

ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT - REZUMAT

Proteina Gla matriceală (MGP) în patologia vasculară și osteoarticulară

Doctorand **Ciprian Nicolae Silaghi**

Conducător de doctorat Prof. Dr. **Victor Cristea**

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Introducere	19
2. Calcificarea ectopică	20
2.1. Tipuri și caracteristici ale calcificărilor ectopice: corespondența cu osteogeneza	20
2.2. Mecanisme ale calcificărilor vasculare și cartilajinoase	22
3. Fundamente moleculare cu privire la MGP	28
3.1. Vitamina K și Gla proteinele	28
3.2. Caracterizare structurală și localizarea MGP	29
3.3. Modificări posttranslaționale și factori reglatori ai exprimării și activității MGP	31
3.4. Caracterizare funcțională a MGP	34
4. Metode de determinare ale MGP și implicațiile clinice	36
4.1. Generalități	36
4.2. Evaluarea locală a MGP în patologia osteoarticulară și vasculară	37
4.3. Metodele de determinare ale MGP circulant și implicațiile clinice	39
5. Concluzii	43
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	47
2. Studiul 1. Niveluri sinoviale și serice ale ucMGP la pacienții cu gonartroză	49
2.1. Introducere	49
2.2. Obiective	49
2.3. Material și metodă	50
2.4. Rezultate	51
2.5. Discuții	53
3. Studiul 2. Intervale de referință și variații ale nivelurilor circulatorii de tMGP în patologia vasculară și osteoarticulară	55
3.1. Introducere	55
3.2. Obiective	56
3.3. Material și metodă	56
3.4. Rezultate	59
3.5. Discuții	64
4. Studiul 3. Variațiile circulatorii ale tMGP, metaloproteinazei-9 și nitrotirozinei la pacienții cu vene varicoase	69
4.1. Introducere	69
4.2. Obiective	70
4.3. Material și metodă	70
4.4. Rezultate	72
4.5. Discuții	75
5. Studiul 4. Nivelurile serice ale tMGP: un instrument potențial de identificare a stenozei carotidiene minore calcificate la populația cu risc cardiovascular	79
5.1. Introducere	79
5.2. Obiective	80
5.3. Material și metodă	80
5.4. Rezultate	83
5.5. Discuții	89
6. Concluzii generale	93
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	95
REFERINȚE	97

Cuvinte cheie: proteina Gla matriceală, calcificări osteoarticulare, inflamație, interval de referință, vene varicoase, calcificări vasculare, stenoză carotidiană.

INTRODUCERE

Calcificarea fiziologică apare la nivelul oaselor și cartilajului de creștere epifizar, în timp ce calcificarea ectopică este întâlnită la nivelul vasele de sânge, cartilajelor și tesuturilor moi. Calcificarea ectopică a fost subiectul a numeroase studii în ultimii ani, dar factorii de risc și evenimentele care declanșează această afecțiune sunt încă echivoce. În prezent este recunoscut faptul că suprimarea inhibitorilor calcificării reprezintă un mecanism important al declanșării calcificării vasculare sau osteoarticulare.

Un factor cheie îl reprezintă proteina Gla matriceală (MGP), un inhibitor al calcificării ectopice locale dependent de vitamina K, secretat în principal de către celulele musculare netede vasculare și condrocite. În funcție de modificările posttranslaționale la care este supusă (carboxilare și fosforilare), MGP poate exista în diferite conformații: carboxilată (cMGP), fosforilată (pMGP), defosforilată (dpMGP), decarboxilată (ucMGP) sau combinații ale acestora. Studii multiple au confirmat că aceste conformații serice evaluează diferite aspecte ale calcificărilor ectopice: dpMGP reprezintă un factor predictiv al stress-ului local pentru celulele musculare netede vasculare, iar dp-ucMGP un marker al statusului vitaminei K. Cea mai studiată conformație a fost ucMGP, care s-a dovedit a fi neinfluențată de statusul sistemic al vitaminei K, fiind totodată considerată un marker al calcificărilor vasculare prevalente. Cu toate acestea, determinarea ucMGP din lichidele de puncție sau compararea nivelelor locale și circulatorii nu au fost studiate până în prezent.

De asemenea, o cercetare limitată a fost publicată despre MGP totală (tMGP), desemnată astfel datorită faptului că nu diferențiază între conformațiile MGP. Nu a fost publicat nici un studiu privind evaluarea tMGP în patologia vasculară și osteoarticulară. Mai mult decât atât, deși tMGP este disponibilă ca test imunoenzimatic, toate celelalte conformații nu sunt încă accesibile comercial.

Teza cuprinde două părți principale: stadiului actual al cunoașterii cu privire la implicarea MGP în calcificarea ectopică și o secțiune subsecventă de cercetare personală care include patru studii. În cadrul acestora, consimțământul informat a fost obținut de la toți participanții. Conceptul studiilor a respectat declarația de la Helsinki, fiind aprobate de Comisia de etică a universității.

A priori cercetărilor, am adresat câteva întrebări la care ne-am propus să răspundem. Ar putea MGP din lichidul sinovial (LS) al pacienților cu artroză să fie determinat în conformația ucMGP? Există o relație între MGP și inflamație? Ar putea tMGP seric să discrimineze între populația sănătoasă și pacienții cu afecțiuni vasculare (AV) sau afecțiuni osteoarticulare (AO)? Există o similitudine a dinamicii circulatorii între tMGP și ucMGP la subiecții sănătoși? Care ar fi contribuția MGP de proveniență venoasă la totalul circulant al MGP? Ar putea exista o relație între MGP, stress-ul oxidativ și remodelarea matricei extracelulare la pacienții cu vene varicoase (VV)? Poate tMGP să diferențieze între prezența sau absența calcificărilor carotidiene la populația cu risc cardiovascular? Chiar dacă rezultatele preliminare au fost promițătoare, studii clinice ulterioare vor fi necesare pentru a implementa tMGP ca marker valid al calcificărilor vasculare și osteoarticulare.

