,36 \pm 33,24\%$ ;  $p=0,013$ ),
- nie wykazano natomiast żadnych statystycznie istotnych różnic w ilościowych oznaczeniach pozostałych czynników hemostazy w grupie pacjentów z MZ względem grupy pacjentów z MC,
- istotny wzrost: vWF ( $153,45 \pm 28,12$  vs.  $125,89 \pm 31,80\%$ ;  $p < 0,001$ ), PDGF ( $22,06 \pm 6,5$  vs.  $16,42 \pm 7,44$  ng/ml;  $p=0,002$ ), TAT ( $3,34 \pm 1,54$  vs.  $1,77 \pm 0,44$   $\mu\text{g/ml}$ ;  $p < 0,001$ ), IL-6 ( $2,80 \pm 1,59$  vs.  $1,81 \pm 0,81$  pg/ml;  $p=0,013$ ), MCP-1 ( $377,5 \pm 152,37$  vs.  $282,21 \pm 68,00$  pg/ml;  $p=0,002$ ) oraz TAFI ( $98,62 \pm 32,15$  vs.  $76,59 \pm 8,09\%$ ;  $p=0,009$ ) w grupie pacjentów z MZ w porównaniu do grupy kontrolnej,

- zaobserwowano znaczący wzrost: vWF ( $174,36 \pm 33,24$  vs.  $125,89 \pm 31,80\%$ ;  $p < 0,001$ ), PDGF ( $20,91 \pm 8,5$  vs.  $8,64 \pm 7,44$  ng/ml;  $p = 0,027$ ), TAT ( $3,62 \pm 1,18$  vs.  $1,77 \pm 0,44$   $\mu$ g/ml;  $p < 0,001$ ), IL-6 ( $3,17 \pm 1,53$  vs.  $1,81 \pm 0,81$  pg/ml;  $p = 0,001$ ), MCP-1 ( $344,45 \pm 28,70$  vs.  $282,21 \pm 68,00$  pg/ml;  $p = 0,035$ ) oraz TAFI ( $108,7 \pm 33,68$  vs.  $76,59 \pm 8,09\%$ ;  $p < 0,001$ ) w grupie pacjentów z MC w porównaniu do grupy kontrolnej.

Analiza statystyczna z uwzględnieniem płci wykazała:

- znacząco wyższe stężenie TAT ( $3,63 \pm 1,67$  vs.  $1,78 \pm 0,47$   $\mu$ g/ml;  $p < 0,001$ ), IL-6 ( $3,21 \pm 1,82$  vs.  $1,92 \pm 0,88$  pg/ml;  $p = 0,34$ ), MCP-1 ( $353,69 \pm 98,58$  vs.  $272,39 \pm 69,07$  pg/ml;  $p = 0,005$ ) oraz TAFI ( $108,97 \pm 35,43$  vs.  $76,40 \pm 7,48\%$ ;  $p = 0,026$ ) w grupie kobiet z MZ w porównaniu do kobiet grupy kontrolnej,
- znacząco wyższe poziomy: TAT ( $3,22 \pm 1,50$  vs.  $1,77 \pm 0,35$   $\mu$ g/ml;  $p = 0,020$ ), PDGF ( $23,13 \pm 6,24$  vs.  $12,75 \pm 7,99$  ng/ml;  $p = 0,004$ ), vWF ( $154,10 \pm 26,91$  vs.  $88,03 \pm 8,03\%$ ;  $p < 0,001$ ) w grupie mężczyzn z MZ w porównaniu do mężczyzn grupy kontrolnej,
- znacząco niższe stężenie sPECAM-1 ( $42,98 \pm 6,98$  vs.  $52,51 \pm 2,80$  ng/ml;  $p < 0,001$ ) w grupie mężczyzn z MZ w porównaniu do mężczyzn z grupy kontrolnej,
- znacząco wyższe poziomy: vWF ( $172,34 \pm 29,94$  vs.  $88,03 \pm 8,03\%$ ;  $p < 0,001$ ), PDGF ( $19,87 \pm 8,39$  vs.  $12,75 \pm 7,99$  ng/ml;  $p = 0,04$ ), TAT ( $3,59 \pm 0,94$  vs.  $1,77 \pm 0,35$   $\mu$ g/ml;  $p = 0,005$ ), IL-6 ( $3,08 \pm 1,38$  vs.  $1,44 \pm 0,35$  pg/ml;  $p = 0,34$ ), TAFI ( $106,46 \pm 26,66$  vs.  $77,24 \pm 11,31\%$ ;  $p = 0,041$ ) w grupie mężczyzn z MC w porównaniu do mężczyzn grupy kontrolnej,
- znacząco niższe stężenie sPECAM-1 ( $39,91 \pm 4,62$  vs.  $52,51 \pm 2,80$  ng/ml;  $p < 0,001$ ) w grupie mężczyzn z MC w porównaniu do mężczyzn z grupy kontrolnej,
- ponadto nie wykazano żadnej istotnej różnicy w poziomach wszystkich oznaczanych czynników hemostazy między MZ i MC zarówno wśród kobiet jak i wśród mężczyzn.

Analiza statystyczna z uwzględnieniem płci w schorzeniach wykazała:

- znacząco niższe stężenie sPECAM-1 ( $39,91 \pm 4,62$  vs.  $50,16 \pm 18,79$  ng/ml;  $p = 0,002$ ) u mężczyzn z MC w porównaniu do grupy wszystkich badanych pacjentów z MC,
- znacząco wyższe stężenie sPECAM-1 ( $52,51 \pm 2,80$  vs.  $46,50 \pm 4,26$  ng/ml;  $p = 0,007$ ) u mężczyzn z grupy kontrolnej w porównaniu do wszystkich osób z grupy kontrolnej oraz u mężczyzn z grupy kontrolnej w porównaniu do grupy kobiet ( $52,51 \pm 2,80$  vs.  $48,35 \pm 4,02$  ng/ml;  $p = 0,048$ ),

- znacząco wyższe stężenie vWF ( $136,71 \pm 27,21$  vs.  $88,03 \pm 8,03\%$ ;  $p=0,002$ ) w grupie kobiet z grupy kontrolnej w porównaniu do grupy mężczyzn z grupy kontrolnej,
- znacząco niższe stężenie vWF ( $88,03 \pm 8,03$  vs.  $125,89 \pm 31,80\%$ ;  $p=0,012$ ) w grupie mężczyzn z grupy kontrolnej w porównaniu do wszystkich osób z grupy kontrolnej,
- ponadto nie wykazano istotnych różnic w poziomach oznaczanych czynników hemostazy między grupą kobiet, mężczyzn i wszystkich pacjentów z MZ.

#### 4.6. Badanie różnic między miażdżycą zarostową (MZ), a makroangiopatią cukrzycową (MC) poprzez analizę związku zmiennych z szansą występowania miażdżycy – wśród chorych na jedną ze wspomnianych chorób

##### Analiza efektów głównych

W celu sprawdzenia istnienia różnic w zmiennych jakościowych i ilościowych, charakteryzujących MC i MZ, przeanalizowano szansę występowania MC w grupie pacjentów z MC i MZ. W ten sposób dokonano różnicowania między oboma schorzeniami. Wyniki analizy przedstawiono w Tabeli 4.4.

Tabela 4.4. Analiza efektów głównych

	Badana kategoria	Kategoria odniesienia	$\beta_i$	$\beta_i$ błąd standardowy	Statystyka Walda	p	iloraz szans (OR)	OR - 95% CI	OR 95% CI
Płeć	M	Nie	0,813	0,511	2,530	0,1117	2,256	0,828	6,145
Polimorfizm <i>PAR-1</i> : rs35900074 (506 I/D), rs32934 (1426 C/T), rs168753 (IVSn-14)	4	Nie	0,208	0,563	0,137	0,7116	1,232	0,408	3,715
Wyraz wolny		Nie	0,431	0,356	1,462	0,2266	1,538	0,765	3,093
<i>PAR-1</i> : rs35900074:I/D	8	Nie	-0,431	0,482	0,799	0,3713	0,650	0,253	1,671
Nikotynizm	Tak	Nie	1,324	0,534	6,143	0,0132	3,759	1,319	10,714
vWF [%]	-	-	-0,023	0,009	6,927	0,0085	0,977	0,961	0,994
PDGF [pg/ml]	-	-	0,000	0,000	1,452	0,2283	1,000	1,000	1,000
TAT [µg/L]	-	-	-0,118	0,169	0,485	0,4861	0,889	0,638	1,239
IL-6 [pg/ml]	-	-	-0,159	0,161	0,983	0,3216	0,853	0,623	1,168
MCP-1 [pg/ml]	-	-	0,631	1,050	0,361	0,5477	1,880	0,240	14,710
sPECAM-1 [ng/ml]	-	-	-0,311	1,184	0,069	0,7929	0,733	0,072	7,464
TAFI [%]	-	-	-0,011	0,008	1,968	0,1606	0,990	0,975	1,004
PAF [µmol/min/ml]	-	-	0,446	0,377	1,401	0,2365	1,562	0,746	3,270
PLT [G/l]	-	-	0,004	0,004	1,508	0,2195	1,004	0,997	1,011
MPV [fl]	-	-	-0,366	0,211	2,999	0,0833	0,693	0,458	1,049
PT [%]	-	-	-0,040	0,030	1,810	0,1785	0,960	0,905	1,019
Fibrynogen [g/l]	-	-	1,324	1,234	1,151	0,2833	3,758	0,335	42,211

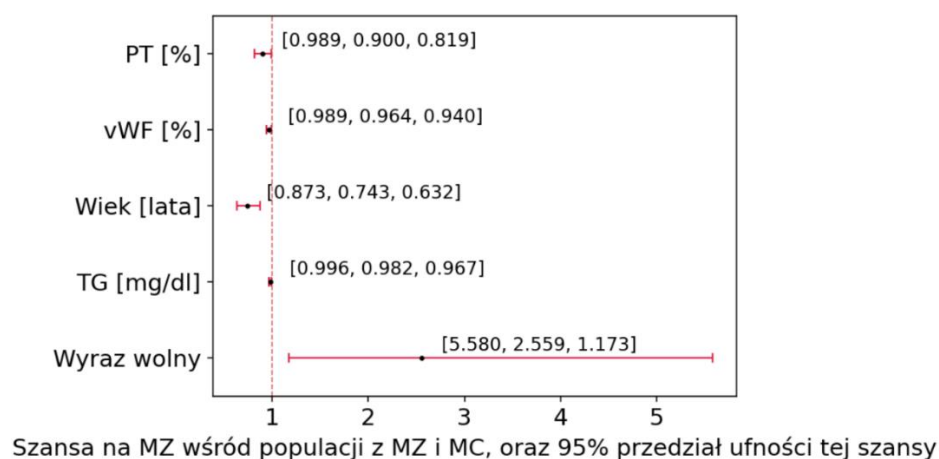
Cholesterol całkowity [mg/dl]	-	-	-0,001	0,004	0,113	0,7362	0,999	0,990	1,007
HDL [mg/dl]	-	-	0,011	0,023	0,231	0,6310	1,011	0,966	1,058
LDL [mg/dl]	-	-	0,007	0,006	1,320	0,2506	1,007	0,995	1,018
Trójglicerydy [mg/dl]	-	-	-0,010	0,005	4,523	0,0334	0,990	0,980	0,999
hsCRP [mg/l]	-	-	0,004	0,062	0,005	0,9427	1,004	0,890	1,134
Glukoza [mg/dl]	-	-	-0,251	0,168	2,222	0,1361	0,778	0,559	1,082
Kwas moczowy [mg/dl]	-	-	0,213	0,288	0,548	0,4593	1,238	0,704	2,177
Białko całkowite [g/dl]	-	-	0,213	0,288	0,548	0,4593	1,238	0,704	2,177
Agregacja PLT z ADP [%]	-	-	-0,005	0,016	0,108	0,7429	0,995	0,965	1,026
Agregacja PLT z kolagenem [%]	-	-	-0,007	0,026	0,064	0,8008	0,993	0,944	1,045
Agregacja PLT z TRAP [%]	-	-	-4,408	4,470	0,972	0,3241	0,012	0,000	77,756
Czas max, agregacji TRAP [s]	-	-	-0,005	0,014	0,124	0,7249	0,995	0,968	1,023
Czas max, agregacji ADP [s]	-	-	-0,017	0,016	1,223	0,2688	0,983	0,953	1,013
Czas max, agregacji kolagen [s]	-	-	0,001	0,008	0,011	0,9164	1,001	0,986	1,016
Mikrocytka [%]	-	-	-0,040	0,021	3,821	0,0506	0,961	0,923	1,000
Mikrocytka aktywowane [%]	-	-	-0,052	0,020	6,663	0,0098	0,949	0,913	0,988
Agregaty PLT [%]	-	-	-0,077	0,146	0,280	0,5964	0,925	0,695	1,233
Agregaty PLT aktywowane [%]	-	-	-0,010	0,028	0,135	0,7129	0,990	0,936	1,046
PAR-1 [%]	-	-	-0,008	0,031	0,066	0,7972	0,992	0,933	1,055
PAR-1+TRAP [%]	-	-	-0,048	0,022	4,920	0,0265	0,953	0,913	0,994
Ciśnienie skurczowe [mmHg]	-	-	-0,019	0,026	0,499	0,4798	0,981	0,932	1,034
Ciśnienie rozkurczowe [mmHg]	-	-	-0,005	0,037	0,019	0,8916	0,995	0,926	1,070
Wiek [lata]	-	-	-0,127	0,044	8,406	0,0037	0,881	0,809	0,960
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	-	-	-0,243	0,086	7,937	0,0048	0,784	0,663	0,929
ALAT [U/L]	-	-	0,011	0,017	0,458	0,4987	1,011	0,979	1,045
AspAT [U/L]	-	-	0,002	0,017	0,012	0,9135	1,002	0,970	1,035
GGTP [U/l]	-	-	0,002	0,006	0,135	0,7135	1,002	0,991	1,013
Mocznik [mg/dl]	-	-	-0,087	0,025	12,080	0,0005	0,917	0,873	0,963
Kreatynina [mg/dl]	-	-	-0,632	1,563	0,164	0,6859	0,532	0,025	11,369

Zmiennymi mającymi istotny jednowymiarowy wpływ na różnicowanie między MZ i MC (Tabela 4.4.) były: palenie tytoniu ( $p = 0,013$ ), stężenie vWF ( $p = 0,009$ ) oraz trójglicerydów ( $p = 0,033$ ), względna ilość aktywowanych mikrocytek ( $p = 0,010$ ), stężenie PAR-1+TRAP ( $p = 0,027$ ), wiek ( $p = 0,004$ ), BMI ( $p = 0,005$ ), stężenie mocznika ( $p < 0,001$ ).

Krotność zmiany szansy występowania MZ względem szansy występowania MC (określany dalej w tekście jako 'iloraz szans' (z ang. *Odds Ratio*, OR) wynosiła: 3,760 (nikotyzm vs. brak nikotyzmu), 0,977 (z każdym wzrostem stężenia vWF o 1 punkt procentowy), 0,990 (z każdym wzrostem stężenia trójglicerydów o 1 mg/dl), 0,949 (z każdym wzrostem ilości względnej aktywowanych mikrocytek o 1 punkt procentowy), 0,953



(z każdym wzrostem PAR-1+TRAP o 1 punkt procentowy), 0,881 (z każdym wzrostem wieku o 1 rok), 0,784 (z każdym wzrostem BMI o 1) oraz 0,917 (z każdym wzrostem stężenia mocznika o 1 mg/dl). Następnie, metodą krokową, opracowano model wielowymiarowy (Rycina 4.12.). Stworzony (iteracyjnie, bez interakcji) model wielowymiarowy wykorzystywał informację o: stężeniu trójglicerydów (TG), wieku pacjenta, stężeniu czynnika von Willebranda (vWF) oraz czasu protrombinowego (PT, %) – w celu różnicowania MZ i MC.

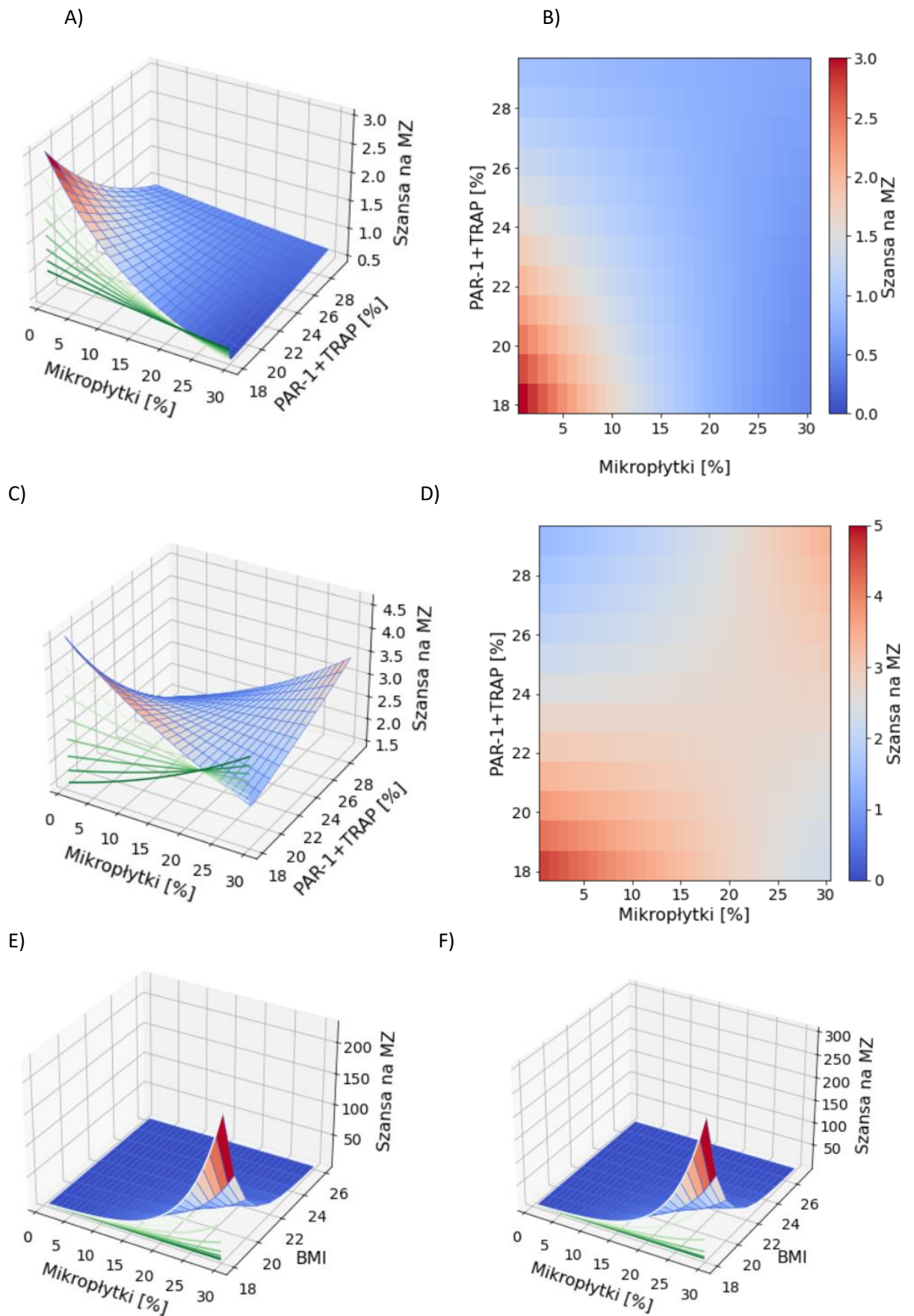


**Rycina 4.12.** Wielowymiarowy wpływ czasu protrombinowego (PT, %), procentowego udziału czynnika von Willenbranda (vWF, %), wieku (lata), stężenia trójglicerydów (TG, mg/dl) na szansę na występowanie miażdżycy zarostowej (MZ) wśród populacji chorych na miażdżycę zarostową lub makroangiopatię cukrzycową (MZ i MC)

Zgodnie z tym modelem, wśród osób chorych na jedną z tych chorób (MZ bądź MC), „bazowa” szansa na występowanie MZ wynosiła 2,559 (pacjent referencyjny: wiek 58 lat, TG 126 mg/dl, vWF 154%, PT 104%). Każda kolejna zmiana o jedną jednostkę którejkolwiek z tych zmiennych powodowała zmniejszenie tej szansy o około: 1,83% (TG), 34,59% (wiek), 3,73% (vWF) oraz 11,11% (PT).

### Analiza interakcji

W celu sprawdzenia istnienia wieloczynnikowych różnic pomiędzy MZ i MC przeprowadzono analizę interakcji. W pierwszym jej etapie dokonano selekcji interakcji, które istotnie wносиłyby informację w kontekście różnicowania dwóch schorzeń, względem modelu naiwnego (nie zawierającego zmiennych), których szczegółowe wyniki przedstawiono w Tabeli D.2. W trakcie analizy interakcji wyłoniono następujące interakcje 2. stopnia: ilość mikroplatek z PAR-1+TRAP (LR  $p = 0,006$ , w modelu czynnikowym  $p = 0,020$ , Rycina 4.12A-D), ilość mikroplatek z BMI (LR  $p = 0,012$ , w modelu czynnikowym  $p = 0,029$ , Rycina 4.12E-F) oraz wiek z paleniem tytoniu (LR  $p = 0,031$ , w modelu czynnikowym  $p = 0,035$ ).



**Rycina 4.13.** Analiza wielowymiarowa: A-D) Ilość mikroptytek z PAR-1+TRAP; E-F) ilość mikroptytek z BMI (Rycina 4.12E-F) oraz wiek z paleniem tytoniu

U pacjenta ze względną ilością mikroplętek równą 10,90%, wzrost PAR-1+TRAP1 o 1 punkt procentowy powodował zmniejszenie szansy na występowanie MZ o 5,93%. Choć wpływ wzrostu ilości mikroplętek (o 1 punkt procentowy), sam z siebie, nie powodował istotnych zmian wspomnianej szansy ( $p = 0,103$ ), 1,005-krotnie modulował on zmianę szansy wynikającą ze wzrostu PAR-1+TRAP1 (Rycina 4.13A-D, Tabela D.2.).

U pacjenta ze odsetkiem mikroplętek równym 10,90%, wzrost BMI o 1 powodował zmniejszenie szansy na występowanie MZ o 24,84%. Choć wpływ wzrostu odsetka mikroplętek (o 1 punkt procentowy), sam z siebie, nie powodował istotnych zmian wspomnianej szansy ( $p = 0,162$ ), 1,022-krotnie modulował on zmianę szansy wynikającą ze wzrostu BMI (Rycina 4.13E-F, Tabela D.2.).

U pacjenta w wieku 58 lat, palenie było związane 3,352-krotnie większą szansą występowania MZ. Wśród osób niepalących, z każdym wzrostem wieku o 1 rok wspomniana szansa zmniejszała się o 22,10%. Wzrost jednego parametru 1,22-krotnie (o 22%) modulował wpływ drugiego na tę szansę.

## 5. DYSKUSJA

Miażdżyca zarostowa (inaczej miażdżyca kończyn dolnych) jest typem miażdżycy tętnic obwodowych (PAD), której objawy takie jak: ból spoczynkowy, niegojące się owrzodzenia i zgorzel związane z przewlekłym niedokrwieniem (tj. III i IV stopień Fontaine'a lub kategoria Rutherforda) określa się jako przewlekłe niedokrwienie zagrażające kończynom (ang. *Chronic Limb-Threatening Ischemia*, CLTI), lub (formalnie) krytycznym niedokrwieniem kończyn (ang. *Critical Limb Ischemia*, CLI). Jest to stan znacząco pogarszający jakość życia i funkcjonowania, często prowadzący do śmierci<sup>116</sup>. Z uwagi na rozległość choroby, anatomiczną lokalizację zmian czy rozległe choroby współistniejące rewaskularyzacja jest przeciwwskazana aż u 40% pacjentów. Wobec braku metod leczenia stosowanym rozwiązaniem terapeutycznym pozostaje amputacja kończyny, która jednakże wiąże się z jeszcze gorszym rokowaniem: śmiertelność okołoperacyjna wynosi 5–20%, u 30% pacjentów konieczna jest druga amputacja, a pełną sprawność ruchową osiąga się jedynie u 25–50% chorych<sup>116</sup>.

Jedną z najbardziej znaczących chorób współistniejących, która nasila i przyspiesza rozwój zmian miażdżycowych, jest cukrzyca. Wskutek toczących się stanów zapalnych, spowodowanych i nasilanych przede wszystkim hiperglikemią, akumulacją końcowych produktów zaawansowanej glikacji (ang. *Advanced Glycation-End Products*, AGEs) w ścianach naczyń oraz podwyższonym stężeniem reaktywnych form tlenu, dochodzi do inicjowania w różnych odcinkach różnych tętnic procesów miażdżycogennych tzw. makroangiopatii cukrzycowej (MC). Rozsiany charakter MC wynika przede wszystkim z relatywnie dużej powierzchni obwodowego łożyska naczyniowego, co ma swoje konsekwencje w postępie innych patologii m.in. wzrasta ryzyko postępu choroby niedokrwiennej serca, chorób naczyniowych, układu naczyniowo-mózgowego, neurologicznych oraz CLTI<sup>117</sup>. Ponadto u pacjentów z cukrzycą wraz z wiekiem, czasem trwania choroby i obecnością neuropatii obwodowej wzrasta ryzyko PAD<sup>73,118</sup>. Wynika to m.in. ze stanów zapalnych ściany naczyń krwionośnych, zmian funkcjonalnych elementów morfotycznych krwi oraz zmian hemostatycznych (tj. zaburzeń w wydzielaniu czynników hemostazy). Przebieg miażdżycy jest cięższy, zmiany pojawiają się wcześniej, a objawy niedokrwienia znacznie szybciej nasilają się.

W związku z tym, że przebieg zarówno miażdżycy zarostowej jak i makroangiopatii cukrzycowej często jest ciężki (obie te choroby prowadzą do podobnych klinicznych objawów - niedokrwienie kończyn dolnych, choroba wieńcowa czy udar mózgu), a jednocześnie

etiologia i mechanizmy patofizjologiczne obu z nich są różne - istnieje konieczność podejmowania prób nad typowaniem wczesnych markerów każdego z tych schorzeń. Pozyskiwana wiedza przyczynia się nie tylko do lepszego diagnozowania miażdżycy, ale również na poznawanie mechanizmów, które zachodzą podczas poszczególnych zmian angiologicznych, a w dalszej konsekwencji – na typowanie nowych celi terapeutycznych. Ponadto być może umożliwi opracowywanie strategii opóźniania klinicznych objawów. Wciąż jednak znanych jest zbyt mało narzędzi molekularnych, które pozwalałyby na typowanie głównych elementów determinujących rozwój danego etapu patomechanizmu makroangiopatii cukrzycowej czy miażdżycy zarostowej.

