



UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Karolina Maria Gawryś

Klinika Chorób Wewnętrznych
4 Wojskowy Szpital Kliniczny z Polikliniką we Wrocławiu
lekarz rezydent

*„Ocena zmienności proteomu i funkcji płytek krwi u pacjentów w ostrej fazie
udar niedokrwiennego mózgu”*

Rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych w dyscyplinie: medycyna.

Promotor:

Prof. Dr hab. Arkadiusz Derkacz
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych, Nadciśnienia Tętniczego
i Onkologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

Streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim

STRESZCZENIE

Wstęp: Udar mózgu, zaraz po chorobie niedokrwiennej serca, stanowi drugą, najczęstszą przyczynę zgonów i niepełnosprawności na świecie. Mimo to, w praktyce klinicznej, wciąż zauważalny jest brak biochemicznych markerów naczyniopochodnego uszkodzenia mózgu, które umożliwiłyby optymalizację procesu diagnostyczno-terapeutycznego. W patofizjologii incydentu niedokrwienego dużą rolę odgrywają płytki krwi. Pogłębienie wiedzy o ich roli i wyodrębnienie różnic w ich proteomie powinno umożliwić wykrycie nowych biomarkerów udaru mózgu oraz przyczynić się do zwiększenia skuteczności profilaktyki i efektywności terapii.

Cele pracy: Nadrzędnym celem przeprowadzonego badania było pogłębienie wiedzy o chorobie naczyniowej mózgu, jej patogenezie i przebiegu, stosując zasady medycyny translacyjnej. Jego realizacja opierała się na analizie zmienności proteomu i funkcji płytek krwi, na którą składała się ocena właściwości agregacyjnych i markerów aktywacji prozapalnej, pomiędzy grupą badaną a kontrolną oraz na dynamicznej ocenie zmian tych parametrów wśród osób z udarem OUN w ustalonych szeregach czasowych. Ponadto celem niniejszej pracy stała się identyfikacja białek płytek krwi będących potencjalnymi kandydatami na biomarkery udaru niedokrwienego oraz wyodrębnienie cech fenotypowych płytek związanych z wyższym ryzykiem incydentów zakrzepowych w łożysku naczyniowym.

Materiał i metody: Do grupy badanej zakwalifikowano 32 pacjentów (w wieku 29-80 lat) ze świeżo rozpoznanym udarem niedokrwinnym OUN. Grupę kontrolną stanowiło 29 ochotników, dobranych demograficznie do grupy badanej. Od pacjentów pobrana została krew w pierwszej, trzeciej i siódmej dobie hospitalizacji, natomiast w grupie kontrolnej jednokrotnie. Z pobranego materiału, z wyodrębnionej frakcji oczyszczonych płytek krwi, wykonane zostały testy agregometryczne, odzwierciedlające aktywację trombocytów oraz dokonano oceny proteomu płytek krwi za pomocą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (LC-MS). W pozostałym materiale (osocze i surowica) oznaczono parametry biochemiczne umożliwiające stratyfikację ryzyka sercowo-naczyniowego, zgodnie z obowiązującymi standardami Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego oraz markery aktywacji płytek krwi. Pracę zrealizowano w ramach projektu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (program Iuventus Plus, grant IP 2012 009472). Na badanie uzyskano zgodę o sygnaturze KB – 371/2018 wydaną przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Wyniki uzyskane w trakcie badań poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu Statistica 13.1 StatSoft®.

Wyniki: Zidentyfikowano dziesięć białek lub grup białek, których stężenia w płytkach krwi istotnie różniły się między grupami:

- Białko amyloidu β A4,
- Amyloidopodobne białko 2,
- Białko koaktozynopodobne,
- Albumina osoczowa,
- Czynniki 7 regulacji interferonu,
- Białko S zależne od witaminy K,

- Filamina A,B,C,
- Trombospondyna-1 i trombospondyna-2,
- Grupa białek histonowych (H2A typu 1, H2A typu 1-A, H2A typu 2B, H2A J, H2A v, z, x),
- Białko zasadowe płytek krwi

Ponadto wykazano, że udarowi niedokrwiennemu mózgu towarzyszy wzrost potencjału pro-oksydacyjnego, wyższe wartości sP-selektyny i niższe stężenie tromboksanu.