CERCETARE PERSONALĂ

Studiul 1. Niveluri sinoviale și serice ale ucMGP la pacienții cu gonartroză

Obiective. Am emis ipoteza conform căreia MGP poate fi determinat din LS în conformația ucMGP. Obiectivele studiului au fost stabilirea valorilor sinoviale al ucMGP și investigarea unei potențiale relații între nivelul local și circulant de ucMGP, precum și asocierea acestor niveluri cu vârsta și inflamația la pacienții cu gonartroză.

Material și metodă. Am efectuat un studiu de tip caz-control la pacienți cu gonartroză și efuziune articulară (n=26), care au fost comparați cu un grup de control format din 30 de voluntari aparent sănătoși. Toți participanții au beneficiat de examinare ultrasonografică a genunchiului pentru evaluarea calcificărilor articulare. Pe baza semnelor clinice, a simptomelor de inflamație articulară și a valorilor vitezei de sedimentare a hematiilor (VSH), pacienții au fost împărțiți într-un grup inflamator și un grup non-inflamator. Concentrația ucMGP a fost determinată din ser și LS cu ajutorul unui test competitiv de imunoabsorbție enzimatică (ELISA) (VitaK BV, Maastricht, Olanda) pe un cititor de microplăci (Biorad 550, Hercules, California).

Rezultate. În cadrul pacienților cu gonartroză a existat o corelație pozitivă între nivelul seric și sinovial al ucMGP ($r=0,42$, $p<0,05$), nivelul seric fiind semnificativ mai mare decât cel sinovial [3157(1820-4729) nM versus 884(100-2058) nM; $p<0,001$]. Nivelurile locale și circulante de ucMGP nu s-au corelat cu vârsta și nu s-a constatat nicio diferență între sexe. Deși la grupul inflamator nivelul sinovial al ucMGP a fost mai crescut decât la grup non-inflamator [1388(480-2058) nM versus 808(100-1902) nM], iar nivelul seric de ucMGP a avut o tendință inversă, diferențele nu au atins semnificația statistică. S-a calculat RucMGP (raportul între ucMGP sinovial și seric) și s-a identificat o corelație pozitivă între RucMGP și VSH ($r=0,4$; $p<0,05$), precum și un RucMGP semnificativ mai mare în grupul inflamator comparativ cu grupul non-inflamator [36(17-69) față de 24(5-55); $p<0,05$]. Mai mult decât atât, pacienții care prezentau calcificări articulare au avut cele mai crescute niveluri serice de ucMGP [3609(2064-4472) nM], dar și cele mai scăzute niveluri sinoviale de ucMGP [786(100-1147) nM], precum și cel mai mic RucMGP [21(10-30)].

Concluzii. Studiul a stabilit că determinarea ucMGP a fost utilă pentru cuantificarea MGP din LS. Rezultatele au demonstrat faptul că evaluarea combinată a ucMGP din ser și LS (definit ca RucMGP) ar putea servi ca marker inflamator articular la pacienții cu gonartroză.

Studiul 2. Intervale de referință și variații ale nivelurilor circulatorii de tMGP în patologia vasculară și osteoarticulară

Obiective. Scopul principal a fost compararea nivelurilor serice de tMGP la populația sănătoasă versus pacienții cu AV și AO. Ca obiective secundare ne-am propus să stabilim intervalele de referință ale tMGP circulant, să evaluăm relația dintre tMGP și diferiți factori de risc cardiovascular (i.e., vârsta, fumatul, indicele de masă corporală și inflamația) și să comparăm nivelurile serice ale tMGP și ucMGP în populația sănătoasă.

Material și metodă. Am realizat un studiu tip caz-control, în care am înscris un grup de subiecți sănătoși (n=114) și un grup de pacienți (n=95). Grupul de pacienți a fost constituit din persoane diagnosticate cu AV [i.e., boală arterială coronariană (BAC) (n=26), accident vascular cerebral (AVC) (n=6), hipertensiune arterială (HTA) (n=30), diabet zaharat (DZ) (n=10)] și AO [i.e., osteopenie și osteoporoză (OP) (n=13) și artrită reumatoidă (AR) (n=10)]. Densitatea minerală osoasă (DMO) a fost evaluată la pacienți în zona șoldului prin absorbtimetrie cu fascicul dual de raze X (Lunar Prodigy Advance, GE Lunar, Madison, WI, Statele Unite ale Americii). Determinarea imunoturbidimetrică a fost utilizată pentru evaluarea serică a proteinei C-reactive înalt sensibile (hs-CRP) (kit CRP U-hs, Diasys Diagnostic System, Holzheim, Germania) pe un analizor CS-T240 (Dirui, Changchun, China). Pentru evaluarea nivelului seric de tMGP am folosit un kit ELISA (USCN Life Science Inc, Wuhan, China) și un cititor de plăci Organon 230S (Organon Teknika, Oss, Olanda). De asemenea, am determinat ucMGP seric la 47 de subiecți sănătoși selectați aleatoriu, utilizând un test competitiv ELISA (VitaK BV, Maastricht, Olanda) și un cititor de plăci Biorad 550, Hercules, California. Studiul a fost parțial finanțat prin grantul CNC SIS PN 42 - 107/2008.

