

Molekularne mechanizmy wzmożonej aktywności pro-zakrzepowej płytek krwi w stwardnieniu rozsianym

Streszczenie

Stwardnienie rozsiane (MS) jest przewlekłą chorobą zapalną OUN, charakteryzującą się demielinizacją włókien istoty białej, spowodowaną rozpadem otoczki mielinowej. Uważa się, że rozwój procesów autoimmunologicznych, chroniczny stan zapalny i długotrwały wpływ stresu oksydacyjnego stanowią główne przyczyny demielinizacji, która w konsekwencji prowadzi do śmierci neuronów. Badania epidemiologiczne potwierdzają zwiększone ryzyko występowania incydentów niedokrwiennych związanych z patologiczną aktywnością pro-zakrzepową płytek krwi u pacjentów z MS, szczególnie w fazie progresywnej (PMS). Wskazuje to na zaburzenia hemostatycznej czynności płytek krwi w MS. Udział płytek w patogenezie MS obejmuje również ich interakcje z leukocytami oraz komórkami śródbłonna, prowadzące do naruszenia BBB i infiltracji limfocytów do miejsc tworzenia się ognisk demielinizacji w OUN. Ponadto, uczestnictwo płytek krwi w procesie neurodegeneracji obejmuje inicjowanie i rozwój procesów zapalnych oraz generowanie RFT.

Celem pracy było poznanie molekularnego podłoża podwyższonej aktywności pro-zakrzepowej płytek krwi występującej u pacjentów z PMS. W pierwszej kolejności ocenie poddano stan czynnościowy płytek krwi poprzez określenie ekspresji i stopnia reaktywności głównych receptorów powierzchniowych dla fizjologicznych agonistów płytkowych. Następnie podjęto próbę określenia zmian molekularnych fibrynogenu (jako białka kluczowego dla potencjału pro-zakrzepowego krwi) oraz głównych białek cytoszkieletu (β -tubuliny i β -aktyny), które mogą stanowić podłoże zmienionej funkcji hemostatycznej płytek krwi. Kolejnym krokiem było przeprowadzenie skringowej analizy porównawczej (PMS vs kontrola) profilu ekspresji cząsteczek miRNA w płytkach krwi i megakariocytach. W ostatnim etapie badań ocenie poddano wybrane parametry funkcjonowania mitochondriów płytkowych.

Analizując wyniki uzyskane z przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że płytki krwi od pacjentów z PMS wykazują zwiększoną aktywność, jak również wzmożoną ekspresję kluczowych receptorów powierzchniowych i nasiloną odpowiedź na działanie fizjologicznych agonistów płytkowych. Wykazano, że płytki krwi oraz megakariocyty pochodzące od pacjentów z PMS posiadają zwiększone stężenie fibrynogenu, jak również charakteryzują się odmiennym profilem PTMs łańcuchów α -, β - oraz γ -fibrynogenu oraz zmianami w sekwencjach genów *FGA*, *FGB* i *FGG*, które w sposób istotny różnicują badane grupy. W pracy wykazano także istotne zmiany dotyczące białek cytoszkieletu, odnoszące się przede

wszystkim do β -tubuliny, które manifestują się zwiększonym stężeniem wewnątrzkomórkowym tego białka oraz wzrostem liczby transkryptów mRNA zarówno w płytkach krwi, jak i w megakariocytach w PMS. Wykryto również zmiany w sekwencji genu *TUBB1* kodującego β -tubulinę. Skriningowa analiza profilu ekspresji miRNA w płytkach krwi i megakariocytach od pacjentów z PMS wykazała istotne zmiany w ilości cząsteczek miRNA (miR-15b-5p, miR-24-3p, miR-126-5p oraz miR-199a-3p) będących potranskrypcyjnymi regulatorami ekspresji genów, które zaangażowane są w kluczowe szlaki aktywacji płytek krwi, jak również uczestniczą w różnicowaniu oraz programowanej śmierci komórek. Ponadto, stwierdzono, że w płytkach krwi pacjentów z PMS dochodzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wolnych rodników tlenowych, obserwuje się spadek MMP oraz zwiększoną liczbę transkryptów mRNA dla genów kodujących enzymy zaangażowane w komórkowy metabolizm tlenowy (oksydaza cytochromu c oraz GAPDH).