Wiadomym jest, że różne czynniki, zaangażowane w odmienne procesy biochemiczne, mogą mieć właściwości miażdżycogenne m.in. czynniki zapalne, zmodyfikowane LDL, elementy morfotyczne, produkty stresu oksydacyjnego, czy glikacji. Mnogość związków zaangażowanych w patomechanizmy aterogenne oraz szlaków biochemicznych, które zachodzą z ich udziałem, sprawia, że miażdżycą jest procesem złożonym. Klasyfikacja miażdżycy na różne podtypy jak np. miażdżycą zarostowa, czy makroangiopatia cukrzycowa pozwala na systematyzację tego zaburzenia ze względu na etiologię. Prowadzone prace obejmują zarówno poszukiwanie istotnych związków pomiędzy parametrami antropometrycznymi, laboratoryjnymi i obrazowymi (które są istotnie powiązane z pojawianiem się miażdżycy zarostowej i makroangiopatii cukrzycowej) jak i określanie związku występowania każdego z tych schorzeń z nowymi, potencjalnymi markerami, zaangażowanymi w kluczowe etapy rozwijania się zmian aterogennych ( tj. aktywację płytek krwi, inicjację i progresję stanu zapalnego oraz w procesy je nasilające jak np. zaburzenia hemostazy, krzepnięcia, fibrynolizy). Określenie udziału poszczególnych metabolitów m.in. ich stężenia, czy aktywności umożliwia w konsekwencji lepsze poznanie patomechanizmów inicjujących i mających znaczącą rolę w poszczególnych podtypach miażdżycy.

### **5.1. Porównanie miażdżycy zarostowej i makroangiopatii cukrzycowej w kontekście oceny antropometrycznej, laboratoryjnej i klinicznej**

Do parametrów antropometrycznych, określanych w diagnostyce klinicznej należą: wzrost, masa ciała, indeks masy ciała (ang. *Body Mass Index*, BMI), obwód talii, obwód bioder, stosunek obwodu talii do obwodu bioder (ang. *Waist-Hip Ratio*, WHR), obwód klatki piersiowej, procentowa zawartość tkanki tłuszczowej oraz procentowa zawartość masy mięśniowej. Powszechnie wiadomo, że zarówno nadwaga jak i otyłość (opisywane za pomocą

BMI i masy ciała) są silnie związane z ryzykiem miażdżycy – nadmiar tkanki tłuszczowej obciąża serce i może prowadzić do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, gdyż tkanka tłuszczowa trzewna promuje stan zapalny i zaburzenia metaboliczne<sup>119</sup>. Podobnie otyłość centralna, mierzona obwodem talii i WHR, jest silnie związana z ryzykiem miażdżycy, gdyż tkanka tłuszczowa zgromadzona w jamie brzusznej wykazuje większą aktywność metaboliczną, może indukować stany zapalne i przyczyniać się do insulinooporności, która najczęściej prowadzi do T2DM, a w dalszej konsekwencji do rozwoju makroangiopatii cukrzycowej<sup>119</sup>. Niska masa mięśniowa również może zwiększać ryzyko rozwoju miażdżycy z uwagi na fakt, że to właśnie mięśnie odgrywają kluczową rolę w metabolizmie glukozy i tłuszczów.

W przedstawionej pracy wykazano istotne różnice w wartościach BMI i WHR u pacjentów z powikłaniami naczyniowymi w porównaniu do osób zdrowych, będących w podobnym wieku i tej samej populacji etnicznej. Wartości obu parametrów były znacząco wyższe w grupach osób zarówno z MZ jak i z MC niż w grupie kontrolnej. Wyniki te są zgodne z rezultatami badań prowadzonych przez inne zespoły badawcze, w których udowodniono, że postęp miażdżycy jest związany z BMI – wykazano, że wzrost BMI o każdą jedną jednostkę powyżej normy powoduje wzrost ryzyka wystąpienia miażdżycy i choroby niedokrwiennej serca o 10%. Ponadto wzrost masy ciała o 10 kg zwiększa ryzyko miażdżycy i choroby wieńcowej o 12%<sup>119</sup>. Wiadomo także, że sztywność tętnic – stymulująca nadmierną produkcję i odkładania się kolagenu w tkankach, prowadząca do postępu miażdżycy – wzrasta u pacjentów z otyłością ( $BMI \geq 40 \text{ kg/m}^2$ )<sup>120</sup>. Rozwijanie się stanów zapalnych w naczyniach krwionośnych w otyłości spowodowane jest m.in. aktywacją adipokin i cytokin oraz zwiększeniem poziomu aldosteronu we krwi. Adipokiny i cytokiny, np. IL-1 $\beta$ , IL-18 i TNF prowadzą do dysfunkcji komórek śródbłonna oraz zwiększają przepuszczalność połączeń między endoteliocytami. Podwyższony poziom aldosteronu zwiększa natomiast objętość krwi, promuje agregację płytek, dysfunkcję śródbłonna naczyniowego, zakrzepicę i włóknienie. Ponadto adipokiny leptyna, rezystyna, IL-6 i białko chemotaktyczne monocytów „zwabiają” monocyty/makrofagi do tkanki tłuszczowej (w otyłości makrofagi stanowią nawet do 40% wszystkich komórek tkanki tłuszczowej)<sup>121</sup>, indukując: zapalenie tkanki tłuszczowej trzewnej, zapalenie tkanek ogólnoustrojowych, stres oksydacyjny, oksydację lipidów, insulinooporność, dysfunkcję śródbłonna i nadkrzepliwość – procesy wpływające na rozwój miażdżycy<sup>119</sup>. Otyłość przyspiesza także pojawienie się objawów klinicznych insulinooporności i cukrzycy typu 2, które są dodatkowymi czynnikami indukującymi i rozwijającymi przewlekłe stany

zapalne, powodujące w konsekwencji MC<sup>121</sup>. W otyłości makrofagi tkanki tłuszczowej ulegają polaryzacji w prozapalne makrofagi M1, które następnie zaczynają wydzielać cytokiny prozapalne, przez co mogą zaburzać sygnalizację insulinową, indukując tym samym insulinooporność. Wysokie wartości BMI w T1DM również przyspieszają rozwój makro- i mikroangiopatii<sup>122</sup>. W przedstawionej pracy wykazano, że wartość BMI była znacząco wyższa w grupie z MC w porównaniu do grupy z MZ oraz w porównaniu do grupy kontrolnej. Analogiczną zależność jak dla BMI zaobserwowano również dla WHR. W związku z tym, że obecnie aż dwa miliardy dorosłych ludzi na całym świecie (30% światowej populacji), ma nadwagę lub otyłość (co odpowiada za ponad 3,4 miliona zgonów rocznie) i wiadomym jest, że otyłość jest niezależnym czynnikiem zwiększającym ryzyko miażdżycy, konieczne jest podejmowanie działań skutecznego obniżania wartości BMI i WHR u pacjentów z otyłością. Związek otyłości, zapalenia tkanki tłuszczowej i chorób metabolicznych sprawia, że szlaki zapalne są jednym z celi terapeutycznych w leczeniu powikłań metabolicznych takich jak makroangiopatia cukrzycowa, miażdżycza zarostowa i inne patologie związane z otyłością<sup>121</sup>.

Kluczową rolę wśród zaburzeń metabolicznych charakteryzujących cukrzycę, które wpływają na postęp miażdżycy, odgrywa długotrwała ekspozycja na hiperglikemię i insulinooporność, zwłaszcza w połączeniu z takimi czynnikami ryzyka jak: otyłość, nadciśnienie tętnicze i dyslipidemia. Badania laboratoryjne i kliniczne prowadzone w wielu ośrodkach badawczych jednomyślnie potwierdzają, że rozwój MC jest spowodowany: nadprodukcją reaktywnych form tlenu, stresem oksydacyjnym, intensywnym formowaniem i aktywacją różnych AGEs, oddziaływaniem AGE-RAGE, przepływem polioli i heksozaminy, czy aktywacją kinazy białkowej C. Procesy te prowadzą do przewlekłego zapalenia naczyń<sup>27</sup>. Obecnie uznaje się, że utrzymująca się hiperglikemia jest główną przyczyną rozwoju waskulopatii w T2DM – hiperglikemia stymuluje apoptozę, zmniejsza replikację komórek śródbłonna (EC) i przyspiesza postęp miażdżycy<sup>123</sup>. Ponadto insulinooporność hepatocytów i miocytów jest zarówno główną przyczyną wystąpienia i postępu cukrzycy, jak i istotnym czynnikiem ryzyka wystąpienia i postępu innych schorzeń miażdżycowych, takich jak nadciśnienie i dyslipidemia<sup>124</sup>. Do najbardziej znaczących czynników rozwoju miażdżycy, pojawiających się w cukrzycy, należą przede wszystkim: czas trwania cukrzycy, stężenie HbA<sub>1c</sub>, obecność zwapnień błony środkowej tętnic. Czynniki te nawet 3-krotnie zwiększają ryzyko zgonu z powodu choroby niedokrwiennej serca w porównaniu do stanu bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej<sup>125</sup>. W związku z powyższym oczywistym parametrem różnicującym pacjentów z MC od pacjentów z MZ bądź od osób zdrowych jest stężenie

glukozy. W przedstawionej pracy wykazano istotnie niższą glikemię w grupie pacjentów z MZ w porównaniu do grupy pacjentów z MC oraz istotnie wyższe stężenie glukozy w grupie osób z MC w porównaniu do grupy kontrolnej. Analiza porównawcza wartości glikemii z uwzględnieniem podziału na płeć również wykazała, że w grupie kobiet i w grupie mężczyzn występuje znacząco niższe stężenie glukozy w grupie pacjentek z MZ w porównaniu do pacjentek z MC oraz, analogicznie, znacząco niższe stężenie glukozy w grupie mężczyzn z MZ w porównaniu z grupą mężczyzn z MC. Takie same zależności zachodziły w grupie pacjentek z MC w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej oraz w grupie mężczyzn z MC w porównaniu do grupy kontrolnej. Z uwagi na brak danych dotyczących wartości HbA<sub>1c</sub> nie było możliwe sprawdzenie znaczenia tego parametru w różnicowaniu MZ od MC i MC od grupy kontrolnej. Wykazano natomiast istotnie niższe stężenie mocznika w grupie pacjentów z MZ w porównaniu do grupy pacjentów z MC, wynikające najprawdopodobniej z zaburzeń czynności nerek w MC. Związek wzrostu stężenia mocznika w zaburzeniach naczyniowych został już zaobserwowany wcześniej w badaniach prowadzonych przez inne zespoły badawcze<sup>126,127</sup>. W przedstawionej pracy zaobserwowano także znaczącą redukcję HDL u chorych z MZ i u chorych z MC w porównaniu do grupy kontrolnej. Zależność ta jest powszechnie wykazywana w innych badaniach naukowych<sup>128</sup>. Ponadto w grupie z MC wykazano znacząco wyższe stężenie trójglicerydów niż w grupie kontrolnej, co również jest powszechnie obserwowaną zależnością<sup>129,130</sup>. Należy także wyjaśnić, że znacząco wyższe stężenie LDL u kobiet z MZ w porównaniu do kobiet z MC, wynikało natomiast ze stosowanej przez kobiety z cukrzycą terapii hipolipemizującej. Ponadto w cukrzycy często obserwowane jest podwyższenie stężenia kwasu moczowego w porównaniu do stanu bez zaburzeń węglowodanowych. Wykazano, że w T2DM poziom kwasu moczowego jest istotnie powiązany z mikroalbuminurią nawet u pacjentów z prawidłowym poziomem kreatyniny w surowicy<sup>131</sup>, co może być ważne we wczesnym wykrywaniu cukrzycowej choroby nerek. Poziom kwasu moczowego może być potencjalnym narzędziem przesiewowym umożliwiającym wczesne wykrycie cukrzycowej choroby nerek<sup>131</sup>.

## 5.2. Ocena poziomu aktywacji powierzchniowego PAR-1

PLT odgrywają istotną rolę w mechanizmach progresji miażdżycy – choć wiadomym jest, że zarówno ich aktywacja (np. trombiną) jak i agregacja wykazuje działanie miażdżycogenne, to wciąż nie do końca jest znane znaczenie tych procesów w miażdżycy o odmiennej etiologii np. makroangiopatii cukrzycowej, czy miażdżycy zarostowej. Jak dotąd



wykazano, że inicjacja i rozwój miażdżycy na drodze aktywacji czynników indukujących adhezję PLT do śródbłonna polega na oddziaływaniu PAR (receptorów trombinowych aktywowanych przez proteazy) z trombiną – ekspresja PAR-1 wzrasta wraz z postępowaniem miażdżycy<sup>74</sup>, co jest związane ze wzmożonym wydzielaniem trombiny<sup>132</sup>. W receptorach tych upatruje się wręcz kluczowe cele terapeutyczne i diagnostyczne, mogące spowalniać procesy miażdżycogenne, co wynika z ich właściwości molekularnych. PAR należą do transbłonowych receptorów sprzężonych z białkiem G, które są w unikalny sposób aktywowane przez proteolityczne rozszczepienie ich zewnątrzkomórkowej części. To rozszczepienie „demaskuje” nowy N-koniec, pełniący rolę „uwięzowanego” ligandu, który wiążąc się z drugą domeną zewnątrzkomórkową białka powoduje różnorodne odpowiedzi komórkowe. Fizjologicznie PAR-1 ulega ekspresji w różnych tkankach, w tym na powierzchni komórek naczyń krwionośnych, neuronów, fibroblastów, komórek nabłonkowych. Nadekspresję PAR-1 wykazano natomiast w niektórych zaburzeniach metabolicznych jak miażdżycy oraz w różnych ludzkich nowotworach, np. na powierzchni komórek raka piersi, okrężnicy, prostaty, przełyku, jajnika, a także w czerniaku i w agresywnych białaczkach (w tym w fazie przełomu), w których jest negatywnym czynnikiem prognostycznym<sup>133</sup>. PAR-1 bierze także udział w kilku reakcjach pronowotworowych – jest np. związany z pierwotnym wzrostem, agresywną inwazyjnością, przerzutami i angiogenezą<sup>133</sup>. Ponadto wiadomo, że PAR-1 jest receptorem obecnym na komórkach śródbłonna naczyń i komórkach mięśni gładkich oraz na powierzchni elementów morfotycznych np. LEU, PLT. Aktywowane trombocyty indukują wzmożoną syntezę chemokin, która jest ściśle powiązana ze zwiększoną ekspresją cząsteczek adhezyjnych, głównie E-selektyny, VCAM-1 i ICAM-1<sup>134</sup>. PAR-1 przyczynia się do zaburzeń naczyniowych, ponieważ pośredniczy w odpowiedzi komórkowej wywołanej reakcją z trombiną i pokrewnymi proteazami. Agonistą receptora PAR-1 jest również TRAP (peptyd aktywujący receptor trombinowy) – substytut trombiny. Aktywacja PAR-1 przez trombinę, czy TRAP prowadzi do aktywacji receptorów GPIIb/IIIa, dzięki czemu możliwe jest związanie PLT z czynnikiem von Willebranda, warunkującym adhezję PLT do kolagenu. Nie do końca jednak poznane jest, w którym podtypie miażdżycy aktywacja PLT poprzez oddziaływanie PAR-1 z trombiną odgrywa kluczową rolę.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że poziom ekspresji PAR-1 na PLT nie poddawanych działaniu TRAP był porównywalny w osocząch pacjentów z MZ, MC i grupy kontrolnej. Zastosowanie TRAP spowodowało jednak znaczący wzrost stężenia PAR-1 na PLT pacjentów z MC nie tylko w porównaniu do PLT osób z grupy kontrolnej, ale nawet

do pacjentów z MZ. Wyniki te wskazują, że być może interakcja płytkowych PAR-1 i trombiny pełni istotną rolę w inicjacji i rozwoju miażdżycy na tle przede wszystkim makroangiopatii cukrzycowej. Obserwację tę należałoby jednak potwierdzić poprzez przeprowadzenie badania na znacznie większej liczbie prób osoczy bogatopłytkowych pacjentów z MC i MZ. Ponadto analiza statystyczna z uwzględnieniem płci wykazała znacząco wyższy poziom ekspresji PAR-1 na PLT mężczyzn z MZ w porównaniu do kobiet z MZ i znacząco niższy w porównaniu do mężczyzn z MC. Sugeruje to znacząco wyższą predyspozycję PLT mężczyzn z MZ do aktywacji z udziałem trombiny niż PLT kobiet z MZ, przy czym jest ona znacząco niższa niż u mężczyzn z MC. Z uwagi na fakt, że interakcja płytkowego PAR-1 z trombiną indukuje zmiany kształtu PLT i zapoczątkowuje uwalnianie  $Ca^{2+}$  i innych związków z ziarnistości cytoplazmy, zwiększając w ten sposób właściwości agregacyjne PLT<sup>134</sup>, w wielu badaniach sugerowane jest, że ten pierwszy etap kaskady prowadzącej do agregacji PLT jest kluczowy, a PAR-1 stanowi zarówno cel diagnostyczny jak i terapeutyczny. Obecnie wprowadzono już kilka narzędzi molekularnych, które hamują lub nawet uniemożliwiają oddziaływanie PAR-1 z trombiną<sup>135</sup>. Znane są np. przeciwciała zakłócające proteolizę, przez co uniemożliwiają aktywację receptora<sup>136,137</sup>. Epitopami dla tych przeciwciał są białka kodowane przez sekwencje egzodomeny PAR-1 tj. sekwencja kodująca miejsce proteolizy dla trombiny oraz sekwencja kodująca fragment podobny do hirudyny<sup>137</sup>. Możliwe jest również ortosteryczne zakłócanie interakcji „związany” ligand (nowy N-koniec utworzony w wyniku działania trombiny) i miejsce wiązania ligandu poprzez stosowanie mimetyków peptydowych jak np. worapaksar (SCH-530348), antagonistą PAR-1. Worapaksar w badaniach przedklinicznych wykazywał działanie przeciwpłytkowe tj. hamował *in vitro* agregację ludzkich PLT indukowaną przez 10 nM trombinę lub 15  $\mu$ M peptyd aktywujący receptor trombiny o wysokim powinowactwie (ang. *high affinity Thrombin Receptor Activating Peptide*, haTRAP)<sup>138</sup>. Obecnie worapaksar jest wprowadzony jako pierwszy lek w klasie antagonistów PAR-1, który może być stosowany przez pacjentów z pozytywnym wywiadem zawału mięśnia sercowego lub PAD, nawet w połączeniu z aspiryną i/lub kłopidogrelem celem zmniejszenia ryzyka sercowo-naczyniowego u pacjentów<sup>139</sup>. Z uwagi na to, że worapaksar jest przeciwwskazany u pacjentów z historią udaru mózgu, przemijającego napadowego niedokrwienia, krwotoku śródczaszkowego, oraz u pacjentów z masą ciała poniżej 60 kg (z powodu zwiększonego ryzyka krwawień do mózgu, które potencjalnie przewyższa ryzyko korzyści terapeutycznych) konieczne jest prowadzenie badań nad poszukiwaniem nowych antagonistów PAR-1<sup>140</sup>. Blokowanie skutków interakcji trombiny z PAR-1 może zachodzić również na etapie hamowania rekrutacji białek G do wewnątrzkomórkowej pętli trzeciej (ICL3) PAR-1 przez

np. pepducyny<sup>141,142</sup>. Te struktury, penetrujące palmitoilowane peptydy, mogą być tak projektowane, by pasowały do sekwencji takich jak PAR-1 (pepducyna P1pal-12, P1pal-7), czy PAR-4 (pepducyna P4pal-10). Na podstawie badań przeprowadzonych *in vitro* stwierdzono, że pepducyny mogą być włączane do błony komórkowej tworząc obszar odpowiadający interakcji między białkiem G a GPCR, zaburzając przez to sygnalizację komórkową, np. P1pal-12 usuwa wolne białko G z cytozolu, co zakłóca rekrutację białek G do PAR-1<sup>142</sup>. Obecnie P1pal-7 jest już natomiast wprowadzona jako lek (PZ128) przeciwzakrzepowy w leczeniu stanów nieostrych w ramach wieńcowych interwencji przezskórnych (TRIP-PCI)<sup>143</sup>. Zauważono również, że takie związki jak parmoduliny, które są ukierunkowane na cytoplazmatyczną powierzchnię PAR-1 (nie modyfikując przy tym endogennego miejsca wiązania ligandu po stronie zewnątrzkomórkowej) selektywnie blokują wewnątrzkomórkowy przepływ wapnia, w którym pośredniczy oś PAR-1–Gq. Takie działanie hamuje agregację PLT, jednocześnie jednak nie wpływając na zmianę kształtu PLT – zmianom nie ulega aktywność RhoA poprzez oś PAR-1–G13, determinująca zmianę kształtu PLT. Wiadomym jest również, że aktywacja PAR-1 zlokalizowanych na powierzchni komórek śródbłonka i komórek mięśniowych naczyń przyczynia się do jego skurczu i zwężenia oraz prowadzi do uwolnienia vWF, endoteliny, tlenku azotu (NO) i czynnika płytkowego (PGI<sub>2</sub>), co być może jest związane ze wzrostem stężenia cyklicznego monofosforanu adenozy (caMP)<sup>144</sup>. Jak dotąd wykazano, że poza hamowaniem aktywności PLT w modelach chorób zakrzepowo-zatorowych *in vitro* i *in vivo*, antagoniści PAR-1 służą jako sondy do badania mechanizmów aktywacji PAR-1, w których bierze udział „związany” ligand<sup>145</sup>. Ponadto w śródbłonku, parmoduliny hamują efekt prozapalny, w którym pośredniczy PAR-1, nie mając wpływu na szlak ochronny APC<sup>70</sup>. Potwierdzenie istotnego wpływu aktywacji PLT zwłaszcza w makroangiopatii cukrzycowej poprzez przeprowadzenie badań na znacznie większej grupie pacjentów niż w przedstawionej pracy, być może spowoduje, że dostępne już leki hamujące interakcję PAR-1/trombina będą wprowadzane do farmakoterapii na wczesnych etapach makroangiopatii cukrzycowej.

### 5.3. Określenie polimorfizmów genu PAR-1

Większość genów kodujących receptory obecne na PLT została już zsekwencjonowana, co pozwoliło na określenie rodzajów polimorfizmów występujących w regionach kodujących i regulujących (czyli w tych miejscach genu, w których najczęściej pojawiają się mutacje). Prowadzone przez różne zespoły badania przyczyniają się do ciągłego poznawania konsekwencji tych polimorfizmów dla funkcji PLT i ich udziału w predyspozycjach

do nadmiernych krwawień lub tworzenia się skrzepin. Zazwyczaj wysoka gęstość receptorów jest związana ze zwiększonym ryzykiem zakrzepicy, natomiast niska ich gęstość – z nadmiernym krwawieniem<sup>146</sup>. Wykazano np., że różnice w gęstości integryny 21 na powierzchni PLT, występujące u osób zdrowych, korelują ze stopniem adhezji do kolagenu<sup>147</sup>. Różna gęstość receptorów na powierzchni PLT może być skutkiem nie tylko toczącego się jakiegoś patomechanizmu, ale również może wynikać z mutacji, które pojawiają się w genach kodujących te receptory. Zauważono, że dla PAR-1 zakres jego ekspresji na PLT wykazuje międzyosobniczą zmienność liczby receptorów, przy zachowaniu stabilnej gęstości receptora w czasie, co wskazuje na istnienie mutacji genetycznych w genie kodującym PAR-1<sup>147</sup>. Obecnie znane są trzy polimorfizmy genu kodującego PAR-1: w regionie 5 regulatorowym zidentyfikowano dwa z nich, tj. przejście CT o 1426 parach zasad (bp) powyżej miejsca startu transkrypcji (1426 C/T) oraz powtórzenie o długości 13 bp (I) poprzedniej sekwencji 506 5-CGGCCGCGGGAAG-3 (506 I/D), natomiast trzeci polimorfizm (transwersję AT), zlokalizowano w sekwencji interweniującej (IVS), 14 nukleotydów powyżej miejsca startowego egzonu 2 (IVSn 14 A/T). Częstość występowania mutacji w danym fragmencie genu kodującego PAR-1 jest różna w różnych jednostkach chorobowych. Oszacowano, że częstość występowania alleli: IVS-14T, 1426 T oraz -506 w grupie osób zdrowych wynosi odpowiednio: 0,185, 0,041 i 0,256<sup>114</sup>. Podobna wartość dla polimorfizmu -506I/D w grupie osób zdrowych została wyznaczona przez inny zespół badawczy i wynosiła ona 0,27<sup>148</sup>. W przedstawionej pracy wykazano, że częstotliwości alleliczne IVSn-14 T, 1426 T, 506 I wynosiły odpowiednio: i 0,194, 0,028, 0,27. Wartość częstości występowania allelu T w grupie kontrolnej była niższa i wynosiła 0,028, co być może wynikało ze zbyt niskiej liczebności grupy.

