

UNIwersytet Medyczny we Wrocławiu
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH
WYDZIAŁ LEKARSKI

lek. Aleksandra Turek-Jakubowska

Dynamiczna ocena wybranych aspektów patofizjologii
świeżego udaru niedokrwiennego mózgu
ze szczególnym uwzględnieniem zmian proteomu osocza

ROZPRAWA DOKTORSKA

PROMOTOR: dr hab. n. med. Adrian Doroszko

Projekt finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach Programu
Iuventus Plus (grant nr IP 2012 009472).

WROCLAW 2018

STRESZCZENIE

Wstęp: Udar mózgu w 70-80% przypadków ma etiologię niedokrwienną i jest jedną z najczęstszych przyczyn śmierci oraz trwałej niepełnosprawności u osób dorosłych. Z tego powodu nagłym problemem jest optymalizacja procesu diagnostyczno-terapeutycznego jego ostrej fazy. Niektóre doniesienia sugerują, że pomiar stężenia w osoczu białek pochodzących z mózgu – uwalnianych i przenikających barierę krew-mózg w stanie ostrej fazy, mógłby być przydatny w optymalizacji postępowania w ostrym niedokrwieniu mózgu. Niemniej, żadne z białek osocza nie znalazło do tej pory zastosowania w algorytmach diagnostyki lub leczenia udarów niedokrwiennych. Kolejnym obszarem dającym możliwość modyfikacji postępowania u osób z niedokrwieniem mózgu jest dysfunkcja śródbłonna naczyniowego. Może ona być niezależnym czynnikiem ryzyka lub wczesnym rewelatorem patologii u osób, które nie rozwinęły jeszcze objawów klinicznych.

Cele pracy: Głównym celem badania była identyfikacja białek – potencjalnych kandydatów na biomarkery udaru niedokrwiennego mózgu oraz punktów uchwytu dla działania nowych leków neuroprotektynnych. Dodatkowo zaplanowano powiązanie faktu wystąpienia udaru mózgu z oszacowanym ryzykiem sercowo-naczyniowym (za pomocą konwencjonalnych markerów biochemicznych), jak również z funkcją śródbłonna ocenioną na podstawie badań czynnościowych (z użyciem metody laser dopler) oraz badania biochemicznych markerów funkcji śródbłonna.

Materiał i metody: Grupę badaną stanowiło 32 pacjentów (w wieku 29-80 lat) z nowo zdiagnozowanym świeżym udarem niedokrwiennym mózgu. Grupa kontrolna składała się z 29 ochotników, dobranych demograficznie do grupy badanej. Ocenę proteomu osocza ludzkiego w szeregach czasowych przeprowadzono za pomocą metody będącej połączeniem chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (LC-MS). Pobranie i zabezpieczenie krwi do przeprowadzenia późniejszych analiz (w tym LC-MS proteomu osocza, markerów funkcji śródbłonna oraz podstawowych badań biochemicznych), jak i nieinwazyjne badanie funkcji śródbłonna naczyniowego metodą laser dopler było w grupie badanej przeprowadzane dwukrotnie (w 1. i 7. dobie hospitalizacji), a w grupie kontrolnej jednokrotnie.

Wyniki: Dzięki badaniu LC-MS zidentyfikowano dziesięć białek, których stężenia w osoczu istotnie różniły się między grupą badaną, a grupą kontrolną: składowa B dopełniacza, apolipoproteina A-I, fibronektyna, fetuina A, alfa-1B-glikoproteina, białko szoku cieplnego rodziny Hsp70, fosforylaza tymidynowa, syntetaza tryptofanylo-tRNA, fikolina-2, dipeptydaza beta-alanylohistydynowa. Ponadto udało się wykazać, że udarowi niedokrwiennemu towarzyszy istotna dysfunkcja śródbłonna naczyniowego zależna przede wszystkim od podwyższonego stężenia asymetrycznej dimetyloargininy oraz niedoboru kwasu foliowego.

Wnioski: Jest to pierwsze dynamiczne badanie LC-MS przeprowadzone na modelu klinicznym, które różnicuje proteom osocza pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu w szeregach czasowych i porównuje z grupą kontrolną bez deficytów neurologicznych. Wymienione białka powinny zostać poddane dalszej prospektywnej zewnętrznej walidacji jako czynniki ryzyka, markery udaru niedokrwiennego lub punkty uchwytu dla działania leków. Dodatkowo wskazanie, że elementem patofizjologii udaru mózgu jest dysfunkcja śródbłonna naczyniowego, manifestująca się jako choroba ogólnoustrojowa, stwarza nowe pole do dalszej optymalizacji procesu terapeutycznego ostrej fazy udaru mózgu oraz ewentualnej profilaktyki pierwotnej.

SUMMARY

Background: Stroke is in 70-80% of cases related to ischemia and constitutes a major cause of mortality and disability in adults. Therefore, optimizing the management of acute cerebral ischemia remains among the most emerging problems. Some reports suggest that measuring the plasma concentrations of brain-derived proteins may be useful in determining the optimal therapeutic options in the acute phase of cerebral ischemia. Nevertheless, none of such proteins has been included into algorithms for the management of acute phase of stroke nor in the diagnostics. Another field for modifying the schemes of ischemic stroke treatment seems to be an endothelial dysfunction, which could constitute both, an independent risk factor for stroke, as well as an early revelator of pathology in humans without any clinical symptoms developed.

Aims: The major goal of this study was to identify proteins that may become potential candidates for biomarkers of ischemic stroke and molecular targets for new neuroprotective agents. Additionally, it was planned to verify the link between ischemic stroke and the global cardiovascular risk (estimated using conventional biochemical markers), as well as with endothelial status assessed both in functional tests (using the laser Doppler-based device) and in the blood tests (concentrations of relevant biomarkers).

Material and methods: The study groups constituted a total of 32 subjects (age 29-80 y) diagnosed with acute ischemic stroke. The control group was established by 29 volunteers, who were demographically matched to the study one. Human plasma proteome was analysed by the tandem of liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS). Sampling and preservation of blood for further laboratory analyses (including proteome LC-MS, endothelial function biomarkers and basic lab tests) and non-invasive examination of vascular endothelial function (laser Doppler device) were performed twice in study group (1st and 7th day of hospitalization) and once in control group.

Results: The LC-MS analyses identified ten proteins, which plasma concentrations differed between study group and healthy controls: complement factor B, apolipoprotein A-I, fibronectin, alpha-2-HS-glycoprotein, alpha-1B-glycoprotein, heat shock cognate 71 kDa protein/heat shock-related 70 kDa protein 2, thymidine phosphorylase, cytoplasmic tryptophan-tRNA ligase, ficolin-2, beta-Ala-His dipeptidase. Furthermore, this study revealed that ischemic stroke is accompanied by significant endothelial dysfunction, which might result from the changes in asymmetric dimethylarginine and folic acid concentrations.

Conclusions: This is the first dynamic LC-MS study performed on a clinical model, which differentiates plasma proteome of patients with ischemic stroke in time series and compares to controls without neurological deficits. Listed proteins should undergo further clinical validation as risk factors, markers of ischemic stroke or drug targets. Furthermore, demonstration that endothelial dysfunction (as a systemic condition) is an element of stroke pathophysiology - creates a new field for further optimizing of the therapeutic process of acute phase of stroke and may enable the primary prevention.