

Stwardnienie rozsiane (łac. *sclerosis multiplex*, SM) jest przewlekłą chorobą zapalną ośrodkowego układu nerwowego (OUN), charakteryzującą się demielinizacją włókien istoty białej, spowodowaną rozpadem otoczki mielinowej w wyniku uszkodzenia rozpuszczalnego, zasadowego białka mieliny. SM jest główną przyczyną niepełnosprawności neurologicznej młodych dorosłych. Dane Światowej Organizacji Zdrowia wskazują, że średnia częstość występowania SM w Europie wynosi 80 przypadków na 100 tysięcy osób. SM jest chorobą heterogenną, o zmiennym przebiegu klinicznym i zróżnicowanym obrazie patofizjologicznym, będących składową toczącego się procesu zapalnego, glejozy, demielinizacji, niszczenia aksonów i neuronów, jak również naprawczych mechanizmów remielinizacji. W przebiegu SM wyróżnia się postać pierwotnie-postępującą (PP) stanowiącą tylko 10% przypadków, oraz postać rzutowo-remisyjną (RR), która w większości przypadków po około 10 latach od pierwszych objawów przechodzi w fazę wtórnie-postępującą (SP).

Płytki krwi są wielofunkcyjnymi komórkami, które uczestniczą w patofizjologii wielu chorób neurodegeneracyjnych. W przypadku SM, komórki układu odpornościowego, głównie autoreaktywne limfocyty T przenikają do OUN i uwalniają cytokiny prozapalne, które aktywują makrofagi, co prowadzi do tworzenia się zapalnych ognisk demielinizacyjnych w istocie białej. Płytki krwi zawierają dużą różnorodność aktywnych biologicznie związków znajdujących się w  $\alpha$ -ziarnistościach, liczne receptory błonowe, mediatory zapalne, immunomodulatory i cząsteczki adhezyjne, które wpływają na przepuszczalność bariery krew-mózg i wzmagają infiltrację autoreaktywnych limfocytów T, przez co uczestniczą w tworzeniu zmian neurozapalnych w OUN. Wiele doniesień, wraz z naszymi publikacjami, potwierdza nieprawidłowości w funkcjonowaniu płytek krwi u pacjentów z SM. Płytki wykazują właściwości prozakrzepowe i wzmożoną aktywację w przebiegu SM i są obecne w aktywnych zapalnie zmianach demielinizacyjnych. Jednak dokładne określenie znaczenia płytek w patologii SM wciąż wymaga wyjaśnienia.

W naszych najnowszych badaniach wykazaliśmy podwyższone stężenie białek prozakrzepowych (fibrynogenu i apolipoproteiny A-I) w płytkach krwi pacjentów z SPSM, w stosunku do grupy kontrolnej zdrowych ochotników. Fibrynogen (Fg) jest głównym białkiem krzepnięcia krwi, a także jest zaangażowany w agregację płytek. Obecny w płytkach Fg może być syntetyzowany w megakariocytach (komórkach prekursorowych płytek) albo w samych płytkach (płytki zawierają część transkryptomu pochodzącego z megakariocytów), lub częściowo może pochodzić z puli Fg osoczewego (syntetyzowanego w hepatocytach).

W obecnym projekcie zaplanowaliśmy analizę sekwencji i ekspresji mRNA dla Fg płytkowego w SPSM. Jak również analizę profilu ekspresji cząsteczek płytkowego miRNA, które odpowiedzialne są za regulowanie procesu translacji mRNA. Znalezienie molekularnego podłoża zwiększonego stężenia Fg płytkowego może znacząco przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmów wzmożonej aktywacji i nadreaktywności płytek, a zwłaszcza ich zwiększonej agregacji i adhezji obserwowanych w SPSM.

Analiza porównawcza sekwencji i ekspresji mRNA dla Fg i ekspresji dla miRNA będzie prowadzona zarówno w megakariocytach jak i w płytkach krwi. Dodatkowo, przy użyciu testu ELISA porównamy stężenie Fg w megakariocytach pochodzących od pacjentów z SPSM, oraz w grupie kontrolnej, co pozwoli ustalić, czy zwiększenie syntezy Fg płytkowego w SPSM zachodzi już w megakariocytach.

W celu sprawdzenia, czy zwiększona ilość Fg nie jest wynikiem zaabsorbowania go przez płytki z osocza, przeprowadzimy analizę porównawczą Fg obecnego w płytkach i w osoczu pacjentów z SPSM na podstawie różnic w modyfikacjach potranslacyjnych ocenianych za pomocą spektrometrii masowej.

Agregacja płytek krwi jest uzależniona od Fg. Aby ocenić jakie jest znaczenie zwiększonej ilości Fg płytkowego w procesie agregacji w SPSM, za pomocą cytometrii przepływowej oszacujemy, czy ilość Fg zawartego w wyizolowanych płytkach (SPSM i kontrolnych), koreluje ze stopniem ich agregacji. Po wyizolowaniu płytek z krwi, a następnie ich stymulacji typowym agonistą, jakim jest ADP, stopień agregacji płytek zostanie oznaczony w cytometrze przepływowym, a także rozmiar i morfologia agregatów oraz udział Fg będą określone przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego.

Megakariocyty do wszystkich analiz zostaną wyizolowane z krwi za pomocą cyfrowego sortera komórek. Płytki krwi będą izolowane z osocza oczyszczonego z zanieczyszczeń erytrocytami/leukocytami z użyciem DynaBeads metodą filtracji na złożu BSA–Sepharose 2B. Czystość zawiesiny płytek zostanie oceniona na cytometrze przepływowym.

Złożoność objawów klinicznych i patomechanizmów SM oraz nieznaną etiologią tego schorzenia powodują, że obecna farmakologia sprowadza się jedynie do leczenia objawowego, spowalniającego postęp choroby. Poznanie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw funkcjonowania płytek w SPSM może stanowić podstawę do rozwoju bardziej specjalistycznych badań neurologicznych oraz wprowadzenia specyficznych metod leczenia przeciwplatekowego w przebiegu SM.