

Pomimo aktualnych doniesień literaturowych na temat zmienionej aktywności i/lub ekspresji COX-1 w warunkach zaburzonego

metabolizmu w glównodanów, mechanizm glikacji COX-1 w cukrzycy wciąż pozostaje niejasny. Ewentualne rozpoznanie takich zmian mogło by przyczynić się do częściowego wyjaśnienia zjawiska „oporności na aspirynę” u osób z cukrzycą. W ostatnim czasie pojawiły się przypuszczenia, iż jedną z przyczyn tego zjawiska może być nieenzymatyczna glikacja płytkowej COX-1. Takie przypuszczenie ma swoje silne uzasadnienie w fakcie, iż przeciwplatekcyjne działanie aspiryny polega na acetylacji i inhibicji aktywności COX-1, zatem nieenzymatyczne modyfikacje COX-1 pod wpływem wysokiego stężenia glukozy mogłyby upośledzać reakcję tego enzymu z ASA. Osobnym wątkiem, który wydaje się atrakcyjny do zbadania w kontekście tzw. „oporności na aspirynę”, jest możliwość ubikwitynacji COX-1 i wynikające z tego implikacje dotyczące aktywności tak zmodyfikowanego enzymu w przebiegu cukrzycy. Zasadne wydaje się sprawdzenie, czy nieenzymatyczne modyfikacje COX-1 mają związek z ubikwitynacją tego białka i czy może to mieć związek z podwyższoną aktywnością COX-1 obserwowaną w cukrzycy. W przypadku potwierdzenia powyższego założenia, zbadamy także, czy podwyższona ubikwitynacja COX-1 chroni jednocześnie nie to białko przed acetylacją ze strony kwasu acetylosalicylowego.

W pierwszym etapie badań ocenimy funkcjonowanie płytek krwi na podstawie pomiaru generacji tromboksanu A₂ przez te komórki (wyrażonego poziomem jego stabilnego metabolitu, TxB₂) oraz agregacji tych komórek w pełnej krwi. Metodę tę wykorzystamy także do oceny stopnia wywołania oporności na aspirynę u osób z cukrzycą po suplementacji tego leku oraz do zbadania roli receptora chemokiny 4 w ubikwitynacji COX-1. Poziom zewnątrzkomórkowej ubikwityny w surowicy oznaczymy stosując immunosorbencyjne metody enzymatyczne z wykorzystaniem egzogennej ubikwityny sprzężonej z fluoresceiną. W celu oznaczenia stopnia glikacji i/lub acetylacji COX-1 w płytkach krwi zastosujemy analizę LC-MS/MS. Wyizolowane białko białko posłuży także do analizy zmian strukturalnych zachodzących w COX-1 pod wpływem glikacji i/lub acetylacji z wykorzystaniem dichroizmu kołowego. Poziom receptora dla chemokiny 4 w lizatach płytkowych oraz ubikwitynowanego COX-1 w immunoprecypitatach płytkowych oznaczymy za pomocą metody immunoblotingu, stosując przeciwciała wykrywające, odpowiednio, CXCR4 oraz ubikwitynowane białka. Z kolei aktywność wyizolowanego COX-1 zbadamy wykorzystując komercyjny test ELISA.

Wierzimy, iż uzyskane wyniki dostarczą po raz pierwszy wiedzy na temat nieenzymatycznych modyfikacji, jakim ulega COX-1 w płytkach krwi pochodzących od osób cierpiących na cukrzycę. Dodatkowo wykażemy, czy istnieje bezpośredni związek pomiędzy aktywnością tego enzymu a aktywnością płytek krwi w warunkach zaburzonego metabolizmu w glównodanów. Jest to o tyle istotne, iż pozwoli poznać niektóre mechanizmy odpowiedzialne za nieprawidłowe funkcjonowanie płytek krwi w rodowisku wysokiego stężenia glukozy. Unikatem wydają się także badania nad możliwością ubikwitynacji COX-1, w odpowiedzi na glikację tego enzymu w cukrzycy. Rzuci to nowe światło nad rolę procesu ubikwitynacji w modulowaniu aktywności enzymów komórkowych, takich jak COX-1, w przebiegu chorób metabolicznych. Kluczowy efekt, jaki niesie za sobą realizacja prezentowanego projektu to poznanie bezpośrednich czynników odpowiedzialnych za występowanie u osób z cukrzycą zjawiska „oporności na aspirynę”. Wierzimy, że w sposób jednoznaczny i definitywny wykażemy, czy u podłoża tego zjawiska leży nieenzymatyczna glikacja COX-1, ubikwitynacja tego białka czy te oba te procesy przyczyniają się do mniejszej podatności COX-1 na inhibicję ze strony kwasu acetylosalicylowego.