

Proteomiczna, metabolomiczna i lipidomiczna analiza krwi w poszukiwaniu mechanizmów progresji miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek

Mgr inż. Joanna Tracz

STRESZCZENIE

Przewlekła choroba nerek (*ang. chronic kidney disease, CKD*) charakteryzuje się długotrwałą, progresywną oraz nieodwracalną utratą funkcji nerek, która w ostatnim stadium wymaga leczenia nerkozastępczego. Zaburzenie powoduje gromadzenie w organizmie produktów ubocznych metabolizmu, co naraża pacjentów na rozwój wielu schorzeń towarzyszących. Jednym z nich jest bardzo szybko postępująca miażdżycy związana z CKD (*ang. chronic kidney disease-related atherosclerosis, CKD-A*) oraz jej konsekwencje w postaci choroby sercowo-naczyniowej (*ang. cardiovascular disease, CVD*) i jej powikłań, które są główną przyczyną śmierci wśród pacjentów z CKD. W kilku badaniach wykazano, że charakter zmian miażdżycowych, pojawiających się w dysfunkcyjnych naczyniach krwionośnych w CKD różni się od tych występujących w klasycznej CVD, sugerując zaangażowanie innych mechanizmów molekularnych w rozwój CKD-A. Jednak patomechanizm akceleracji CVD w CKD nie został do tej pory w pełni wyjaśniony.

Nadrzędnym celem badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej była próba pogłębienia wiedzy na temat procesów i szlaków zaangażowanych w rozwój CKD-A. Rozprawa doktorska ma formę spójnego tematycznie zbioru artykułów, składającego się z pracy przeglądowej oraz dwóch prac eksperymentalnych. W pracy przeglądowej omówiono wszechstronne zastosowanie różnych podejść „omicznych”, ze szczególnym uwzględnieniem proteomiki do badania CKD i potencjał wykorzystania biologii systemów oraz badań integracyjnych do analizy patomechanizmu, leżącego u podstaw progresji CKD-A. Następnie przeprowadzono kompleksową analizę proteomu frakcji leukocytów oraz metabolomiczną i lipidomiczną analizę osocza, z wykorzystaniem metod opartych na spektrometrii mas (MS). Materiał badawczy uzyskano od dwóch grup pacjentów z różnym stopniem zaawansowania CKD i tym samym z różną progresją miażdżycy oraz dwóch grup z klasyczną CVD, również różniących się pod względem zaawansowania miażdżycy, lecz bez objawów dysfunkcji nerek. Jako referencję wykorzystano materiał zebrany od zdrowych ochotników. Uzyskane wyniki zostały częściowo zweryfikowane na poziomie białek i mRNA z wykorzystaniem takich technik jak ELISA, western blot, ddPCR oraz celowanej analizy MS wykonanej w trybie MRM. Przeprowadzone analizy statystyczne i bioinformatyczne pozwoliły wskazać procesy oraz szlaki molekularne zaangażowane w rozwój i progresję CKD-A.

Zidentyfikowane zmiany akumulacji białek ujawniły zaburzenia mechanizmów zapalnych w CKD-A związane z procesem transmigracji komórek przez śródbłonek naczyń. Wykazano, że w CKD może dochodzić do nasilenia mobilizacji i adhezji leukocytów na powierzchni śródbłonka, lecz procesy odpowiedzialne za reorganizację cytoszkieletu i polaryzację komórki, niezbędne do ukończenia procesu migracji, są najprawdopodobniej zahamowane. W tej sytuacji może dochodzić do agregacji komórek na powierzchni śródbłonka, lokalnego stanu zapalnego i dysfunkcji śródbłonka, promujących procesy aterogenne. W konsekwencji obserwujemy nasilenie programowanej śmierci komórek silnie skorelowane ze zmianami na poziomie molekul adhezyjnych.

W pracy, po raz pierwszy scharakteryzowano również unikalny profil lipidomiczny pacjentów z miażdżycą niezwiązaną i związaną z CKD, wskazując na obniżony poziom akumulacji sfingomielin, cholesterolu i jego estrów, fosfatydylocholin, ceramidów i fosfatydyloetanolamin w CKD w porównaniu do CVD. Wykazano również podwyższony poziom akumulacji triacylogliceroli w CKD, jednak szczegółowa analiza związków będących substratami dla tych lipidów, jak również LDL i HDL, pokazała, że w tym przypadku dużo większą rolę mogą odgrywać zaburzenia w procesie syntezy bądź degradacji tych cząsteczek, a nie ich ogólnego poziomu, co może mieć wpływ na ich aterogenne i anty-aterogenne właściwości. Przeprowadzone analizy korelacyjne sugerują, że unikalny profil lipidowy może być związany z nasileniem stanu zapalnego, towarzyszącego dysfunkcji nerek.

Podsumowując, zidentyfikowano wiele zmian na poziomie białek, lipidów i niskocząsteczkowych metabolitów, które wskazują między innymi na zaburzenia mechanizmów zapalnych, w szczególności systemicznego stanu zapalnego, migracji, apoptozy i procesu koagulacji, a co za tym idzie homeostazy śródbłonna i leukocytów w CKD-A. Bezpośrednie porównanie akumulacji molekuł u pacjentów z klasyczną CVD oraz CKD przybliżyło nas do zrozumienia mechanizmu molekularnego przyspieszonego rozwoju CKD-A. Zaprezentowane wyniki wspierają postulowaną teorię „odwróconej epidemiologii” w CKD, a przyszłe badania powinny skupić się między innymi na mechanistycznych badaniach procesu diapedezy poszczególnych subpopulacji leukocytów w CKD.