Polimorfizm insercji 13 bp, oznaczany jako -506 I/D (F2R, rs 35900074) nie jest związany z fenotypem płytkowym PAR-1<sup>115</sup>. W przedstawionej pracy wykazano występowanie trzech wariantów polimorfizmu -506 I/D w genie kodującym PAR-1 tj. homozygoty I/I, heterozygoty I/D oraz homozygoty D/D. Stwierdzono, że największy procentowy udział heterozygoty -506 I/D był rozpoznawany w grupie z MZ. Odsetek wariantu 506 I/I występował rzadko, natomiast homozygoty -506 D/D dominowały w każdej z grup tj. grupie z MC, z MZ i grupie kontrolnej. Wyniki te wskazują, że występowanie wariantu heterozygoty I/D w pozycji -506 I/D genu PAR-1 może w konsekwencji być związane z niższą podatnością na aktywację płytkowych PAR-1 wskutek działania trombiny. W konsekwencji być może również i ta mutacja (oprócz stałej ekspozycji PLT na hiperglikemię w MC) przyczynia się do wolniejszego przebiegu

procesów miażdżycogennych w MZ w porównaniu do MC. Wyniki te zostały również potwierdzone w innym badaniu przedstawionym w niniejszej pracy, którego celem było określenie poziomu ekspresji PAR-1 aktywowanego TRAP w zależności od danego genotypu tj. DD, I/D i II. Zauważono, że poziom ekspresji PAR-1 u pacjentów z MC jest wyraźnie wyższy w przypadku genotypu DD, szczególnie w grupie u mężczyzn. Sugeruje to istotny wpływ polimorfizmu -506 DD na znaczący wzrost ekspresji genu PAR-1 w grupie chorych z MC oraz MZ. Obserwacja ta jest zgodna z wnioskami, które wyciągnięto na podstawie badań przeprowadzonych przez inny zespół, w których wykazano, iż allel I w homozygotach I/I jest mniej powszechny w grupie mężczyzn z chorobą zakrzepowo-zatorową niż w grupie mężczyzn kontrolnych. Dodatkowo, stwierdzono obniżenie poziomu fragmentów protrombiny F1+2 u homozygotycznych nosicieli allelu -506 I. Te dane sugerują potencjalne działanie ochronne polimorfizmu insercji -506 I u mężczyzn dotkniętych żylną chorobą zakrzepowo-zatorową<sup>114</sup>. Wykazano także, że allel D wpływa na lepsze rokowania przeżycia chorych i mniejsze ryzyko nawrotu choroby pacjentek z rakiem piersi<sup>149</sup>, a także daje lepsze rokowania przeżycia chorych i mniejsze ryzyko nawrotu choroby. Ponadto wykazano, że genotyp DD w grupie osób zdrowych jest znacznie wyższy niż w grupie badanej<sup>148</sup>, co jest zgodne z wynikami przedstawionymi w niniejszej pracy – w grupie kontrolnej zaobserwowano znacznie wyższą częstość występowania allelu D niż grupy badanych chorych (z MZ lub z MC).

Polimorfizm -1426 C/T (F2R, rs 32934), podobnie jak polimorfizm -506 I/D nie jest powiązany z fenotypem płytkowym PAR-1<sup>115</sup>. Ponadto badania prowadzone przez różne zespoły dotyczące polimorfizmu -1426 C/T wskazują, że częstość występowania allelu T w miejscu allelu C zdarza się bardzo rzadko (0,041). W przedstawionej pracy znacząca liczba próbek wykazywała obecność jedynie homozygoty C/C, natomiast polimorfizmu -1426 C/T pojawił się tylko raz. Jest to zgodne z obserwacjami innych zespołów badawczych, wskazujących na to, że w małej grupie badanej mogą w ogóle nie występować osoby z genotypem CT lub TT.

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu IVS-14 A/T w genie PAR-1 może wpływać na gęstość receptorów na PLT oraz na ich funkcje w grupie zdrowych ochotników<sup>115</sup>. Allel T (o częstości allelicznej 0,14) jest związany z niższą ekspresją PAR-1 na powierzchni PLT oraz powoduje zmniejszoną odpowiedź PLT na aktywację peptydem SFLLRN (agonisty końca aminowego PAR-1) w porównaniu z allelem A<sup>115</sup>. Ponadto różnice w odpowiedzi PLT na SFLLRN u zdrowych osób są skorelowane ze zmiennością gęstości PAR-1 na powierzchni PLT, a różnica ta przynajmniej częściowo wynika z dziedziczenia jednego z polimorfizmów

PAR-1<sup>146</sup>. Wykazano także, że liczba PAR-1 na powierzchni PLT jest powiązana z zmiennością intronową sekwencji IVSn 14 A/T oraz, potwierdzono jej wpływ na regulację odpowiedzi PLT na SFLLRN w kontekście agregacji i ekspresji selektyny P. Zmienność intronowa IVSn 14 A/T może zatem mieć znaczenie kliniczne. Badania przeprowadzone na zwierzętach z antagonistami PAR-1 sugerują, że mniejsza dostępność PAR-1 może zwiększać skłonność do krwawień. Zatem odziedziczone różnice w gęstości receptorów mogą mieć znaczenie kliniczne u osób, u których ryzyko krwawienia jest już zwiększone, na przykład u osób z łagodną hemofilią lub chorobą von Willebranda, a także u pacjentów poddawanych zabiegom chirurgicznym. Wieloczynnikowa analiza regresji Coxa wykazała, że posiadanie allelu T w genie kodującym PAR-1 jest niezależnym czynnikiem predykcyjnym złożonych zdarzeń niedokrwiennych, nawet po uwzględnieniu innych czynników ryzyka<sup>150</sup> – ryzyko związane z wystąpieniem zdarzeń niedokrwiennych jest niższe w przypadku nosicieli allelu T. Badania przeprowadzone na próbach osocza nosicieli allelu T (częstość 14,8%) celem sprawdzenia występowania niższego ryzyka zdarzeń zakrzepowych i większego ryzyka krwawienia po dokonaniu zabiegu PCI (z powodu niestabilnej lub stabilnej choroby wieńcowej), nie wykazały wpływu różnic genotypowych na częstość występowania zdarzeń sercowo-naczyniowych (odpowiednio 33,7%, 28,8% i 31,6% dla genotypów A/A, A/T i T/T,  $p = 0,50$ ) ani krwawień (odpowiednio 15,7%, 14,7% i 18,8% dla genotypów A/A, A/T i T/T,  $p = 0,90$ ). W modelu regresji Coxa uwzględniającym wiek, rasę, płeć, BMI i palenie tytoniu, nosicielstwo allelu T nie było powiązane ani z zdarzeniami sercowo-naczyniowymi (HR 1,19, 95% CI 0,89-1,59,  $p = 0,23$ ), ani z krwawieniem (HR 0,73, 95% CI 0,37-1,4,  $p = 0,34$ )<sup>151</sup>. U pacjentów z zawałem serca typu STEMI, którzy zostali poddani procedurze PCI wykazano, natomiast, że posiadanie co najmniej jednej kopii allelu T jest związane ze znacznie niższym ryzykiem wystąpienia zespołu niedokrwienia w porównaniu z nosicielami homozygot dla allelu A<sup>152</sup>. Ponadto, polimorfizm intronowy IVSn 14 A/T może wpływać na szybkość przetwarzania mRNA lub zwiększać efektywność transkrypcji oraz ilość syntetyzowanego białka<sup>115</sup>. Wykazano, że obecność allelu T jest powiązana nie tylko z niższą ekspresją PAR-1 na powierzchni PLT, ale także z niższą agregacją PLT, zmniejszoną odpowiedzią komórkową na peptyd aktywujący PAR-1 oraz zmniejszoną aktywnością prokoagulacyjną. Potencjalnie związek między polimorfizmem IVS-14 A/T a fenotypem płytkowym PAR-1 może wynikać z wpływu na splicing intronów. Miejsce zmiany sekwencji znajduje się w sekwencji pośredniej (IVS), 14 nukleotydów powyżej miejsca startowego egzonu 2, co może wpływać na proces rozpoznawania miejsca splicingu. Nie stwierdzono jednak różnic w sekwencji w regionie połączenia egzonów 2 na cDNA PLT między osobnikami homozygotycznymi dla allelu A,

heterozygotycznymi i homozygotycznymi dla allelu T<sup>115</sup>. Ekspresja PAR-1 może być również kontrolowana na etapie transkrypcji. Analiza ilościowa ekspresji genów na poziomie mRNA nie wykazała jednak korelacji ani z liczbą receptorów PAR-1, ani z polimorfizmem intronowym IVS-14 A/T<sup>115</sup>. Zauważono natomiast, że u homozygot dla allelu A obserwowana jest zwiększona agregacja PLT oraz odpowiedź prokoagulacyjna. Klopidogrel skutecznie hamuje jednak tę odpowiedź, niezależnie od genotypu PAR-1, przy czym dla allelu A znacznie częściej obserwowane jest utrzymywanie się wyższej reaktywności PLT, pomimo leczenia klopidogrelem, co zwiększa ryzyko zdarzeń zakrzepowo-zatorowych i wymusza konieczność stosowania dodatkowego leczenia przeciwplatekowego<sup>152</sup>. W przedstawionej pracy zaobserwowano takie same zależności między występowaniem homozygot A/A i heterozygot A/T jak w powyżej opisanych badaniach naukowych. Wykazano, że procentowy udział homozygoty AA jest największy w każdej z badanych grup, heterozygota AT występowała rzadziej i z porównywalną częstością w każdej z grup, natomiast homozygota TT występowała bardzo rzadko. Wykazano także, że homozygota AA w polimorfizmie IVS-14 genu PAR-1 występowała znacząco częściej w grupie pacjentów z MC i MZ w porównaniu do grupy kontrolnej. Wskazuje to na silniejsze skłonności do aktywacji i agregacji PLT w MC i MZ niż u osób zdrowych.

#### **5.4. Ocena agregacji mikroplatek (PMP) i platek krwi (PLT)**

Mikrocząsteczki pochodzące z PLT (PMP) i mikrocząsteczki pochodzące ze śródbłonna (EMP) odgrywają istotną rolę w procesie angiogenezy<sup>153</sup>, ponieważ są nośnikami sygnałów międzykomórkowych. Biorą one udział we wszystkich etapach angiogenezy, włączając w to proliferację, migrację oraz tworzenie struktur podobnych do naczyń krwionośnych, poprzez stymulowanie ruchu komórek śródbłonna i formowanie nowych naczyń<sup>52</sup>. W stanach zaburzonej funkcji śródbłonna oraz w stanach zapalnych, jak choroba wieńcowa czy mikroangiopatie zakrzepowe, zaobserwowano znaczący wzrost stężenia PMP, EMP i monocytów. W przypadku chorób naczyniowych można zaobserwować zmiany w zawartości mikrocząsteczek. Krążące mikrocząsteczki odzwierciedlają procesy aktywacji komórek oraz uszkodzenia zarówno krążących, jak i stałych komórek układu naczyniowego<sup>154</sup>. EMP posiadają ekspresję molekuł adhezyjnych, a najbardziej charakterystyczne dla nich są kombinacje antygenów CD105+/CD144+. Wzrost populacji mikrocząsteczek wykazujących ten zestaw antygenów może świadczyć o uszkodzeniu naczyń, co z kolei zwiększa ryzyko powikłań zakrzepowych. EMP wykazują również ekspresję multimerów vWF<sup>155</sup>. U pacjentów z różnym stopniem zaawansowania choroby wieńcowej obserwuje się wzrost EMP (CD31+,

CD42-)<sup>156</sup>. Wykazano bezpośrednią zależność pomiędzy liczbą tych mikrocząsteczek a obrazem naczyń uzyskiwanym w angiografii, zwłaszcza w przypadku zwężenia lewej tętnicy wieńcowej zstępującej w porównaniu z liczbą mikrocząsteczek u chorych ze zwężeniem prawej tętnicy wieńcowej. Ponadto, wzrost liczby EMP (CD31+, aneksyna V+) koreluje z dysfunkcją śródbłonna, co można ocenić angiograficznie poprzez obniżenie napięcia naczyń w odpowiedzi na podanie acetylocholiny<sup>157</sup>.

Wzrost poziomu PMP stwierdza się natomiast przede wszystkim w przypadkach zamknięcia naczyń mózgowych, co może wskazywać na aktywację PLT w małych naczyniach<sup>158</sup>. W stabilnej chorobie wieńcowej zaobserwowano wzrost liczby PMP (CD61+, CD42b+), co może sygnalizować stan prozakrzepowy<sup>156</sup>. Natomiast u pacjentów z tętniakiem aorty brzusznej na powierzchni PMP zauważono aktywny TF, co sugeruje interakcje PLT z mikrocząsteczkami pochodzenia monocytarnego oraz ich udział w procesie tworzenia zakrzepu<sup>159</sup>. Wzrost subpopulacji PMP oznaczanych jako CD63+ i Selektyna P+ u osób z PAD oraz zawałem serca koreluje z wczesną fazą zawału serca i miażdżycą tętnic<sup>160</sup>. Wysokie stężenie PMP oznaczanych jako CD62+ i CD63+ obserwowane jest u pacjentów z chromaniem przestankowym oraz u osób, które doświadczyły incydentów niedokrwienia<sup>161</sup>.

Na podstawie otrzymanych wyników przedstawionych w niniejszej pracy wykazano istnienie istotnych różnic w udziałach procentowych aktywowanych PMP aktywowanych w grupach pacjentów z MZ, MC i grupy kontrolnej. Wykazano znacząco niższy poziom aktywowanych PMP u pacjentów z MZ w porównaniu do pacjentów z MC oraz istotny wzrost poziomu zarówno nieaktywowanych jak i aktywowanych PMP u pacjentów z MC w porównaniu do grupy kontrolnej. Analiza z uwzględnieniem płci wykazała znaczący wzrost poziomów nieaktywowanych i aktywowanych PMP w grupie kobiet z MC w porównaniu do kobiet grupy kontrolnej, istotny wzrost poziomu nieaktywowanych i aktywowanych PMP oraz aktywowanych agregatów płytkowych w grupie kobiet z MZ w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej oraz znaczący wzrost poziomu aktywowanych agregatów płytkowych u mężczyzn z MC w porównaniu do mężczyzn z grupy kontrolnej. W analizie statystycznej przeprowadzonej z uwzględnieniem płci w danym schorzeniu wykazano natomiast znacząco wyższy poziom aktywowanych PMP oraz aktywowanych agregatów PLT w grupie kobiet z MZ w porównaniu do grupy mężczyzn z MZ oraz do grupy wszystkich pacjentów z MZ. Na podstawie przeprowadzonych badań można więc stwierdzić, że prawdopodobnym jest, że PMP są markerem pozwalającym na różnicowanie pacjentów z MC od pacjentów z MZ. Otrzymane wyniki są zgodne z obserwacjami innych zespołów badawczych, które również wykazały wzrost liczby krążących PMP w różnych chorobach układowych, zwłaszcza



w cukrzycy. Sugeruje to aktywację komórek, z których się wywodzą oraz udział mikrocząsteczek w niszczeniu śródbłonka<sup>162</sup>. W T1DM obserwowany jest podwyższony poziom PMP, EMP i mikrocząsteczek z eksponowaną fosfatydyloseryną oraz wzrost prokoagulacyjnej aktywności mikrocząsteczek<sup>163</sup>, które korelują ze stężeniem HbA<sub>1c</sub>. Sugeruje to występowanie związku z gospodarką węglowodanową. W T2DM zaobserwowano jedynie istotnie wyższą całkowitą liczbę mikrocząsteczek z eksponowaną fosfatydyloseryną, ale nie wykazano ich aktywności prokoagulacyjnej. Nie zaobserwowano też wzrostu liczby PMP (CD42+ i CD41a+) ani liczby monocytarnych mikroplatek oznaczanych jako CD14+. Brak obserwowanej zależności pomiędzy PMP w T2DM najprawdopodobniej wynika z tego, że badana grupa pacjentów nie wykazywała powikłań o charakterze makroangiopatii (być może okres trwania cukrzycy był krótki). W dostępnej, bieżącej literaturze nie ma natomiast informacji o tym, by jakkolwiek zespół naukowców podjął temat sprawdzenia zależności wzrostu liczby PMP od stopnia zaawansowania makroangiopatii cukrzycowej. Wiadomym jest jedynie, że u pacjentów z T2DM obserwowane jest wysokie stężenie aktywowanych PLT<sup>164</sup>, które w miejscu uszkodzenia ściany naczyniowej powodują interakcje licznych glikoproteinowych receptorów płytkowych z włóknami kolagenu<sup>165</sup>. Jak dotąd nie wykazano natomiast podwyższonego stężenie aktywowanych PMP w T2DM. Przedstawiona w pracy obserwacja, wskazująca na znacząco wyższy poziom aktywowanych PMP u pacjentów z MC w porównaniu do pacjentów z MZ, jest pionierskim odkryciem, który wymaga potwierdzenia poprzez przeprowadzenie analogicznych eksperymentów na znacznie większej grupie pacjentów z MZ i MC. Otrzymane wyniki pozwoliłyby być może wówczas na dokonanie jednoznacznej oceny znaczenia aktywowanych PMP jako wiarygodnego markera różnicującego makroangiopatię cukrzycową od miażdżycy zarostowej.

### 5.5. Oceny ilościowe wybranych parametrów hemostazy i stanu zapalnego

Aktywacja PLT inicjowana oddziaływaniem PAR<sup>74</sup> z czynnikiem Xa lub trombiną jest procesem determinującym rozwój miażdżycy, wpływającym zarówno na powstawanie i procesowanie blaszki miażdżycowej jak i na zapoczątkowywanie i wzmacnianie towarzyszącemu jej stanowi zapalnemu (i miejscowemu i odpowiedzi systemowej)<sup>166</sup>. Wykazano, że trombina, poprzez proteolityczną aktywację receptorów PAR-1, PAR-3 i PAR-4, precyzyjnie reguluje zarówno stany fizjologiczne, jak i patologiczne naczyń<sup>102</sup>. Aktywacja receptora PAR-2 inicjuje procesy proaterogenne, takie jak indukcja stresu oksydacyjnego, chemotaksja monocytów i fibroblastów, indukcja stanu zapalnego, migracja i proliferacja VSMCs, angiogeneza oraz apoptoza<sup>167</sup>. W rezultacie patomechanizmów inicjowanych

oddziaływaniem trombiny z PAR dochodzi do inicjowania syntezy cytokin zapalnych, takich jak IL-6 i IL-8, oraz chemokin typu 2, jak CCL-2, selektyny E, ICAM-1, VCAM-1, TF, a także proliferacji VSMCs i uwalniania czynników wzrostu<sup>166</sup>. Wiele białek układu krzepnięcia przyczynia się do uszkodzenia bariery śródbłonkowej, rozwijania stresu oksydacyjnego, rekrutacji leukocytów, zapalenia, migracji i namnażaniu VSMCs, odpowiedzi immunologicznej, apoptozy PLT i innych komórek, oraz do intensyfikacji postępu procesów związanych z angiogenezą<sup>166,168</sup>. Wzmoczona produkcja trombiny w początkowych stadiach miażdżycy również stymuluje PLT i śródbłonek do zwiększonej ekspresji PAR<sup>132</sup>. Zaktywowane PLT oddziałują następnie ze śródbłonkiem poprzez interakcję płytkowej selektyny P z ligandem glikoproteinowym, obecnym na EC (ang. *P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*, SGL-1). Interakcja ta jest dodatkowo stabilizowana glikoproteiną  $\beta 3$ .

Na aktywację PLT wpływają takie czynniki związane z procesem krzepnięcia jak: kompleks trombina-antytrombina III (TAT), inhibitor fibrynolizy aktywowany trombiną (TAFI) oraz czynnik von Willebranda (vWF). TAT uważany jest za czuły wskaźnik aktywacji krzepnięcia (tzw. „gotowości prozakrzepowej”) – przyjmuje się, że pomiar stężenia TAT odzwierciedla ekspresję trombiny<sup>169</sup>. TAFI natomiast osłabia mechanizmy fibrynolizy, sprzyja rozwojowi powikłań zakrzepowo-zatorowych. U chorych z przewlekłą obwodową niewydolnością tętniczą w przebiegu miażdżycy wykazano znamienity wzrost stężenia TAT w surowicy krwi<sup>170</sup>. Podobnie w przedstawionej pracy wykazano znacząco wyższe poziomy TAT i TAFI u pacjentów z miażdżycą (zarówno MC jak i MZ) w porównaniu do grupy zdrowych ochotników, co wskazuje na występowanie u nich wyższej tzw. „gotowości prozakrzepowej”. Analiza płci wykazała, że w grupie mężczyzn z MZ poziom TAT był znacząco wyższy niż u zdrowych mężczyzn, natomiast w grupie mężczyzn z MC zarówno poziom TAT jak i TAFI był znacząco wyższy niż u zdrowych ochotników. W przedstawionej pracy wykazano także, że w obu typach miażdżycy, tj. i MC i MZ poziomy vWF, były znacząco wyższe niż w grupie kontrolnej. Co ciekawe, tylko różnica poziomów vWF była istotnie niższa u pacjentów z MZ w porównaniu do pacjentów z MC. Obserwacja ta sugeruje, że być może vWF jest istotnym czynnikiem różnicującym miażdżycę zarostową od makroangiopatii cukrzycowej. Wykazane w przedstawionej pracy znacząco niższe uwalnianie vWF (w postaci ziarnistości) z PLT w MZ w porównaniu do MC może wskazywać na zmniejszenie poziomu adhezji PLT ze śródbłonkiem, co w konsekwencji prowadzi do łagodzenia stanu zapalnego poprzez zmniejszenie liczby cząsteczek czynnika VIII – białka ostrej fazy przenoszonego przez vWF. Przedstawione w pracy wyniki są spójne z rezultatami przedstawionymi przez inne

zespoły badawcze, które wskazują na znacząco wyższe stężenie vWF u chorych z cukrzycą, zagrożonych ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych w porównaniu z grupą zdrowych, aktywnych fizycznie osób<sup>171</sup>, a także u osób z miażdżycą w porównaniu do zdrowych osób<sup>172</sup>.

Interakcja PAR-1 z trombiną indukuje także ekspresję białek chemotaktycznych dla monocytów (MCP-1) w EC i VSMCs<sup>173</sup>. MCP-1 jest chemokina, która oddziaływując ze swoim receptorem CCR2 (ang. *Chemokine Receptor Type 2*) stymuluje monocyty do transmigracji przez miejsca połączeń EC oraz przez błonę podstawową, co nasila dysfunkcję śródbłonka<sup>173</sup>. W przedstawionej pracy wykazano znaczący wzrost stężenia MCP-1 w grupie pacjentów z MC i MZ w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto analiza z uwzględnieniem płci wykazała, że zarówno w grupie kobiet jak i w grupie mężczyzn z MZ lub MC obserwowane są znacząco wyższe stężenia MCP-1 niż w grupie kontrolnej. Wykazane w pracy wysokie stężenia MCP-1 są zgodne z wynikami opublikowanymi przez inne zespoły badawcze, wskazującymi na wzmocnienie procesów zapalnych z udziałem MCP-1 u pacjentów z miażdżycą w porównaniu do osób bez miażdżycy, czy makroangiopatii cukrzycowej<sup>174,175</sup>. Aktywowane monocyty i makrofagi mogą następnie syntezować, udostępniać i uwalniać czynnik tkankowy (TF), fosfolipidy (PL), czynnik aktywujący płytki (PAF), inne cytokiny prozapalne (IL-1, IL-8, TNF) leukotrieny, tromboksany, toksyczne metabolity tlenu<sup>44</sup>. W fizjologicznych warunkach wyściółka śródbłonka nie wykazuje ekspresji TF – natomiast wzrost ekspresji TF pojawia się wówczas w sąsiednich warstwach. W blaszce miażdżycowej TF jest obecny w makrofagach, VSMCs oraz w pozostałościach komórek piankowatych w martwiczym rdzeniu blaszki<sup>176</sup>.

Ponadto aktywowane PLT uwalniają różnorodne chemokiny, np. czynnik płytkowy 4 (ang. *Platelet Factor 4* – PF4), czynniki wzrostu oraz serotoninę, stymulujące proliferację VSMC. PLT są także źródłem białek związanych z układem krzepnięcia, takich jak czynnik V, XI i XIII, oraz białek związanych z fibrynolizą tj. plazminogenu i PAI-1. Fibrynogen, fibryna oraz jej produkty rozpadu odgrywają istotne role już we wczesnych etapach zmian miażdżycowych, a ich ilość narasta wraz z postępem pogrubienia błony wewnętrznej i rozwojem blaszki<sup>177</sup>. Produkty rozpadu fibryny stymulują przemieszczanie się monocytów i produkcję IL-6. Rozwijający się w ścianie tętnicy stan zapalny, wsparty przez procesy związane z krzepnięciem, może nasilać lokalną produkcję trombiny, indukując zamknięty cykl patofizjologicznych procesów, które przyczyniają się do zwiększenia formowania się skrzeplin wewnątrz blaszek miażdżycowych, co z kolei prowadzi do ich destabilizacji<sup>178</sup>. Wówczas wzrasta stężenie cytokin, w tym IL-6, uwalnianej przez makrofagi. Do jej głównych zadań należy regulowanie odpowiedzi immunologicznej poprzez wpływ na aktywację i proliferację limfocytów B. Interleukina ta pobudza także wątrobę do syntezy białek ostrej fazy, takich jak

fibrynogen, CRP czy amyloid A, łącząc tym samym miejscową reakcję zapalną z odpowiedzią systemową. Badania przedstawione w niniejszej pracy również wykazały, że IL-6 jest parametrem różnicującym pacjentów z zaburzeniami miażdżycowymi (tj. z MC lub z MZ) od osób zdrowych. Analiza z uwzględnieniem płci również dowiodła, że osocza zarówno kobiet z MC jak i mężczyzn z MC wykazują znacząco wyższe poziomy IL-6 niż osocza odpowiednio kobiet i mężczyzn z grupy zdrowej. Podobne obserwacje zauważyli badacze innego zespołu, którzy oprócz znacząco podwyższonego poziomu IL-6 u pacjentów z MC w porównaniu do zdrowych ochotników wykazali ponadto, że poziom IL-6 korelował z poziomem zwapnienia tętnic<sup>179</sup>.

