

Stwardnienie rozsiane (MS) jako jedna z najczęściej występujących chorób neurodegeneracyjnych jest jedną z głównych przyczyn występowania niepełnosprawności u osób młodych. Według danych WHO obecnie szacuje się, iż na świecie liczba chorych na MS wynosi około 2,3 mln. Choroba ma najczęściej przebieg wielofazowy z licznymi okresami zaostrzeń i remisji.

Patologiczną podstawą MS jest demielinizacja włókien istoty białej spowodowana rozpadem otoczki mielinowej neuronów, w wyniku uszkodzenia rozpuszczalnego, zasadowego białka mielininy. MS jest chorobą autoimmunizacyjną charakteryzującą się zmiennym przebiegiem klinicznym oraz zróżnicowanym obrazem patofizjologicznym, która oprócz uszkodzenia neuronów, cechuje się utratą integralności bariery krew-mózg (BBB), jak również naciekami leukocytarnymi do ośrodkowego układu nerwowego (OUN), doprowadzając do wystąpienia chronicznego stanu zapalnego oraz zaburzenia neuroprzeżywalności. Heterogenny przebieg tych procesów utrudnia przewidywanie postępów choroby i wdrożenie właściwego postępowania terapeutycznego.

Płytki krwi są wielozadaniowymi komórkami pełniącymi funkcje w obrębie układu krążenia, które biorą także udział w patofizjologii wielu chorób neurodegeneracyjnych. Oddziałują z komórkami układu immunologicznego oraz stanowią źródło biologicznie czynnych substancji zmagazynowanych w ich ziarnistościach, które wpływają na przepuszczalność BBB wzmagając infiltrację autoreaktywnych limfocytów T, przyczyniając się do rozwoju stanu zapalnego. Istnieją doniesienia, w tym publikacje zespołu mojego opiekuna naukowego potwierdzające zaburzenia czynności płytek krwi u pacjentów z MS, które mogą być przyczyną zwiększonego ryzyka występowania epizodów niedokrwienych, takich jak udar mózgu i zawał mięśnia sercowego, szczególnie w fazie SPMS, których zwiększoną częstość obserwowano w badaniach epidemiologicznych.

Najnowsze badania naukowe prowadzone przez zespół mojego opiekuna naukowego mają na celu poznanie molekularnych mechanizmów wzmożonej aktywności prozakrzepowej płytek krwi w SPMS. Badania wstępne wykazały podwyższone stężenie  $\beta$ -tubuliny w płytkach krwi u pacjentów z SPMS w stosunku do grupy zdrowych ochotników, co może stanowić istotną przyczynę prozakrzepowej aktywności płytek krwi w SPMS.

Hemostatyczna funkcja płytek jest uwarunkowana aktywacją tych komórek, która prowadzi do zmiany ich kształtu, adhezji, agregacji i degranulacji wewnątrzkomórkowych ziarnistości i czynników zapalnych. Mikrotubule wraz z innymi filamentami tworzą tzw. cytoszkielet płytkowy. Kluczową rolę w trakcie reorganizacji architektury komórki odgrywają białka cytoszkieletu. Zmiany ilościowe i/lub strukturalne w cząsteczkach białek cytoszkieletu płytkowego bezpośrednio warunkują zmiany w biologicznej odpowiedzi płytek, np. sprzyjając tworzeniu się skrzepu w miejscu uszkodzonego naczynia krwionośnego, co prowadzi do okluzji naczynia i wystąpienia niedokrwienia.

W niniejszym projekcie zaplanowano analizy porównawcze mające wyjaśnić przyczyny i konsekwencje zaobserwowanych różnic w stężeniu płytkowej  $\beta$ -tubuliny. Badania mają na celu określenie na jakim etapie dochodzić może do zaburzeń w syntezie  $\beta$ -tubuliny.

W pierwszym etapie badań zostanie oznaczone stężenie  $\beta$ -tubuliny w megakariocytach metodą ELISA, zarówno w grupie badanej SPMS jak i kontrolnej. Pozwoli to na ustalenie, czy wzmożona synteza  $\beta$ -tubuliny w SPMS zachodzi już w samych megakariocytach, czy też zaburzenie jest na poziomie płytkowym, gdyż płytki krwi, pomimo braku jądra komórkowego, są zdolne do syntezy białek na matrycy cząsteczek mRNA pochodzącego od megakariocytów. Ponadto wykonana zostanie analiza ekspresji mRNA dla  $\beta$ -tubuliny zarówno w megakariocytach, jak i w płytkach krwi metodą Real-Time PCR.

Kolejne analizy będą dotyczyły określenia zmian w strukturze  $\beta$ -tubuliny obecnej w płytkach krwi, w tym modyfikacji potranslacyjnych ocenianych metodą spektrometrii mas. Przeprowadzona zostanie także analiza porównawcza sekwencji płytkowych transkryptów uzyskanych z SPMS oraz kontroli.

Materiał badawczy pochodzący od wcześniej zrekrutowanej grupy badanej oraz grupy kontrolnej, po 55 osób w każdej grupie, został zgromadzony w postaci „zbankowanej” biblioteki cDNA oraz wyizolowanej i oczyszczonej frakcji białkowej, pochodzących z płytek krwi oraz z megakariocytów.

Określenie molekularnego podłoża zmian ilościowych i być może jakościowych  $\beta$ -tubuliny w płytkach krwi może przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmu wzmożonej aktywności prozakrzepowej płytek krwi, a zwłaszcza zwiększonej adhezji i agregacji obserwowanych u pacjentów z SPMS. Może to przyczynić się do ustalenia nowych celów terapeutycznych i rozwoju nowych metod leczenia przeciwplatekowego w przebiegu MS.