Rezultate. Am stabilit intervalul de referință pentru tMGP în populația sănătoasă ca fiind 57 ± 26 $\mu\text{g/L}$. Nu s-a constatat nicio corelație semnificativă între nivelul seric al tMGP (72 ± 32 $\mu\text{g/L}$) și ucMGP (3455 ± 685 nM) la subiecții sănătoși. Populația sănătoasă sub 40 de ani a avut un nivel crescut de tMGP

circulant ($p = 0,03$) și un nivel semnificativ mai scăzut de hs-CRP ($p < 0,001$) decât subiecții peste 40 de ani. Un trend descendent al nivelurilor serice de tMGP a fost observat cu înaintarea în vârstă, dar pragul de semnificație statistică nu a fost atins. De asemenea, niveluri crescute ale tMGP au fost identificate la fumători comparativ cu subiecții nefumători ($69 \pm 27 \mu\text{g/L}$ versus $52 \pm 24 \mu\text{g/L}$, $p = 0,001$). La efectuarea unei regresii liniare multivariate cu tMGP desemnat ca variabilă dependentă și hs-CRP, vârsta și fumatul ca variabile independente, doar asocierea dintre tMGP și fumat s-a păstrat ($\beta = 15,1$; 95% CI 4.4-25.9; $r^2 = 0,264$; $p = 0,006$). Am găsit o corelație negativă între tMGP și hs-CRP ($r = -0.212$, $p = 0,023$) în populația sănătoasă. Dimpotrivă, la grupul de pacienți ($n = 95$), nivelurile serice de tMGP s-au corelat pozitiv cu hs-CRP ($r = 0,225$, $p = 0,03$). S-a observat că nivelurile serice de tMGP au fost semnificativ mai mici la subiecții sănătoși peste 40 de ani, comparativ cu pacienții AV ($p < 0,001$) sau AO ($p < 0,001$). De asemenea, tMGP a fost mai crescut la pacienții cu AV decât la pacienții cu AO ($p < 0,05$). Mai mult decât atât, în cadrul subgrupurilor de pacienți cu AV sau AO, am observat niveluri mai ridicate de tMGP la pacienții cu BAC ($p < 0,001$), AVC ($p = 0,001$), HTA ($p < 0,001$), DZ ($p < 0,001$) și AR ($p < 0,001$), comparativ cu subiecții sănătoși peste 40 de ani.

Concluzii. Acesta a fost primul studiu care a stabilit intervalul de referință pentru tMGP și faptul că nu există nicio corelație între tMGP și ucMGP în populația sănătoasă. De asemenea, tMGP circulant crește la fumătorii aparent sănătoși și crește odată cu inflamația la pacienții cu AV și AO. Nivelurile de tMGP au fost semnificativ mai mici la populația sănătoasă față de pacienții cu AV sau AO. În consecință, tMGP ar putea fi utilizat ca instrument de screening simplu și disponibil pentru identificarea acestor pacienți.

Studiul 3. Variațiile circulatorii ale tMGP, metaloproteinazei-9 și nitrotirozinei la pacienții cu vene varicoase

Obiective. Obiectivul principal a fost evaluarea interacțiunii dintre nivelurile circulante ale tMGP, metaloproteinazei-9 [(MMP-9), marker al remodelării matricei extracelulare] și nitrotirozinei [(NT), marker pentru stress-ul oxidativ] la pacienții cu VV. De asemenea, am dorit să investigăm comportamentul acestor parametri plasmatici înainte și după un eveniment traumatizant (îndepărtarea chirurgicală a VV) și să aflăm dacă există o contribuție a MGP provenit de la nivelul venelor superficiale ale membrului inferior la totalul circulant al MGP.

Material și metodă. Studiul de tip caz-control a fost realizat pe pacienți cu VV ($n = 29$) și un grup de voluntari aparent sănătoși ($n = 29$), potriviți ca vârstă și sex, fără antecedente de boală varicoasă, DZ sau BAC. Concentrațiile plasmatiche ale tMGP, MMP-9 și NT au fost determinate pe un cititor de plăci Organon 230S (Organon Teknika, Oss, Olanda), utilizând kituri ELISA de tip sandwich: USCN Life Science Inc, Wuhan, China pentru tMGP; IBL International GMBH, Hamburg, Germania pentru MMP-9 și, respectiv, Abnova, Jhongli, Taiwan pentru NT.

Rezultate. Diferențele dintre pacienții cu VV și subiecții sănătoși s-au reflectat doar prin nivelul ridicat al MMP-9 ($84 \pm 42 \text{ ng/mL}$ versus $49 \pm 34 \text{ ng/mL}$, $p = 0,001$), pe când nivelurile circulante ale tMGP și NT nu au atins semnificația statistică. La compararea pacienților înainte și după intervenția chirurgicală, doar nivelurile de tMGP au fost semnificativ scăzute ($62 \pm 18 \mu\text{g/L}$ față de $47 \pm 21 \mu\text{g/L}$, $p < 0,05$). Astfel, tMGP circulant a scăzut cu 15% după intervenția chirurgicală. Am constatat, de asemenea, o asociere independentă între tMGP și MMP-9 la pacienții cu VV, care s-a păstrat chiar și după ajustarea cu vârsta, sexul și indicele de masă corporală ($r = 0,37$, $p < 0,01$). Nu s-a identificat nicio corelație între NT și tMGP sau MMP-9 și nu s-au găsit diferențe semnificative statistic ale concentrațiilor plasmatiche de NT în niciunul dintre grupurile comparate.