Toczący się stan zapalny jest powiązany ze wzmożonym procesem neowaskularyzacji. Choć zjawisko to należy do mechanizmów naprawczych, wywołanych uszkodzeniem ściany naczyń i warunkuje tworzenie krążenia obocznego, to sprzyja rozwojowi miażdżycy. Zauważono, że w blaszkach podatnych na pęknięcie obserwuje się dwukrotne zwiększenie liczby mikronaczyń, natomiast w pękających nawet czterokrotne. W praktyce klinicznej uważa się, że liczba mikronaczyń koreluje z zaawansowaniem choroby. Mikronaczynia powstające w blaszce miażdżycowej charakteryzują się odmienną strukturą rozgałęzień i budową w porównaniu do tych w przydanie. Inwazja vasa vasorum (sieci mikronaczyń usytuowanych w obrębie błon zewnętrznych tętnic i żył, odpowiadających za zaopatrywanie dużych naczyń krwionośnych) ma miejsce głównie w obszarach pęknięć błony środkowej, szczególnie w pobliżu rdzenia nekrotycznego. Te naczynia tworzą liczne rozgałęzienia wokół zewnętrznej powierzchni rdzenia. Większość mikronaczyń w zmianie miażdżycowej pozostaje niedojrzała, charakteryzując się mniejszą średnicą niż naczynia w przydanie oraz głównie składają się z komórek śródbłonna, z niewielką ilością perycytów i VSMCs. Są one podatne na pęknięcie, co może prowadzić do krwawienia do wnętrza blaszki miażdżycowej i tworzenia się mikrozakrzepów. Aktywacja procesów krzepnięcia stymuluje proliferację VSMC oraz pobudza je do produkcji składników tkanki łącznej. W ten sposób, pozornie bezobjawowe krwawienia w mikrokrażeniu mogą prowadzić do nagłego postępu miażdżycy. Proces neowaskularyzacji odgrywa więc kluczową rolę w pękaniu blaszki miażdżycowej. Mikronaczynia charakteryzują się także zwiększoną przepuszczalnością dla elementów morfotycznych, co ułatwia komórkom zapalnym przechodzenie z krwi do naczyń, nasilając infiltrację płytki przez makrofagi, co sprzyja dalszemu rozwojowi angiogenezy. Istnieje więc pozytywne sprzężenie zwrotne: nowo tworzące się naczynia umożliwiają przedostawanie się komórek zapalnych do ściany naczyń, co następnie stymuluje tworzenie naczyń krwionośnych. Wykazano, że liczba mikronaczyń koreluje z liczbą komórek zapalnych obecnych w zmianie miażdżycowej, a nie

z grubością samej blaszki miażdżycowej. Proces angiogenezy w miażdżycy jest złożony, gdyż obejmuje: autolizę macierzy zewnątrzkomórkowej, migrację i proliferację komórek śródbłonna, VSMCs i perycytów, a także tworzenie i dojrzewanie nowych struktur naczyniowych<sup>180</sup>. Głównymi czynnikami stymulującymi angiogenezę są niedotlenienie i lokalne procesy zapalne, które aktywują ekspresję czynników wzrostu np.: czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), płytkowego czynnika wzrostu (PDGF), podstawowego czynnika wzrostu fibroblastów (b-FGF) oraz ich receptorów. VEGF pobudza proliferację EC oraz inicjuje proces angiogenezy, natomiast PDGF i b-FGF odpowiadają za dojrzewanie nowo powstałych struktur naczyniowych. PDGF uważany jest za kluczowy czynnik odpowiedzialny za dojrzewanie nowych naczyń<sup>181</sup>, który reguluje i różnicuje podziały komórkowe, wpływając tym samym na napięcie naczyń krwionośnych. PDGF i inne czynniki wzrostowe stymulują komórki mięśni gładkich błony środkowej do migracji w kierunku górnych warstw błony wewnętrznej, a następnie do podziałów i wytwarzania elementów tkanki łącznej (kolagenu, elastyny i proteoglikanów). W ten sposób powstaje włóknista powłoka, pokrywająca pierwotną zmianę miażdżycową. Formowanie tej tzw. czapeczki łącznotkankowej ma na celu osłonięcie toksycznych elementów zmiany miażdżycowej i uważane jest za objaw korzystnych procesów gojenia. Ponadto PDGF uważany jest (podobnie jak PF-4) za marker czynności PLT. W przedstawionej pracy wykazano, znacząco podwyższony poziom PDGF w grupie pacjentów z MC i MZ w porównaniu do zdrowych ochotników.

### **5.6. Badanie różnic między miażdżycą zarostową i makroangiopatią cukrzycową**

Analiza interakcji zachodzących w badanej grupie pacjentów (MZ i MC) wykazała, że znacznie wyższą szansę na MZ mają osoby z niskim odsetkiem mikroplatek przy jednocześnie niskiej aktywacji PAR-1 (obecnego na płytkach w tym mikroplatekach) za pomocą TRAP. Oznacza to, że aktywacja płytek krwi (przy wysokim stężeniu mikroplatek) trombiną obserwowana jest częściej u chorych z MC. Ta sama analiza (Rycina 4.13.C-D), w której wnioskowaniem objęto populację, z której pochodziła badana grupa pacjentów wykazała, że nie tyle sama liczba mikroplatek, a jej związek z aktywacją PAR-1 przez TRAP wpływa na szansę na MZ. U osób z pośrednimi wartościami PAR-TRAP (20 – 26%) nawet przy wysokim odsetku mikroplatek obserwuje się zwiększoną (ok. 2-krotnie) szansę na MZ. Najmniejsze szanse na MZ obserwuje się u dla PAR-1 + TRAP > 26% i odsetku mikroplatek < 15%.

## 6. WNIOSKI

1. Wykazano istotnie niższe wartości BMI, stężenia glukozy i stężenia mocznika oraz istotnie niższe wartości współczynnika dystansu chromania w grupie pacjentów z miażdżycą zarostową w porównaniu do grupy pacjentów z makroangiopatią cukrzycową.
2. PLT osób z makroangiopatią cukrzycową wykazały wyższą predyspozycję do inicjacji i rozwoju zaburzeń miażdżycowych przebiegających z aktywacją PAR-1 niż PLT osób z miażdżycą zarostową, przy czym ekspresja PAR-1 na aktywowanych PLT mężczyzn z miażdżycą zarostową zachodziła znacząco intensywniej niż na aktywowanych PLT kobiet z miażdżycą zarostową.
3. Wykazano, że w grupie z makroangiopatią cukrzycową znacząco częściej występowały mutacje w genu PAR-1 (-506 **D/D**; IVS-14 **A/A**) sprzyjające aktywacji i agregacji PLT, natomiast w grupie z miażdżycą zarostową mimo częstego występowania homozygoty IVS-14 **A/A**, ekspresja PAR-1 była niższa być może dlatego, że w grupie tej częściej występowała heterozygota -506 **I/D**. Wskazuje to na protekcyjne właściwości allelu I.
4. Aktywowanie mikroplatek za pomocą TRAP okazało się użyteczną metodą w różnicowaniu grupy pacjentów z miażdżycą zarostową od grupy pacjentów z makroangiopatią cukrzycową. Obserwację tę należy jednak potwierdzić poprzez przeprowadzenie badań na znacznie większej grupie pacjentów.
5. Wykazano istotnie niższe stężenia vWF w grupie pacjentów z miażdżycą zarostową w porównaniu do grupy pacjentów z makroangiopatią cukrzycową, co w konsekwencji przyczynia się do wolniejszego przebiegu procesów miażdżycogennych i zapalnych – niższy poziom vWF zmniejsza zarówno adhezję PLT do śródbłonka oraz liczbę cząsteczek czynnika VIII (białka ostrej fazy) przenoszonego przez vWF.
6. Analiza interakcji wykazała, że choć odsetek mikroplatek 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. STRESZCZENIE

### 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 mikroplątkach 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

### Materiał:

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 śródbłonna 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.



## 8. 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 ( $25.31 \pm 10.18$  vs.  $18.63 \pm 12.98$  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 ( $15.56 \pm 13.82$  vs.  $23.25 \pm 15.95\%$ ;  $p=0.045$ ) and a significant increase in both non-activated ( $19.21 \pm 14.33$ , vs.  $9.59 \pm 5.80\%$ ;  $p=0.007$ ) and activated PMP ( $23.25 \pm 15.95$  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 ( $153.45 \pm 28.12$  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.

---

## 9. LITERATURA

1. Davies, M. G. Critical limb ischemia: epidemiology. *Methodist Debaquey Cardiovasc J* **8**, 10–14 (2012).
2. Fowkes, F. G. R. *et al.* Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet* **382**, 1329–1340 (2013).
3. Criqui, M. H. & Aboyans, V. Epidemiology of peripheral artery disease. *Circ Res* **116**, 1509–1526 (2015).
4. Pasiński Tomasz & Gaciąg Zbigniew. Rozwój i regresja miażdżycy. in *Angiologia* (Warszawa, 2004).
5. Stanowisko polskich ekspertów dotyczące leczenia zachowawczego u pacjentów z chorobą tętnic kończyn dolnych. *Via Medica* **25**, 77–114 (2019).
6. Algorytmy i wytyczne postępowania terapeutycznego w ramach trudno gojących się ran. *Forum Leczenia Ran* **3**, 95–116 (2020).
7. Dobrzyńska M. Historia badań nad miażdżycą oraz rola diety w patogenezie. *Acta Medicorum Polonorum* **6**, 35–40 (2016).
8. American Diabetes Association, ADA. Cardiovascular disease and risk management: standards of medical care in Diabetes -2018. *Diabetes Care* **41**, 86–104 (2018).
9. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u osób z cukrzycą 2023. *Curr Top Diabetes* **3**, 1–140 (2023).
10. Sun, H. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* **183**, (2022).
11. Barua, R. S. *et al.* Dysfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in healthy smokers with impaired endothelium-dependent vasodilatation. *Circulation* **104**, 1905–1910 (2001).
12. Visseren, F. *et al.* 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *European Heart Journal* vol. 42 3227–3337 Preprint at <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab484> (2021).
13. Rosenson, R. S. *et al.* Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* **13**, 48–60 (2016).
14. Lim, S. S. *et al.* A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380**, 2224–2260 (2012).

15. Lonn, E. M. *et al.* Blood-Pressure Lowering in Intermediate-Risk Persons without Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* **374**, 2009–2020 (2016).
16. Fetterman, J. L. *et al.* Mitochondrial DNA damage and vascular function in patients with diabetes mellitus and atherosclerotic cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol* **15**, (2016).
17. Modrzejewski W & Musiał W. Stare i nowe czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego - jak zahamować epidemię miażdżycy? Część I. Klasyczne czynniki ryzyka. *Forum Zaburzeń Metabolicznych* 106–114 (2010).
18. Goncalves, A. *et al.* Alcohol consumption and risk of heart failure: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Eur Heart J* **36**, 939–945 (2015).
19. Fairweather, D. Sex differences in inflammation during atherosclerosis. *Clin Med Insights Cardiol* **8**, 49–59 (2015).
20. Barylski M. Hipercholesterolemia rodzinna, wielogenowa, wtórna- definicje, zasady postępowania. *Chor Serca i Naczyń* 337–349 (2012).
21. Wang J, Wei B & Cao S. Identification by microarray technology of key genes involved in the progression of carotid atherosclerotic plaque. *Genes Genet Syst* 253–258 (2014).
22. Rognoni A, Cavallino Ch. & Veia A. Pathophysiology of Atherosclerotic Plaque Development. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* **13**, 10–13 (2015).
23. Jebari-Benslaiman, S. *et al.* Pathophysiology of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* **23**, (2022).
24. Ross R. Mechanisms of disease: Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N.Engl.J.Med.* **340**, 115–126 (1999).
25. Conte, M. S. *et al.* Global vascular guidelines on the management of chronic limb-threatening ischemia. *J Vasc Surg* **69**, 3S-125S.e40 (2019).
26. Libby, P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature* **592**, 524–533 (2021).
27. Katakami, N. Mechanism of development of atherosclerosis and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* vol. 25 27–39 Preprint at <https://doi.org/10.5551/jat.RV17014> (2018).
28. Xiaoxu, J. Y. *et al.* A Narrative Review of Diabetic Macroangiopathy: From Molecular Mechanism to Therapeutic Approaches. *Diabetes Therapy* **15**,.
29. Wang, H. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Estimation of Global and Regional Gestational Diabetes Mellitus Prevalence for 2021 by International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group's Criteria. *Diabetes Res Clin Pract* **183**, (2022).
30. Kowal-Gierczak B. *Podstawy Angiologii. Polskie Towarzystwo Angiologiczne.* . (1994).

31. De Kleijn, M. J. J. *et al.* Endogenous estrogen exposure and cardiovascular mortality risk in postmenopausal women. *Am J Epidemiol* **155**, 339–345 (2002).
32. Williams, B. *et al.* 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal* vol. 39 3021–3104 Preprint at <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy339> (2018).
33. An, Y. *et al.* The role of oxidative stress in diabetes mellitus-induced vascular endothelial dysfunction. *Cardiovasc Diabetol* **22**, (2023).
34. Sarkar, R., Meinberg, E. G., Stanley, J. C., Gordon, R. D. & Webb, R. C. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **78**, 225–230 (1996).
35. Jeremy, J. Y., Rowe, D., Emsley, A. M. & Newby, A. C. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* **43**, 580–594 (1999).
36. Boyko, E. J. *et al.* Risk of Foot Ulcer and Lower-Extremity Amputation Among Participants in the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study. *Diabetes Care* **45**, 357–364 (2022).
37. Wytyczne Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego dotyczące cukrzycy i stanu przedcukrzycowego współistniejących z chorobami sercowo-naczyniowymi opracowane we współpracy z Europejskim Towarzystwem Badań nad Cukrzycą. *Polskie Towarzystwo Kardiologiczne* (2019).
38. Windyga J & Undas A. *Zakrzepy i Zatory*. (Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2014).
39. Zawilska K, Hus I, Domaszyńska A & Robak T. Fizjologia hemostazy. in *Podstawy Hematologii*.
40. Mann, K. G., Brummel-Ziedins, K., Orfeo, T. & Butenas, S. Models of blood coagulation. *Blood Cells Mol Dis* **36**, 108–117 (2006).
41. Zapata, J. C., Cox, D. & Salvato, M. S. The role of platelets in the pathogenesis of viral hemorrhagic fevers. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, (2014).
42. George JN. Platelets. *Lancet* **355**, 1531–1539 (2000).
43. Creager Mark, D. V. J. , L. J. *Choroby Naczyń. Podręcznik Towarzyszący Do Braunwald's Heart Disease*. (Wydawnictwo Czelej, Lublin, 2008).
44. Shibata, N., Okamoto, K. & Tatsumi, N. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* **359**, 211–229 (2008).
45. Michiels, C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* **196**, 430–443 (2003).

46. Ismaeel, A. *et al.* The nitric oxide system in peripheral artery disease: Connection with oxidative stress and biopterins. *Antioxidants* **9**, 1–16 (2020).
47. Gawaz, M., Langer, H. & May, A. E. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* **115**, 3378–3384 (2005).
48. Finn, A. V., Nakano, M., Narula, J., Kolodgie, F. D. & Virmani, R. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 1282–1292 (2010).
49. Ferrari, R. & Fox, K. Insight into the mode of action of ACE inhibition in coronary artery disease: the ultimate ‘EUROPA’ story. *Drugs* **69**, 265–277 (2009).
50. Barteneva, N. S. *et al.* Circulating microparticles: square the circle. *BMC Cell Biol* **14**, (2013).
51. Piccin, A., Murphy, W. G. & Smith, O. P. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* **21**, 157–171 (2007).
52. Morel, O. *et al.* Sustained elevated amounts of circulating procoagulant membrane microparticles and soluble GPV after acute myocardial infarction in diabetes mellitus. *Thromb Haemost* **91**, 345–353 (2004).
53. Siljander, P. R. M. Platelet-derived microparticles - an updated perspective. *Thromb Res* **127 Suppl 2**, (2011).
54. Owens, A. P. & MacKman, N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res* **108**, 1284–1297 (2011).
55. Maślanka K. Physiopathological activity of cell membrane microparticles. *Journal of Transfusion Medicine* **3**, 9–17 (2010).
56. Morel, O., Morel, N., Freyssinet, J. M. & Toti, F. Platelet microparticles and vascular cells interactions: a checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses. *Platelets* **19**, 9–23 (2008).
57. Konkolewska, M., Kurc, S. & Stępień, E. *A Thousand Words about Microparticles in Cardiology. Journal of Medical Science* vol. 2.
58. Berckmans, R. J. *et al.* Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. *Arthritis Rheum* **46**, 2857–2866 (2002).
59. Łopaciuk S. Fizjologia hemostazy . in *Podstawy hematologii* 95–113 (Wydawnictwo CZELEJ, Lublin, 2003).
60. Jy, W. *et al.* Endothelial microparticles induce formation of platelet aggregates via a von Willebrand factor/ristocetin dependent pathway, rendering them resistant to dissociation. *J Thromb Haemost* **3**, 1301–1308 (2005).

61. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2043766/>.
62. Barry, O. P., Praticò, D., Savani, R. C. & FitzGerald, G. A. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* **102**, 136–144 (1998).
63. Sabatier, F. *et al.* Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood* **99**, 3962–3970 (2002).
64. Mesri, M. & Altieri, D. C. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem* **274**, 23111–23118 (1999).
65. Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. G. & Schiöth, H. B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**, 1256–1272 (2003).
66. Rasmussen, U. B. *et al.* cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca<sup>2+</sup> mobilization. *FEBS Lett* **288**, 123–128 (1991).
67. Vu, T. K. H., Hung, D. T., Wheaton, V. I. & Coughlin, S. R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64**, 1057–1068 (1991).
68. Austin, K. M., Covic, L. & Kuliopulos, A. Matrix metalloproteases and PAR-1 activation. *Blood* **121**, 431–439 (2013).
69. Malito, E. *et al.* Defining a protective epitope on factor H binding protein, a key meningococcal virulence factor and vaccine antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 3304–3309 (2013).
70. Aisiku, O. *et al.* Parmodulins inhibit thrombus formation without inducing endothelial injury caused by vorapaxar. *Blood* **125**, 1976–1985 (2015).
71. Aisiku, O. *et al.* Parmodulins inhibit thrombus formation without inducing endothelial injury caused by vorapaxar. *Blood* **125**, 1976–1985 (2015).
72. Structure-function relationships in the activation of platelet thrombin receptors by receptor-derived peptides - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1313429/>.
73. Polpili, E. , F. C. , F. F. *et al.* Role of the protease-activated receptor 1 in regulating the function of glial cells within central and peripheral nervous system. *J Neural Transm* 1259–1271 (2019).
74. Ossovskaya, V. S. & Bunnett, N. W. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* **84**, 579–621 (2004).

75. Han, X. & Nieman, M. T. The domino effect triggered by the tethered ligand of the protease activated receptors. *Thromb Res* **196**, 87–98 (2020).
76. Trejo, J. Protease-activated receptors: new concepts in regulation of G protein-coupled receptor signaling and trafficking. *J Pharmacol Exp Ther* **307**, 437–442 (2003).
77. Hakanishi-Matsui, M. *et al.* PAR-3 is a cofactor for PAR-4 activation by thrombin. *Nature* **404**, 609–613 (2000).
78. Kawabata, A. & Kuroda, R. Protease-activated receptor (PAR), a novel family of G protein-coupled seven trans-membrane domain receptors: activation mechanisms and physiological roles. *Jpn J Pharmacol* **82**, 171–174 (2000).
79. Ludeman, M. J. *et al.* PAR-1 cleavage and signaling in response to activated protein C and thrombin. *J Biol Chem* **280**, 13122–13128 (2005).
80. Malaquin, N. *et al.* Senescent fibroblasts enhance early skin carcinogenic events via a paracrine MMP-PAR-1 axis. *PLoS One* **8**, (2013).
81. Riewald, M., Petrovan, R. J., Donner, A., Mueller, B. M. & Ruf, W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* **296**, 1880–1882 (2002).
82. Russo, A., Soh, U. J. K., Paing, M. M., Arora, P. & Trejo, J. A. Caveolae are required for protease-selective signaling by protease-activated receptor-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6393–6397 (2009).
83. Ramachandran, R., Noorbakhsh, F., Defea, K. & Hollenberg, M. D. Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 69–86 (2012).
84. Martin, C. B. *et al.* The thrombin receptor, PAR-1, causes transformation by activation of Rho-mediated signaling pathways. *Oncogene* **20**, 1953–1963 (2001).
85. Proteinase-activated receptors - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11356985/>.
86. Bourquard, T. *et al.* Unraveling the molecular architecture of a G protein-coupled receptor/ $\beta$ -arrestin/Erk module complex. *Sci Rep* **5**, (2015).
87. Zhang, J., Ferguson, S. S. G., Barak, L. S., Ménard, L. & Caron, M. G. Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* **271**, 18302–18305 (1996).
88. Dugina, T. N., Kiseleva, E. V., Chistov, I. V., Umarova, B. A. & Strukova, S. M. Receptors of the PAR family as a link between blood coagulation and inflammation. *Biochemistry (Mosc)* **67**, 65–74 (2002).
89. Fuster, V., Moreno, P. R., Fayad, Z. A., Corti, R. & Badimon, J. J. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol* **46**, 937–954 (2005).



90. Libby, P., Ridker, P. M. & Maseri, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* **105**, 1135–1143 (2002).
91. Gimbrone, M. A. & García-Cardeña, G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* **118**, 620–636 (2016).
92. Strukova, S. M. Thrombin as a regulator of inflammation and reparative processes in tissues. *Biochemistry (Mosc)* **66**, 8–18 (2001).
93. Esmon, C. T. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas* **47**, 305–314 (2004).
94. Coughlin, S. R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* **3**, 1800–1814 (2005).
95. Chambers, R. C., Leoni, P., Blanc-Brude, O. P., Wembridge, D. E. & Laurent, G. J. Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *J Biol Chem* **275**, 35584–35591 (2000).
96. Weber, D. S. & Griendling, K. K. Thrombin: Beyond coagulation. *J Mol Cell Cardiol* **36**, 13–15 (2004).
97. Patterson, C., Stouffer, G. A., Madamanchi, N. & Runge, M. S. New tricks for old dogs: nonthrombotic effects of thrombin in vessel wall biology. *Circ Res* **88**, 987–997 (2001).
98. Brass, L. F. Thrombin and platelet activation. *Chest* **124**, 18S–25S (2003).
99. Lapetina, E. G. The signal transduction induced by thrombin in human platelets. *FEBS Lett* **268**, 400–404 (1990).
100. Offermanns, S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* **99**, 1293–1304 (2006).
101. De Cristofaro, R. & De Candia, E. Thrombin domains: structure, function and interaction with platelet receptors. *J Thromb Thrombolysis* **15**, 151–163 (2003).
102. Hirano, K. The roles of proteinase-activated receptors in the vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 27–36 (2007).
103. Licari, L. G. & Kovacic, J. P. Thrombin physiology and pathophysiology. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* **19**, 11–22 (2009).
104. Xie, W. Z. *et al.* Activation of the coagulation system in cancerogenesis and metastasation. *Biomed Pharmacother* **59**, 70–75 (2005).
105. Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Andriopoulou, P. & Maragoudakis, M. E. M. Effects of thrombin/thrombosis in angiogenesis and tumour progression. *Matrix Biology* **19**, 345–351 (2000).

106. Luo, W., Wang, Y. & Reiser, G. Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. *Brain Res Rev* **56**, 331–345 (2007).
107. Xi, G., Reiser, G. & Keep, R. F. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? *J Neurochem* **84**, 3–9 (2003).
108. Suo, Z., Citron, B. A. & Festoff, B. W. Thrombin: a potential proinflammatory mediator in neurotrauma and neurodegenerative disorders. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **3**, 105–114 (2004).
109. Epstein R J. *Biologia Molekularna Człowieka* . (Lublin, 2005).
110. Chromosomal assignment of the human thrombin receptor gene: localization to region q13 of chromosome 5 - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8395910/>.
111. Kahn, M. L., Hammes, S. R., Botka, C. & Coughlin, S. R. Gene and locus structure and chromosomal localization of the protease-activated receptor gene family. *J Biol Chem* **273**, 23290–23296 (1998).
112. De Backer, M. D., Loonen, I., Verhasselt, P., Neefs, J. M. & Luyten, W. H. M. L. Structure of the human histamine H1 receptor gene. *Biochem J* **335** ( Pt 3), 663–670 (1998).
113. Wu, Y., Ruef, J., Rao, G. N., Patterson, C. & Runge, M. S. Differential transcriptional regulation of the human thrombin receptor gene by the Sp family of transcription factors in human endothelial cells. *Biochem J* **330** ( Pt 3), 1469–1474 (1998).
114. Arnaud, E. *et al.* Protective effect of a thrombin receptor (protease-activated receptor 1) gene polymorphism toward venous thromboembolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 585–592 (2000).
115. Dupont, A. *et al.* An intronic polymorphism in the PAR-1 gene is associated with platelet receptor density and the response to SFLLRN. *Blood* **101**, 1833–1840 (2003).
116. Iso, Y. *et al.* Impact of implanted bone marrow progenitor cell composition on limb salvage after cell implantation in patients with critical limb ischemia. *Atherosclerosis* **209**, 167–172 (2010).
117. Ye, J. *et al.* Diabetes Mellitus Promotes the Development of Atherosclerosis: The Role of NLRP3. doi:10.3389/fimmu.2022.900254.
118. Thiruvoipati, T., Kielhorn, C. E. & Armstrong, E. J. (No Title). (2015) doi:10.4239/wjd.v6.i7.961.
119. Henning, R. J. *Obesity and Obesity-Induced Inflammatory Disease Contribute to Atherosclerosis: A Review of the Pathophysiology and Treatment of Obesity*. *Am J Cardiovasc Dis* vol. 11 [www.AJCD.us/ISSN:2160-200X/AJCD0135880](http://www.AJCD.us/ISSN:2160-200X/AJCD0135880) (2021).

120. Can, M. *et al.* Evaluation of subclinical atherosclerosis in obese patients with three noninvasive methods: Arterial stiffness, carotid intima-media thickness, and biomarkers of endothelial dysfunction. *Arch Endocrinol Metab* **67**, 622 (2023).
121. Rivellese, F. *et al.* Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Diabetes. Front. Physiol* **10**, 1607 (2020).
122. Borderie, G. *et al.* Albuminuric diabetic kidney disease predicts foot ulcers in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* **37**, 108403 (2023).
123. Xiaoxu, J. Y. *et al.* A Narrative Review of Diabetic Macroangiopathy: From Molecular Mechanism to Therapeutic Approaches. doi:10.1007/s13300-024-01532-7.
124. Zhao, X. *et al.* The crucial role and mechanism of insulin resistance in metabolic disease. (2023) doi:10.3389/fendo.2023.1149239.
125. Poznyak, A. V, Litvinova, L., Poggio, P., Sukhorukov, V. N. & Orekhov, A. N. Effect of Glucose Levels on Cardiovascular Risk. (2022) doi:10.3390/cells11193034.
126. Prommer, H.-U. *et al.* Chronic kidney disease induces a systemic microangiopathy, tissue hypoxia and dysfunctional angiogenesis. doi:10.1038/s41598-018-23663-1.
127. Wei Ling Lau, N. D. V. Urea, a true uremic toxin: the empire strikes back. *Clin Sci (Lond)*.
128. Casula, M., Colpani, O., Xie, S., Catapano, A. L. & Baragetti, A. cells. (2021) doi:10.3390/cells10081869.
129. Kenneth R Feingold. Dislipidemia in Patients with Diabetes. *Endotext*.
130. Qiu, Y. & Cn, Y. Z. Open Access Lipids in Health and Disease. doi:10.1186/s12944-024-02160-7.
131. Saima Zeb, B. B. S. B. M. A. S. Correlation of uric acid with micralbuminuria in Type-2 diabetic patients with normal creatinine. *Pak J Med Sci* 951–955 (2024).
132. Borissoff, J. I. *et al.* Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state. *Circulation* **122**, 821–830 (2010).
133. Hagag, A. A., Nosair, N. A., Ghaith, F. M. & Elshenawy, E. H. Prognostic value of protease activated receptor-1 in children with acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* **6**, (2014).
134. Jakobsche-Policht, U., Bednarska-Chabowska, D., Sadakierska-Chudy, A. & Adamiec-Mroczek, J. Expression of the PAR-1 protein on the surface of platelets in patients with chronic peripheral arterial insufficiency - preliminary report. *Adv Clin Exp Med* **23**, 159–167 (2014).