Wnioski: Jest to pierwsze badanie kliniczne, w którym oceniano zmiany zachodzące w proteomie ludzkich płytek krwi podczas ostrej fazy udaru niedokrwiennego mózgu oraz w interwałach czasowych po jego wystąpieniu, za pomocą wysoce powtarzalnej techniki LC-MS. Zidentyfikowane białka mogą być potencjalnymi kandydatami na biomarkery świeżego udaru niedokrwiennego mózgu, a także nowymi punktami dla uchwytu leków o działaniu neuroprotekcijnym. Ponadto obserwowane różnice w proteomie płytek krwi występujące w ostrej fazie choroby, mogą odzwierciedlać kaskadę zdarzeń związanych z ewolucją w czasie zmian niedokrwiennych OUN. Może to przyczynić się do lepszego zrozumienia patofizjologii udaru mózgu i być podstawą do podjęcia badań nad nowymi lekami o działaniu neuroprotekcijnym.

SUMMARY

Introduction: Stroke is the second most common cause of death and disability, as reported worldwide annually, and is placed right after the coronary artery disease. Nevertheless, in clinical practice, the biochemical markers of vascular brain damage that would allow optimizing the diagnostics and the therapeutic process are still missing. Platelets play an important role in the pathophysiology of vascular ischemia. The knowledge about their exact role and the variability of proteome should enable the discovery of some new stroke biomarkers as well as potential drug targets, contributing thus to increased effectiveness of prophylaxis and therapy.

Objectives: The main goal of the study was to improve the knowledge regarding brain vascular disease, its pathogenesis and clinical course, based on the principles of translational medicine. This was obtained using the analysis of the platelet proteome variability as well as changes in platelet function between the subjects in acute phase of stroke in comparison with the demographically-matched control group. Subsequently, a dynamic assessment of changes in these parameters among subjects with stroke in selected time intervals was performed. Following the analyses, this study aimed to identify platelet proteins as potential candidates for ischaemic stroke biomarkers or therapeutic drug targets and to identify some platelet phenotypic features which could be associated with higher risk for thrombotic events.

Material and methods: A total of 32 patients (aged 29-80 years) with newly diagnosed ischemic central nervous system stroke constituted the study group. The control group was formed by demographically matched 29 volunteers. The blood was collected from the patients during the first, third and seventh day of hospitalization, and once in the control group. Afterwards, aggregometric tests reflecting thrombocyte activation were performed and platelet proteome was evaluated using the liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS). Subsequently, biochemical parameters allowing the stratification of cardiovascular risk according to the European Society of Cardiology guidelines as well as platelet activation markers were determined. The study was conducted as a part of the project financed by the Polish Ministry of Science and Higher Education (Iuventus Plus program, grant IP 2012 009472). The study protocol had been previously approved by the Bioethics Committee at the Wroclaw Medical University with the KB - 371/2018 signature. The statistical analysis was performed using Statistica 13.1 StatSoft® software.

Results: Ten proteins or groups of proteins were identified, with significantly different platelet concentrations between groups:

- Amyloid β A4 protein,
- Amyloid-like protein 2,
- Coactosin-like protein,
- Serum albumin,
- Interferon regulatory factor 7,
- Vitamin K-dependent protein S,
- Filamin-A, Filamin-B, Filamin-C,
- Thrombospondin--1 and Thrombospondin-2,

- Histone protein group (H2A type 1, H2A type 1-A, H2A type 2B, H2A J, H2A v, z, x) ,
- Platelet basic protein

Moreover, ischemic stroke is associated with increased plasma pro-oxidative potential, higher sP-selectin concentrations and lower plasma thromboxane level.

Conclusions: This is the first clinical study in which the changes in human platelet proteomes during the acute phase of ischemic stroke and in the selected time intervals were evaluated using a highly reproducible LC-MS technique. The identified proteins may be potential candidates for biomarkers of acute ischaemic stroke as well as new neuroprotective drugs targets. Moreover, the observed differences in platelet proteome in the acute phase of the disease may reflect the cascade of events related to the evolution of the ischemic lesions. This may contribute to a better understanding of stroke pathophysiology and form the basis for the research on new neuroprotective drugs.