Concluzii. Nivelurile plasmatiche crescute de MMP-9 ar putea diferenția subiecții sănătoși de pacienții cu VV. După îndepărtarea chirurgicală a VV, stress-ul oxidativ reflectat de NT plasmatic nu a influențat nivelurile circulante de tMGP și MMP-9. Prin urmare, scăderea nivelului plasmatic de tMGP

după îndepărtarea VV poate fi constitutivă, reprezentând contribuția MGP de la nivelul venelor superficiale ale membrului inferior la totalul circulant al MGP.

Studiul 4. Nivelurile serice ale tMGP: un instrument potențial de identificare a stenozei carotidiene minore calcificate la populația cu risc cardiovascular

Obiective. Studiul a avut ca scop investigarea relației dintre nivelul seric al tMGP și stenoza carotidiană minoră (SCmin) cu depozite calcificate la femeile aflate la menopauză. Am evaluat interacțiunea la nivel circulant dintre tMGP, inflamație (utilizând hs-CRP ca marker) și ateroscleroza [utilizând grosimea intimă-medie a carotidei (GIMC) ca marker imagistic], pornind de la premisa că nivelurile serice de tMGP se vor asocia independent cu GIMC și hs-CRP. De asemenea, am vrut să investigăm influența DMO asupra nivelurilor serice de tMGP. Obiectivul principal a fost de a stabili dacă tMGP circulant poate diferenția între prezența și absența SCmin cu depozite calcificate la o populație cu risc cardiovascular relativ omogenă.

Material și metodă. Am efectuat un studiu transversal prin înrolarea consecutivă a 72 de femei caucaziene aflate la menopauză. Dintre acestea, 39 au fost fără SCmin și fără calcificări carotidiene (grupul non-SCmin), iar 33 au prezentat SCmin cu cel puțin un depozit calcificat la nivel carotidian (grupul minCAS). Toți participanții au beneficiat de examinare ultrasonografică carotidiană (înregistrate a imaginii în mod B, utilizând Aloka Prosound alfa 10, Tokyo, Japonia) și de evaluare a DMO (folosind absorbtometrie duală cu raze X - Lunar Prodigy Advance, GE lunar, Madison, WI, Statele Unite ale Americii). Nivelul seric de hs-CRP a fost evaluat prin imunoturbidimetrie (kit CRP U-hs, Diasys Diagnostic System, Holzheim, Germania) pe analizorul CS-T240, Dirui, Changchun, China. Cu ajutorul unui kit ELISA de tip sandwich (USCN Life Science Inc, Wuhan, China) am determinat tMGP seric, utilizând cititorul de plăci Organon Reader 230S (Organon Teknika, Oss, Olanda). Studiul a fost susținut prin grantul CNCSIS PN 42 - 107/2008.

Rezultate. Comparativ cu grupul non-SCmin, în grupul SCmin am găsit valori semnificativ crescute ale tMGP (104 ± 30 versus 80 ± 28 $\mu\text{g/L}$, $p < 0,05$), hs-CRP ($6,80 \pm 3,83$ versus $5,04 \pm 2,93$ mg/L , $p < 0,05$) și GIMC medie ($1,11 \pm 0,18$ versus $0,82 \pm 0,18$ mm , $p < 0,001$). Nivelurile serice de tMGP nu a fost influențate de valorile reduse ale DMO la femeile aflate la menopauza ($p = 0,48$). La pacienții cu SCmin s-a evidențiat o asociere independentă între tMGP și GIMC medie ($\beta = -611,3$; 95% CI $-1,172,6$ -- $-49,9$; $r^2 = 0,137$, $p = 0,034$) și, respectiv, între tMGP și hs-CRP ($\beta = 2,6$; 95% CI $0,007$ - $5,3$; $r^2 = 0,119$, $p = 0,049$). În urma efectuării regresiei liniare multivariate cu tMGP desemnat ca variabilă dependentă, iar GIMC medie și hs-CRP ca variabile independente, doar asocierea dintre tMGP și GIMC medie s-a păstrat ($\beta = -568,9$; 95% CI $-1,108,1$ -- $-29,8$; $r^2 = 0,117$, $p = 0,039$). La analiza a trei subgrupuri constituite în funcție de prezența HTA sau DZ tip 2, doar tMGP ($p < 0,05$) și GIMT medie ($p < 0,001$) au fost semnificativ crescute în subgrupul SCmin cu HTA sau DZ tip 2 și subgrupul SCmin cu ambele boli, în comparație cu subgrupul non-SCmin cu HTA sau DZ tip 2. Prin trasarea curbei ROC (Receiver operating characteristic) am stabilit o valoare prag optimă de $87,9$ $\mu\text{g/L}$ pentru tMGP seric (aria de sub curba ROC $= 0,72 \pm 0,06$; 95% CI $0,60$ - $0,84$, $p = 0,001$), care poate discrimina între pacienții cu minCAS și non-minCAS cu o sensibilitate de 73% și specificitate de 64%.

