

## Streszczenie pracy doktorskiej lek. Agata Hanna Bryk

Promotor: prof. dr hab. Anetta Undas

Temat pracy doktorskiej: „*Novel factors modifying properties of fibrin and efficiency of fibrinolysis in patients with type 2 diabetes mellitus*”

(„*Nowe czynniki modyfikujące właściwości fibryny i sprawność fibrynolizy u pacjentów z cukrzycą typu 2*”) – cykl publikacji

Cukrzyca typu 2 cechuje się nieprawidłowym fenotypem skrzepu fibrynowego, charakteryzującym się szybszym tworzeniem gęstszych sieci fibryny o mniejszej podatności na lizę (hipofibrynolizą) w porównaniu do pacjentów bez cukrzycy. Mechanizmy tej zależności nie są w pełni poznane.

Celem mojej rozprawy doktorskiej było zidentyfikowanie nowych czynników modyfikujących właściwości fibryny i sprawność fibrynolizy u pacjentów z cukrzycą typu 2.

Przeprowadzono trzy badania przekrojowe, jedno badanie obserwacyjne oraz jedno badanie in vitro. Oznaczono m.in. hemoglobinę glikowaną, parametry hemostazy, aktywacji płytek, generację trombiny oraz przepuszczalność skrzepu fibrynowego. Sprawność fibrynolizy oceniono trzema metodami, według Lisman i wsp. (2001), Carter i wsp. (2007) oraz Pieters i wsp. (2018).

Pierwszym badanym czynnikiem była oksydacja białek osocza. Oznaczono trzy markery: całkowitą karbonylację osocza, stężenie substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym oraz całkowitą zdolność antyoksydacyjną osocza. Wykazano, iż całkowita karbonylacja osocza zależy od wartości hemoglobiny glikowanej, czasu od rozpoznania cukrzycy, a także od współistniejącej choroby sercowo-naczyniowej. Całkowita karbonylacja osocza korelowała dodatnio z czasem lizy skrzepu ocenionym według Lisman i wsp., oraz ujemnie z przepuszczalnością skrzepu. Podwyższona całkowita karbonylacja osocza (w górnym kwartylu) wykazała wysoką moc dyskryminacyjną dla identyfikacji pacjentów z wydłużonym czasem lizy skrzepu.

Drugim badanym czynnikiem były NETs, tj. zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilowe. Oznaczono cztery markery NETs w osoczu: dwa jądrowe, takie jak cytrulinowany histon H3 i pozakomórkowy DNA, oraz dwa komórkowe, takie jak mieloperoksydaza i elastaza neutrofilowa. Wykazano, iż stężenie markerów jądrowych zależało od stężeń glukozy, hemoglobiny glikowanej oraz interleukiny 6. Stężenie pozakomórkowego DNA korelowało dodatnio z pikiem trombiny. Zarówno stężenie cytrulinowanego histonu H3, jak i pozakomórkowego DNA odpowiadały za istotny odsetek zmienności czasu lizy i przepuszczalności skrzepu. Także stężenie mieloperoksydazy korelowało dodatnio z czasem lizy skrzepu. Pozostałymi predyktorami czasu lizy skrzepu były: stężenie inhibitora aktywatora

plazminogenu 1 i współistniejąca choroba sercowo-naczyniowa, a także czas od rozpoznania cukrzycy.

Trzecim badanym czynnikiem była inkorporacja  $\alpha 2$ -antyplazminy do skrzepu. Wykazano, iż wydłużenie czasu lizy skrzepu u kobiet z cukrzycą w stosunku do mężczyzn z cukrzycą, jest związane z nasiloną inkorporacją  $\alpha 2$ -antyplazminy do skrzepu. Opracowano model opisujący zależność pomiędzy czasem lizy skrzepu ocenionym metodą Carter i wsp. a stopniem inkorporacji  $\alpha 2$ -antyplazminy do skrzepu, stężeniem inhibitora aktywatora plazminogenu 1, stężeniem fibrynogenu, płcią oraz wskaźnikiem masy ciała. Wyższa inkorporacja  $\alpha 2$ -antyplazminy do skrzepu (w górnym kwartylu) była związana z wyższym pikiem trombiny i endogennym potencjałem trombogennym.