135. Liu, X., Yu, J., Song, S., Yue, X. & Li, Q. Protease-activated receptor-1 (PAR-1): a promising molecular target for cancer. *Oncotarget* **8**, 107334–107345 (2017).
136. Cook, J. J. *et al.* An antibody against the exosite of the cloned thrombin receptor inhibits experimental arterial thrombosis in the African green monkey. *Circulation* **91**, 2961–2971 (1995).
137. Hung, D. T., Vu, T. K. H., Wheaton, V. I., Ishii, K. & Coughlin, S. R. Cloned platelet thrombin receptor is necessary for thrombin-induced platelet activation. *J Clin Invest* **89**, 1350–1353 (1992).
138. Chackalamannil, S. *et al.* Discovery of a novel, orally active himbacine-based thrombin receptor antagonist (SCH 530348) with potent antiplatelet activity. *J Med Chem* **51**, 3061–3064 (2008).
139. French, S. L., Arthur, J. F., Tran, H. A. & Hamilton, J. R. Approval of the first protease-activated receptor antagonist: Rationale, development, significance, and considerations of a novel anti-platelet agent. *Blood Rev* **29**, 179–189 (2015).
140. Frampton, J. E. Vorapaxar: a review of its use in the long-term secondary prevention of atherothrombotic events. *Drugs* **75**, 797–808 (2015).
141. Covic, L., Gresser, A. L., Talavera, J., Swift, S. & Kuliopulos, A. Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 643–648 (2002).
142. Covic, L., Misra, M., Badar, J., Singh, C. & Kuliopulos, A. Pepducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation. *Nat Med* **8**, 1161–1165 (2002).
143. Rana, R. *et al.* Noncanonical Matrix Metalloprotease 1-Protease-Activated Receptor 1 Signaling Drives Progression of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **38**, 1368–1380 (2018).
144. Jennings, L. K. Role of Platelets in Atherothrombosis. *Am J Cardiol* **103**, 4A-10A (2009).
145. Hamilton, J. R. & Trejo, J. Challenges and Opportunities in Protease-Activated Receptor Drug Development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **57**, 349–373 (2017).
146. Dupont, A. *et al.* An intronic polymorphism in the PAR-1 gene is associated with platelet receptor density and the response to SFLLRN. *Blood* **101**, 1833–1840 (2003).
147. Cadroy, Y. *et al.* Brief Report Role of 4 Platelet Membrane Glycoprotein Polymorphisms on Experimental Arterial Thrombus Formation in Men. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/98/10/3159/1678644/h8220103159.pdf> (2001).

148. Afife Karabiyik, A. E. N. A. Protease activated receptor 1 gene -506 I/D polymorphism in cancer patients with and without venous thrombosis. *European Journal of Haematology* **546–547** (2011).
149. Eroğlu, A., Karabiyik, A. & Akar, N. The association of protease activated receptor 1 gene -506 I/D polymorphism with disease-free survival in breast cancer patients. *Ann Surg Oncol* **19**, 1365–1369 (2012).
150. Zhang, J. H. *et al.* Effect of platelet receptor gene polymorphisms on outcomes in ST-elevation myocardial infarction patients after percutaneous coronary intervention. *Platelets* **27**, 75–79 (2016).
151. Friedman, E. A. *et al.* Evaluation of the F2R IVS-14A/T PAR-1 polymorphism with subsequent cardiovascular events and bleeding in patients who have undergone percutaneous coronary intervention. *J Thromb Thrombolysis* **41**, 656–662 (2016).
152. Smith, S. M. G. *et al.* PAR-1 genotype influences platelet aggregation and procoagulant responses in patients with coronary artery disease prior to and during clopidogrel therapy. *Platelets* **16**, 340–345 (2005).
153. Mezentsev, A. *et al.* Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, (2005).
154. Kailashiya, J. Platelet-derived microparticles analysis: Techniques, challenges and recommendations. *Anal Biochem* **546**, 78–85 (2018).
155. Maślanka K, Michur H & Smoleńska-Sym G. Cell membrane microparticles. *Acta Haematol. Pol.* **40**, 481–491 (2009).
156. Tan, K. T., Tayebjee, M. H., Macfadyen, R. J., Lip, G. Y. H. & Blann, A. D. Elevated platelet microparticles in stable coronary artery disease are unrelated to disease severity or to indices of inflammation. *Platelets* **16**, 368–371 (2005).
157. Werner, N., Wassmann, S., Ahlers, P., Kosiol, S. & Nickenig, G. Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 112–116 (2006).
158. Burnouf, T., Goubran, H. A., Chou, M. L., Devos, D. & Radosevic, M. Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. *Blood Rev* **28**, 155–166 (2014).
159. Touat, Z. *et al.* Renewal of mural thrombus releases plasma markers and is involved in aortic abdominal aneurysm evolution. *Am J Pathol* **168**, 1022–1030 (2006).
160. Van Der Zee, P. M. *et al.* P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. *Clin Chem* **52**, 657–664 (2006).

161. Tan, K. T., Tayebjee, M. H., Lynd, C., Blann, A. D. & Lip, G. Y. H. Platelet microparticles and soluble P selectin in peripheral artery disease: relationship to extent of disease and platelet activation markers. *Ann Med* **37**, 61–66 (2005).
162. Omoto, S. *et al.* Detection of monocyte-derived microparticles in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* **45**, 550–555 (2002).
163. Sabatier, F. *et al.* Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* **51**, 2840–2845 (2002).
164. Mahmoodian, R., Salimian, M., Hamidpour, M., Khadem-Maboudi, A. A. & Gharehbaghian, A. The effect of mild agonist stimulation on the platelet reactivity in patients with type 2 diabetes mellitus. *BMC Endocr Disord* **19**, (2019).
165. Sachs, L. *et al.* Ex vivo anticoagulants affect human blood platelet biomechanics with implications for high-throughput functional mechanophenotyping. doi:10.1038/s42003-021-02982-6.
166. Borensztajn, K., Peppelenbosch, M. P. & Spek, C. A. Coagulation factor Xa signaling: the link between coagulation and inflammatory bowel disease? *Trends Pharmacol Sci* **30**, 8–16 (2009).
167. Monroe, D. M. & Key, N. S. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *J Thromb Haemost* **5**, 1097–1105 (2007).
168. Borissoff, J. I., Spronk, H. M. H. & ten Cate, H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med* **364**, 1746–1760 (2011).
169. Song, P. *et al.* Effect of plasma thrombin-antithrombin complex on ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev* **12**, 17 (2023).
170. Gosk-Bierska, I., Wasilewska, M. & Wysokiński, W. Role of platelets in thromboembolism in patients with atrial fibrillation. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* **25**, 163–171 (2016).
171. Fiodorenko-Dumas, Z. *et al.* Receptor GP IIb/IIIa as an Indicator of Risk in Vascular Events. doi:10.1177/1076029619845056.
172. I.Gosk-Bierska, R. adamic, P. A. W. E. W. Coagulation in diabetic and non-diabetic claudicants. *Int Angiol* 128–133 (2002).
173. Libby, P. & Theroux, P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* **111**, 3481–3488 (2005).
174. Li, C. ling *et al.* Allicin alleviates inflammation of diabetic macroangiopathy via the Nrf2 and NF-kB pathway. *Eur J Pharmacol* **876**, 173052 (2020).
175. Yuya Desaki, Y. K. R. M. Y. S. FCalfa Receptor Type I and Its Association with Atherosclerosis Development. *Juntendo Medical Journal* (2023).

176. Borissoff, J. I. *et al.* Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state. *Circulation* **122**, 821–830 (2010).
177. Bini, A., Fenoglio, J. J., Mesa-Tejada, R., Kudryk, B. & Kaplan, K. L. Identification and distribution of fibrinogen, fibrin, and fibrin(ogen) degradation products in atherosclerosis. Use of monoclonal antibodies. *Arteriosclerosis* **9**, 109–121 (1989).
178. Kramer, M. C. A. *et al.* Relationship of thrombus healing to underlying plaque morphology in sudden coronary death. *J Am Coll Cardiol* **55**, 122–132 (2010).
179. Saremi, A. *et al.* Association Between IL-6 and the extent of Coronary Atherosclerosis in The Veterans Affairs Diabetes Trial (VADT). doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.07.031.
180. Jaipersad, A. S., Lip, G. Y. H., Silverman, S. & Shantsila, E. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* **63**, 1–11 (2014).
181. Boyle, E. C., Sedding, D. G. & Haverich, A. Targeting vasa vasorum dysfunction to prevent atherosclerosis. *Vascul Pharmacol* **96–98**, 5–10 (2017).
182. Mitra, R. *et al.* Glycocalyx in Atherosclerosis-Relevant Endothelium Function and as a Therapeutic Target. *Curr Atheroscler Rep* **19**, (2017).
183. Haelst P, Zijlstra & May J. *Mechanisms and Correlates of Inflammation in Atherosclerosis*. (Groningen, 2003).
184. Madamanchi, N. R., Vendrov, A. & Runge, M. S. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 29–38 (2005).
185. Valledor A, Lloberas J & Celada A. Macrophage Foam Cells. *eLS. John Wiley & Sons* (2015).
186. Biegelsen ES & Loscalzo J. Endothelial function and atherosclerosis. *Coron. Artery Dis.* **10**, 241–256 (1999).
187. Fishman, A. P. Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. *Ann N Y Acad Sci* **401**, 1–8 (1982).
188. Wasilewski J, Kiljański T, Mirota K & Głowacki J. Znaczenie naprężeń ścinających i rola numerycznej mechaniki płynów w badaniach nad patomechanizmem miażdżycy. *Folia Cardiologica Excerpta* 95–100 (2012).
189. Landmesser, U., Hornig, B. & Drexler, H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* **109**, (2004).
190. Kompleksowa opieka nad pacjentem z chorobą naczyń obwodowych tętnic i żył - rekomendacje zespołu ekspertów. *Acta Angiol* **29**, 1–60 (2023).

191. Fard, A. *et al.* Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 2039–2044 (2000).
192. Milusev, A., Rieben, R. & Sorvillo, N. The Endothelial Glycocalyx: A Possible Therapeutic Target in Cardiovascular Disorders. *Front Cardiovasc Med* **9**, (2022).
193. Foote, C. A. *et al.* Endothelial Glycocalyx. *Compr Physiol* **12**, 3781 (2022).
194. Mordarski S. The role of nitric oxide in neurotransmission. *Medycyna Rodzinna* 13–15 (2004).
195. Tomczyk M, Nowak W & Jaźwa A. Śródbłonek w fizjologii i patogenezie chorób. *Postepy Biochem* **59**, 357–364 (2013).
196. Hack, C. E., Zeerleder, S., Dhainaut, J. F., Taylor, F. & Reinhart, K. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med* **29**, (2001).
197. Davignon, J. & Ganz, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* **109**, (2004).
198. Wu, G., Meininger, C. J., Knabe, D. A., Bazer, F. W. & Rhoads, J. M. Arginine nutrition in development, health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **3**, 59–66 (2000).
199. Gerrity R G. *Arterial Endothelial Structure and Permeability as It Relates to Susceptibility to Atherogenesis*. (New York, 1990).
200. Olofsson, S. O. & Boren, J. Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J Intern Med* **258**, 395–410 (2005).
201. Parthasarathy, S., Raghavamenon, A., Garelnabi, M. O. & Santanam, N. Oxidized low-density lipoprotein. *Methods Mol Biol* **610**, 403–417 (2010).
202. Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Myasoedova, V. A., Grechko, A. V. & Orekhov, A. N. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)* **95**, 1153–1165 (2017).
203. Yu, X. H., Fu, Y. C., Zhang, D. W., Yin, K. & Tang, C. K. Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* **424**, 245–252 (2013).
204. Stary, H. C. *et al.* A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 1512–1531 (1995).
205. Seimon, T. & Tabas, I. Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *J Lipid Res* **50 Suppl**, (2009).



- 
206. Clarke, M. C. H. *et al.* Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circ Res* **102**, 1529–1538 (2008).
207. Pamukcu, B., Lip, G. Y. H., Snezhitskiy, V. & Shantsila, E. The CD40-CD40L system in cardiovascular disease. *Ann Med* **43**, 331–340 (2011).
208. Allahverdian, S., Chaabane, C., Boukais, K., Francis, G. A. & Bochaton-Piallat, M. L. Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* **114**, 540–550 (2018).
209. Geng Y & Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma: colocalization with interleukin -1b converting enzyme. *Am J Path* **147**, 251–266 (1995).
210. Duan, H. *et al.* Suppression of apoptosis in vascular endothelial cell, the promising way for natural medicines to treat atherosclerosis. *Pharmacol Res* **168**, (2021).
211. Skórkowska-Telichowska, K., Adamiec, R., Tuchendler, D. & Gąsiorowski, K. Susceptibility to apoptosis of lymphocytes from patients with peripheral arterial disease. *Clin Invest Med* **32**, (2009).
212. Endostatin derivative angiogenesis inhibitors - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19781376/>.
213. Konishi, T. *et al.* Pathological Quantification of Carotid Artery Plaque Instability in Patients Undergoing Carotid Endarterectomy. *Circ J* **82**, 258–266 (2017).
214. Frygier A, Radomski M, Kochman W & Sukiennik A. Definicja i możliwości przyżyciowej identyfikacji niestabilnej blaszki miażdżycowej. *Folia Cardiologica Excerpta* **4**, 260–264 (2009).
215. Mauriello, A. *et al.* Asymptomatic carotid plaque rupture with unexpected thrombosis over a non-canonical vulnerable lesion. *Atherosclerosis* **218**, 356–362 (2011).
216. Van Dijk, A. C. *et al.* Intraplaque Hemorrhage and the Plaque Surface in Carotid Atherosclerosis: The Plaque At RISK Study (PARISK). *AJNR Am J Neuroradiol* **36**, 2127–2133 (2015).
217. Ostadal, P., Cepkova, M. & Alan, D. Atherosclerosis and inflammation mononuclear cell recruitment and adhesion molecules with reference to the implication of ICAM-1/LFA-1 pathway in atherogenesis. *Int J Cardiol* **66 Suppl 1**, 87–89 (1998).
218. Seners, P. *et al.* Relationships between brain perfusion and early recanalization after intravenous thrombolysis for acute stroke with large vessel occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **40**, 667–677 (2020).
219. AP, L. & PR, M. Intraplaque hemorrhage. *Curr Mol Med* **6**, 479–488 (2006).

- 
220. Sikora J & Kostka B. Blood platelets as pharmacological model. *Post Biol Kom* **232**, 561–570 (2005).
221. Hoffman, M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev* **17**, (2003).
222. Undas A. Hemostaza, krwawienia i leczenie krwią. in *Podstawy chirurgii. Medycyna Praktyczna* 175–180 (Kraków, 2009).
223. Borissoff, J. I., Spronk, H. M. H., Heeneman, S. & Ten Cate, H. Is thrombin a key player in the ‘coagulation-atherogenesis’ maze? *Cardiovasc Res* **82**, 392–403 (2009).
224. Hemostatic risk factors for atherothrombotic disease: an epidemiologic view - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11487026/>.
225. De Moerloose, P., Boehlen, F. & Neerman-Arbez, M. Fibrinogen and the risk of thrombosis. *Semin Thromb Hemost* **36**, 7–17 (2010).
226. Abdalla, S., Lothar, H., Langer, A., El Faramawy, Y. & Quitterer, U. Factor XIIIa transglutaminase crosslinks AT1 receptor dimers of monocytes at the onset of atherosclerosis. *Cell* **119**, 343–354 (2004).
227. Schmaier, A. H. The elusive physiologic role of Factor XII. *J Clin Invest* **118**, 3006–3009 (2008).
228. Stone, O. A. *et al.* Critical role of tissue kallikrein in vessel formation and maturation: implications for therapeutic revascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 657–664 (2009).
229. Porcu, P. *et al.* Circulating tissue kallikrein levels correlate with severity of carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1104–1110 (2004).
230. Tissue factor, tissue pathway factor inhibitor and risk factors of atherosclerosis in patients with chronic limbs ischemia: preliminary study - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18677291/>.
231. Mitchell, C. T., Kamineni, A., Palmas, W. & Cushman, M. Tissue factor pathway inhibitor, vascular risk factors and subclinical atherosclerosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis* **207**, 277–283 (2009).
232. Massberg, S. *et al.* Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* **16**, 887–896 (2010).
233. Mosnier, L. O., Zlokovic, B. V. & Griffin, J. H. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* **109**, 3161–3172 (2007).
234. Anderson, H. A. *et al.* Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol* **4**, 87–91 (2003).

- 
235. Liao, D. *et al.* Human protein S inhibits the uptake of AcLDL and expression of SR-A through Mer receptor tyrosine kinase in human macrophages. *Blood* **113**, 165–174 (2009).
236. Mahmoodi, B. K., Brouwer, J. L. P., Veeger, N. J. G. M. & Van Der Meer, J. Hereditary deficiency of protein C or protein S confers increased risk of arterial thromboembolic events at a young age: results from a large family cohort study. *Circulation* **118**, 1659–1667 (2008).
237. Fay, W. P., Garg, N. & Sunkar, M. Vascular functions of the plasminogen activation system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 1231–1237 (2007).
238. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11487021/>.
239. White, H. D. Oral antiplatelet therapy for atherothrombotic disease: current evidence and new directions. *Am Heart J* **161**, 450–461 (2011).

**10. OZNACZENIE SKRÓTÓW**

**ADP** adenzynodifosforan

**AGEs** końcowe produkty zaawansowanej glikacji

**ALAT** aktywność aminotransferazy alaninowej

**AP2** białko adaptorowe 2

**APC** aktywne białko C

**APC** Allophycocyanina

**AspAT** aktywność aminotransferazy asparaginowej

**ATP** adenzynotryfosforan

**bFGF** czynnik wzrostu podstawowy fibroblastów

**BMI** wskaźnik masy ciała

**BSA** albumina wołowa

**CD** antygen powierzchniowy

**COX-2** cyklooksygenaza 2

**CRP** reaktywnego białka C

**CTGF** czynnik wzrostu tkanki łącznej

**DAF** czynnik przyspieszający rozkład

**DAG** diacyloglicerol

**DEGs** zmiana ekspresji genów

**DM** cukrzyca

**DTNB** kwas 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowy

**EDTA** kwas wersenianowy

**EIA** test immunoenzymatyczny

**ELISA** test immunoenzymatyczny

**EMP** mikrocząsteczki pochodzące z komórek śródbłonna

**eNOS** syntaza tlenku azotu

**EPCR** receptor dla endotelialnego białka C

- FACS** system sortowania komórek aktywowanych fluorescencją
- FITC** Izotiocyanian fluoresceiny
- FSC** rozrzut przedni
- GEF** czynnik wymiany guaninina-nukleotydy
- GGTP** aktywność gammaglutamylotransferazy
- GP** glikoproteina
- GPCR** receptory sprzężone z białkiem G
- HbA1c** hemoglobina glikowana
- HDL** lipoproteiny o wysokiej gęstości
- hsCRP** wysokowrażliwe białko C-reaktywne
- ICAM-1** cząsteczka adhezji międzykomórkowej
- IL-6** interleukina 6
- IP3** 1,4,5-trifosforanu inozytolu
- K/R** wskaźnik kostka/ramię
- LDL** lipoproteiny o niskiej gęstości
- LDLG** gen receptora dla LDL
- LEU** leukocyty
- Lp(a)** lipoproteina (a)
- LTA** agregometria optyczna oparta na pomiarze światła widzialnego
- MC** makroangiopatia cukrzycowa
- MCP-1** białko chemotaktyczne dla monocytów
- MLCK** kinaza łańcucha lekkiego miozyny
- MMP** metaloproteinazy macierzy
- MP** mikropłytki
- MZ** miazdżyca zarostowa
- NCEP** Narodowego Programu Edukacji Cholesterolowej Panelu III Leczenia Dorosłych
- NF- $\kappa$ B** czynnika transkrypcji łańcucha kappa B

**NO** tlenek azotu

**OB** odczyn Biernackiego

**oxLDL** oksydowany LDL

**PAD** choroba tętnic obwodowych

**PAF** czynnik aktywujący płytki

**PAF-AH** poziom aktywności czynnika aktywującego płytki

**PAI-1** inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1

**PAOD** obwodowa niewydolność tętnicza

**PAR-1** receptor aktywowany proteazą

**PBS** bufor fosforanowy bez  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$

**PDGF** płytkopochodny czynnik wzrostu

**PECAM-1** cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonka płytek krwi 1

**PF4** czynnik płytkowy

**PGI<sub>2</sub>** prostacyklina

**PKC** kinaza białkowa C

**PLT** płytki krwi

**PMP** mikrocząsteczki pochodzące z płytek krwi

**PPP** osocze ubogopłytkowe

**PRP** osocze bogatopłytkowe

**PSGL-1** glikoproteinowy ligand-1 selektyny P

**PT** czas protrombinowy

**RT-PCR** odwrotnej transkrypcji łańcuchowej reakcji polimeryzacji

**SCORE** ang. *Systematic COronary Risk Evaluation*

**SNP** polimorfizm pojedynczego nukleotydu

**sPECAM-1** rozpuszczalna forma płytkowo-śródbłonkowego czynnika adhezyjnego

**SSC** rozrzut boczny

**TAFI** aktywowany trombiną inhibitor fibrynolizy

**TAT** kompleks trombina-antytrombina

**T2DM** cukrzyca typu 2

**TF** czynnik tkankowy

**TM** trombomodulina

**TNF- $\alpha$**  czynnika martwicy nowotworu  $\alpha$

**TRAP** peptyd aktywujący receptor trombinowy

**TXA2** tromboksan

**VCAM-1** cząsteczka adhezyjna komórek naczyniowych 1

**VEGFR** receptor dla czynnika wzrostu śródbłónka

**VSMCs** komórki mięśni gładkich naczyń

**vWF** czynnik von Willebranda

**WHO** Światowa Organizacja Zdrowia

**WHR** stosunek obwodu talii do obwodu bioder

## 11. SPIS RYCIN I TABEL

<b>Rycina 1.1.</b> Tablica SCORE 10-letnie ryzyko incydentu sercowo-naczyniowego zakończonego zgonem w zależności od płci, wieku, ciśnienia tętniczego skurczowego, stężenia cholesterolu całkowitego i palenia papierosów (wg ESC 2003).....	str.5
<b>Rycina 1.2.</b> Mechanizmy dysfunkcji śródbłonna wywołanej ROS w powikłaniach naczyniowych DM.....	str.8
<b>Tabela 1.1.</b> Mechanizmy sprzyjające rozwojowi miażdżycy u chorych na cukrzycę.....	str.5
<b>Rycina 1.3.</b> Budowa płytki krwi.....	str.11
<b>Rycina 1.4.</b> Obraz aktywowanej płytki krwi.....	str.13
<b>Rycina 1.5.</b> Zdjęcie z mikroskopu fluorescencyjnego oraz skaningowego przedstawiające aktywowane płytki krwi oraz komórki śródbłonna, które wydzielają pozakomórkowe mikropęcherzyki .....	str.15
<b>Tabela 1.2.</b> Porównanie egzosomów i PMP .....	str.15
<b>Rycina 1.6.</b> Regulacja i fizjologia pączkowania błony komórkowej i tworzenia mikrocząstek .....	str.16
<b>Rycina 1.7.</b> Budowa i aktywacja receptora dla trombiny PAR-1.....	str.18
<b>Tabela 1.3.</b> Specyficzność proteaz względem receptorów PAR .....	str.19
<b>Rycina 1.8.</b> Porównanie mechanizmów aktywowania PAR-1 przez trombinę i przez APC.....	str.20
<b>Rycina 1.9.</b> Lokalizacja genomowa genu PAR-1 - 15q11.2.....	str.26
<b>Tabela 3.1.</b> Charakterystyka badanych grup .....	str.28
<b>Tabela 3.2.</b> Klasyfikacja zaburzeń glikemii według Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego.....	str.30
<b>Tabela 3.3.</b> Kryteria rozpoznania zespołu metabolicznego według WHO oraz NCEP i ATP III .....	str.30