Concluzii. Femeile cu SCmin aflate la menopauză au avut un nivel semnificativ crescut de tMGP seric comparativ cu grupul non-SCmin. Deși tMGP s-a asociat independent cu GIMC și hs-CRP, relația cu GIMC a fost mai puternică. În consecință, nivelurile serice crescute de tMGP sunt prezise în mod independent de scăderea GIMC. Am stabilit un prag seric pentru tMGP care poate identifica prezența SCmin calcificate la femeile aflate la menopauză. Dacă rezultatele noastre sunt validate de studii ulterioare, tMGP circulant poate fi utilizat ca marker pentru identificarea stenozei carotidiene calcificate în populația cu risc cardiovascular.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Continua dispută în evaluarea non-invazivă a calcificărilor ectopice o reprezintă implementarea unui marker circulant valid. În acest sens, cele patru studii ale tezei au adresat două teme originale: determinarea locală a ucMGP și validarea clinică a tMGP ca marker circulant al calcificării în patologia vasculară și osteoarticulară.

Una dintre cele mai importante contribuții a fost evaluarea pentru prima dată a ucMGP local din LS al pacienților cu gonartroză. Rezultatele au arătat că determinarea combinată a ucMGP din ser și LS ar putea servi ca marker inflamator articular la acești pacienți.

De asemenea, a fost stabilit intervalul de referință a tMGP în populația sănătoasă, evaluându-se în paralel asocierea cu factorii de risc cardiovascular la pacienții stratificați pe diverse patologii vasculare sau osteoarticulare.

În ceea ce privește patologia venoasă, am constatat că MGP de la nivelul venelor superficiale ale membrului inferior are o contribuție la totalul circulant al MGP. De asemenea, studiul a demonstrat interacțiunea dintre comportamentul circulant al tMGP, MMP-9 (ca marker al remodelării matricei extracelulare) și NT (marker pentru stress-ul oxidativ).

Ca punct final, am stabilit un prag seric pentru tMGP care va ajuta la identificarea prezenței SCmin calcificate la femeile aflate la menopauză. În consecință, tMGP seric poate fi recomandat ca marker al SCmin calcificate în populația cu risc cardiovascular.

Luată împreună, rezultatele oferă noi perspective asupra fiziopatologiei calcificării ectopice din prisma ucMGP local și tMGP circulant. Deși în ultimele trei studii am utilizat un kit ELISA comercial pentru determinarea tMGP, recomandăm prudență în interpretarea rezultatelor. Utilizarea clinică este justificată doar prin investigații suplimentare care vor fi preocuparea noastră centrală în viitorul apropiat. Astfel, nivelurile serice de tMGP ar putea fi folosite ca un instrument simplu și disponibil pentru screening-ul calcificărilor ectopice.

Teza aduce date obiective cu privire la comportamentul MGP ca inhibitor al calcificărilor în patologia vasculară și osteoarticulară. Ne-am atins obiectivele propuse și considerăm că studiile efectuate au avut un aport important la elucidarea anumitor aspecte privind calcificarea ectopică în context clinic.

“IULIU HAȚIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY CLUJ-NAPOCA

PHD SCHOOL

Ph.D. THESIS - ABSTRACT

The matrix Gla protein in vascular and osteoarticular pathologies

PhD Candidate **Ciprian Nicolae Silaghi**, MD

Scientific Coordinator Professor **Victor Cristea**, MD, PhD

CLUJ-NAPOCA 2014



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Introduction	19
2. Ectopic calcification	20
2.1. Types and characteristics of ectopic calcifications: correspondence with osteogenesis	20
2.2. Mechanisms of vascular and cartilaginous calcifications	22
3. Molecular fundamentals of MGP	28
3.1. Vitamin K and Gla proteins	28
3.2. Structural characterization and location of MGP	29
3.3. Post-translational modifications and regulatory factors of MGP expression and activity	31
3.4. Functional characterization of MGP	34
4. MGP assays and clinical aspects	36
4.1. Generalities	36
4.2. Local assessment of MGP in osteoarticular and vascular pathologies	37
4.3. Assays for circulating MGP and clinical implications	39
5. Conclusions	43
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Work hypothesis/objectives	47
2. Study 1. Synovial and serum levels of ucMGP in patients with arthritis	49
2.1. Introduction	49
2.2. Objectives	49
2.3. Material and method	50
2.4. Results	51
2.5. Discussion	53
3. Study 2. Reference intervals and variations of circulating tMGP in vascular and osteoarticular pathology	55
3.1. Introduction	55
3.2. Objectives	56
3.3. Material and method	56
3.4. Results	59
3.5. Discussion	64
4. Study 3. The behavior of circulating tMGP, matrix metalloproteinase-9 and nitrotyrosine in patients with varicose veins	69
4.1. Introduction	69
4.2. Objectives	70
4.3. Material and method	70
4.4. Results	72
4.5. Discussion	75
5. Study 4. Circulating tMGP: a potential tool to identify minor carotid stenosis with calcification in population with cardiovascular risk	79
5.1. Introduction	79
5.2. Objectives	80
5.3. Material and method	80
5.4. Results	83
5.5. Discussion	89
6. General conclusions	93
7. Originality and innovative contributions of the thesis	95
REFERENCES	97

Key words: matrix Gla protein, osteoarticular calcifications, inflammation, reference interval, varicose veins, vascular calcification, carotid stenosis.

INTRODUCTION

Physiological calcification occurs in bones and epiphyseal cartilages during growth, while ectopic calcification can be found in blood vessels, cartilages and soft tissues. Ectopic calcification has been the topic of several studies in recent years, but the risk factors and line of events that trigger this condition are still elusive. Nowadays, it is recognized that a major mechanism by which vascular or osteoarticular calcification arises is the loss of calcification inhibitors.