W kolejnym etapie, metodą spektrometrii masowej zbadano modyfikacje post-translacyjne fibrynogenu w skrzepach osoczowych pacjentów z cukrzycą typu 2, przed i po wdrożeniu leczenia kwasem acetylosalicylowym w dawce 75 mg raz dziennie. Przyjmowanie kwasu acetylosalicylowego potwierdzono supresją stężenia tromboksanu B2. Zidentyfikowano po 10 miejsc glikacji na łańcuchach  $\alpha$  i  $\beta$  fibrynogenu, oraz 6 na łańcuchu  $\gamma$  fibrynogenu. Glikacji podlegały lizyny, o których wiadomo z poprzednich badań, iż są istotne dla interakcji z czynnikiem XIII ( $\alpha K$ -208,  $\alpha K$ -448 and  $\alpha K$ -539) i działania plazminy ( $\alpha K$ -81). Wykazano 7 miejsc acetylacji. Trzy miejsca acetylacji były tożsame z miejscami glikacji ( $\alpha K$ -195,  $\beta$ -247,  $\beta K$ -353). Leczenie kwasem acetylosalicylowym nie miało wpływu na intensywność acetylacji, jak również czas lizy skrzepu badany metodą Pieters i wsp.

Ostatnimi badanymi czynnikiem były modyfikacje post-translacyjne  $\alpha 2$ -antyplazminy glikowanej i acetylowanej *in vitro*. Zidentyfikowano 11 miejsc glikacji i 10 miejsc acetylacji. Inkubacja  $\alpha 2$ -antyplazminy z glukozą była związana z glikacją 4 (K-418, K-427, K-434 i K-441) z 6 reszt lizyny, o których wiadomo, że są ważne dla oddziaływania z plazminą. Miejsca glikacji były tożsame z miejscami acetylacji w 9 przypadkach. Inkubacja  $\alpha 2$ -antyplazminy z glukozą i kwasem acetylosalicylowym była związana z obniżoną acetylacją tych miejsc w porównaniu do inkubacji z samym kwasem acetylosalicylowym. Na lizynach 182 i 448 obniżonej acetylacji towarzyszyła wyższa intensywność glikacji, co wskazuje na możliwą konkurencję procesów glikacji i acetylacji w odniesieniu do tych dwóch miejsc modyfikacji.

Podsumowując, nowe zidentyfikowane czynniki, które wpływały na właściwości skrzepu fibryny i lizę, obejmowały: zwiększoną oksydację białek, nasiloną generację zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych oraz wzmożoną inkorporację  $\alpha 2$ -antyplazminy do skrzepu. Zidentyfikowano modyfikacje post-translacyjne fibrynogenu i  $\alpha 2$ -antyplazminy.

## Summary

Type 2 diabetes mellitus is associated with an unfavorable fibrin clot phenotype, characterized by a faster formation of more compact fibrin networks, which are less susceptible to lysis (hypofibrinolysis) when compared with patients without diabetes. The mechanisms involved are only partially understood.

My dissertation aimed to identify novel factors modifying properties of fibrin and efficiency of fibrinolysis in patients with type 2 diabetes mellitus.

There were three cross-sectional studies, one observational study and one in vitro study. The glycated hemoglobin, hemostasis parameters, platelet activation markers, thrombin generation along with fibrin clot permeability, were investigated. Fibrinolysis efficiency was assessed using three methods, by Lisman et al. (2001), Carter et al. (2007) and Pieters et al. (2018).