<b>Tabela 3.4.</b> Sekwencje zaprojektowanych starterów reakcji PCR .....	str.35
<b>Tabela 4.1.</b> Porównanie wartości wybranych parametrów antropometrycznych oraz biochemicznych wykładników progresji makroangiopatii cukrzycowej i miażdżycy zarostowej w grupie badanej i kontrolnej.....	str. 46
<b>Rycina 4.1.</b> Wartości BMI pacjentów z makroangiopatią cukrzycową (MC), grupy kontrolnej (KONTROLA) oraz z miażdżycą zarostową (MZ) .....	str.48
<b>Rycina 4.2.</b> Wartości stężenia glukozy, mocznika, HDL i trójglicerydów w próbach krwi pacjentów z makroangiopatią cukrzycową (MC) grupy kontrolnej (KONTROLA) oraz z miażdżycą zarostową (MZ).....	str. 49
<b>Tabela 4.2.</b> Parametry niedokrwienia kończyn dolnych .....	str.50
<b>Rycina 4.3.</b> Analiza cytometryczna (SSC i FCS) izolowanych preparatów ludzkich płytek krwi spoczynkowych (A i D), wybramkowanych i wyznakowanych PAR-1 bez aktywacji (B i E) oraz wybramkowanych i wyznakowanych na PAR-1 i aktywowanych 10 $\mu$ M TRAP (C i F); wyznakowanych przeciwciałami anty CD61-FITC oraz PAR-1-APC. Poziom ekspresji PAR-1 odczytano z bramek P1. Markerami M1 i M2 oznaczono bramki dla mikropłytek i normopłytek, analizie PAR-1 poddawano zsumowaną populację. Przykładowy obraz analiz pacjenta obciążonego makroangiopatią cukrzycową .....	str.52
<b>Rycina 4.4.</b> Odsetkowy udział receptora PAR-1 przed i po dodaniu peptydu aktywującego receptor trombinowy (TRAP) w próbach krwi pacjentów z makroangiopatią cukrzycową (MC), grupy kontrolnej (KONTROLA) oraz z miażdżycą zarostową (MZ) .....	str.53
<b>Tabela 4.3.</b> Poziom ekspresji genów PAR-1 i genu referencyjnego $\beta$ -aktyny [ $\Delta C_T$ ] w krwi pełnej .....	str.55
<b>Rycina 4.5A.</b> Rozdział w 3 % żelu agarozowym produktów amplifikacji genu PAR-1 z polimorfizmem -506 I/D. Ścieżki: 1 – homozygota I/I, 2 – heterozygota I/D, 3 – homozygota D/D, M – marker wielkości GeneRuler™ 50bp DNA.Ladder (Fermentas) .....	str.56
<b>Rycina 4.5B.</b> Odsetkowy udział wariantów polimorfizmu -506 I/D genu PAR-1: homozygota D/D (kolor niebieski), heterozygota I/D (kolor czerwony), homozygota I/I (kolor zielony).....	str.56

- Rycina 4.6A.** Wynik trawienia restrykcyjnego enzymem *MvaI* produktów PCR celem sprawdzenia występowania polimorfizmu -1426 C/T genu PAR-1. Ścieżki: 1 – 6 homozygoty C/C, M – marker wielkości GeneRuler™ 100bp DNA.Ladder (Fermentas)..... str.57
- Rycina 4.6B.** Odsetkowy udział wariantów polimorfizmu -1426 C/T genu PAR-1: homozygota C/C (kolor niebieski), heterozygota C/T (kolor czerwony), homozygota T/T (kolor zielony) .....str.58
- Rycina 4.7A.** Przykładowe rozdziały produktów amplifikacji fragmentu DNA obejmującego miejsce polimorfizmu IVSn-14 A/T genu *PAR-1* metodą SNaPshot. Allele określano na podstawie wielkości starterów i kolorów znakowanych fluorescencyjnie ddNTPs (terminatorów) włączanych podczas reakcji wydłużania starterów. A – czerwony pik, homozygota typu dzikiego (AA); B – zielony i czerwony pik, heterozygota (AT); C – zielony pik, homozygota zmutowana (TT) .....str.59
- Rycina 4.7B.** Odsetkowy udział wariantów polimorfizmu IVS-14 A/T genu PAR-1: homozygota A/A (kolor niebieski), heterozygota A/T (kolor czerwony), homozygota T/T (kolor zielony).....str.60
- Rycina 4.8.** Zestawienie wyników badań w makroangiopatii cukrzycowej (MC), miażdżycy zastoinowej (MZ) i w grupie kontrolnej (Kontrola) .....str.61
- Rycina 4.9.** Udział procentowy: A) płytek krwi; B) mikroplatek przed i po aktywacji TRAP w grupach pacjentów z makroangiopatią cukrzycową (MC), kontroli (KONTROLA) i z miażdżycą zarostową (MZ) .....str.62
- Rycina 4.10.** Analiza cytometryczna ekspresji PAR-1 w ludzkich płytkach spoczynkowych (A) oraz płytkach aktywowanych 10µM TRAP (B). Płytki krwi wybramkowano na obecność antygeny CD61-FITC i wyznakowano przeciwciałami skierowanymi przeciw antygenowi PAR-1-APC. Umownie zaznaczone regiony P4, P3, P1 odnoszą się odpowiednio do mikroplatek, normoplatek i agregatów płytkowych. Obraz pacjenta z MC.....str.64
- Rycina 4.11.** Ocena ilościowa zawartości czynników hemostazy i stanu zapalnego: stężenia kompleksu trombina-antytrombina III (TAT), stężenia interleukiny 6 (IL-6), procentowego udziału czynnika von Willebranda (vWF), procentowego udziału inhibitora fibrylizacji aktywowanego trombiną (TAFI), stężenia płytkowego czynnika wzrostu (PDGF), stężenia monocytarnej proteiny 1 (MCP-1) oraz stężenia rozpuszczalnej cząsteczki adhezji komórkowej

płytkowo-śródłonkowej typ 1 (sPECAM-1) w próbach krwi pacjentów z makroangiopatią cukrzycową (MC), grupy kontrolnej (KONTROLA) oraz z miażdżycą zarostową (MZ)..... str.66

**Tabela 4.4.** Analiza efektów głównych .....str.68

**Rycina 4.12.** Wielowymiarowy wpływ czasu protrombinowego (PT, %), procentowego udziału czynnika von Willenbranda (vWF, %), wieku (lata), stężenia trójglicerydów (TG, mg/dl) na szansę na występowanie miażdżycy zarostowej (MZ) wśród populacji chorych na miażdżycę zarostową lub makroangiopatię cukrzycową (MZ i MC) .....str.70

**Rycina 4.13.** Analiza wielowymiarowa: A-D) Ilość mikroplatek z PAR-1+TRAP; E-F) ilość mikroplatek z BMI (Rycina 4.12E-F) oraz wiek z paleniem tytoniu ..... str.71

**Rycina D.1.** Glikokaliks ochronny śródłonka (EC GCX):<sup>182</sup> a – wybrane składniki EC GCX<sup>13</sup>; b – kapilara mięśnia sercowego<sup>183</sup>; c i d – hodowla EC GCX odpowiednio szczura i wołu..... str.121

**Rycina D.2.** Rozwój blaszki miażdżycowej. Reaktywne formy tlenu (ROS), wytwarzane przez komórki śródłonka, mięśni gładkich oraz makrofagi, utleniają LDL w przestrzeni podśródłonkowej, szczególnie w obszarach uszkodzonego śródłonka. To inicjuje serię zdarzeń, które kończą się formowaniem włóknistej blaszki miażdżycowej. Pęknięcie takiej blaszki prowadzi do tworzenia się skrzepliny i częściowego lub całkowitego zamknięcia naczynia.....str.123

**Rycina D.3.** Mechanizmy biorące udział w powstawaniu komórek piankowatych i rozwoju zmian miażdżycowych<sup>185</sup>; a – fizjologiczna błona wewnętrzna; b – wczesne stadium zmiany miażdżycowej, smuga tłuszczowa charakteryzuje się podśródłonkową akumulacją makrofagów/komórek piankowatych, które zawierają ogromne ilości lipidów – czerwone zabarwienie; c – mechanizm powstawania blaszki miażdżycowej – przewlekły stan zapalny..... str.124

**Tabela D.1.** Charakterystyka osoczowych czynników krzepnięcia.....str.128

**Rycina D.4.** Kaskada układu krzepnięcia - szlak aktywacji krzepnięcia.....str.129

**Rycina D.5.** Schemat układu fibrynolitycznego..... str.131

**Tabela D.2.** Analiza interakcji .....str.137

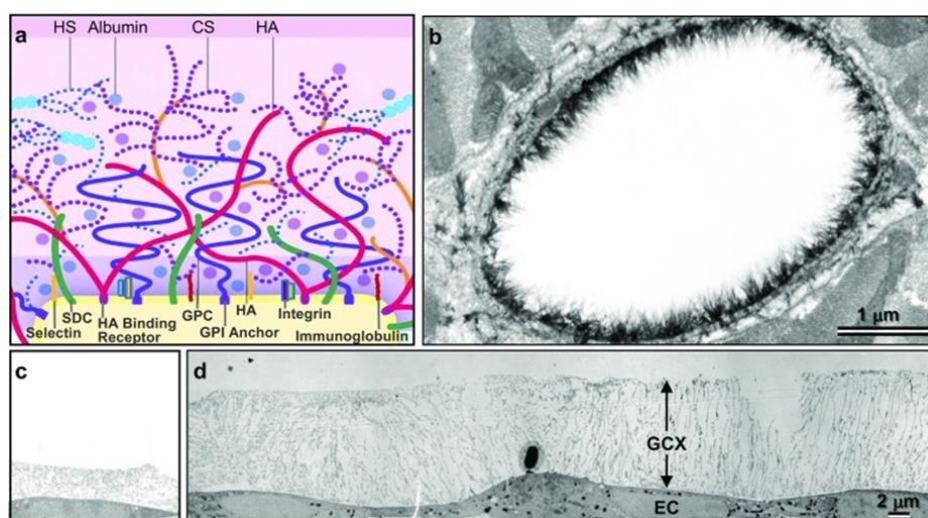
## 12. DODATEK

### 12.1. Budowa i regulacja funkcja śródbłónka

Śródbłonek (ang. *Endothelium*, *EC*) stanowi integralną część naczynia niezależnie od jego średnicy, funkcji czy lokalizacji<sup>186</sup>. Jego powierzchnia wynosi kilkaset metrów kwadratowych<sup>187</sup> i czyni go największym narządem ciała. Zbudowany jest z pojedynczej, ciągłej warstwy wysoko zróżnicowanych, wyspecjalizowanych komórek, skierowanych do światła naczynia. Komórki te są bezpośrednio ekspozycjonowane na działanie pulsacyjnego przepływu elementów morfotycznych i makrocząsteczek krążących we krwi, przy czym mają one ograniczoną zdolność do regeneracji.

Śródbłonek, poza swoją funkcją fizyczną i anatomiczną jako bariera oddzielająca środowisko wewnątrznaczyniowe od zewnątrznaczyniowego, odgrywa aktywną biologicznie rolę jako dynamiczna i plastyczna powierzchnia styczna, przenosząca sygnały biochemiczne i biomechaniczne. Na powierzchnię ściany tętnicy oddziałują naprężenia rozciągające i ścinające, które przyczyniają się do powstawania blaszek miażdżycowych np. oscylacyjne siły ścinające działając w określonych lokalizacjach (zakręty wewnętrzne naczyń, rozwidlenia oraz miejsca odgałęzienia) powodują uszkodzenia śródbłónka<sup>188</sup> i rozwijanie blaszki miażdżycowej. Śródbłonek bierze także udział w różnych procesach np. krzepnięcia i fibrylizacji, angiogenezy, regulacji ciśnienia tętniczego, układu immunologicznego<sup>90,189</sup>. Jest zaangażowany w interakcje z lokalnym i ogólnoustrojowym środowiskiem; modyfikacja cech fenotypowych śródbłónka wpływa na regulację hemostazy lub na inicjowanie i rozwój zaburzeń naczyniowych<sup>190,191</sup>.

Warstwą ochronną śródbłónka jest glikokaliks (ang. *Glycocalyx*, *GcX*)<sup>182,192</sup>, będący ujemnie naładowaną warstwą białkowo-glikozaminową, zbudowaną z różnych łańcuchów glikozaminoglikanów (ang. *Glycosaminoglycans*, *GAGs*), takich jak siarczan heparanu (ang. *Heparan Sulphate*, *HS*), kwas hialuronowy (ang. *Hyaluronic Acid*, *HA*) i siarczan chondroityny (ang. *Chondroitin Sulfate*, *CS*), połączonych z rdzeniami białkowymi, które zakotwiczą GAGs w błonie komórkowej (Rycina D.1.).



**Rycina D.1.** Glikokaliks ochronny śródbłonka (EC GCX):<sup>182</sup> a – wybrane składniki EC GCX<sup>13</sup>; b – kapilara mięśnia sercowego<sup>183</sup>; c i d – hodowla EC GCX odpowiednio szczura i wołu<sup>14,182</sup>

Glikokaliks pełni kluczową rolę w regulacji funkcji komórek śródbłonka oraz stanu naczyń tętniczych, gdyż stanowi fizyczną barierę dla różnych molekuł, np.: LDL, komórek stanu zapalnego oraz płytek krwi (ang. *Platelets*, PLT). Umożliwia on komórkom śródbłonka wykrywanie i regulowanie sił hemodynamicznych oraz zmian pojawiających się w przepływającej krwi<sup>190</sup>. Przy zaburzonym przepływie krwi glikokaliks staje się cieńszy i mniej stabilny, co prowadzi do zakłóceń w redystrybucji połączeń międzykomórkowych oraz zaburzeń szlaków przekazywania sygnałów, skutkując m.in. utratą funkcji ochronnej. Takie zmiany wywołują dysfunkcję śródbłonka, a w konsekwencji rozwój procesów miażdżycowych<sup>190,193</sup>. Utrata integralności glikokaliksu powoduje odsłonięcie cząsteczek adhezyjnych dla PLT oraz leukocytów (ang. *Leucocyte*, LEU) na powierzchni śródbłonka, co umożliwia tym krwinkom osiągnięcie śródbłonka. Zwiększona przepuszczalność ułatwia także cząsteczkom LDL dostawanie się do śródbłonka, który dotknięty procesem miażdżycowym, stwarza warunki prowadzące do utlenienia LDL. Prowadzi to do stopniowego narastania blaszki miażdżycowej oraz tworzenia się zakrzepów (aterotromboza)<sup>192</sup>. Choć utrata integralności glikokaliksu koreluje z formowaniem się blaszek miażdżycowych, to w praktyce klinicznej nie jest uznawana za czynnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Niemniej jednak, wiadomo, że czynniki ryzyka miażdżycy, takie jak: nadciśnienie, starzenie się, cukrzyca i otyłość, prowadzą do uszkodzenia glikokaliksu śródbłonka, podkreślając tym samym znaczenie tej struktury w patogenezie zaburzeń sercowo-naczyniowych<sup>193</sup>. Nagromadzenie blaszek miażdżycowych powoduje sztywnienie ściany naczynia. Blaszka miażdżycowa może stać się niestabilna i pękać, co prowadzi do uwolnienia skrzepliny

do światła tętnicy. Skrzeplina ta może pozostać na powierzchni ściany naczynia lub być przenoszona z krwią, powodując zatorowość naczyń tętniczych w odległych miejscach<sup>23,190</sup>.

Zmieniony śródbłonek nie jest w stanie zapewnić prawidłowego rozkurczu naczyń, co zaburza przepływ krwi. Dochodzi do upośledzenia syntezy prostacyklin oraz zwiększonego wydzielania różnych czynników skurczających naczynia, takich jak endotelina 1, czy tlenek azotu (NO), który jest wydzielany z L-argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenu azotu (ang. *Nitric Oxide Synthase*, eNOS)<sup>22</sup>. NO reguluje napięcie mięśni gładkich tętnic, zapewniając im właściwe funkcjonowanie, a także ogranicza przyleganie leukocytów i płytek krwi do śródbłonka<sup>194</sup>. Indukuje również procesy regeneracyjne w śródbłonku, utrudnia przemieszczanie się komórek mięśni gładkich z warstwy środkowej do wewnętrznej naczynia<sup>194</sup>, przyczynia się do utrzymywania równowagi skurczu oraz przeciwdziała stanom zapalnym ściany tętnicy<sup>195,196</sup>. Obniżony poziom tlenu azotu (NO) prowadzi do procesów proaterogennych, takich jak: wzmożony skurcz tętnic, zwiększona adhezja PLT do śródbłonka, utleniające modyfikacje lipoprotein zgromadzonych w błonie wewnętrznej, efekt proliferacyjny<sup>35</sup> i migracyjny komórek mięśni gładkich naczyń (ang. *Vascular Smooth Cells*, VSMCs)<sup>34</sup>, adhezja i infiltracja śródbłonka przez monocyty i limfocyty, które migrując do przestrzeni podśródbłonkowej inicjują lokalne stany zapalne<sup>197</sup>. Obniżenie wydzielania NO ma istotne konsekwencje dla reakcji immunologiczno-zapalnych w ścianie naczynia<sup>198</sup>.

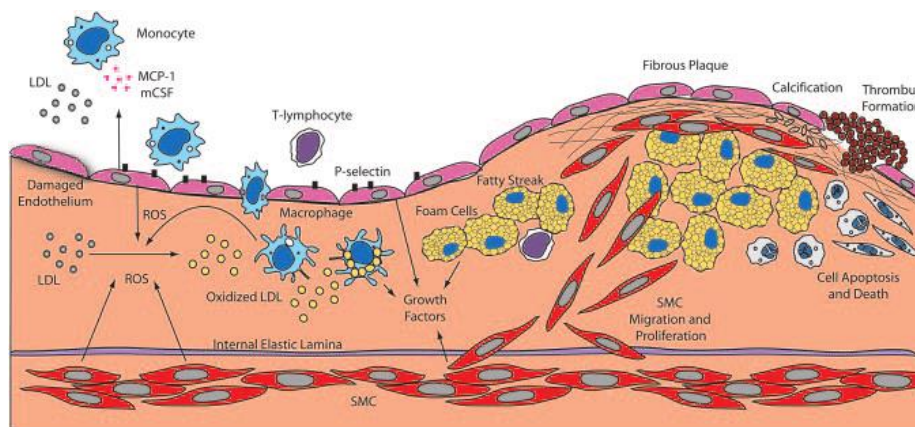
## 12.2. Czynniki wpływające na rozwój dysfunkcji śródbłonka

Na rozwój dysfunkcji śródbłonka wpływa wiele czynników m.in. zaburzenia metabolizmu lipidowego, transmigracja monocytów i ich przekształcanie się w makrofagi, odpowiedź immunologiczna kontrolowana przez limfocyty T, wewnątrz- i zewnątrzkomórkowa akumulacja lipidów, wzmożona neowaskularyzacja oraz aktywacja procesów krzepnięcia krwi.

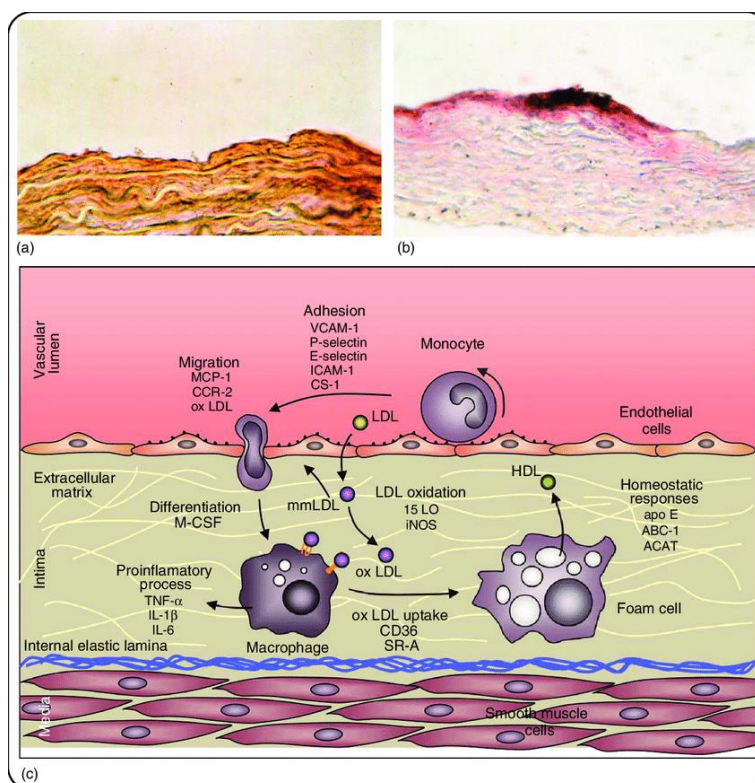
Zaburzenia metabolizmu lipidowego wpływają na modyfikację funkcji i budowy komórek śródbłonka (ang. *Endothelium Cells*, EC). Hipercholesterolemia indukuje zmiany strukturalne EC – ekspozycja na krew o wysokim poziomie cholesterolu i trójglicerydów prowadzi do przejścia tych komórek w tzw. fenotyp wydzielniczy<sup>199</sup>. Połączenia między komórkami śródbłonka stają się bardziej przepuszczalne, a siły ścinające działające na ścianę naczynia ułatwiają LDL osiągnięcie błony wewnętrznej (poprzez zwiększony nacisk) powodując mikrourazy śródbłonka. Ponadto LDL mogą wiązać się z proteoglikanami błony wewnętrznej za pomocą apolipoproteiny B (komponentu białkowego LDL)<sup>200</sup>. Minimalnie zmienione

cząsteczki LDL (mmLDL) przedostają się do przestrzeni subintymalnej, gdzie ulegają różnym modyfikacjom w wyniku utleniania, przekształcając się w oksydowane LDL (oxLDL)<sup>201</sup>. LDL mogą także dostawać się do przestrzeni subintymalnej poprzez transcytozę<sup>202</sup>. W warunkach prawidłowych EC nie dopuszczają do adhezji ani migracji krwinek białych, jednak rezultatem dysfunkcji jest zwiększona ekspresja adhezyn, przede wszystkim naczyniowej cząsteczki przylegania komórkowego typu 1 (ang. *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*, VCAM-1; CD106). Ligandem dla VCAM-1 jest integryna VLA-4 (ang. *Very Late Antygen 4*), która znajduje się tylko na monocytach i limfocytach T<sup>89</sup>. Do śródbłonkowych cząstek adhezyjnych należą również: selektyna E (CD62E), selektyna P (CD62P), ICAM-1 (ang. *Intercellular Adhesion Molecule-1*; CD54), ICAM-2 (ang. *Intercellular Adhesion Molecule-2*; CD102) i PECAM-1 (ang. *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*). Z badań epidemiologicznych wynika, że stężenia rozpuszczalnych postaci tych cząstek krążących we krwi korelują ze stopniem rozwoju miażdżycy<sup>91</sup>.

Na dysfunkcję śródbłonka wpływają również monocyty, które w procesie transmigracji przechodzą przez miejsca połączeń EC oraz przez błonę podstawową. Transmigracja stymulowana jest chemokinami produkowanymi przez EC oraz przez VSMCs<sup>173</sup>, np. białkiem chemotaktycznym monocytów typu 1 (ang. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*, MCP-1) i jego receptorem CCR2 (ang. *Chemokine Receptor Type 2*). Monocyty osadzone w ścianie naczynia ulegają przemianom, które prowadzą do ich namnażania i przekształcenia się w aktywne makrofagi. Ten proces inicjowany jest czynnikiem stymulującym kolonie monocytów (ang. *Macrophage Colony-Stimulating Factor*, M-CSF), który również jest produkowany przez EC i przez VSMCs. Makrofagi rozpoczynają oczyszczanie ściany naczynia poprzez usuwanie oxLDL<sup>203</sup> – na powierzchni makrofagów pojawiają się receptory zmiatające, umożliwiające wchłanianie aterogennych LDL, np. receptory zmiatające A (ang. *Scavenger Receptors A*, SR-A, CD204) oraz receptory zmiatające B (ang. *Scavenger Receptors B*, SR-B, CD36). Ekspresja tych receptorów nie jest regulowana w sposób zwrotny, prowadzi więc do nadmiernej akumulacji oxLDL w makrofagach i tworzenia charakterystycznych dla miażdżycy komórek piankowatych (ang. *Foam Cells*)<sup>90,203</sup>, co przedstawiono na Rycinie D.2. i Rycinie D.3.



**Rycina D.2.** Rozwój blaszki miażdżycowej. Reaktywne formy tlenu (ROS), wytwarzane przez komórki śródbłonna, mięśni gładkich oraz makrofagi, utleniają LDL w przestrzeni podśródbłonkowej, szczególnie w obszarach uszkodzonego śródbłonna. To inicjuje serię zdarzeń, które kończą się formowaniem włóknistej blaszki miażdżycowej. Pęknięcie takiej blaszki prowadzi do tworzenia się skrzepliny i częściowego lub całkowitego zamknięcia naczynia<sup>184</sup>



**Rycina D.3.** Mechanizmy biorące udział w powstawaniu komórek piankowatych i rozwoju zmian miażdżycowych<sup>185</sup>; a – fizjologiczna błona wewnętrzna; b – wczesne stadium zmiany miażdżycowej, smuga tłuszczowa charakteryzuje się podśródbłonkową akumulacją makrofagów/komórek piankowatych, które zawierają ogromne ilości lipidów – czerwone zabarwienie; c – mechanizm powstawania blaszki miażdżycowej – przewlekły stan zapalny

Akumulacja komórek piankowatych w błonie wewnętrznej tętnicy tworzy nacieki tłuszczowe (ang. *Fatty Streaks*)<sup>204</sup>. W wyniku apoptozy komórek piankowatych, spowodowanej akumulacją uszkodzonych organelli, dochodzi do wtórnego uwalniania zawartości<sup>202,205</sup>. Zgromadzony w nadmiarze wolny cholesterol, może krystalizować,



powodując postęp tworzenia się blaszki miażdżycowej<sup>206</sup>. Makrofagi, przyciągane przez sygnały chemotaktyczne, przyczyniają się do powstawania rdzenia martwiczego między wewnętrzną a zewnętrzną błoną elastyczną. Ten rdzeń, zbudowany głównie z lipidów i martwych komórek, jest stopniowo formowany poprzez mechanizm tzw. błędnego koła<sup>205</sup>.

Istotną rolę w rozwoju i przebiegu miażdżycy odgrywa specyficzna, zależna od antygeny, odpowiedź immunologiczna kontrolowana przez limfocyty T. W blaszce miażdżycowej dominują limfocyty T pomocnicze (Th; CD4+)<sup>4</sup>. Modyfikują one odpowiedź immunologiczną zarówno humoralną, jak i komórkową poprzez bezpośredni kontakt z komórkami zapalnymi lub za pośrednictwem cytokin. Ich aktywacja następuje po połączeniu receptorów TCR (ang. *T-cell receptor* – receptorów limfocytów T) z małymi fragmentami antygeny związanymi z cząsteczkami MHC klasy II (ang. *Major Histocompatibility Complex*) – zjawisko prezentacji antygeny. W warunkach prawidłowych cząsteczki MHC-II są głównie obecne na komórkach dendrytycznych i makrofagach. W miażdżycy limfocyty T mogą być wystawione na prezentację oxyLDL, białka szoku termicznego (ang. *Heat Shock Proteins* – HSP) lub antygeny *Chlamydia pneumoniae*<sup>4</sup>. Połączenie receptorów limfocytów T (TCR) z prezentującymi antygen cząsteczkami MHC-II samo w sobie nie jest wystarczające do aktywacji limfocytów T. Konieczna jest ko-stymulacja, czyli równoczesne połączenie innych białek na powierzchni limfocytów i komórek prezentujących antygen. W kontekście patogenezy miażdżycy kluczowa jest para białek CD40L/CD40. CD40L występuje na powierzchni limfocytów T i jest ligandem dla CD40 obecnego między innymi na limfocytach B i komórkach dendrytycznych. CD40L pojawia się również na komórkach śródbłonna, mięśni gładkich i makrofagach zaangażowanych w rozwój blaszki miażdżycowej<sup>4</sup>. W wyniku interakcji z CD40 dochodzi do aktywacji tych komórek, co inicjuje ekspresję różnych czynników biorących udział w rozwoju miażdżycy. Istotność roli interakcji CD40L/CD40 w patogenezy miażdżycy podkreśla fakt, że pacjenci z niestabilną chorobą wieńcową wykazują wyższe stężenia rozpuszczalnej formy CD40L (sCD40L) niż pacjenci z postacią stabilną oraz osoby zdrowe. Dodatkowo, wyjściowe stężenia sCD40L mają znaczenie w prognozowaniu ostrej choroby sercowo-naczyniowej<sup>207</sup>.

