

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Wprowadzenie

Stenoza aortalna (AS) jest najczęstszą przyczyną nabytej wady zastawkowej serca u osób powyżej 65 roku życia, bez dostępnego leczenia farmakologicznego. Patomechanizm AS jest procesem złożonym i ściśle regulowanym, związanym z aktywacją wielu szlaków na poziomie molekularnym, komórkowym i tkankowym. Liczne badania wskazują, że podwyższony poziom lipoprotein, oksydowanych fosfolipidów (OxPL) lub towarzysząca cukrzyca typu 2 (DMT2) mogą przyspieszyć rozwój AS. Jednak, mechanizmy leżące u podstaw wpływu tych czynników na stan zapalny, układ krzepnięcia i fibrynolizy oraz kalcyfikację zastawek aortalnych nie zostały w pełni poznane.

Cel badania

Zbadanie mechanizmów związanych z działaniem czynników modulujących progresję AS, tj. hiperglikemii i nasilonego stresu oksydacyjnego ze szczególnym uwzględnieniem ich potencjalnych związków z zapaleniem, aktywacją układu krzepnięcia, hipofibrynolizą i kalcyfikacją u pacjentów z ciężką AS.

Metody i Wyniki

W **Publikacji 1** przebadano 76 pacjentów z ciężką AS (bez DMT2) i 50 pacjentów z AS i DMT2 (AS-DM). Zastawkową ekspresję końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGEs) i receptora dla AGEs (RAGE) oceniano immunofluorescencyjnie. Poziomy AGEs i rozpuszczalnej izoformy RAGE (sRAGE) w surowicy krwi oceniano za pomocą testów ELISA. Pacjenci AS-DM mieli zwiększoną akumulację AGEs i RAGE w obrębie stenotycznych zastawek aortalnych oraz w surowicy krwi w porównaniu z pacjentami bez DMT2. Ponadto, w grupie AS-DM ekspresja AGEs i RAGE, oraz ich poziom w surowicy krwi korelowały z poziomem hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}). Co istotne, u pacjentów AS-DM zastawkowa ekspresja AGEs i poziom AGEs w surowicy krwi były związane z ciężkością choroby.

W **Publikacji 2** oceniono 100 pacjentów z AS (bez DMT2) i 50 pacjentów z AS i DMT2 (AS-DM). Zastawkową ekspresję jądrowego czynnika kappa B (NF-κB), białka morfogenetycznego kości-2 (BMP-2), protrombiny (FII) i aktywnego czynnika X (FXa) oceniono immunofluorescencyjnie. Ekspresję NF-κB i BMP-2 w hodowlach pierwotnych komórek interstycjalnych zastawki (VICs) po stymulacji glukozą oceniono na poziomie białka i mRNA (*RELA*). W badaniach mechanistycznych zastosowano inhibitor reaktywnych form tlenu – ROS (NAC) lub inhibitor szlaku NF-κB (BAY 11-7082). W zastawkach z grupy AS-DM

obserwowano zwiększoną ekspresję NF-κB, BMP-2 i białek układu krzepnięcia w porównaniu do zastawek z grupy bez DM. Zastawkowa ekspresja NF-κB i BMP-2 dodatnio korelowała z ekspresją FII i FXa. Tylko u chorych z DM, zastawkowa ekspresja NF-κB była związana z poziomem HbA_{1c} i fruktozaminy we krwi oraz ciężkością AS. Eksperymenty *in vitro* wykazały, że wysokie stężenie glukozy zwiększyło ekspresję NF-κB i BMP-2, podczas gdy zastosowanie inhibitorów ROS (NAC) lub NF-κB (BAY 11-7082) znacząco je obniżyło. Analiza ekspresji mRNA (*RELA*) w komórkach VICs potwierdziła te wyniki.

