

Karbamylacja jako czynnik etiopatologiczny zaburzeń krzepnięcia krwi w chorobach nerek.

Przewlekła choroba nerek jest częstym zaburzeniem, co wynika z dużego rozpowszechnienia głównych jej przyczyn, przede wszystkim cukrzycy, nadciśnienia tętniczego i miażdżycy. Dotyka około 850 milionów ludzi na całym świecie, a codzienna egzystencja około 10 milionów zależy od leczenia nerkozastępczego (dializy) z powodu zaawansowanej niewydolności nerek. Oczekując na potencjalny przeszczep pacjenci są poddawani dializoterapii często przez wiele lat, co w konsekwencji, mimo że jest zabiegiem ratującym życie, prowadzi do wielu powikłań i radykalnie obniża jakość życia pacjenta.

Pomimo ciągłych działań mających na celu poprawę wydajności urządzeń do dializy, zastępują one obecnie około 10% fizjologicznej czynności nerek, pozostawiając pacjentów w stanie częściowo wyrównanej mocznicy. Krwawienia są dobrze znanym powikłaniem niewydolności nerek i około 50% pacjentów z poddawanych dializoterapii cierpi na zaburzenia hemostazy. Mogą one mieć łagodny przebieg i prezentować się w postaci krwawych podbiegnięć lub przedłużonych krwawień w miejscach dostępu naczyniowego, jednak często są stanami potencjalnie zagrażających życiu i przybierają formę krwawień z przewodu pokarmowego lub krwawienia wewnątrzczaszkowego.

Upośledzenie funkcji nerek powoduje zatrzymanie w organizmie zbędnych produktów przemiany materii, w tym mocznika. Jego stężenie u osób z schyłkową niewydolnością nerek może być 6-7-krotnie wyższe w porównaniu do osób zdrowych. Duże stężenie mocznika we krwi pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek prowadzi do około 3-krotnego wzrostu stężenia kwasu izocyjanowego który reagując z resztami lizyny i N-końcowymi grupami aminowymi białek i peptydów powoduje powstanie karbamyliny (homocytrulina; HCit). Ta nieodwracalna modyfikacja może wystąpić w wielu miejscach w obrębie jednego białka, zmieniając jego ładunek, strukturę i funkcję. Teoretycznie wszystkie białka mogą ulegać karbamylocji jednak stopień ich modyfikacji *in vivo* zależy m.in. od dostępności i nukleofilowości wolnych grup aminowych, od polarności rozpuszczalnika oraz od długości życia danego białka. Karbamylowane białka są istotnym czynnikiem w powstawaniu powikłań w przewlekłej niewydolności nerek a ich poziom u pacjentów ma wartość kliniczną jako biomarker ze względu na ich silną związek ze śmiertelnością sercowo-naczyniową.

W poniższym projekcie scharakteryzujemy rolę karbamylocji w hemostazie ze szczególnym uwzględnieniem wpływu tej modyfikacji na funkcje płytek krwi. Nasze wyniki wstępne pokazały że obecność cyjanianu prowadzi do karbamylocji receptora płytkowego GpIIb/IIIa, głównego białka błonowego płytek krwi, którego interakcje z czynnikiem von Willebranda (vWF) i fibrynogenem mają krytyczne znaczenie dla prawidłowej adhezji i agregacji płytek krwi. Jednocześnie analizując materiał od pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek pokazaliśmy wysoki poziom karbamylocji białek płytek krwi w porównaniu do zdrowych osób. Nasze szczególne zainteresowanie wzbudził wysoki poziom modyfikacji receptora GpIIb/IIIa u dializowanych pacjentów silnie ograniczający zdolność płytek krwi do wiązania fibrynogenenu co jest kluczowym etapem tworzenia skrzepu.

Dlatego też ogólne cele projektu są następujące:

1. Zbadanie efektu karbamylocji na białka powierzchniowe płytek krwi, ze szczególnym uwzględnieniem receptora GpIIb/IIIa *in vitro* i w materiale klinicznym.
2. Charakteryzacja karbamylowanego vWF *in vitro* oraz w próbkach klinicznych od pacjentów z schyłkową niewydolnością nerek.
3. Charakteryzacja efektu karbamylocji na proteolizę vWF przez ADAMTS13, jak również struktury multimerów vWF w osoczu pacjentów.
4. Zbadanie wpływu karbamylocji vWF na interakcje z kolagenem, czynnikiem VIII i płytkami *in vitro*
5. Zbadanie potencjału ochronnego wolnych aminokwasów na wywołaną karbamylocją nieprawidłową kinetykę agregacji.

Nadrzędnym celem proponowanego projektu jest identyfikacja karbamylocji płytek krwi jako nowego biomarkera związanego z ryzykiem krwawień w przewlekłej chorobie nerek i charakterystyka mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za zaburzenia homeostazy w karbamylocji. To z kolei utworzy drogę do opracowania nowych strategii leczenia ukierunkowanych na poprawę pierwotnej hemostazy w przewlekłej chorobie nerek.