Gromadzenie lipidów występuje zarówno wewnątrz komórek, jak i poza nimi. Komórki mięśni gładkich naczyń (VSMCs)<sup>208</sup> są przyciągane do tych obszarów, gdzie migrują z warstwy środkowej do wewnętrznej pod wpływem sygnału chemotaktycznego wysłanego przez limfocyty T wydzielające interferon gamma (IFN gamma). Gdy VSMCs przesuwają się do warstwy wewnętrznej, zmieniają swoją funkcję celem naprawy uszkodzonej ściany naczynia. VSMCs proliferują i wytwarzają substancje pozakomórkowe, które stabilizują

zmianę i zmniejszając stan zapalny<sup>208</sup> (Rycina 1.2.). Macierz pozakomórkowa składa się z elementów tkanki łącznej, takich jak kolagen i proteoglikany, które są odkładane w obszarze blaszki szczególnie blisko jej powierzchni, prowadząc do formowania się czapeczki włóknistej. Wytrzymałość tej struktury zależy od ilości kolagenu typu 1 i 3 oraz od jej grubości. Czapeczka włóknista pełni rolę w separacji bogatego w lipidy i trombogenicznego rdzenia od światła naczynia, co ma zapewnić integralność blaszki miażdżycowej i jej ochronę<sup>4,208</sup>. Do gromadzenia się lipidów poza komórkami przyczynia się również apoptoza komórek piankowatych – zaburzenia w fagocytozie ciałek apoptotycznych prowadzą do ich nadmiernego gromadzenia się w blaszce miażdżycowej, stanowiąc silny bodziec immunologiczny<sup>209</sup>. Ponadto apoptoza EC może wywoływać erozję blaszki miażdżycowej oraz sprzyjać powstawaniu zakrzepu. Dodatkowo, osłabia naturalne właściwości przeciwzakrzepowe śródbłonna, co sprzyja nadmiernemu krzepnięciu. Apoptoza VSMCs może z kolei prowadzić do osłabienia czapeczki łącznotkankowej, zwiększając ryzyko powstania niestabilnej zmiany predysponowanej do pęknięcia<sup>210,211</sup>. Na powierzchni ciałek apoptotycznych występuje fosfatydyloseryna – fosfolipid o silnych właściwościach prozakrzepowych. Prokoagulacyjne cechy komórek ulegających apoptozie są istotne, ponieważ mogą przyczyniać się do tworzenia zakrzepu w momencie pęknięcia blaszki miażdżycowej. Apoptoza komórek w blaszce miażdżycowej odgrywa rolę w procesie jej pęknięcia i powstawania zakrzepu, wpływając na rozwój ostrych postaci powikłań klinicznych<sup>210</sup>.

W rozwoju miażdżycy obserwowany jest również wzmożony proces neowaskularyzacji, czyli tworzenia naczyń krwionośnych. Należy on do mechanizmów naprawczych wywołanych uszkodzeniem ściany naczynia i umożliwia m.in. tworzenie krążenia obocznego. Zjawisko to w kontekście miażdżycy jest jednak niekorzystne. W blaszkach podatnych na pęknięcie obserwuje się dwukrotne zwiększenie liczby mikronaczyń, natomiast w pękających nawet czterokrotne (w porównaniu z stabilną blaszką, która silnie zwięża światło naczynia). Uważa się, że liczba mikronaczyń koreluje z zaawansowaniem choroby. Ponadto mikronaczynia charakteryzują się zwiększoną przepuszczalnością dla elementów morfotycznych, co ułatwia komórkom zapalnym przechodzenie z krwi do naczyń, nasilając infiltrację płytki przez makrofagi. W rezultacie, zapalenie sprzyja dalszemu rozwojowi angiogenezy. Istnieje więc pozytywne sprzężenie zwrotne: nowo tworzące się naczynia umożliwiają przedostawanie się komórek zapalnych do ściany naczynia, co następnie stymuluje proces angiogenezy. Badania potwierdzają związek między tworzeniem mikronaczyń a zapaleniem, gdzie wykazano, że liczba mikronaczyń koreluje z liczbą komórek zapalnych obecnych w zmianie miażdżycowej, a nie z grubością samej blaszki miażdżycowej. Proces

angiogenezy w miażdżycy jest złożony, gdyż obejmuje: autolizę macierzy zewnątrzkomórkowej, migrację i proliferację komórek śródbłonna, VSMCs i perycytów, a także tworzenie i dojrzewanie nowych struktur naczyniowych<sup>180</sup>. Głównymi czynnikami stymulującymi angiogenezę są niedotlenienie i lokalne procesy zapalne, które aktywują ekspresję czynników wzrostu np.: czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), płytkowego czynnika wzrostu (ang. *Platelet Derived Growth Factors*, PDGF), podstawowego czynnika wzrostu fibroblastów (ang. *Basic Fibroblast Growth Factor*, b-FGF) oraz ich receptorów. VEGF pobudza proliferację EC oraz inicjuje proces angiogenezy, natomiast PDGF i b-FGF odpowiadają za dojrzewanie nowo powstałych struktur naczyniowych. W późniejszych fazach angiogenezy ważną rolę pełnią angiopoetyny oraz receptory kinazy tyrozynowej, które są niezbędne do połączenia EC z otaczającymi je komórkami mezenchymalnymi<sup>43</sup>. Wykazano, że hamowanie angiogenezy przy użyciu endostatyny zmniejsza wzrost zmian miażdżycowych o 70%, co wskazuje na istotną rolę neowaskularyzacji w progresji miażdżycy<sup>212</sup>. Mikronaczynia powstające w blaszce miażdżycowej charakteryzują się odmienną strukturą rozgałęzień i budową w porównaniu do tych w przydance. Inwazja vasa vasorum (sieci mikronaczyń usytuowanych w obrębie błon zewnętrznych tętnic i żył, odpowiadających za zaopatrywanie dużych naczyń krwionośnych) ma miejsce głównie w obszarach pęknięć błony środkowej, szczególnie w pobliżu rdzenia nekrotycznego. Te naczynia tworzą liczne rozgałęzienia wokół zewnętrznej powierzchni rdzenia. Większość mikronaczyń w zmianie miażdżycowej pozostaje niedojrzała, charakteryzując się mniejszą średnicą niż naczynia w przydance oraz głównie składają się z komórek śródbłonna, z niewielką ilością perycytów i VSMCs. INF- $\gamma$ , produkowany przez aktywne limfocyty T, może odgrywać rolę w tym procesie poprzez hamowanie proliferacji VSMCs. Dodatkowo, INF- $\gamma$  jest inhibitorem PDGF, który jest kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za dojrzewanie nowych naczyń<sup>181</sup>. Ponadto niedojrzałe mikronaczynia są podatne na pęknięcie, co może prowadzić do krwawienia do wnętrza blaszki miażdżycowej i tworzenia się mikrozakrzepów. Aktywacja procesów krzepnięcia stymuluje proliferację VSMC oraz pobudza je do produkcji składników tkanki łącznej. W ten sposób, pozornie bezobjawowe krwawienia w mikrokrażeniu mogą prowadzić do nagłego postępu miażdżycy. Proces neowaskularyzacji odgrywa więc kluczową rolę w pękaniu blaszki miażdżycowej.

### 12.3. Niestabilność blaszki miażdżycowej

Stabilność blaszki miażdżycowej zależy od grubości wytworzonej czapeczki włóknistej (zawierającej kolagen, dużą ilość macierzy pozakomórkowej i mały rdzeń martwicy) oraz od stopnia naciekania przez komórki zapalne<sup>213</sup>. Stabilna blaszka miażdżycowa ma małą zawartość lipidów zlokalizowanych pozakomórkowo i jest oddzielona od światła naczynia krwionośnego zwartą, włóknistą czapeczką zabezpieczającą przed pęknięciem. Niestabilna blaszka miażdżycowa jest określana również jako ranliwa, trombogenna czy blaszka podwyższonego ryzyka, czyli blaszka miażdżycowa, zidentyfikowana przyżyciowo, o udokumentowanym wysokim prawdopodobieństwie pęknięcia z trombogennymi następstwami<sup>214</sup>. Posiada ona duży, martwicy rdzeń lipidowy, a grubość czapeczki łącznotkankowej nie przekracza 65  $\mu\text{m}$ . W jej obrębie dochodzi do nasilenia procesu zapalnego zdominowanego przez makrofagi i limfocyty T. Często obserwowany jest proces neowaskularyzacji i krwotoki do wnętrza blaszki<sup>48</sup>.

Wzrost rdzenia martwiczego prowadzi do stopniowego osłabienia czapeczki, które może być skutkiem jej rozciągania lub degradacji włókien kolagenowych przez zwiększoną aktywność metaloproteinaz macierzy (ang. *Matrix Metalloproteinases*, MMPs), które są aktywowane przez makrofagi<sup>208</sup>. Znacząca apoptoza VSMC prowadzi do zmniejszenia produkcji kolagenu oraz innych elementów macierzy pozakomórkowej. To z kolei pogłębia stan zapalny i dalsze powiększanie się rdzenia martwiczego blaszki miażdżycowej. W miarę upływu czasu w obrębie blaszki powstają ogniska kalcyfikacji<sup>206</sup>. W zaawansowanym stadium rozwoju blaszki miażdżycowej obserwuje się liczne miejsca pęknięć i procesów naprawczych, powodujące stopniowe przyrastanie blaszki do wewnętrznej ściany naczynia oraz postępujące zwężenie jego światła<sup>215</sup>. Komórki zapalne pełnią kluczową rolę zarówno w tworzeniu, jak i rozwoju blaszek miażdżycowych. Makrofagi i limfocyty przyczyniają się do destabilizacji blaszki poprzez wzmożone uwalnianie IFN- $\gamma$  przez limfocyty T (CD4+, CD28-)<sup>216</sup>. W miejscu zmiany miażdżycowej dochodzi do wydzielania prozapalnych cytokin, które nie tylko działają miejscowo, ale również wpływają na syntezę markerów stanu zapalnego np. białka C-reaktywnego (ang. CRP) i fibrynogenu. Istotnymi cząsteczkami biorącymi udział w adhezji i migracji komórek zapalnych są: cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 (ang. *Intercellular Adhesion Molecule 1*, CD54, ICAM-1), cząsteczka adhezyjna komórek naczyniowych 1 (ang. *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*, CD106, VCAM-1) oraz cząsteczka związana z funkcją limfocytów (ang. *Lymphocyte Function Associated Molecule*, CD18, LFA-1)<sup>217</sup>. W niestabilnej blaszce miażdżycowej mogą pojawiać się obszary krwawienia, będące wynikiem

uszkodzonych, nieprawidłowo rozwijających się mikronaczyń tętniczych (*vasa vasorum*) lub obecności owrzodzeń<sup>217</sup>. Krwawienie do wnętrza blaszki miażdżycowej odgrywa istotną rolę w procesach apoptozy oraz kształtowaniu się rdzenia martwiczego, ponieważ hemoglobina, uwolniona z erytrocytów, destabilizuje strukturę blaszki<sup>218</sup>, a żelazo (uwalniane z hemoglobiny), prowadzi do intensywnego formowania reaktywnych form tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*, ROS), które generują stres oksydacyjny i osłabiają stabilność blaszki miażdżycowej<sup>219</sup>.

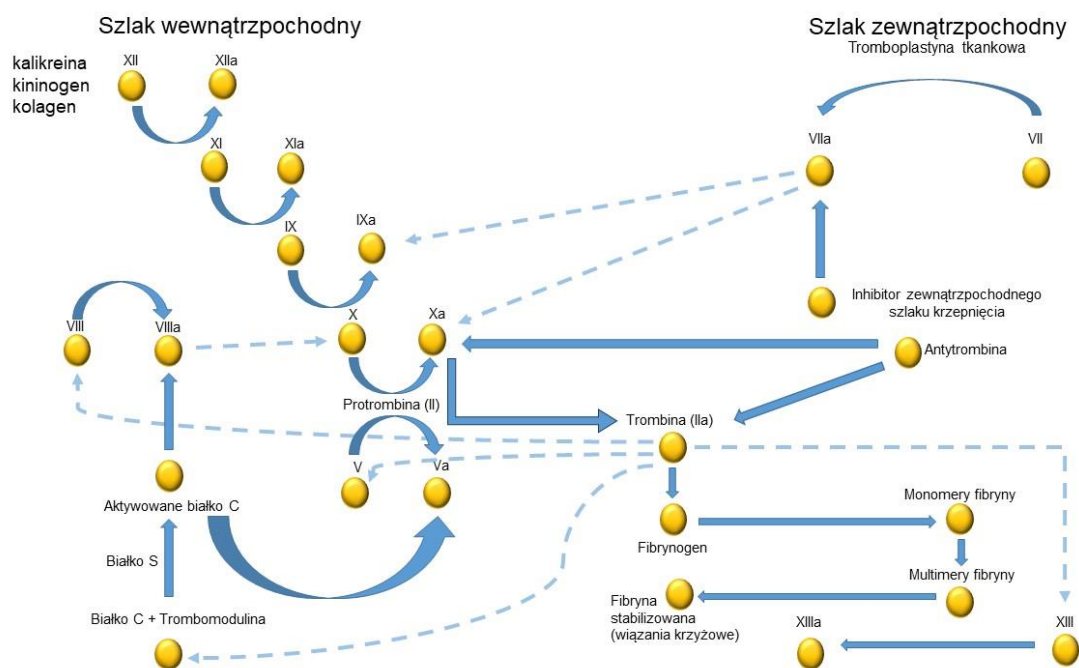
#### 12.4. Osoczowy układ krzepnięcia krwi

Proces krzepnięcia krwi polega na przekształceniu fibrynogenu, rozpuszczalnego białka osocza, w trójwymiarową sieć fibryny, która wzmacnia płytkowy czop hemostatyczny. W procesie tworzenia fibryny bierze udział kilkanaście różnych czynników, w tym 12 białek osocza znanych jako czynniki krzepnięcia, a TF, integralna część błony komórkowej, fosfolipidy błon komórkowych oraz jony wapnia. (Tabela D.1.).

**Tabela D.1.** Charakterystyka osoczowych czynników krzepnięcia<sup>39</sup>

Czynnik	Masa cząsteczkowa (kDa)	Gen kodujący	Lokalizacja genu	Stężenie w osoczu (µg/ml)	Czynność
fibrynogen (cz. I)	340			3000	prekursor fibryny, agregacja płytek krwi
łańcuch α		<i>FGA</i>	4q28		
łańcuch β		<i>FGB</i>	4q28		
łańcuch γ		<i>FGG</i>	4q28		
protrombina (cz. II)	72	<i>F2</i>	11p11-q12	100	proenzym
cz. V (proakceleryna)	330	<i>F5</i>	1q24	10	kofaktor
cz. VII (prokonwertyna)	50	<i>F7</i>	13q34-qter	0,5	proenzym
cz. VIII (globulina antyhemofilowa A)	330	<i>F8</i>	Xq28	0,1	kofaktor
cz. IX (czynnik Christmasy, globulina antyhemofilowa B)	56	<i>F9</i>	Xq27.1-q27.2	5	proenzym
cz. X (czynnik Stuarta)	56	<i>F10</i>	13q34-qter	10	proenzym
cz. XI	160	<i>F11</i>	4q34-q35	5	proenzym
cz. XII (czynnik Hagemana)	80	<i>F12</i>	5q33-qter	30	proenzym
cz. XIII	320			60	stabilizacja fibryny
łańcuch A		<i>F13A1</i>	6p25.3-p24.3		
łańcuch B		<i>F13B</i>	1q31-q31.2		
cz. tkankowy (TF)	45	<i>F3</i>	1p22-p21	0,1a	kofaktor
cz. von Willebranda (vWF)	225 × n	<i>vWF</i>	12p13.3	10	adhezja płytek krwi

Czynniki krzepnięcia II, VII, IX, X, XI, XII oraz prekalikreina występują w osoczu jako nieaktywne proenzymy, znane jako zymogeny. Ich aktywacja zachodzi poprzez ograniczoną proteolizę, co prowadzi do przekształcenia ich w aktywne proteazy. Każdy zymogen jest podstawą dla wcześniej aktywowanego enzymu, co prowadzi do tworzenia kolejnych enzymów. W wyniku każdego etapu reakcji dochodzi do zwiększenia ilości aktywnych cząsteczek, gdyż niewielka ilość enzymu może hydrolizować większą liczbę cząsteczek substratu. Proces krzepnięcia krwi jest skomplikowaną reakcją kaskadową (Rycina D.4). Czynniki V, VIII oraz wielkocząsteczkowy kininogen nie występują w postaci proenzymów, ale działają jako kofaktory, przyspieszając kolejne etapy aktywacji procesu krzepnięcia. Fibrynogen pełni rolę podstawowej jednostki budulcowej w tworzeniu skrzepu fibrynowego, natomiast czynnik XIII odpowiada za stabilizację tego skrzepu<sup>39</sup>.



**Rycina D.4.** Kaskada układu krzepnięcia - szlak aktywacji krzepnięcia [autorski rysunek]

W mechanizmie zewnątrzpochodnym proces krzepnięcia krwi inicjowany jest poprzez utworzenie kompleksu TF z aktywnym czynnikiem VII (VIIa). Około 1-2% cząsteczek czynnika VII w krążeniu krwi występuje w postaci aktywnej. Po związaniu z TF, czynnik VIIa ulega zmianie konformacyjnej, co odsłania jego miejsce aktywne. Ta reakcja zachodzi przy udziale jonów wapnia, na powierzchni komórek, których błony dostarczają fosfolipidów o ujemnym ładunku. Połączenie TF-VIIa prowadzi do przekształcenia czynnika IX w IXa oraz czynnika X w Xa. Czynnik Xa, nawet bez swojego kofaktora – czynnika Va – generuje

niewielką ilość trombiny. Ta ilość jest zbyt mała, by utworzyć stabilną fibrynę, ale wystarczająca do aktywacji PLT, oddzielenia czynnika VIII od vWF oraz aktywacji czynników V, VIII i XI. Bezpośrednio po wytworzeniu niewielkiej ilości trombiny, kompleks Xa-VIIa-TF jest dezaktywowany przez inhibitor szlaku krzepnięcia zależnego od inhibitorów szlaku czynnika tkankowego (ang. *Tissue Factor Pathway Inhibitor*, TFPI). Natomiast czynnik IXa, powstały w wyniku działania kompleksu TF-VIIa, tworzy na powierzchni aktywowanych płytek krwi kompleks z czynnikiem VIII (VIIIa), również aktywowanym przez generowaną wcześniej niewielką ilość trombiny, oraz z czynnikiem X. W kompleksie nazywanym tenazą, czynnik X ulega aktywacji do Xa. Następnie, czynnik Xa na powierzchni płytek krwi tworzy kompleks z aktywowanym (również przez trombinę) czynnikiem V (Va) oraz protrombiną. Kompleks ten jest nazywany protrombinazą. W wyniku tej reakcji tworzy się duża ilość trombiny, zdolna do utworzenia stabilnej fibryny. W procesie krzepnięcia krwi *in vivo*, czynniki XII, prekalikreina i kininogen wielkocząsteczkowy nie odgrywają znaczącej roli, dlatego osoby z niedoborem tych białek nie wykazują skłonności do nadmiernego krwawienia<sup>220</sup>. Procesy krzepnięcia krwi mają miejsce na powierzchni komórek, które dostarczają TF lub fosfolipidy o ujemnym ładunku, co stanowi podstawę dla teorii komórkowej krzepnięcia krwi Hoffmana<sup>221</sup>, dzielącej krzepnięcie na trzy fazy: inicjacji, wzmocnienia i propagacji. Teoria ta jest rozwinięciem koncepcji kaskadowej.

W ostatnim etapie procesu krzepnięcia, fibrynogen przekształcany jest w trójwymiarową sieć fibryny. Trombina oddziela od fibrynogenu dwie pary małych peptydów, zwanych fibrynopeptydami A i B. Cząsteczki fibrynogenu pozbawione fibrynopeptydów, nazywane monomerami fibryny, spontanicznie polimeryzują, tworząc sieć przestrzenną fibryny. Końcowym krokiem jest stabilizacja polimeru fibryny. Czynnik XIII, aktywowany przez trombinę, staje się enzymem transglutaminazy (XIIIa), który tworzy kowalencyjne wiązania krzyżowe między włóknami fibryny. Dzięki temu fibryna staje się bardziej odporna na deformacje mechaniczne, mniej podatna na rozkład enzymatyczny (fibrylizę) i w przeciwieństwie do fibryny powstałej w nieobecności czynnika XIIIa, nie rozpuszcza się w roztworze mocznika<sup>38</sup>. Czynnik vWF pełni podwójną rolę w procesie hemostazy: uczestniczy w tworzeniu płytkowego czopu hemostatycznego, umożliwiając adhezję PLT do podśródbłonkowej macierzy w obszarze uszkodzenia naczynia, a także tworzy kompleks z czynnikiem VIII krzepnięcia, co chroni go przed proteolitycznym rozkładem i szybkim usunięciem z krwiobiegu.

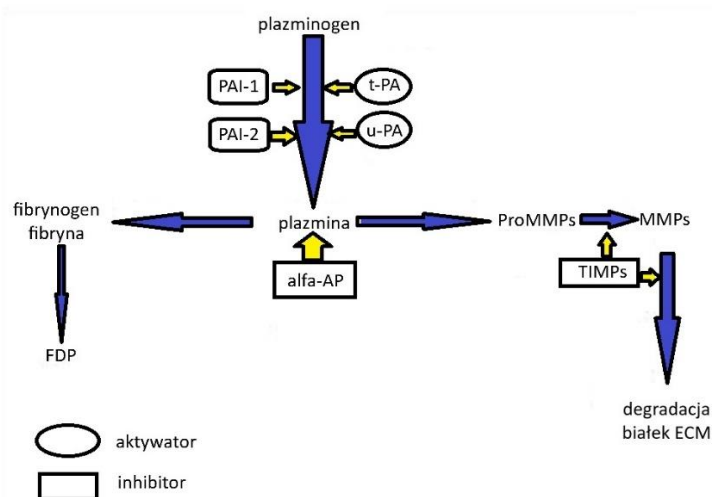
Endogenne inhibitory krzepnięcia pełnią istotną rolę w kontrolowaniu działania trombiny w obszarze uszkodzonej ściany naczynia, zapobiegając nadmiernemu wzrostowi

czopa hemostatycznego. Niedobór lub zaburzenia funkcji tych inhibitorów mogą prowadzić do skłonności do tworzenia zakrzepów, które zawężają światło naczynia. Kluczowymi endogennymi inhibitorami krzepnięcia krwi są TFPI, antytrombina (ang. *Antithrombin*, AT), białko C (ang. *Protein C*, PC) oraz białko S (ang. *Protein S*, PS)<sup>38</sup>. TFPI jest białkiem syntetyzowanym w wątrobie, śródbłonku naczyniowym i megakariocytach, występuje głównie w osoczu w formie związanej z lipoproteinami. W miejscach uszkodzenia ściany naczyniowej, gdzie gromadzą się aktywowane PLT, obserwuje się duże stężenia TFPI. Białko to hamuje proces krzepnięcia, inaktywując kompleksy czynników VIIa, Xa i TF. Bardzo ważną rolę w hamowaniu krzepnięcia krwi odgrywa antytrombina. Jest ona jednołańcuchową glikoproteina, wytwarzaną w wątrobie<sup>222</sup>. Antytrombina łączy się stechiometrycznie (1:1) z kompleksem i dezaktywuje trombinę oraz czynniki Xa, IXa, XIa i XIIa, a także czynnik VIIa związany z TF. Białka C i S są komponentami tzw. układu inhibitorowego białka C. Oprócz nich, w skład tego układu wchodzi jeszcze dwa inne białka – trombomodulina oraz śródbłonkowy receptor białka C. Uruchamianie układu białka C zachodzi po pojawieniu się trombiny w krwiobiegu. Po związaniu się trombiny z trombomoduliną na komórkach śródbłonka, traci ona zdolność do koagulacji fibrynogenu, aktywacji innych czynników krzepnięcia i PLT, a równocześnie przekształca białko C w aktywowane białko C (ang. *Activated Protein C*, APC). APC, współdziałając z białkiem S, hamuje krzepnięcie poprzez częściową proteolizę czynników krzepnięcia Va i VIIIa. Ponadto, aktywuje fibrylizę.

### **12.5. Osoczowy układ fibrylizy**

Fibrylizacja utrzymuje płynność krwi w łożysku naczyniowym poprzez rozpuszczanie śródnaczyniowych złogów fibryny. Podstawowy mechanizm fibrylizacji polega na stopniowej proteolizie fibryny przez plazminę powstającą z plazminogenu – wątrobowego proenzymu<sup>222</sup> (Rycina D.5.).