W **Publikacji 3** oceniono 50 pacjentów z AS i stężeniem lipoproteiny(a) [Lp(a)] ≥ 50 mg/dl oraz 20 pacjentów z AS i Lp(a) < 50 mg/dl. Zastawkową ekspresję OxPL oceniano za pomocą immunofluorescencji. Stężenie OxPL, antygeny inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1) i inhibitora fibrynolizy aktywowanego trombiną (TAFI) oceniono za pomocą testów ELISA. Czas lizy skrzepu (CLT) w osoczu wyznaczono turbidymetrycznie. Pacjenci z AS i Lp(a) ≥ 50 mg/dl mieli zwiększoną ekspresję OxPL w zastawkach i wyższe stężenie OxPL w surowicy krwi w porównaniu do pacjentów z AS i Lp(a) < 50 mg/dl. Zastawkowa ekspresja OxPL korelowała ze stężeniami OxPL i Lp(a) w surowicy krwi. Tylko u pacjentów z Lp(a) ≥ 50 mg/dl, stężenia OxPL w surowicy korelowały z CLT, stężeniami PAI-1 i TAFI w osoczu, oraz ciężkością AS. Analiza regresji wieloczynnikowej wykazała, że wyższe poziomy OxPL determinowały wydłużone CLT u pacjentów z AS i Lp(a) ≥ 50 mg/dl.

W **Publikacji 4** przebadano 75 pacjentów z ciężką AS. Zastawkową akumulację lipidów oceniono histochemicznie, zaś ekspresję PAI-1 i NF-κB metodą immunofluorescencji. Zastawki pobrane od dawców autopsyjnych stanowiły kontrolę. Ekspresję PAI-1 w komórkach VICs hodowanych w różnych warunkach oceniono na poziomie białka i mRNA (*SERPINE1*). W badaniach mechanistycznych zastosowano inhibitor aktywności PAI-1 (TM5275) lub szlaku NF-κB (BAY 11-7082). Supernatanty hodowli VICs dodano do osocza pozbawionego PAI-1 i oznaczono CLT zmodyfikowaną metodą. W supernatantach oznaczono także poziom antygeny PAI-1 za pomocą testu ELISA. Wyłącznie w stenotycznych zastawkach aortalnych stwierdzono ekspresję PAI-1, która korelowała z akumulacją lipidów, ekspresją NF-κB oraz ciężkością AS. *In vitro*, VICs wykazywały wysoką ekspresję PAI-1. Stymulacja LDL zwiększyła poziom PAI-1 w supernatantach VICs i wydłużyła CLT. Hamowanie aktywności PAI-1 skróciło CLT, natomiast hamowanie szlaku NF-κB zmniejszyło ekspresję PAI-1 w VICs, poziom jego antygeny w supernatantach oraz skróciło CLT. Analiza ekspresji mRNA (*SERPINE1*) w komórkach VICs potwierdziła te wyniki.

W **Publikacji 5** omówione zostały najnowsze potencjalne strategie terapeutyczne hamujące progresję AS.

Wnioski

U pacjentów z AS i towarzyszącą DMT2 źle kontrolowana cukrzyca prowadzi do nadmiernej akumulacji AGEs w zastawkach aortalnych, przez co nasila lokalny stres oksydacyjny i zapalenie oraz syntezę mediatorów wapnienia zastawki, co w konsekwencji może prowadzić do szybszej progresji AS. Hiperglikemia niekorzystnie wpływa na procesy związane z progresją AS poprzez nasiloną aktywację *in loco* szlaku NF-κB. Nasze badanie sugeruje, że u pacjentów z AS i współistniejącą DMT2 utrzymywanie HbA_{1c} i fruktozaminy w zakresie norm referencyjnych może spowolnić tempo progresji AS. Pacjentów z ciężką AS charakteryzuje hipofibrynoliza. Wysokie stężenia Lp(a) w surowicy krwi wiążą się z podwyższonym poziomem OxPL, które determinują hipofibrynolizę silniej niż Lp(a). Ponadto, nadekspresja PAI-1 w obrębie stenotycznych zastawek spowodowana akumulacją lipidów, jest mediowana nadmierną aktywacją szlaku NF-κB i przynajmniej częściowo jest odpowiedzialna za hipofibrynolizę. Zatem, nasze wyniki sugerują, że szlak NF-κB może być potencjalnym celem terapeutycznym w AS.