One of the key proteins involved in local ectopic calcification is the vitamin K-dependent matrix Gla protein (MGP), an extracellular calcification inhibitor, mainly secreted by vascular smooth muscle cells and chondrocytes. Depending on its two post-translational modifications (carboxylation and phosphorylation), circulating MGP can be found in different conformations: carboxylated (cMGP), phosphorylated (pMGP), desphosphorylated (dpMGP), uncarboxylated (ucMGP) or combinations thereof. A growing body of evidence has confirmed that circulating MGP conformations could evaluate different aspects of ectopic calcification: dpMGP could predict local stress of vascular smooth muscle cells and dp-ucMGP is as marker for vitamin K status. By far, the most studied conformation was ucMGP, proved to be uninfluenced by systemic vitamin K status and being considered a marker for prevalent vascular calcification. However, neither assessment of ucMGP in body fluids, nor comparisons of local with circulating ucMGP were studied before.

Only modest literature was published on total MGP (tMGP), designated this was due to its indiscriminating capacity between different MGP conformations. There is no study published to date concerning tMGP assessment in different vascular or osteoarticular pathologies. Moreover, while tMGP is accessible as an immunoassay kit, all other MGP conformations are not yet commercially available.

The thesis comprises two major parts: an overview of the current state of knowledge about MGP involvement in ectopic calcifications and a subsequent personal research section which includes four studies. Informed consent was obtained from all the participants. The study designs complied with the declaration of Helsinki and was approved by the local Medical Ethics Committee.

Several questions were raised before the researches to which we attempted to find answers. Could MGP from synovial fluid (SF) of arthritis patients be assessed with ucMGP assay? May be a relationship between MGP and inflammation? Could circulating tMGP discriminate between healthy population and patients with vascular disease (VD) or osteoarticular disease (OD)? Is there an association between the behavior of tMGP and ucMGP in healthy subjects? Does MGP originating from veins has a contribution to the total circulating MGP pool? Could be a relationship between MGP, oxidative stress and extracellular matrix remodeling in patients with varicose veins (VV)? Is there a possibility to use tMGP for distinguishing between the presence and absence of calcified carotid atherosclerosis in population with cardiovascular risk? Even if the preliminary results were promising, further clinical studies are needed to implement tMGP as a valid marker for vascular and osteoarticular calcifications.

PERSONAL RESEARCH

Study 1. Synovial and serum levels of ucMGP in patients with arthritis

Objectives. We hypothesized that MGP can be assayed as ucMGP in SF. Our objectives were to establish the synovial levels of ucMGP and to investigate the potential relationship between local and circulating ucMGP levels and their association with age and inflammation in patients with arthritis.

Material and method. We performed a case-control study in arthritis patients with knee joint effusion (n=26). We also recruited 30 apparently healthy volunteers, defined as control group. All the

participants underwent ultrasonographic knee examination for articular calcifications assessment. Patients were divided into inflammatory and non-inflammatory groups based on clinical signs and symptoms of joint inflammation and also erythrocyte sedimentation rate (ESR) values. The ucMGP levels were determined in serum and SF with a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (VitaK BV, Maastricht, Netherlands) on a microplate reader (Biorad 550, Hercules, California).

Results. Within the group of arthritis patients we found a positive correlation between serum and synovial levels of ucMGP ($r = 0.42$; $p < 0.05$), serum ucMGP levels being significantly higher than synovial levels [3157(1820-4729) nM versus 884(100-2058) nM; $p < 0.001$]. Local or circulating levels of ucMGP were not associated with age and also no differences between genders were found. Even if synovial ucMGP levels from the inflammatory group were higher than non-inflammatory group [1388(480-2058) nM versus 808(100-1902) nM] and serum ucMGP levels showed an inverse trend, statistical significance was not reached. We calculated RucMGP (ration between synovial and serum ucMGP) and we found a positive association between RucMGP and ESR ($r = 0.4$; $p < 0.05$), but also significantly higher RucMGP in the inflammatory versus non-inflammatory group [36(17-69) versus 24(5-55); $p < 0.05$]. Moreover, arthritis patients with articular calcification had the highest serum ucMGP levels [3609(2064-4472) nM], but the lowest RucMGP [21(10-30)] and synovial ucMGP levels [786(100-1147) nM].

Conclusions. Our study proved that ucMGP assay was useful for the quantification of MGP in SF. The results imply that combined assessment of ucMGP in serum and SF (as RucMGP) could potentially serve as a joint inflammatory marker in arthritis patients.

Study 2. Reference intervals and variations of circulating tMGP in vascular and osteoarticular pathology

Objectives. The main purpose was to establish if there is a difference in tMGP levels when comparing healthy population to patients with VD or OD. The secondary objectives were to establish the reference intervals for circulating tMGP, to assess the relationship between tMGP and different cardiovascular risk factors (i.e., age, smoking, body mass index and inflammation) and also to investigate if there is an association between the behavior of tMGP and ucMGP in healthy population.