Uzyskane wyniki mogą stanowić częściowe wyjaśnienie potencjalnych mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za zwiększony potencjał pro-zakrzepowy płytek krwi, przyczyniający się do obserwowanego w PMS wzrostu ryzyka występowania incydentów sercowo-naczyniowych.

Angela Dziedzic

The molecular mechanisms of increased platelet pro-thrombotic activity of blood platelets in multiple sclerosis

Summary

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) characterized by demyelination of white matter fibers caused by the breakdown of the myelin sheath. It is believed that the development of autoimmune processes, chronic inflammation and the long-term impact of oxidative stress are the main causes of demyelination, which in consequence lead to neuronal death. Epidemiological studies confirm an increased risk of ischemic events associated with pathological blood platelet pro-thrombotic activity in patients with MS, especially in the progressive phase (PMS), which indicate the disturbance in the hemostatic role of platelets in MS course. The involvement of blood platelets in the pathogenesis of MS also includes their interactions with leukocytes and endothelial cells, leading to a violation of the BBB and infiltration of lymphocytes to the sites of demyelination foci in the CNS. Moreover, the blood platelet participation in the process of neurodegeneration involves the initiation and development of inflammatory processes and generation of reactive oxygen species (ROS).

The aim of the study was to investigate the molecular basis of increased platelet pro-thrombotic activity in PMS patients. Firstly, the functional status of platelets was assessed by determining the expression and degree of reactivity of major surface receptors for physiological platelet agonists. Then an attempt was made to determine the molecular changes of fibrinogen (as a central protein for the blood pro-thrombotic potential), and the main proteins of the cytoskeleton (β -tubulin and β -actin), which may underlie an altered hemostatic function of platelets. The next step was to perform a comparative screening analysis (PMS vs control) of the miRNA expression profile in platelets and megakaryocytes. In the last stage of the research, selected parameters of the platelet mitochondria functioning were assessed.

Analyzing the results obtained from the conducted experiments, it was found that blood platelets from PMS patients demonstrate an increased activity, as well as elevated expression levels of crucial surface receptors and an enhanced response to the action of physiological platelet agonists. It has been shown that platelets and megakaryocytes from PMS patients have an augmented concentration of fibrinogen, as well as are characterized by a different PTMs profile of the α -, β - and γ -fibrinogen chains and exhibit changes in the sequences of the *FGA*, *FGB* and *FGG* genes that significantly differentiate the studied groups. In this work, it is also demonstrated significant changes in cytoskeleton proteins, mainly related to β -tubulin, which

are manifested by an increased intracellular concentration of this protein and an increment in the number of mRNA transcripts in both platelets and megakaryocytes in PMS. Changes in the sequence of the *TUBB1* gene encoding β -tubulin were also detected. Screening analysis of the miRNA expression profile in platelets and megakaryocytes from PMS patients showed significant changes in the amount of miRNA molecules (miR-15b-5p, miR-24-3p, miR-126-5p and miR-199a-3p) being a post-transcriptional gene expression regulators, which are involved in the essential blood platelet activation pathways, as well as differentiation and programmed cell death. In addition, it was found that in the blood platelets of PMS patients there is a growth in the intracellular level of ROS, a decrease in MMP and an increased number of mRNA transcripts for genes encoding enzymes involved in cellular oxygen metabolism (cytochrome c oxidase and GAPDH).

The obtained results may be a partial explanation of the potential molecular mechanisms responsible for the enhanced pro-thrombotic potential of platelets, contributing to the increase in the risk of cardiovascular events observed in PMS patients.

Angela Dziedzic