

1. Cel projektu.

Częstość występowania krwotoku podpajęczynówkowego z pękniętego tętniaka (aSAH) została oszacowana na 6,67: 100 000. Każdego roku, na aSAH zapada około pół miliona osób. Około 15% z nich umiera przed dotarciem do szpitala, 25% w ciągu 24 godzin a 45% w ciągu 30 dni. Głównym czynnikiem przyczyniającym się do śmierci i niepełnosprawności osób, które przeżyły aSAH jest Późne Niedokrwienie Mózgu (DCI). Mechanizmy DCI są słabo poznane, brak jest skutecznej terapii farmakologicznej. Niestety, większość leków eksperymentalnych nie poprawia znacząco wyników leczenia pacjentów z aSAH. Jedynie doustna nimodipina wykazuje efekty; nie przeciwdziała DCI, ale poprawia wyniki neurologiczne. Dlatego w celu odkrycia nowych celów terapeutycznych konieczne jest nowe podejście do badania patofizjologii DCI na poziomie molekularnym i komórkowym. Jak już wiadomo, obecność wynaczynionej hemoglobiny w przestrzeni podpajęczynówkowej indukuje uwalnianie reaktywnych form tlenu (ROS), powodując peroksydację lipidów błonowych komórek śródbłonna i proliferację komórek mięśni gładkich. W ośrodkowym układzie nerwowym rolę ochronną przed szkodliwym działaniem ROS odgrywają enzymy: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), układ glutationowy (w tym peroksydaza glutationowa (GPx) i reduktaza (GR) oraz układ tioredoksyny (w tym peroksydaza tioredoksyny (TPx) i reduktaza (TR)) wszystkie one potrzebują fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH), którego głównym źródłem jest dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD). Po aSAH aktywność tych enzymów spada, maleje również ich stężenie, zaburzając dynamiczną równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną na korzyść produkcji ROS. Ponadto wtórne przekąźniki komórkowe (miRNA) mogą również odgrywać ważną rolę w tym procesie; Homeostaza tętnic i ich reaktywność regulowana jest także przez swoje miRNA, których ekspresja może korelować z ryzykiem DCI. Stawiamy hipotezę, że ryzyko DCI zależy od aktywności i stężenia SOD, GPx, GR, TPx, TR, G6PD, stężenia nukleotydu NADPH i ekspresji miRNA regulującego enzymy przeciwutleniające i homeostazę naczyniową.

2. Badania podstawowe realizowane w projekcie.

Analizowana grupa będzie składać się z około 132 pacjentów z aSAH i 44 ochotników (pacjenci z zespołami cieśni nerwów obwodowych). Od każdego pacjenta zostaną pobrane seryjne próbki krwi.

Aby zidentyfikować metabolity związane z DCI, u 704 pacjentów zostanie zastosowana chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Pozwoli to na identyfikację związanych z DCI różnic w metabolitach związanych ze stresem oksydacyjnym i mechanizmami antyoksydacyjnymi.

Za pomocą testu ELISA (test immunoenzymatyczny) wykonamy analizę stężeń i aktywności enzymów mechanizmów przeciwutleniających, a mianowicie: SOD, GPx, GR, TPx, TR, G6PD i stężenia nukleotydu NADPH u wszystkich pacjentów z aSAH. Analiza zostanie przeprowadzona za pomocą testu ELISA na 132 próbkach osocza w 5 punktach czasowych i próbkach kontrolnych. Zostaną ustalone statystycznie istotne różnice między grupami (z DCI i bez). Na tym etapie ustalimy, który enzym przeciwutleniający działa niewłaściwie u pacjentów z DCI.

Następnie zostanie przeprowadzona analiza miRNA. Wykonamy profilowanie prawie wszystkich mikroRNA wykrywalnych w ludzkim osoczu, w próbkach 20 pacjentów po aSAH (10 z DCI i 10 bez; w 2 punktach czasowych). Te miRNA, które zostaną ocenione jako statystycznie istotne dla DCI, zostaną walidowane na całej grupie chorych - składającej się ze 132 pacjentów po aSAH i w grupie kontrolnej. W rezultacie potwierdzimy czy ekspresja miRNA jest zmieniona przez DCI i czy miRNA, które różnicują pacjentów według wystąpienia DCI, są również wrażliwe na operację (tj. czy ich ekspresja zmienia się w odpowiedzi na leczenie chirurgiczne). Następnie ustalimy, czy ustalony profil miRNA może być wykorzystany jako marker monitorujący pacjentów z DCI. Mamy nadzieję, że te badania przybliżą nas do zrozumienia patofizjologii DCI.

3. Uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej.

DCI po krwotoku podpajęczynówkowym stwarza zagrożenie dla chorego. Ubytkowe objawy neurologiczne będące rezultatem DCI mogą doprowadzić do zgonu spowodowanego niedokrwieniem mózgu i jego następstwami. Ponieważ niewiele wiadomo na temat patofizjologii DCI, brak jest odpowiedniego leczenia. Choroba ta pozostaje wyzwaniem zarówno dla lekarzy, jak i biologów molekularnych. Głównym celem tego projektu jest odpowiedź na pytanie o istniejącą korelację pomiędzy metabolomiką, mechanizmami przeciwutleniającymi, ekspresją miRNA a patogenezą DCI. W perspektywie, projekt ten może dostarczyć klinicznie użytecznych informacji, które pomogą w prognozowaniu indywidualnego ryzyka wystąpienia DCI i jego monitorowania. Oczekujemy, że nasze wyniki będą mogły być wykorzystane w planowaniu nowych terapii lekowych, zapobiegających wystąpieniu DCI.