

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
Chemijos ir geomokslų fakultetas



Biochemijos studijų programos magistrantas

Artūras KAČIULIS

*Baigiamasis magistro darbas*

**Naujų molekulinę sepsio terapijos taikinių paieška sepsiu sergančių pacientų kraujo plazmoje**

Darbo vadovas:  
dr. Kęstutis Stašaitis

Vilnius 2017

# Naujų molekulinų sepsio terapijos taikinių paieška sepsiu sergančių pacientų kraujo plazmoje

## SANTRAUKA

Sepsis – viena mirtingiausių ligų, kasmet nusinešanti daugiau nei 40 procentų ja susirgusių žmonių gyvybių. Pastaraisiais metais pasirodant vis daugiau duomenų apie nuo II pasaulinio karo laikų praktiškai nepakitusios sepsio gydymo strategijos neefektyvumą, tampa akivaizdu, kad būtina ieškoti naujų terapijos taikinių ir būdų šiai klastingai ligai gydyti. Vienas iš pagrindinių mirties nuo sepsio mechanizmų yra susijęs su jo sąlygojama endotelinio barjero disfunkcija. Šio mokslinio darbo metu mėginome įvertinti vieno iš galimų tokių endotelio pažeidimų sukėlėjų – baltymo HMGB1 kiekį sepsiu sergančių pacientų kraujo plazmoje bei jo poveikį kraujagyslių endotelio ląstelėms. Imunofermeninės analizės metodais buvo sukonstruota sistema kiekybinei HMGB1 detekcijai kraujo plazmoje. Tyrimo rezultatai atskleidė, kad sepsio metu ( $n=98$ ) HMGB1 koncentracija kelis šimtus kartų viršija jo koncentraciją sveikų asmenų ( $n=30$ ) kraujyje ( $384,26 \pm 122,28$  ng/ml lyginant su  $2,7 \pm 1,4$  ng/ml;  $p=0,007$ ), taip pat minėto baltymo koncentracija statistiškai patikimai skiriasi sepsi išgyvenančių ir nuo jo mirstančių pacientų kraujyje ( $256,17 \pm 72,74$  ng/ml, lyginant su  $427,33 \pm 68,92$  ng/ml;  $p=0,04$ ) bei tarp tų pacientų, kuriems sepsio pasekoje išsivystė dauginis organų disfunkcijos sindromas (DODS), ir tų, kuriems šis sindromas diagnozuotas nebuvo ( $560 \pm 65,68$  ng/ml, lyginant su  $324,6 \pm 104,12$ ;  $p=0,02$ ). Todėl HMGB1 baltymas galėtų būti laikomas vienu iš biožymenų, leidžiančių įtartį sepsi, jo sunkumą bei letalios baigties tikimybę. HMGB1 citotoksiškumo tyrimai, atlikti inkubuojant sepsiu sergančių pacientų kraujo plazmą su HUVEC endotelio ląstelių linija ir ląstelių žūti vertinant pagal LDH sukeltus kalorimetrinius pokyčius atskleidė citotoksinį šio baltymo poveikį endoteliui (150 ng/ml, 12 h,  $18,4 \pm 6,2$  %; 200 ng/ml 12 h,  $31,7 \pm 3,9$  %; 400 ng/ml, 12 h,  $54,1 \pm 11,3$  %). Analogiški eksperimentai su išgrynintu rekombinantiniu HMGB1 taip pat rodė jo panašų citotoksinį poveikį, kuris statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo rezultatų, gautų inkubuojant HUVEC su atitinkamais HMGB1 kiekiais kraujo plazmos mišinyje ( $p=0,06$ ). Ateityje planuojama atlikti daugiau eksperimentų, kurie atsakytų į klausimą, ar HMGB1 pats, nedalyvaujant kitiems molekuliniais veiksniais, sukelia endotelio pažeidimą ir dėl to galėtų tapti galimu taikiniu sepsio terapijai.

# **Research of novel therapeutic targets for sepsis in plasma from septic patients**

## **SUMMARY**

Sepsis is one of the deadliest known diseases all over the world with the case fatality rate exceeding 40 %. In recent years there has been growing evidence, that current strategies of sepsis therapy, which in fact did not undergo any significant changes since the World War II, are not efficient enough. This makes it clear that there is a huge need for novel targets of therapy to be found. One of the major mechanisms for sepsis caused death is highly related to endothelial barrier disruption and increased permeability that is very common during sepsis. We have tried to investigate the amount of high mobility group box 1 protein (HMGB1), as a possible target for sepsis therapy, in plasma from septic patients (n=98) as well as its effect on endothelial cells. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) based system for quantitative detection of HMGB1 was created. It was shown that during sepsis HMGB1 concentration increases hundred of times in comparison to healthy (n=30) individuals (384,26±122,28 ng/ml and 2,7±1,4 ng/ml respectively; p=0,007). It was also shown that there is a statistically significant difference between HMGB1 concentrations in plasma from sepsis survivors in comparison to lethal cases of sepsis (256,17±72,74 ng/ml and 427,33±68,92 ng/ml respectively; p=0,04), as well as between those who developed multiple organ dysfunction syndrome (MODS) and those who did not (560±65,68 ng/ml in comparison to 324,6±104,12 respectively; p=0,02). It suggests that HMGB1 might be used as sepsis biomarker with ability to distinguish both between septic and non-septic individuals and between those septic patients who are at a high risk of MODS and death and those who are not. Another part of this project was based on the investigation of HMGB1 cytotoxicity on HUVEC primary endothelial cells. While using calorimetric LDH assay, it was shown that HMGB1 in septic plasma is cytotoxic to the endothelium (150 ng/ml, 12 h, 18,4±6,2 %; 200 ng/ml 12 h, 31,7±3,9 %; 400 ng/ml, 12 h, 54,1±11,3 %). The same experiments were repeated with respective concentrations of recombinant HMGB1. Although it was shown that recombinant HMGB1 also has a similar cytotoxic effect on HUVEC, statistical analysis did not show any significant differences from septic plasma mixture with respective amount of HMGB1 (p=0,06). Further experiments need to be done in the future in order to find out if HMGB1 alone is responsible for endothelial barrier disruption during sepsis and might become a novel target for sepsis therapy.