Material and method. We carried out a case-control study, in which a group of healthy subjects ($n = 114$) and a group of patients ($n = 95$) were enrolled. The patient group consisted of individuals diagnosed with VD [i.e., coronary artery disease (CAD) ($n = 26$), stroke ($n = 6$), hypertension (HT) ($n = 30$) or diabetes mellitus (DM) ($n = 10$)] and OD [i.e., osteopenia and osteoporosis (OP) ($n = 13$) or rheumatoid arthritis (RA) ($n = 10$)]. Bone mineral density (BMD) was assessed in patients in the hip area by dual-energy X-ray absorptiometry (Lunar Prodigy Advance, GE Lunar, Madison, WI, USA). An immunoturbidimetric assay (CRP U-hs, Diasys Diagnostic System, Holzheim, Germany) was used for serum high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) evaluation on CS-T240 analyzer (Dirui, Changchun, China). For tMGP assessment we used an ELISA kit (USCN Life Science Inc., Wuhan, China) and a microtitre plate reader Organon 230S (Organon Teknika, Oss, the Netherlands). We have also measured ucMGP by competitive ELISA (VitaK BV, Maastricht, Netherlands) on a microtitre plate reader (Biorad 550, Hercules, California) in 47 randomly selected healthy subjects. The study was partially supported by the grant CNC SIS PN 42-107/2008.

Results. We established the reference range for tMGP in healthy population as 57 ± 26 $\mu\text{g/L}$. There was no significant correlation between tMGP (72 ± 32 $\mu\text{g/L}$) and ucMGP (3455 ± 685 nM) in healthy subjects. The healthy population under 40 years had higher levels of circulating tMGP ($p = 0.03$) and significantly lower levels of hs-CRP ($p < 0.001$) than subjects over 40 years. A descending trend was observed in serum tMGP levels with age, but statistical significance was not reached. Also, elevated tMGP levels were determined in smoking compared to non-smoking subjects (69 ± 27 $\mu\text{g/L}$ versus 52 ± 24 $\mu\text{g/L}$, $p = 0.001$). When we performed a multivariate linear regression analysis with tMGP pointed as dependent variable, and hs-CRP, age and smoking as independent variables, only the association

between tMGP and smoking was preserved ($\beta=15.1$; 95%CI 4.4-25.9; $r^2=0.264$; $p=0.006$). We also found a negative association between tMGP and hs-CRP ($r = -0.212$, $p=0.023$) in healthy population. On the contrary, in overall patients ($n=95$), tMGP levels were positively associated with hs-CRP ($r = 0.225$, $p = 0.03$). We found that serum tMGP levels were significantly lower in healthy subjects over 40 years compared to VD ($p<0.001$) or OD patients ($p<0.001$), but also tMGP was higher in VD than OD ($p<0.05$). Moreover, within VD and OD subgroups we observed higher levels of tMGP in patients with CAD ($p<0.001$), stroke ($p=0.001$), HT ($p<0.001$), DM ($p<0.001$) and RA ($p<0.001$) compared to healthy subjects over 40 years.

Conclusions. The study was first to established the reference range for tMGP in healthy population and there was no correlation between tMGP and ucMGP. Also circulating tMGP increases with smoking in apparently healthy population and with inflammation in vascular and osteoarticular pathology. Serum tMGP levels were significantly lower in healthy population than VD or OD patients, thus tMGP might be used as a simple and available screening tool to identify patients with VD and OD.

Study 3. The behavior of circulating tMGP, matrix metalloproteinase-9 and nitrotyrosine in patients with varicose veins

Objectives. The main objective was to assess the interplay between circulating tMGP, matrix metalloproteinase-9 [(MMP-9) as marker for extracellular matrix remodeling] and nitrotyrosine [(NT) as marker for oxidative stress] in patients with VV. Moreover, we wanted to investigate the behavior of these parameters before and after a stressful event (surgical removal of VV from inferior limbs) and to find out if there is a contribution of MGP originating from superficial veins of the inferior limb to the total pool of circulating MGP.

Material and method. The case-control study was accomplished on patients with VV ($n=29$) and a group of age-sex matched apparently healthy volunteers ($n = 29$) with no history of VV, DM or CAD. Plasma levels of tMGP, MMP-9 and NT were assessed on an Organon 230S reader (Organon Teknika, Oss, the Netherlands) using sandwich ELISA kits: USCN Life Science Inc., Wuhan, China for tMGP, IBL International GMBH, Hamburg, Germany for MMP-9 and Abnova, Jhongli, Taiwan for NT, respectively.

Results. Differences between patients with VV and age-sex matched healthy subjects were reflected only by higher levels of MMP-9 (84 ± 42 ng/mL versus 49 ± 34 ng/mL, $p=0.001$) and not by circulating tMGP or NT levels. When patients before removal of VV were compared to patients after surgery, only tMGP was found significantly decreased (62 ± 18 μ g/L versus 47 ± 21 μ g/L, $p<0.05$). Thereby, circulating tMGP levels decreased with 15% after surgery. We also found an independent association between tMGP and MMP-9 in patients with VV, which was preserved even after the adjustment with age, gender and BMI ($r = 0.37$, $p< 0.01$). We did not find any correlation of NT with tMGP or MMP-9 and no significant differences in plasma NT levels in any pairwise comparisons.

Conclusions. Higher circulating levels of MMP-9 could differentiate between healthy individuals and patients with VV. Consequently, oxidative stress assessed by NT did not affect circulating levels of tMGP or MMP-9 after surgical removal of VV. The constitutive decrease in plasma level of tMGP could be considered the contribution of MGP from superficial veins of the inferior limb to the total pool of circulating MGP.