Rycina D.5. Schemat układu fibrynolitycznego [autorski rysunek]

## 12.6. Białka zaangażowane w proces miażdżycy

Aktywacja plazminogenu może następować dwoma szlakami: wewnętrznym i zewnętrznym. Zewnętrzna aktywacja układu fibrynolizy przebiega z udziałem tkankowego aktywatora plazminogenu (ang. *tissue Plasminogen Activator*, tPA), uwalnianego z naczyniowego śródbłonka w wyniku jego uszkodzenia, wskutek stresu emocjonalnego lub wysiłku fizycznego. Czynnikiem ten (należący do proteaz serynowych) łączy się z fibryną wskutek czego przekształca plazminogen w plazminę, głównie w miejscu odkładania się złogów fibryny. Istotną rolę w fibrynolizie odgrywa również APC. Białko to pobudza fibrynolizę poprzez hamowanie inhibitorów tPA, natomiast trombina osłabia fibrynolizę poprzez pobudzenie aktywowanego przez trombinę inhibitora fibrynolizy (ang. *Thrombin Activated Fibrinolysis Inhibitor*, TAFI). W wyniku trawienia przez plazminę fibrynogenu i fibryny powstają wielko- i drobnocząsteczkowe produkty degradacji tych białek (ang. *fibrinogen/fibrin degradation products*, FDP), oznaczane jako fragmenty X,Y,D i E. Podczas trawienia fibryny stabilizowanej, zamiast fragmentu D, powstaje podwójny fragment D (D-dimer), w którym dwie cząsteczki połączone są wiązaniem krzyżowym. Głównymi inhibitorami aktywatorów plazminogenu są PAI-1 i PAI-2 (ang. *Plasminogen Activator Inhibitor* -1, -2). PAI-1 jest wytwarzany w komórkach mięszu wątroby, śródbłonka i megakariocytach. Po uwolnieniu ze śródbłonka wiąże on i inaktywuje tPA i uPA. PAI-2 występuje natomiast w łożysku, monocytach oraz makrofagach. Aktywator ten szybciej inaktywuje uPA niż tPA. Głównym osoczymym inhibitorem plazminy jest  $\alpha_2$ - antyplazmina (syntetyzowana w wątrobie), która tworzy z plazminą stechiometryczny kompleks. Z chwilą

wyczerpania się  $\alpha$ 2- antyplazminy, pojawiająca się w osoczu plazmina jest zobojętniana przez  $\alpha$ 2- makroglobulinę. Najczęściej stosowane leki antyfibrynolityczne, kwas  $\epsilon$ -aminokapronowy i kwas traneksamowy, hamują przyłączanie plazminogenu do fibryny przez blokowanie w cząsteczce plazminogenu miejsc wiążących lizynę. Natomiast bezpośrednim inhibitorem plazminy jest inny lek – aprotynina. Przepływ krwi w naczyniach prowadzi do relatywnie szybkiego rozrzedzenia aktywnych czynników krzepnięcia w obszarze uszkodzenia ściany naczynia, co dodatkowo zmniejsza ryzyko przekształcenia fizjologicznego skrzepu w zakrzep. Aktywne czynniki krzepnięcia są następnie rozkładane przez komórki miększu wątroby i usuwane przez komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego<sup>38</sup>.

Jednym z białek kaskady krzepnięcia, które odgrywa istotną rolę w miażdżycy, jest trombomodulina. Usunięcie tego białka z błony śródbłonka w trakcie tworzenia się blaszek miażdżycowych sprzyja intensyfikacji procesów proaterogennych. Dochodzi do zakłócenia funkcji śródbłonka oraz uszkodzenie jego bariery, wzmożonego stresu oksydacyjnego, aktywacji PLT i LEU inicjacji stanu zapalnego, apoptozy oraz rekrutacji i migracji VSMCs, a także indukcji angiogenezy. Wskazuje to na istotną rolę trombiny w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych<sup>223</sup>. Zarówno trombina, czynnik Xa, XIa, IXa, jak i plazmina wykazują aktywność enzymatyczną, aktywując składniki układu dopełniacza C3 i C5, co prowadzi do indukcji stanu zapalnego oraz chemotaksji komórek prozapalnych. Zmiany w obrębie blaszek miażdżycowych charakteryzują się zwiększoną ekspresją receptorów dla anafilatoksyn C3R i C5R, szczególnie w: makrofagach, komórkach śródbłonka, VSMCs oraz na powierzchni limfocytów T i komórek tłuszcznych. Zaobserwowano również, że podwyższone poziomy fibrynogenu w osoczu, kluczowego czynnika wpływającego na ilość produkowanej trombiny, silnie korelują z intensyfikacją procesów zwapnień w tętnicach wieńcowych oraz zwiększeniem grubości błony wewnętrznej i środkowej, stanowiąc wskaźniki wczesnej miażdżycy<sup>224</sup>. Fibrynogen może wpływać na fenotyp blaszek miażdżycowych poprzez zwiększanie przepuszczalności komórek śródbłonka, co prowadzi do gromadzenia się LDL w przestrzeniach międzykomórkowych, tworzenia komórek piankowatych, stymulację migracji monocytów i VSMCs, nasilanie reaktywności lub agregacji PLT, w konsekwencji przyczyniając się do rozwoju stanu zapalnego<sup>225</sup>. Podobnie podwyższone poziomy D-dimerów w osoczu korelują z nasiloną reakcją zapalną oraz zwiększonym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych, co czyni je biomarkerami zakrzepicy spowodowanej miażdżycą<sup>224</sup>. Ponadto aktywacja czynnika XIII, inicjuje tworzenie wiązań krzyżowych między łańcuchami fibryny, co stabilizuje skrzep, a także sprzyja powstawaniu nadmiernie aktywnych dimerów receptora

angiotensyny II typu 1, prowadząc do przewlekłej stymulacji monocytów oraz nasilenia procesów miażdżycowych<sup>226</sup>.

Proces wewnątrzpochoдного krzepnięcia może być także istotny w patogenezie zakrzepicy, stąd farmakologiczne zahamowanie aktywacji czynnika XII stanowi potencjalny cel terapeutyczny. Czynniki XII wpływa na produkcję bradykininy, reguluje napięcie i przepuszczalność naczyń, a także aktywuje układy dopełniacza i fibrylizy oraz ułatwia syntezę tPA w komórkach śródbłonna. Układ kalikreiny stymuluje aktywację aktywatora plazminogenu typu urokinazowego i plazminogenu<sup>227</sup>. Nieprawidłowo sfałdowane białka, występujące w zmienionych miażdżycowo tętnicach, mogą również aktywować czynnik XII, prowadząc do wytwarzania kalikreiny bez wyzwania procesów krzepnięcia<sup>228</sup>. Stężenie kalikreiny w tkankach i prekalikreiny w osoczu koreluje z nasileniem chorób układu krążenia, a te czynniki odgrywają istotną rolę w procesach naprawczych naczyń<sup>229</sup>.

Podobnie TFPI powszechnie występujący w tętnicach, wykazuje zwiększoną ekspresję w obszarach zmian miażdżycowych<sup>230</sup>. TFPI jest obecny w komórkach śródbłonna, VSMCs i makrofagach w obszarach włóknistej otoczki oraz na obrzeżach blaszek miażdżycowych. Często występuje wraz z TF, przy czym jego aktywność jest niższa w obszarach zmian miażdżycowych<sup>132</sup>, co sugeruje, że TFPI odgrywa rolę nie tylko w regulacji działania TF w kontekście tworzenia skrzeplin, ale także kontroluje szlaki sygnałowe proaterogenne indukowane przez TF. TFPI jest również skutecznym inhibitorem metaloproteinaz macierzy, które uczestniczą w destabilizacji blaszek miażdżycowych i powikłaniach zakrzepowo-miażdżycowych. Stężenie TFPI w osoczu stanowi wskaźnik stopnia dysfunkcji śródbłonna naczyń: wysokie stężenie całkowitego i wolnego TFPI wiąże się ze zwiększonym nasileniem zmian miażdżycowych i zwapnieniami w tętnicach wieńcowych, podczas gdy niskie stężenie całkowitego TFPI związane jest z większym ryzykiem zakrzepicy w miażdżycy<sup>231,232</sup>.

Białko C wykazuje właściwości przeciwwakrzepowe, przeciwapoptotyczne i przeciwzapalne, a także stabilizuje interakcje z barierą śródbłonną<sup>233</sup>. Zmniejszenie lokalnej ekspresji receptora białka C w śródbłonnku prowadzi do osłabienia procesów przeciwmiażdżycowych i przeciwwakrzepowych, spowodowanej np. zwiększoną utratą trombomoduliny z uszkodzonego śródbłonna, obecności dużej liczby złogów LDL oraz lokalnego stanu zapalnego w obrębie ścian naczyniowych<sup>233</sup>.

Białko S łączy się z regulatorem układu dopełniacza C4b, formując kompleks, który osadza się na powierzchni komórek podlegających apoptozie, co zwiększa zdolność fagocytarną makrofagów<sup>234</sup>. Ponadto białko S hamuje ekspresję receptorów typu A w makrofagach, co ogranicza wychwyt acetylowanego cholesterolu LDL, redukując

gromadzenie lipidów wewnątrzkomórkowych<sup>235</sup>. Niedobór dziedziczny białka C i S wiąże się z zwiększonym ryzykiem wystąpienia zdarzeń zakrzepowo-zatorowych<sup>236</sup>. Poprawne funkcjonowanie układu fibrynolitycznego odgrywa istotną rolę w rozpuszczaniu zakrzepu powstałego po rozerwaniu blaszki miażdżycowej. Procesy takie jak rekrutacja i migracja komórek zapalnych, ułatwianie osadzania się złogów fibryny, zwiększona aktywność trombiny, destabilizacja PLT oraz promowanie tworzenia się zakrzepów na blaszkach miażdżycowych są kluczowymi elementami tego systemu<sup>237</sup>. Trombina wraz z TF stymuluje ekspresję PAI-1, który (uwalniany również przez aktywowane PLT), posiada właściwości prozapalne: pobudza aktywność makrofagów, indukuje proliferację, migrację oraz apoptozę VSMCs, oraz wpływa na gromadzenie się macierzy pozakomórkowej w blaszce miażdżycowej<sup>237,238</sup>. Podobnie plazmina, nie tylko przyczynia się do rozpuszczania zakrzepów, ale także nasila procesy zapalne oraz degradację macierzy pozakomórkowej. Fibrynogen i fibryna z kolei przyczyniają się do zwiększonego wydzielania cytokin prozapalnych i chemokin<sup>238</sup>.

Właściwości pro-miażdżycowe trombiny głównie wynikają z aktywacji receptorów PAR, których ekspresja na PLT jest wzmożona podczas rozwoju miażdżycy. Inhibicja receptora PAR-1, uniemożliwia stymulujący wpływ trombiny na PLT, przez co stanowi obiecującą strategię terapeutyczną w prewencji pierwotnej i wtórnej miażdżycy<sup>239</sup>. W badaniach klinicznych drugiej fazy jednego z doustnych antagonistów receptora PAR-1 (worapaksar) wykazano, że związek ten obniża liczbę zawałów serca niepowodujących zgony pacjentów z objawami choroby wieńcowej, którzy mieli zaplanowaną przezskórną interwencję wieńcową (ang. *Percutaneous Coronary Interventions*, PCI). Blokowanie PAR-1 nie prowadzi do hamowania produkcji fibryny zależnej od trombiny, co oznacza, że nie obserwuje się powikłań krwotocznych. Wyniki badań przedklinicznych nad antagonistą PAR-1 (E-5555) są interesujące ze względu na ograniczenie pro-miażdżycowych właściwości trombiny, które wykraczają poza hamowanie aktywacji PLT. W badaniach tych zauważono, że hamuje on uwalnianie rozpuszczalnego ligandu receptora CD40s z PLT oraz IL-6 i selektyny P z komórek mięśni gładkich tętnic wieńcowych i komórek śródbłonna<sup>239</sup>.

**Tabela D.2. Analiza interakcji**

Wpływ względnej ilości mikrocytów na modulację szansy występowania MZ względem MC przez PAR-1+TRAP (Rycina 4.12A-D)										
Efekt/interakcja	Badana kategoria	$\beta_i$	$\beta_i$ błąd standardowy	Statystyka Walda	$\beta_i$ - 95% CI	$\beta_i$ 95% CI	p	iloraz szans (OR)	OR - 95% CI	OR 95% CI
Wyraz wolny		0,157	0,296	0,281	-0,423	0,738	0,596	1,170	0,655	2,091
Mikrocytki [%]		-0,042	0,026	2,657	-0,093	0,009	0,103	0,959	0,911	1,009
PAR-1+TRAP [%]		<b>-0,057</b>	<b>0,027</b>	<b>4,443</b>	<b>-0,111</b>	<b>-0,004</b>	<b>0,035</b>	<b>0,944</b>	<b>0,895</b>	<b>0,996</b>
mikrocytki [%]*(PAR-1+TRAP [%])		<b>0,005</b>	<b>0,002</b>	<b>5,449</b>	<b>0,001</b>	<b>0,009</b>	<b>0,020</b>	<b>1,005</b>	<b>1,001</b>	<b>1,009</b>
Wpływ BMI na modulację szansy występowania MZ względem MC przez PAR-1+TRAP (Rycina 4.12 E-F)										
Efekt/interakcja	Badana kategoria	$\beta_i$	$\beta_i$ błąd standardowy	Statystyka Walda	$\beta_i$ - 95% CI	$\beta_i$ 95% CI	p	iloraz szans (OR)	OR - 95% CI	OR 95% CI
Wyraz wolny		<b>0,592</b>	<b>0,289</b>	<b>4,203</b>	<b>0,026</b>	<b>1,158</b>	<b>0,040</b>	<b>1,808</b>	<b>1,026</b>	<b>3,185</b>
Mikrocytki [%]		-0,039	0,028	1,953	-0,094	0,016	0,162	0,962	0,910	1,016
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]		<b>-0,222</b>	<b>0,088</b>	<b>6,438</b>	<b>-0,394</b>	<b>-0,051</b>	<b>0,011</b>	<b>0,801</b>	<b>0,674</b>	<b>0,951</b>
Mikrocytki [%]*BMI [kg/m <sup>2</sup> ]		<b>-0,022</b>	<b>0,010</b>	<b>4,740</b>	<b>-0,041</b>	<b>-0,002</b>	<b>0,029</b>	<b>0,978</b>	<b>0,959</b>	<b>0,998</b>
Wpływ interakcji między nikotynizmem, a wiekiem na modulację szansy występowania MZ względem MC										
Efekt/interakcja	Badana kategoria	$\beta_i$	$\beta_i$ błąd standardowy	Statystyka Walda	$\beta_i$ - 95% CI	$\beta_i$ 95% CI	p	iloraz szans (OR)	OR - 95% CI	OR 95% CI
Wyraz wolny		-0,156	0,351	0,197	-0,845	0,533	0,657	0,856	0,430	1,704
Nikotynizm	<b>Yes</b>	<b>1,210</b>	<b>0,586</b>	<b>4,255</b>	<b>0,060</b>	<b>2,359</b>	<b>0,039</b>	<b>3,352</b>	<b>1,062</b>	<b>10,582</b>
Wiek [lata]		<b>-0,199</b>	<b>0,069</b>	<b>8,281</b>	<b>-0,335</b>	<b>-0,064</b>	<b>0,004</b>	<b>0,819</b>	<b>0,715</b>	<b>0,938</b>
Nikotynizm*Wiek [lata]		<b>0,201</b>	<b>0,095</b>	<b>4,467</b>	<b>0,015</b>	<b>0,387</b>	<b>0,035</b>	<b>1,222</b>	<b>1,015</b>	<b>1,473</b>

### 13. OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE

#### Granty badawcze:

**SONATA 17 (UMO-2021/43/D/NZ5/02471):** Wpływ COVID-19 na poziom końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGEs) i innych wykładników stresu oksydacyjnego u pacjentów z cukrzycą i ze schyłkową niewydolnością nerek na tle cukrzycy. Kierownik projektu w UMW: Bronowicka-Szydełko Agnieszka Wiesława, data rozpoczęcia 03-10-2022, data zakończenia 02-10-2025, w trakcie realizacji

**PRELUDIUM (UMO-2012/05/N/NZ5/00836)** Badanie procesów glikacji i stresu oksydacyjnego oraz patologii metabolizmu węglowodanów i tłuszczów we krwi. Kierownik projektu w UMW: Bronowicka-Szydełko Agnieszka Wiesława, data rozpoczęcia 11-02-2013, data zakończenia 10-02-2018.

**GRANT UCZELNIANY (NR SUBK.A410.24.013):** Wstępna weryfikacja znaczenia diagnostycznego wskaźników wczesnego zaburzenia funkcji nerek i ostrego zaburzenia funkcji nerek w powikłaniach post-COVID19 u pacjentów z cukrzycą typu 2. Kierownik projektu w UMW: Bronowicka-Szydełko Agnieszka Wiesława, data rozpoczęcia 01-01-2024, data zakończenia 31-12-2024, w trakcie realizacji.

**GRANT UCZELNI NR 1634:** Analiza ekspresji genu homologu białka PAR-5 (białko 14-3-3) u pacjentów z miażdżycą zarostową i makroangiopatią. Kierownik projektu w UMW: Dorota Bednarska-Chabowska, data rozpoczęcia 03-10-2007, data zakończenia 02-10-2009.

**Wyróżnienia:** Srebrna Odznaka Honorowa, 2006 r. – odznaczenie uczelniane przyznane przez Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Ukończone studia podyplomowe w Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu im. Piastów Śląskich 2022/2023. "Badania Kliniczne - projektowanie, organizacja i realizacja" – 2 semestry. Kwalifikacje: Projektowanie, prowadzenie i zarządzanie badaniami klinicznymi.

**H -Index: 5**

**IF:21,127**

**MNiSW: 556**

**Publikacje: 12**

Tupikowski K., Jakobsche-Policht U., Bittner J., Ptaszkowski K., Hałoń A., Zdrojowy R., Adamiec R., Gosk-Bierska I. [i in.]: The influences of selected clotting and fibrinolysis factors on survival of patients with kidney tumors - a prospective study, Archives of Medical Science,

---

2023, vol. 19, nr 4, s.1003-1010. DOI:10.5114/aoms/128845, 100 punktów, KANG(57.14) KURO100(14.28) LPATKD200(14.28) PFIZBIOM(14.28)

Bronowicka-Szydełko A., Krzystek-Korpacka M., Gacka M., Pietkiewicz J., Jakobsche-Policht U. [i in.]: Association of novel advanced glycation end-product (AGE10) with complications of diabetes as measured by enzyme-linked immunosorbent assay, *Journal of Clinical Medicine*, 2021, vol. 10, nr 19, art.4499 [20 s.]. DOI:10.3390/jcm10194499, 140 punktów, KANG(28.0) LBIMBIOCH(84.0) (28.0)

Bronowicka-Szydełko A., Krzystek-Korpacka M., Kuzan A., Gostomska-Pampuch K., Gacka M., Jakobsche-Policht U., Adamiec R., Gamian A.: Non-standard AGE4 epitopes that predict polyneuropathy independently of obesity can be detected by slot dot-blot immunoassay, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2020, vol. 29, nr 1, s.91-100. DOI:10.17219/acem/112612, 70 punktów, KANG(17.5) LBIOCH(43.75) (8.75)

Bronowicka-Szydełko A., Krzystek-Korpacka M., Kuzan A., Gostomska-Pampuch K., Gacka M., Jakobsche-Policht U., Adamiec R., Gamian A.: Advanced glycation end products derived from serum albumin modification by glucose (AGE-1) reflect clustering of lipid-associated metabolic abnormalities and are decreased in patients treated with acarbose: A cross-sectional study, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2020, vol. 29, nr 3, s.275-284. DOI:10.17219/acem/112611, 70 punktów, KANG(17.5) LBIOCH(43.75) (8.75)

Fiodorenko-Dumas Ź., Dumas I., Mastej K. [i in.]: Receptor GP IIb/IIIa as an indicator of risk in vascular events, *Clinical and Applied Thrombosis-Hemostasis*, 2019, vol. 25, art.1076029619845056 [8 s.]. DOI:10.1177/1076029619845056, 70 punktów, PFIZJO(35.0) PFIZKLF(35.0)

Małecki R., Gacka M., Kuliszkiwicz-Janus M., Jakobsche-Policht U., Kwiatkowski J., Adamiec R. [i in.]: Altered plasma fibrin clot properties in essential thrombocythemia, *Platelets*, 2016, vol. 27, nr 2, s.110-116. DOI:10.3109/09537104.2015.1042967, 25 punktów, KANG(16.66) KHEMA(8.33)

Jakobsche-Policht U., Bednarska-Chabowska D., Sadakierska-Chudy A., Adamiec-Mroczek J.: Expression of the PAR-1 protein on the surface of platelets in patients with chronic peripheral arterial insufficiency - preliminary report, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2014, vol. 23, nr 2, s.159-167, 15 punktów, KANG(7.5) KOK(3.75) LMEDSZDT(3.75)

Małecki R., Fiodorenko-Dumas Ź., Jakobsche-Policht U., Małodobra M., Adamiec R.: Altered monocyte calcium-sensing receptor expression in patients with type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis, *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2013, vol. 64, nr 4, s.521-527, 20 punktów, KANG(12.0) LMEDSZDT(4.0) PFIZJO(4.0)

Kluz J., Kopeć W., Jakobsche-Policht U., Adamiec R.: Circulating endothelial cells, endothelial apoptosis and soluble markers of endothelial dysfunction in patients with systemic lupus erythematosus-related vasculitis, *International Angiology*, 2009, vol. 28, nr 3, s.192-201, 20 punktów, KANG(15.0) KNEFR(5.0)

Zdrojowy K., Knapik-Kordecka M., Jakobsche-Policht U., Adamiec R.: Ocena wybranych cytokin prozapalnych w przewlekłym niedokrwieniu kończyn w przebiegu makroangiopatii cukrzycowej i miażdżycy zarostowej, *Polski Merkuriusz Lekarski*, 2009, vol. 27, nr 162, s.458-462, 6 punktów, KANG(6.0)

Małecki Rafał, Adamiec Rajmund, Jakobsche Urszula. Expression of extracellular calcium-sensing receptor in peripheral blood monocytes in patients with arteriosclerosis obliterans, diabetes mellitus type 2 complicated with macroangiopathy in the context of the selected proinflammatory factors *Diabetologia Doswiadczalna i Kliniczna*, 2007, vol. 17, nr 5, s. 235-239, 5 punktów.

Rabczyński Maciej, Jakobsche Urszula, Adamiec Rajmund. Serologiczne wykładniki przewlekłego zakażenia *Chlamydia pneumoniae* i Cytomegalowirusem (CMV) u chorych na miażdżycę zarostową - doniesienie wstępne. *Przegląd Lekarski*, 2007, vol. 64, nr 6, s. 416-418, 5 punktów.

### **Plakaty i abstrakty: 9**

Bronowicka-Szydełko A., Kuzan A., Madziarska K., Krzystek-Korpaczka M., Gacka M., Pietkiewicz J., Jakobsche-Policht U., Adamiec R. [i in.]: Higher level of novel advanced glycation end-product (AGE10) is observed in some complications of type 2 diabetes, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2023, vol. 32, nr 3 spec., s.53, 0 punktów.

Bronowicka-Szydełko A., Kuzan A., Gacka M., Jakobsche-Policht U., Adamiec R., Gamian A. [i in.]: Znaczenie diagnostyczne końcowych produktów zaawansowanej glikacji formowanych podczas modyfikacji albuminy przez metyloglioksal (AGE-4), W: II Konferencja Szkoleniowa "Multi-omika - biologia systemów w badaniach medycznych". Wrocław, 21 czerwca 2018 r. Książka abstraktów, 2018, s.9, 0 punktów

Stępniewski P., Małecki R., Stępniewska M., Jakobsche-Policht U., Kuźnik E. [i in.]: Influence of angiogenin and advanced glycation end-products on the development of increased vascular stiffness, subclinical atherosclerosis and cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes mellitus type 2, W: iMEDIC - International MEDical Interdisciplinary Congress 2016. Bydgoszcz [11 June 2016]. Abstract book / Sokołowska Natalia, Stemplowski Wojciech (red.), 2016, Bydgoszcz, Dział Wydawnictw Collegium Medicum, s.34, ISBN 978-83-943177-3-7, 0 punktów

Bronowicka-Szydełko A., Kuzan A., Gacka M., Pietkiewicz J., Jakobsche-Policht U., Adamiec R., Gamian A. [i in.]: Slot dot-blot as an effective method for detection of ages present in sera in trace amounts, W: 3rd World Congress on Maillard Reaction & Glycation "Targeting glycation in health & diseases". Budapest, Hungary, May 26-27, 2016. Abstracts book & scientific agenda, 2016, s.64, 0 punktów

Bronowicka-Szydełko A., Pietkiewicz J., Gacka M. [i in.]: Mechanisms that prevent the accumulation of advanced glycation end-products (AGEs) in tissues, W: The challenges of contemporary science : theory and applications [CD-ROM] / Markowski Konrad Andrzej,



---

Gajadhur Marta, Badyda Artur Jerzy (red.), 2014, Warszawa, Fundacja na Rzecz Młodych Naukowców, s.23-25, ISBN 978-83-935118-1-5, 0 punktów

Jakobsche-Policht U., Bednarska-Chabowska D., Sadakierska-Chudy A., Adamiec R.: Udział białka PAR-1 w aktywacji płytek krwi u pacjentów z przewlekłą obwodową niewydolnością tętniczą (PAOD) w przebiegu cukrzycy - doniesienie wstępne, W: VI Karpacka Konferencja Diabetologiczna. Karpacz, 17-20 maja 2012 r. Streszczenia prac oryginalnych, 2012, s.21 poz.S18, 0 punktów

Jakobsche-Policht U., Bednarska-Chabowska D., Adamiec R.: Ekspresja białka PAR-1 w grupie chorych z miażdżycą zarostową i makroangiopatią cukrzycową, Acta Angiologica, 2009, vol. 15, nr suppl., s.D45-D46 poz.34, 0 punktów

Kluz J., Jakobsche-Policht U., Adamiec R.: Ekspresja LFA-1 i VLA-4 na monocytach krwi obwodowej, krążące komórki śródbłónka oraz stężenie IL-1 $\beta$  i IL-10 w surowicy krwi chorych na SLE z zapalną mikroangiopatią, Acta Angiologica, 2009, vol. 15, nr suppl., s.D16-D17 poz.4, 0 punktów

Kluz J., Gacka M., Jakobsche-Policht U., Adamiec R.: Vasculitis w przebiegu układowego toczenia rumieniowatego (SLE) - ocena aktywacji monocytów krwi obwodowej i stopnia dysfunkcji komórek śródbłónka. Implikacje patogenetyczne przedwczesnej miażdżycy, Acta Angiologica, 2008, vol. 14, nr suppl., s.A51-A52 poz.19, 0 punktów