The first investigated factor was plasma protein oxidation. Three markers were assessed: total plasma carbonylation, concentration of thiobarbituric acid reactive substances and total antioxidant capacity. The total protein carbonylation was shown to associate with the glycated hemoglobin, time since diabetes diagnosis and concomitant cardiovascular disease. Total plasma carbonylation correlated positively with clot lysis time assessed according to Lisman et al., and negatively with clot permeability. Increased total plasma carbonylation (in top quartile) showed high discriminatory power in identifying patients with prolonged clot lysis time.

The second investigated factor was NETs, i.e. neutrophil extracellular traps. Four markers of NETs were assessed: two nuclear markers, such as citrullinated histone H3 and cell-free DNA, and two cellular markers, such as myeloperoxidase and neutrophil elastase. The concentration of nuclear markers was shown to associate with glucose concentration, glycated hemoglobin and interleukin 6. The concentration of cell-free DNA was positively correlated with peak thrombin. Both citrullinated histone H3 and cell-free DNA significantly contributed to the variance of clot lysis time and clot permeability. Moreover, myeloperoxidase concentration positively correlated with clot lysis time. The other predictors of clot lysis time were: plasminogen activator inhibitor 1 concentration and concomitant cardiovascular disease, as well as time since diabetes diagnosis.

The third investigated factor was  $\alpha$ 2-antiplasmin incorporation into the clot. The prolonged clot lysis time in women with diabetes when compared to men with diabetes was shown to associate with enhanced  $\alpha$ 2-antiplasmin incorporation into the clot. A model was developed to describe the relationship between the clot lysis time assessed according to Carter et al. and the extent

of  $\alpha$ 2-antiplasmin incorporation into the clot, plasminogen activator inhibitor 1 concentration, fibrinogen concentration, sex and body-mass index. Increased  $\alpha$ 2-antiplasmin incorporation into the clot (top quartile) was associated with higher peak thrombin and endogenous thrombin potential.

In the next step, the post-translational modifications of fibrinogen were investigated with mass-spectrometry in plasma fibrin clots of diabetic patients before and after introducing the treatment with acetylsalicylic acid at the dose of 75 mg once daily. The administration of acetylsalicylic acid was confirmed by suppressed level of thromboxane B2. There were 10 glycation sites identified in  $\alpha$  and  $\beta$  fibrinogen chains, and 6 in  $\gamma$  fibrinogen chain. The lysine residues found to be glycated, were previously reported to be involved in cross-linking by factor XIII ( $\alpha$ K-208,  $\alpha$ K-448 and  $\alpha$ K-539) and plasmin cleavage ( $\alpha$ K-81). There were 7 acetylation sites. Three acetylation sites were identical with FL sites ( $\alpha$ K-195,  $\beta$ -247,  $\beta$ K-353). Treatment with acetylsalicylic acid did not affect intensity of acetylation, as well as clot lysis time assessed according to Pieters et al.

The last investigated factors were post-translational modifications of  $\alpha$ 2-antiplasmin glycated and acetylated in vitro. There were 11 glycation sites and 10 acetylation sites. Incubation of  $\alpha$ 2-antiplasmin with glucose was associated with glycation of 4 (K-418, K-427, K-434 and K-441) out of 6 lysine residues, known to be important for mediating the interaction with plasmin. Glycation and acetylation overlapped at 9 sites. Incubation of  $\alpha$ 2-antiplasmin with glucose and acetylsalicylic acid was associated with the decreased acetylation at all these sites when compared with incubation with only acetylsalicylic acid. At lysine residues 182 and 448, decreased acetylation was associated with increased glycation intensity suggesting the possible competition between glycation and acetylation processes in relation to these two modification sites.

In summary, novel identified factors that affected fibrin clot properties and lysis involved: increased protein oxidation, enhanced generation of neutrophil extracellular traps and larger incorporation of  $\alpha$ 2-antiplasmin into the clot. The post-translational modifications of fibrinogen and  $\alpha$ 2-antiplasmin were identified.