Study 4. Circulating tMGP: a potential tool to identify minor carotid stenosis with calcification in population with cardiovascular risk

Objectives. The study aimed to investigate the relationship between serum tMGP and minor carotid stenosis (minCAS) with calcification in postmenopausal women. We examined the interplay between serum tMGP, inflammation (using hs-CRP as circulating marker) and atherosclerosis [using carotid intima-media thickness (CIMT) as imagistic marker], presuming that serum tMGP levels would

be independently associated with CIMT and hs-CRP. We also wanted to investigate the potential confounding effect of low BMD on circulating tMGP. The main objective was to establish whether circulating tMGP could differentiate between the presence and absence of minCAS with calcification in a relatively homogenous population with cardiovascular risk.

Material and method. We conducted a cross-sectional study on 72 consecutive enrolled Caucasian postmenopausal women. Among them, 39 were without minCAS and free of carotid calcification (designated as the non-minCAS group) and 33 had minCAS with at least one calcified carotid deposit (designated as the minCAS group). All participants underwent carotid ultrasound examination (recorded by B-mode imaging - Aloka Prosound alpha 10, Tokyo, Japan) and BMD assessment (using dual-energy X-ray absorptiometry - Lunar Prodigy Advance, GE Lunar, Madison, WI, USA). Serum hs-CRP was assessed by an immunoturbidimetric assay (CRP U-hs, Diasys Diagnostic System, Holzheim, Germany) with an auto-chemistry analyzer (CS-T240, Dirui, Changchun, China). Serum tMGP was measured with a sandwich ELISA kit (USCN Life Science Inc., Wuhan, China) using Organon Reader 230S (Organon Teknika, Oss, the Netherlands). The study was supported by the grant CNCISIS PN 42-107/2008.

Results. We found significantly elevated serum tMGP (104 ± 30 versus 80 ± 28 $\mu\text{g/L}$, $p<0.05$), hs-CRP (6.80 ± 3.83 versus 5.04 ± 2.93 mg/L , $p<0.05$) and mean CIMT (1.11 ± 0.18 versus 0.82 ± 0.18 mm , $p<0.001$) values in minCAS compared to non-minCAS group. We confirmed that tMGP ($p=0.48$) was not influenced by low BMD in postmenopausal women. Circulating tMGP was independently associated with mean CIMT ($\beta=-611.3$; 95%CI -1172.6 – -49.9 ; $r^2=0.137$; $p=0.034$) and hs-CRP ($\beta=2.6$; 95%CI 0.007 – 5.3 ; $r^2=0.119$; $p=0.049$) in the minCAS group. We performed a multivariate linear regression analysis with tMGP pointed as dependent variable and both mean CIMT and hs-CRP as independent variables. Only the association between tMGP and mean CIMT was preserved ($\beta=-568.9$; 95%CI -1108.1 – -29.8 ; $r^2=0.117$; $p=0.039$). When we analyzed three subgroups designated by the presence of HT or type 2 diabetes mellitus (T2DM), only tMGP ($p<0.05$) and mean CIMT ($p<0.001$) were significantly elevated in the minCAS subgroup with HT or T2DM and in minCAS subgroup with both diseases, compared to the non-minCAS subgroup with HT or T2DM. Using a receiver operating characteristic (ROC) curve, we established an optimum threshold value of 87.9 $\mu\text{g/L}$ for serum tMGP (area under ROC= 0.72 ± 0.06 ; 95% CI 0.60 – 0.84 ; $p=0.001$) that may discriminate between minCAS and non-minCAS subjects with 73% sensitivity and 64% specificity.

Conclusions. Postmenopausal women with minCAS had significantly higher serum tMGP levels compared to non-minCAS group. Although tMGP was independently associated with both CIMT and hs-CRP, the relationship with CIMT is stronger, implying that higher serum tMGP levels are independently predicted by lower CIMT values. A serum tMGP threshold was established to help discriminate between the presence and absence of calcified minCAS in postmenopausal women. If our outcomes are further validated, circulating tMGP might be used as marker to identify calcified carotid stenosis in risk population.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

The great dispute in the non-invasive assessment of ectopic calcifications is to apply a valid circulating parameter as their marker. In this respect, the four studies of the thesis have addressed two original themes: local assessment of ucMGP and clinical validation of tMGP as circulating calcification marker in patients with vascular and osteoarticular pathologies.

One of the major contributions was the use of ucMGP assay for the first time to analyze MGP levels in SF of arthritis patients. The results implied that combined assessment of ucMGP in serum and SF of arthritis patients could potentially serve as a joint inflammatory marker.

The reference range for tMGP in healthy population was also first established, along with the parallel assessment of cardiovascular risk factors and stratification of patients by different vascular and osteoarticular pathologies.

In terms of vein pathology, we found that MGP originating from the superficial veins of the inferior limb have a contribution to the total pool of circulating MGP. Also, the study has established the interplay between the circulating behavior of tMGP, MMP-9 (a marker for remodeling of extracellular environment) and NT (a marker for oxidative stress).

As a final point, we have established a threshold for serum tMGP that will help discriminate between the presence and absence of calcified minCAS in postmenopausal women. Accordingly, serum tMGP may be recommended as a marker for calcified minCAS in risk population.

Taken together, our results provide additional insights into the physiopathology of ectopic calcification in terms of local ucMGP and circulating tMGP. Although a commercial ELISA kit for tMGP has been used in the last three studies, caution in interpretation of findings was recommended. The use in clinical purposes is warranted by further investigations which will be our central concern in near future. Thereby, serum tMGP levels might be used as a simple and available screening tool for ectopic calcifications.

The present thesis has brought objective data on the behavior of MGP as calcification inhibitor in vascular and osteoarticular pathology. We achieved our goals and we believe that our findings could be considered an important contribution to elucidate aspects of ectopic calcification in clinical context.